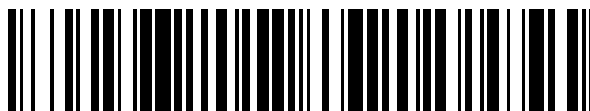


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 332**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2007 E 07733118 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2040728**

54 Título: **FKBP-L y usos del mismo como inhibidor de la angiogénesis**

30 Prioridad:

09.06.2006 GB 0611405

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2015

73 Titular/es:

**ALMAC DISCOVERY LIMITED (100.0%)
ALMAC HOUSE 20 SEAGOE INDUSTRIAL
ESTATE
CRAIGAVON BT63 5QD, GB**

72 Inventor/es:

**ROBSON, TRACY;
VALENTINE, ANDREA;
O'ROURKE, MARTIN y
HIRST, DAVID**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 548 332 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

FKBP-L y usos del mismo como inhibidor de la angiogénesis**5 Reivindicación de prioridad sobre solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente del reino Unido Núm. 0611405.2 de Robson et al., presentada el 9 de Junio de 2006.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos FKBP-L, péptidos FKBP-L, fragmentos y derivados de péptidos FKBP-L, y usos de los mismos.

15 Antecedentes de la invención

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente y puede ser controlada por medio de señalización intrínseca a través de factores solubles. Las patologías asociadas con la angiogénesis pueden incluir cáncer (Folkman J. (1971) N. Engl. J. Med. 285: 1182; Folkman J. (1999) Nature Med. 1: 27-31), arteriosclerosis (Lip, G.Y., Blann, A.D. (2004) Ann Med. 36(2) 119-125), psoriasis (Powell, J. (1999) Curr. Opin. Pediatr. 11:457-463), endometriosis (Olive, D.L., Lindheim, S.R., Pritts, E.A. (2004) Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 18(2) 319-328) y algunos trastornos oculares como la retinopatía diabética (Folkman J. (1999) Nature Med. 1:27-31). La angiogénesis también puede ser necesaria para la reparación de heridas ya que los nuevos vasos proporcionan nutrientes para apoyar a las células activas, promover la formación de tejido de granulación y facilitar el aclaramiento de desechos. Aproximadamente 60% de la masa de tejido de granulación puede estar compuesta por vasos sanguíneos que también suministran el oxígeno necesario para estimular la reparación y el crecimiento del vaso. Está bien documentado que los factores angiogénicos están presentes en el líquido de la herida y promueven la reparación mientras que los factores antiangiogénicos inhiben la reparación. En los tumores, cuando las células endoteliales están expuestas a factores solubles que estimulan la angiogénesis, pueden someterse a varios cambios fisiológicos, incluyendo un aumento masivo de la proliferación, la degradación y la invasión a través de la membrana basal del vaso existente, y la migración de distancia desde el vaso sanguíneo a una nueva ubicación. En la nueva ubicación las células endoteliales pueden proliferar de nuevo y formar túbulos capilares antes de la formación en última instancia de una vasculatura tumoral altamente desorganizada (Garcea G, Lloyd TD, Gescher A, Dennison AR, Steward WP, Berry DP. (2004) Eur J Cancer. Junio, 4099): 1302-13). Las células endoteliales activadas pueden mostrar un patrón distinto de expresión génica, lo que conduce a la modificación de las principales funciones celulares implicadas en la angiogénesis. Estas incluyen la regulación del equilibrio proteolítico que conduce a la degradación de la matriz pericelular localizada, la síntesis de moléculas de adherencia que participan en la interacción de la matriz extracelular, y lo más importante, la reorganización del citoesqueleto involucrado en la migración celular (Garcea G, Lloyd TD, Gescher A, Dennison AR, Steward WP, Berry DP. (2004) Eur J Cancer. Junio, 4099): 1302-13).

Se ha demostrado que los compuestos anti-angiogénicos novedosos inhiben una gama de marcadores endoteliales, que han sido identificados por estar regulados al alza en las células endoteliales activadas. Estos pueden incluir receptores, metaloproteínas de la matriz, y proteínas de adherencia. La tasa de éxito de estos inhibidores ha sido bastante alta. Recientemente el compuesto anti-angiogénico novedoso Avastin, un anticuerpo contra VEGF, ha pasado la aprobación por la FDA y la anti-angiogénesis ha sido reconocida ahora como la cuarta modalidad utilizada en el tratamiento del cáncer (Abdollahi A., Hlatky L., Huber P.E. (2005) Drug Resistance Updates, Febrero-Abril; 8:59-74). Estas terapias pueden tener las siguientes ventajas sobre los tratamientos quimioterapéuticos convencionales. En primer lugar, la angiogénesis es principalmente un mecanismo onco-fetal, por lo tanto se deben esperar efectos secundarios mínimos cuando se administra, incluso después de un tratamiento prolongado. En segundo lugar, la angiogénesis asociada al tumor es un mecanismo fisiológico del anfitrión y su inhibición farmacológica no debe, en consecuencia, conducir al desarrollo de resistencia. Finalmente la propia masa tumoral es un objetivo difícil, donde las células endoteliales que recubren la vasculatura de suministro se clasifican con frecuencia como vulnerables.

Los compuestos pro-angiogénicos pueden ser también terapéuticos. Por ejemplo, los compuestos pro-angiogénicos que pueden promover la reparación de heridas incluyen citoquinas angiogénicas, tales como FGF, VEGF, TGF-beta, angiopoyetina, y triptasa de mastocitos.

Un nuevo polipéptido y su gen han sido recientemente identificados y caracterizados parcialmente. Este nuevo polipéptido ha sido nombrado FKBP-L, DIR1 o WISP39. Se ha demostrado que este gen tiene un papel en las respuestas al estrés (Robson, T., Lohrer, H., Bailie, J.R., Hirst, D.G., Joiner, M.C., Arrand, J.E. (1997) Biochemical J. Transactions 25, 335-341). También se ha demostrado que la represión del gen de FKBP-L puede proteger contra el daño celular oxidativo inducido por rayos X y UV (Robson, T., Joiner, M.C., McCullough, W., Precio, M.E., McKeown, S.R., Hirst, D.G. (1999) Radiation Research 152, 451-461; Robson, T., Prize, M.E., Moore, M.L., Joiner, M.C.,

McKelvey-Martin, V.J., McKeown, S.R., Hirst, D.G., (2000) Int. J. Radiat). FKBP-L también puede estabilizar p21 recién sintetizado (un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina y un regulador crítico del ciclo celular) mediante la formación de un complejo trimérico con p21 y Hsp90 (Jascur, T. et al (2005) Molecular Cell, Vol. 17, 237- 249).

- 5 Existe una necesidad de proporcionar nuevos agentes terapéuticos que puedan inhibir la angiogénesis y la migración celular. Tales agentes terapéuticos pueden ser importantes como tratamientos independientes, o para ser utilizados junto con otros agentes terapéuticos.

Compendio de la invención

- 10 Las realizaciones de la presente invención se refieren al uso de polipéptidos FKBP-L para modular la angiogénesis y la migración celular. La presente invención se puede realizar en una variedad de maneras.

- 15 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se pueden utilizar FKBP-L y fragmentos del mismo para modular la angiogénesis. También, en algunas realizaciones, los polipéptidos FKBP-L se pueden utilizar para modular la migración celular y/o la metástasis de las células tumorales. La acción de FKBP-L puede estar mediada por CD44. Por lo tanto, el polipéptido FKBP-L puede, en ciertas realizaciones, ser utilizado para modular la angiogénesis, la migración celular y/o la metástasis de las células que expresan CD44.

- 20 De acuerdo con la invención, se proporciona un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica tal polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado para su uso como un inhibidor de la angiogénesis, o para su uso en el tratamiento de trastornos oculares mediados por angiogénesis, en donde el derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 70% a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 28.

Existen características adicionales de la invención que se describirán más adelante. La invención es susceptible de otras realizaciones y de ponerse en práctica o llevarse a cabo de varias maneras.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención puede entenderse mejor mediante la referencia a los siguientes dibujos.

- La FIG. 1, paneles AC, muestra secuencias de aminoácidos alternativas de FKBP-L completo, fragmentos de FKBP-L de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.
- 35 La FIG. 2, paneles A-E, muestra secuencias de polinucleótidos que codifican FKBP-L y algunos de sus mutantes por delección y variantes de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.
- La FIG. 3 muestra los efectos inhibidores del ADNc de FKBP-L transfectado transitoriamente (SEQ ID NO: 31) sobre el cierre de heridas en HMEC-1 de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La FIG. 4 ilustra un gráfico de dosis-respuesta del efecto de un polipéptido recombinante FKBP-L etiquetado con His (SEQ ID NO: 1) sobre la migración de HMEC-1 en un ensayo *in vitro* de cierre de heridas de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La FIG. 5 ilustra que un polipéptido FKBP-L completo etiquetado con Hemaglutinina (HA) es secretado activamente desde las células HMEC-1 de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La FIG. 6 ilustra el efecto inhibidor del polipéptido recombinante FKBP-L completo sobre el cierre de heridas en HMEC-1 a lo largo del tiempo de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 45 La FIG. 7 ilustra un gráfico de dosis-respuesta del efecto del polipéptido recombinante FKBP-L completo sobre la formación del tubo HMEC-1 en membrana basal en matriz de Matrigel de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La FIG. 8 ilustra el efecto de la proteína recombinante completa FKBP-L sobre la angiogénesis *in vivo* utilizando el ensayo de esponja en ratón, de acuerdo con una realización de la presente invención en la que el panel A muestra el tratamiento de las células con factor de crecimiento de fibroblastos bovino (bFGF) solo, el panel B muestra el tratamiento de células con bFGF con el polipéptido FKBP-L completo.
- La FIG. 9 muestra una reducción del número de vasos observada tras el tratamiento con bFGF y polipéptido FKBP-L recombinante completo (SEQ ID NO: 1) en comparación con bFGF solo de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.
- 50 La FIG. 10 ilustra una respuesta a la dosis del efecto del polipéptido recombinante FKBP-L completo sobre el modelo de angiogénesis en explante de anillo aórtico de rata *ex vivo* de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.
- La FIG. 11 muestra el efecto del polipéptido FKBP-L recombinante completo a un intervalo de concentraciones sobre la viabilidad o la proliferación de HMEC-1 en el análisis MTT después de 24 horas (Panel A) y 48 horas (Panel B) de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.
- 60 La FIG. 12 muestra cambios en la morfología del citoesqueleto de células endoteliales en migración sobre la exposición al polipéptido recombinante FKBP-L completo de acuerdo con una realización de la presente invención, donde los microtúbulos de HMEC-1 se tiñeron usando anti-tubulina.

La FIG. 13 muestra cambios en la morfología del citoesqueleto de células endoteliales en migración sobre la exposición al polipéptido recombinante FKBP-L completo de acuerdo con una realización de la presente invención, donde los filamentos intermedios de HMEC-1 fueron teñidos utilizando *anti-vimentina*.

La FIG. 14 ilustra el efecto del polipéptido recombinante completo FKBP-L sobre la migración de células tumorales PC3 (Panel A), MDA (Panel B) y HT29 (Panel C) de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 15 ilustra el efecto de la inyección intratumoral directa de un constructo de ADNc de FKBP-L sobre el crecimiento celular de xenoinjerto de tumor de próstata humano DU145 *in vivo* de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 16 muestra que la inhibición de la migración celular se correlaciona con la expresión de CD44 en HMEC-1 y las cinco líneas celulares de tumores DU145, PC3, HT29, MCF-7, MDA-231 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 17 muestra el efecto de FKBP-L recombinante completo sobre la migración de células tumorales DU145 (CD44 - ve) (Panel A), HT29 (CD44 + ve) (Panel B), PC3 (CD44 + ve) (Panel C), MDA (CD44 + ve) (Panel D), y MCF-7 (CD44 - ve), (Panel E) de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 18 muestra que la modificación genética para reducir la expresión de CD44 en células PC3 a través de un enfoque dirigido por ARNip inhibe la inhibición mediada por FKBP-L de la migración PC3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 19 muestra que FKBP-L puede interactuar con CD44 endógeno en monocapas de HMEC-1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 20 ilustra mutantes por delección de FKBP-L, donde los Paneles A y B ilustran los resultados de la secuenciación de varios de los mutantes por delección de FKBP-L, y el Panel C ilustra los efectos inhibidores de los mutantes por delección de FKBP-L transfectado transitoriamente sobre el cierre de heridas de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 21 muestra una evaluación de FKBP-L recombinante completo (SEQ ID NO: 1), péptidos FKBP-L 1-57 (1-57) candidato (SEQ ID NO: 6) y el FKBP-L de 24 unidades (oligómeros de 24 unidades) (SEQ ID NO: 10) que abarcan el dominio activo de FKBP-L, usando el análisis de raspado de una herida de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 22 muestra una evaluación de FKBP-L recombinante completo (SEQ ID NO: 1), péptidos FKBP-L 1-57 (1-57) candidato (SEQ ID NO: 6), y FKBP-L de 24 unidades (oligómeros de 24 unidades) (SEQ ID NO: 10) que abarcan el dominio activo de FKBP-L, sobre la formación de contactos endoteliales célula a célula usando la membrana basal sintética Matrigel en el análisis de formación de tubos de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 23 muestra el efecto del péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) (Panel A) y el péptido FKBP-L de 57 unidades (SEQ ID NO: 6) (Panel B) que abarcan el dominio activo de FKBP-L sobre la ramificación angiogénica utilizando el ensayo de anillo aórtico de rata de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 24, paneles A y B, muestra el efecto de péptidos candidato que abarcan el dominio activo de FKBP-L (es decir, el péptido FKBP-L de 24 unidades, SEQ ID NO: 10; el FKBP-L de 57 unidades, SEQ ID NO: 6; y FKBP-L etiquetado con His recombinante completo, SEQ ID NO: 1) sobre la longitud media, longitud máxima (long max), y el número de vasos (núm. de vasos) para la ramificación angiogénica utilizando el análisis de anillo aórtico de rata de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 25 muestra el efecto de FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) sobre la invasión de células endoteliales (HMEC-1) y tumorales (MDA231 y PC3) en un sistema de cámara de Boyden modificado de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 26 muestra el efecto de FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) sobre la adherencia de células endoteliales (HMEC-1) de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 27 muestra el efecto de FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) sobre la migración de células tumorales MDA-231 (Panel A) y PC3 (Panel B), de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 28 muestra que FKBP-L de 24 unidades es un inhibidor angiostático, donde el Panel A muestra el efecto de la adición de FKBP-L de 24 unidades el día 7, y el Panel B muestra un experimento en el que los anillos aórticos fueron expuestos inicialmente a FKBP-L de 24 unidades y a continuación se retiraron los oligómeros de 24 unidades, de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 29 ilustra que FKBP-L de 24 unidades inhibe la angiogénesis *in vivo* utilizando el análisis de esponja en ratón; se muestra el número de vasos observados tras el tratamiento con bFGF solamente en comparación con bFGF y polipéptido FKBP-L recombinante completo (rFKBP-L) (SEQ ID NO: 1), o bFGF combinado con polipéptido FKBP-L de 24 unidades (oligómero de 24 unidades) (SEQ ID NO: 10), de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 30 ilustra la inhibición de la migración de células endoteliales de ratón (2H-11) por el péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 31 muestra que el péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) inhibe el crecimiento del tumor DU145 *in vivo* después de la inyección IP diaria (Panel A); aumenta la supervivencia (Paneles B, C y D); y no es tóxico (Panel E), de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 32 muestra el efecto del péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) sobre la viabilidad o la proliferación de células HMEC-1 usando el análisis MTT de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 33 muestra el efecto de los péptidos candidato que abarcan dominio activo de FKBP-L sobre la viabilidad o la proliferación de células HMEC-1 tras la administración durante 24 horas (Panel A) o 48 horas (Panel B) usando el análisis MTT de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 34, paneles A-L, muestra la respuesta de diversas versiones modificadas/truncadas de FKBP-L de 24 unidades: un FKBP-L de 24 unidades modificado con PEG (Péptido 1), un FKBP-L de 24 unidades con un ácido piroglutámico N-terminal (Péptido 2), y formas truncadas del péptido FKBP-L de 24 unidades (Péptidos 3-12). Todo se compara con el péptido de 24 unidades en el análisis de raspado de heridas con HMEC-1 *in vitro* de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 35 muestra la purificación de FKBP-L recombinante de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención, donde el Panel A muestra un gel de SDS PAGE en condiciones reductoras que muestra la proteína FKBP-L recombinante purificada antes y después de la diálisis (calles 1 y 2, respectivamente); y el Panel B muestra una comparación de SDS PAGE de FKBP-L recombinante sometida a diálisis antes y después del tratamiento con DTT (calle 3 y 4). La calle 3 es una muestra no reducida, la calle 4 es una muestra reducida con DTT 50 mM. El Panel C muestra la purificación adicional de FKBP-L recombinante mediante filtración en gel. Los insertos muestran el análisis de PAGE nativa de ambos picos de la purificación por filtración en gel, junto con la proteína sometida a diálisis, con (+) y sin (-) DTT 100 mM.

La FIG. 36 muestra el análisis cromatográfico de penetración en gel de FKBP-L recombinante de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La FIG. 37 muestra el entrecruzamiento con glutaraldehído de FKBP-L recombinante en presencia (+) y ausencia (-) de DTT 100 mM de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención. La calle c es el control (sin DTT).

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto normal en la técnica. Los profesionales se remiten particularmente a Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel) para las definiciones y los términos de la técnica. Las abreviaturas para los residuos de aminoácido son los códigos convencionales de 3 letras y/o de 1 letra usados en la técnica para referirse a uno de los 20 L-aminoácidos comunes.

A pesar de que los intervalos y los parámetros numéricos que exponen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se refieren tan precisamente como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación típica encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. Además, se debe entender que todos los intervalos descritos en la presente memoria abarcan cualquiera y todos los subintervalos subsumidos en el mismo. Por ejemplo, se debe considerar que un intervalo establecido de "1 a 10" incluye cualquiera y todos los subintervalos entre (y incluido) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10; es decir, todos los subintervalos que comienzan con un valor mínimo de 1 o más, p. ej., 1 a 6,1, y terminan con un valor máximo de 10 o menos, por ejemplo, 5,5 a 10.

Se observa, adicionalmente, que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que se limite expresa e inequívocamente a un referente. El término "o" se utiliza indistintamente con el término "y/o" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, los términos "porción" y "fragmento" se utilizan indistintamente para referirse a partes de un polipéptido, ácido nucleico, u otro constructo molecular.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido FKBP-L biológicamente activo" (p. ej., fragmentos y/o polipéptidos modificados) se utiliza para referirse a un polipéptido que muestra una cantidad y un tipo de actividad iguales o similares a los del polipéptido FKBP-L completo. En este contexto "actividad biológica" de un polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado incluye una cualquiera de actividad anti-angiogénica, la inhibición del crecimiento y/o proliferación de células tumorales, inhibición de la migración y/o metástasis de células tumorales. La actividad biológica de los fragmentos o derivados de FKBP-L puede ser sometida a ensayo en comparación con la de FKBP-L completo usando cualquiera de los análisis *in vitro* o *in vivo* descritos en los ejemplos adjuntos, tales como, por ejemplo, el análisis de cierre de la herida o el análisis de raspado de la herida, el análisis de migración de células *in vitro*, el análisis con Matrigel (tm) para la adherencia célula-célula, el análisis de esponja en ratón, el análisis de explante de anillo aórtico, el análisis de proliferación de MTT, el análisis de formación de tubo de HMEC-1, análisis de crecimiento de células tumorales *in vivo*. En este sentido, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas en el polipéptido basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, carácter

hidrófobo, o carácter hidrófilo de los residuos, siempre que se conserve la especificidad de la actividad (es decir, la función).

5 Según se utiliza en la presente memoria un "sujeto" puede ser un animal. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero. Además, el sujeto puede ser un ser humano. En realizaciones alternativas, el sujeto puede ser un hombre o una mujer. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente, donde el paciente es un individuo que se encuentra bajo atención médica y/o búsqueda activa de atención médica para un trastorno o enfermedad.

10 "Polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para describir moléculas proteicas que pueden comprender proteínas parciales o completas. El término "péptido" se utiliza para indicar una proteína menor que una proteína completa o una proteína muy corta a menos que el contexto indique lo contrario.

15 Como es sabido en la técnica, "proteínas", "péptidos", "polipéptidos" y "oligopéptidos" son cadenas de aminoácidos (típicamente L-aminoácidos) cuyos carbonos alfa están unidos a través de enlaces peptídicos formados por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo grupo del carbono alfa de un aminoácido y el grupo amino del carbono alfa de otro aminoácido. Típicamente, los aminoácidos que constituyen una proteína están numerados en orden, comenzando en el residuo amino terminal y aumentando en dirección al residuo carboxi terminal de la proteína.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "aguas arriba" se refiere a un residuo que es N-terminal con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es una proteína, o 5' con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es un ácido nucleico. Asimismo, según se utiliza en la presente memoria, el término "aguas abajo" se refiere a un residuo que es C-terminal con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es una proteína, o 3' con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es un ácido nucleico.

25 Un "ácido nucleico" es un polinucleótido, tal como un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN). El término se usa para incluir ácidos nucleicos de hebra sencilla, ácidos nucleicos de doble hebra, y ARN y ADN elaborados a partir de nucleótidos o análogos de nucleósidos.

30 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se puede usar para transportar una segunda molécula de ácido nucleico a una célula. En una realización, el vector permite la replicación de secuencias de ADN insertadas en el vector. El vector puede comprender un promotor para aumentar la expresión de la molécula de ácido nucleico en al menos algunas células anfitrionas. Los vectores pueden replicar de forma autónoma (extracromosómica) o pueden ser integrados en un cromosoma de la célula anfitriona. En una realización, el vector puede comprender un vector de expresión capaz de producir una proteína derivada de al menos parte de una secuencia de ácido nucleico insertada en el vector.

40 Como es conocido en la técnica, se puede describir que las condiciones para la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos entre sí van desde baja hasta alta rigurosidad. Generalmente, las condiciones de hibridación altamente rigurosas se refieren a híbridos de lavado en tampón de baja salinidad a temperaturas elevadas. La hibridación puede ser para filtrar el ADN unido utilizando soluciones de hibridación convencionales en la técnica tales como NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, a 65°C, y lavado en NaHPO₄ 0,25 M, SDS al 3,5% seguido de lavado con 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a una temperatura que varía desde temperatura ambiente hasta 68°C dependiendo de la longitud de la sonda (véase p. ej., Ausubel, F.M. et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^a Ed., Capítulo 2, John Wiley & Sons, N.Y.). Por ejemplo, un lavado de alta rigurosidad comprende un lavado en 6X SSC/pirofosfato de sodio al 0,05% a 37°C para una sonda oligonucleotídica de 14 bases, o a 48°C para una sonda oligonucleotídica de 17 bases, o a 55°C para una sonda oligonucleotídica de 20 bases, o a 60°C para una sonda oligonucleotídica de 25 bases, o a 65°C para una sonda nucleotídica de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Las sondas de ácido nucleico se pueden marcar con radionucleótidos por marcaje terminal con, por ejemplo, [γ -³²P]ATP o mediante incorporación de nucleótidos radiomarcados tales como [α -³²P]dCTP mediante marcaje del cebador al azar. Alternativamente, las sondas se pueden marcar mediante la incorporación de nucleótidos marcados con biotina o fluoresceína, y la sonda se puede detectar utilizando estreptavidina o anticuerpos anti-fluoresceína.

55 Los términos "identidad" o "porcentaje de identidad" se refieren a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad se puede determinar alineando dos secuencias, y se refiere al número de residuos idénticos (es decir, aminoácido o nucleótido) en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. El alineamiento y la comparación de secuencias se pueden llevar a cabo utilizando los algoritmos convencionales en la técnica (p. ej. Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443; Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:2444) o versiones computarizadas de estos algoritmos (Wisconsin Genetics Software Package versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI) disponibles públicamente como BLAST y FASTA. También se puede utilizar ENTREZ, disponible a través del National Institute of Health, Bethesda MD, para la comparación de secuencias. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por

defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN, disponible en el sitio de Internet para el National Center for Biotechnology). En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias se puede determinar usando GCG con un peso de hueco de 1, de tal manera que cada hueco de aminoácido se pesa como si fuera una sola falta de coincidencia de aminoácidos entre las dos secuencias. O bien, se puede utilizar el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de soporte lógico de alineamiento de secuencias de GCG (Accelrys, San Diego, CA).

Las propiedades de unión de una proteína que comprende un receptor o un ligando se pueden expresar en términos de especificidad de unión, que puede ser determinada como una medida comparativa en relación con otras sustancias conocidas que se unen al receptor. Los análisis convencionales para la cuantificación de la unión y la determinación de la afinidad de unión son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, unión de equilibrio, filtración en gel, resonancia de plasmón superficial, el uso de compañeros de unión marcados, ELISA y análisis de unión indirectos (p. ej. análisis de inhibición competitiva). Por ejemplo, como es bien conocido en la técnica, la constante de disociación de una proteína se puede determinar poniendo en contacto la proteína con un compañero de unión y midiendo la concentración de proteína unida y libre como una función de su concentración.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "residuos conservados" se refiere a los aminoácidos que son iguales entre una pluralidad de proteínas que tienen la misma estructura y/o función. Una región de residuos conservados puede ser importante para la estructura o función de la proteína. Por lo tanto, los residuos contiguos conservados identificados en una proteína tridimensional pueden ser importantes para la estructura o función de la proteína. Para encontrar los residuos conservados, o las regiones conservadas de la estructura 3-D, se puede realizar una comparación de secuencias para las mismas o similares proteínas de diferentes especies, o de individuos de la misma especie.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "similar" o "homólogo" cuando se refiere a secuencias de aminoácidos o de nucleótidos significa un polipéptido que tiene un grado de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. Las comparaciones de homología se pueden realizar a ojo, o más normalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el porcentaje de homología entre dos o más secuencias (p. ej. Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:726-730). Por ejemplo, se pueden tomar secuencias homólogas para incluir secuencias de aminoácidos que en realizaciones alternativas son idénticas entre sí en al menos en 70%, idénticas en 75%, idénticas en 80%, idénticas en 85%, idénticas en 90%, idénticas en 95%, idénticas en 96%, idénticas en 97%, o idénticas en 98%.

Según se utiliza en la presente memoria, el término idéntica en al menos 90% a la misma incluye secuencias que oscilan entre 90 y 99,99% de identidad con las secuencias indicadas e incluye todas las gamas intermedias. Así, el término al menos idéntica en 90% a la misma incluye secuencias que son 91, 91,5, 92, 92,5, 93, 93,5, 94, 94,5, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,5 por ciento idénticas a la secuencia indicada. Del mismo modo el término "al menos idéntico en 70% incluye secuencias que oscilan desde idéntico en 70 a 99,99%, con todos los intervalos intermedios. La determinación del porcentaje de identidad se determina usando los algoritmos descritos en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, un "dominio" de polipéptido o proteína comprende una región a lo largo de un polipéptido o proteína que comprende una unidad independiente. Los dominios pueden ser definidos en términos de estructura, secuencia y/o actividad biológica. En una realización, un dominio polipeptídico puede comprender una región de una proteína que se pliega de una manera que es sustancialmente independiente del resto de la proteína. Los dominios pueden identificarse utilizando las bases de datos de dominios tales como, pero no limitadas a PFAM, PRODOM, PROSITE, BLOCKS, PRINTS, SBASE, PROFILES ISREC, SAMRT y PROCLASS.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "ligado" identifica un enlace covalente entre dos grupos diferentes (p. ej., secuencias de ácidos nucleicos, polipéptidos, dominios de polipéptidos) que pueden tener uno o varios átomos intermedios entre los dos grupos que están siendo enlazados. Según se utiliza en la presente memoria, "unido directamente" identifica un enlace covalente entre dos grupos diferentes (p. ej., secuencias de ácidos nucleicos, polipéptidos, dominios de polipéptidos) que no tiene ningún átomo intermedio entre los dos grupos que se están unidos.

Según se utiliza en la presente memoria, "dominio de unión al ligando" se refiere a un dominio de una proteína responsable de la unión a un ligando. El término dominio de unión a ligando incluye homólogos de un dominio de unión al ligando o partes de los mismos. En este sentido, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas en el sitio de unión al ligando basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, o carácter hidrófilo de los residuos, siempre que se conserve la especificidad de unión del dominio de unión al ligando.

Según se utiliza en la presente memoria, un "sitio de unión al ligando" comprende los residuos de una proteína que

- interaccionan directamente con un ligando, o los residuos implicados en la colocación del ligando en estrecha proximidad a aquellos residuos que interaccionan directamente con el ligando. La interacción de los residuos en el sitio de unión al ligando se puede definir por la proximidad espacial de los residuos a un ligando en el modelo o estructura. El término sitio de unión a ligando incluye homólogos de un sitio de unión al ligando, o porciones de los mismos. En este sentido, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas en el sitio de unión al ligando basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, o carácter hidrófilo de los residuos, siempre y cuando se conserve la especificidad de unión del sitio de unión al ligando. Un sitio de unión al ligando puede existir en uno o más dominios de unión a ligando de una proteína o polipéptido.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "interaccionan" se refiere a una condición de proximidad entre dos moléculas o partes de una sola molécula (p. ej., diferentes dominios de un péptido). La interacción puede ser no covalente, por ejemplo, como resultado de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, o interacciones electrostáticas o hidrófobas, o puede ser covalente.
- Según se utiliza en la presente memoria, un "ligando" se refiere a una molécula o compuesto o entidad que interacciona con un sitio de unión al ligando, incluyendo sustratos o análogos o partes de los mismos. Como se describe en la presente memoria, el término "ligando" puede referirse a compuestos que se unen a la proteína de interés. Un ligando puede ser un agonista, un antagonista, o un modulador. O, un ligando puede no tener un efecto biológico. O bien, un ligando puede bloquear la unión de otros ligandos inhibiendo de ese modo un efecto biológico. Los ligandos pueden incluir, pero no se limitan a, inhibidores de molécula pequeña. Estas moléculas pequeñas pueden incluir péptidos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos y similares. Los ligandos también pueden incluir polipéptidos y/o proteínas.
- Según se utiliza en la presente memoria, "modular" se refiere a cambiar o alterar la actividad biológica de una molécula de interés. Un compuesto "modulador" puede aumentar o disminuir la actividad, o cambiar las características físicas o químicas, o las propiedades funcionales o inmunológicas, de la molécula de interés. Un compuesto modulador de la presente invención puede incluir péptidos FKBP-L naturales y/o sintetizados químicamente o artificiales, miméticos de péptidos, péptidos modificados (p. ej., fosfopéptidos, péptidos cíclicos, péptidos que contienen aminoácidos D y no naturales, péptidos grapados, péptidos que contienen radiomarcas), o péptidos unidos a anticuerpos, carbohidratos, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, glicolípidos, compuestos heterocíclicos, nucleósidos o nucleótidos o partes de los mismos, y/o pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas (p. ej. péptidos modificados con PEG u otros grupos estabilizadores). Por lo tanto, los polipéptidos FKBP-L de la invención también incluyen péptidos o isómeros modificados químicamente y formas racémicas.
- Un "agonista" comprende un compuesto que se une a un receptor para formar un complejo que provoca una respuesta farmacológica específica al receptor implicado.
- Un "antagonista" comprende un compuesto que se une a un agonista o a un receptor para formar un complejo que no da lugar a una respuesta farmacológica sustancial y que puede inhibir la respuesta biológica inducida por un agonista.
- El término "peptidomiméticos" se refiere a estructuras que sirven como sustitutos para péptidos en interacciones entre moléculas (Morgan et al., 1989, Ann. Reports Med. Chem., 24:243-252). Los peptidomiméticos pueden incluir estructuras sintéticas que pueden o no pueden contener aminoácidos y/o enlaces peptídicos pero que conservan los rasgos estructurales y funcionales de un péptido, o agonista, o antagonista. Los peptidomiméticos también incluyen peptoides, oligopeptoides (Simon et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367); y bibliotecas de péptidos que contienen péptidos de una longitud diseñada que representan todas las secuencias posibles de aminoácidos que corresponden a un péptido, o agonista o antagonista de la invención.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "CE50" se define como la concentración de un agente que da como resultado 50% de un efecto biológico medido. Por ejemplo, la CE50 de un agente terapéutico que tiene un efecto biológico medible puede comprender el valor al cual el agente muestra 50% del efecto biológico.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "CI50" se define como la concentración de un agente que da como resultado 50% de inhibición de un efecto medido. Por ejemplo, la CI50 de un antagonista de la unión puede comprender el valor al cual el antagonista reduce la unión de un ligando a un sitio de unión a ligando en 50%.
- Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad eficaz" significa la cantidad de un agente que es eficaz para producir un efecto deseado en un sujeto. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta terapéutica de un animal o un ser humano que está siendo buscada. La dosis real que comprende la cantidad eficaz puede depender de la ruta de administración, del tamaño y la salud del sujeto, del trastorno que se está tratando, y similares.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" según se utiliza en la presente memoria puede referirse a

compuestos y composiciones que son adecuados para su uso en sujetos humanos o animales, como por ejemplo, para las composiciones terapéuticas administradas para el tratamiento de un trastorno o enfermedad de interés.

El término "composición farmacéutica" se utiliza en la presente memoria para indicar una composición que se puede administrar a un anfitrión mamífero, p. ej., por vía oral, parenteral, tópica, por pulverización para inhalación, por vía intranasal, o por vía rectal, en formulaciones de dosificación unitarias que contienen portadores, diluyentes, coadyuvantes, vehículos y similares no tóxicos convencionales.

El término "parenteral" según se utiliza en la presente memoria, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal o técnicas de infusión.

Una formulación "estable" es aquella en la que el polipéptido o proteína de la misma conserva esencialmente su estabilidad física y química y la actividad biológica durante el almacenamiento. Se encuentran disponibles en la técnica diversos mecanismos analíticos para medir la estabilidad de la proteína y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Para un escrutinio rápido, la formulación de interés se puede mantener a 40°C durante 1 semana a 1 mes, momento en el cual se mide la estabilidad. El grado de agregación después de la liofilización y el almacenamiento se puede utilizar como un indicador de la estabilidad del péptido y/o la proteína. Por ejemplo, una formulación "estable" es aquella en la que menos de aproximadamente 10% y preferiblemente menos de aproximadamente 5% del polipéptido o proteína está presente en forma de un agregado en la formulación. Se puede determinar un aumento en la formación de agregados después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada "estable" puede ser aquella en la que el aumento en la formación de agregado en la formulación liofilizada es menor de aproximadamente 5% o menor de aproximadamente 3%, cuando la formulación liofilizada se incuba a 40°C durante al menos una semana. La estabilidad de la formulación de proteína de fusión se puede medir usando un análisis de actividad biológica tal como un análisis de unión como se describe en la presente memoria.

Polipéptidos FKBP-L como moduladores de la migración celular, la angiogénesis y la metástasis tumoral

La presente invención reconoce que FKBP-L, los fragmentos de FKBP-L y los derivados biológicamente activos de los mismos, puede inhibir la migración celular y puede poseer potentes propiedades de modulación de la angiogénesis. Las realizaciones de la presente invención se refieren a péptidos derivados de FKBP-L y a su uso. La presente invención se puede realizar de varias formas.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los polipéptidos FKBP-L de la presente invención pueden mostrar propiedades anti-angiogénicas. Asimismo, en algunas realizaciones, los polipéptidos FKBP-L de la presente invención se pueden utilizar para modular la migración celular y/o la metástasis de las células tumorales. La acción de los polipéptidos FKBP-L de la presente invención puede, en ciertas realizaciones, estar mediada por CD44. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, los polipéptidos FKBP-L se pueden utilizar para modular la angiogénesis, la migración celular, y/o la metástasis de las células que expresan CD44.

En ciertas realizaciones, la invención se puede utilizar para tratar trastornos mediados por o asociadas con la migración celular. Por ejemplo, los péptidos FKBP-L se pueden utilizar para inhibir o combatir la invasión tumoral y la metástasis. O bien, en algunas realizaciones, los péptidos FKBP-L se pueden utilizar para inhibir la migración de las células implicadas en la cicatrización de heridas. En otras realizaciones más, los péptidos FKBP-L se pueden utilizar para inhibir la angiogénesis para de ese modo tratar los trastornos mediados por la angiogénesis.

Por lo tanto, se describe en la presente memoria un uso para el tratamiento de un trastorno mediado por o asociado con al menos una de la migración celular, la angiogénesis, o la metástasis tumoral, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) un compuesto activo que comprende un péptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento, o derivado a un paciente que lo necesite.

Por ejemplo, se describe en la presente memoria la utilización en un método de modulación de la angiogénesis o la metástasis tumoral, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado a un sujeto que lo necesite.

En otras realizaciones, la presente invención comprende el uso de: (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o un fragmento del mismo, o (ii) un polinucleótido que codifica tal

polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de una composición o medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por o asociado con al menos una de la migración celular y/o la angiogénesis. Por ejemplo, en una realización, la presente invención comprende el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o fragmento del mismo o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para su uso como un inhibidor de la angiogénesis.

Se puede tratar con las composiciones y/o medicamentos de la presente invención una variedad de trastornos que están mediados por o asociados con la angiogénesis y/o la migración celular. Por lo tanto, en realizaciones alternativas, el medicamento puede ser utilizado en el tratamiento de al menos uno de la inflamación asociada a la angiogénesis, los trastornos oculares mediados por la angiogénesis, la cicatrización de heridas, o el cáncer.

También se describe en la presente memoria el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la inflamación asociada a la angiogénesis.

El trastorno asociado con la angiogénesis es un trastorno ocular, por ejemplo, la degeneración macular y otros trastornos oculares descritos en la presente memoria. También se describen los trastornos asociados con la angiogénesis, tales como la arteriosclerosis, la artritis, la psoriasis o la endometriosis. O bien, la presente invención puede comprender el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de trastornos oculares mediados por la angiogénesis. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, el péptido o polinucleótido de FKBP-L se pueden usar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad degenerativa macular o retinopatía diabética. También se describe el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de al menos una de arteriosclerosis, psoriasis, artritis, o endometriosis.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona usos en los métodos de tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso en un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado, un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado del mismo, para al menos uno de tratamiento del cáncer, inhibición de la migración de células tumorales y/o metástasis, o inhibición del crecimiento de células tumorales y/o la proliferación. En una realización, la inhibición de la migración de células tumorales y la metástasis es por medio de la inhibición de la angiogénesis. Por ejemplo, la presente invención puede comprender el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones de la presente invención pueden prevenir el crecimiento de células tumorales y/o la metástasis. En una realización, la inhibición de la migración de células tumorales y la metástasis es por medio de la inhibición de la angiogénesis. Por lo tanto, en una realización, la presente invención puede comprender el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para su uso como inhibidor de la migración de células tumorales y/o la metástasis. En otras realizaciones más, la presente invención puede comprender el uso de (i) un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica semejante polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado en la fabricación de un medicamento para su uso como un inhibidor de crecimiento y/o la proliferación de células tumorales.

La expresión de los polipéptidos FKBP-L se utiliza en la memoria descriptiva de acuerdo con su significado más amplio. Esta designa las proteínas de origen natural mostradas en los SEQ ID NO: 1, 2 y 29, junto con homólogos debido a polimorfismos, otras variantes, mutantes y porciones de dicho polipéptido que conservan sus actividades moduladoras de la angiogénesis. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el polipéptido FKBP-L comprende el SEQ ID NO: 1 con una secuencia N-terminal (véanse los residuos de aminoácido en negrita en el SEC ID NO: 1 como se muestra en la FIG. 1) que incluye un etiqueta de poli-histidina de seis residuos de histidina unidos al extremo N de la proteína, o en el SEQ ID NO: 2 con una treonina en la posición 181 y una glicina en la posición 186 de la secuencia

de tipo salvaje. O se puede utilizar un polipéptido de SEQ ID NO: 29 (Núm. de Acceso Genbank NP_071393; NM_022110; [gi: 34304364]). Los constructos ilustrativos de otros polipéptidos FKBP-L (p. ej., fragmentos y otras modificaciones) de la presente invención se muestran en la FIG.1. Asimismo, se proporcionan constructos ilustrativos de los polinucleótidos que codifican constructos de polipéptidos FKBP-L en la FIG. 2.

Las realizaciones de la presente invención comprenden un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o un fragmento para su uso como un medicamento. Por lo tanto, las realizaciones alternativas de la presente invención comprenden el uso de un péptido FKBP-L o un nucleótido que codifica un péptido FKBP-L como se describe en la presente memoria en donde el polipéptido FKBP-L comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10, o la secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 29, o la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 3 a 7, u 11 a 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 29. O bien, se puede utilizar una secuencia que comprende al menos 18 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 10 (p. ej., SEQ ID NOS: 11, 16, 23). En la presente memoria se debe interpretar que las referencias a péptidos (y a los usos de los mismos) que se muestran como modificados, tales como los SEQ ID NO: 12, 13 y 28, abarcan péptidos de secuencia de aminoácidos idéntica sin la modificación enumerada (y usos de los mismos) a menos que se establezca de otro modo.

Como se describe en la presente memoria, los usos y composiciones de la presente invención pueden utilizar un polipéptido FKBP-L completo, o fragmentos del polipéptido. Por lo tanto, ciertas realizaciones de la presente invención comprenden un derivado de FKBP-L que comprende o consiste en una porción eficaz de la secuencia de aminoácidos N-terminal de FKBP-L de origen natural. Esta secuencia puede comprender o consistir en una porción N-terminal activa del polipéptido FKBP-L. En realizaciones alternativas, el polipéptido puede comprender o consistir en los aminoácidos 1 a 57 del SEQ ID NO: 2 (es decir, SEQ ID NO: 6), o en los aminoácidos 34-57 del SEQ ID NO: 2 (es decir, SEQ ID NO: 10). O bien, el péptido puede comprender o consistir en una secuencia que comprende al menos 18 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 10 (p. ej., SEQ ID NOS: 11, 16, o 23). En una realización alternativa, el polipéptido utilizado en los usos y composiciones de la presente invención puede comprender o consistir en una de las secuencias de aminoácidos mostradas en cualquiera de los SEQ ID NO: 1-7, 10-29. En ciertas realizaciones, la presente invención comprende un fragmento biológicamente activo de FKBP-L, en donde dicho polipéptido incluye no más de 200 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 29.

Según se describe en la presente memoria, los péptidos pueden ser modificados (p. ej., para que contengan PEG y/o etiquetas de His u otras modificaciones). O bien, la presente invención puede comprender polipéptidos aislados que tienen una secuencia idéntica en al menos 70%, o 75%, o el 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 96% o 97%, o 98% o 99% a la secuencias de aminoácidos expuestas en uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1-29. O bien, el péptido aislado o el péptido utilizado para la preparación de un medicamento pueden comprender o consistir en una secuencia que tiene una identidad de al menos 70%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 96%, o 97%, o 98%, o 99% con al menos 18 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 10 (p. ej., SEQ ID NO: 11, 16, 23).

El derivado de FKBP-L de la invención puede tener una longitud variable siempre que conserve su actividad antiangiogénica/proangiogénica y se pueda utilizar de acuerdo con los diversos aspectos de la invención descrita anteriormente. Los equivalentes funcionales de FKBP-L también se describen en la presente memoria. Por ejemplo, un equivalente funcional puede comprender o consistir en una pequeña molécula que se puede unir a CD44 y/o evitar la unión de un ligando (p. ej. MIF) a un complejo que contiene CD44 y CD74. O bien, un equivalente funcional puede comprender o consistir de una molécula pequeña que actuará de una manera similar a la de FKBP-L y sus derivados peptídicos para inhibir al menos la migración celular, la angiogénesis y/o la metástasis.

La dosis administrada del polipéptido FKBP-L puede variar dependiendo de la enfermedad que se está tratando. En realizaciones alternativas, la dosis a alcanzar *in vivo* sería equivalente a un nivel *in vitro* de más de 10^{-12} M o 10^{-11} M o 10^{-10} M o 10^{-9} M o 10^{-8} M o 10^{-7} M o 10^{-6} M o 10^{-5} M. Por lo tanto, la dosis a alcanzar *in vivo* puede ser equivalente a un nivel *in vitro* de 10^{-12} M a 10^{-5} M o 10^{-11} M a 10^{-6} M o 10^{-10} M a 10^{-7} M o 10^{-9} M a 10^{-7} M o intervalos de los mismos. En realizaciones alternativas, la dosificación utilizada puede ser equivalente a un nivel *in vitro* de 1-10.000 ngml⁻¹ o 10-5000 ngml⁻¹ o 100-1000 ngml⁻¹. O bien, en ciertas realizaciones, la dosificación puede comprender de 0,00001 a 500 mg/kg/día, o de 0,0001 a 300 mg/kg/día, o de 0,003 a 100 mg/kg/día, o desde 0,03 a 30 mg/kg/día, o de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, o de 0,3 mg/kg/día a 3 mg/kg/día.

En una realización, el polipéptido FKBP-L se administra a un sujeto que lo necesite. Según se utiliza en la presente memoria, un sujeto que lo necesite es un sujeto que puede resultar beneficiado por la administración de FKBP-L. En otras realizaciones más, la presente invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1-29, o un fragmento biológicamente activo del mismo, y el uso de tales moléculas para la preparación de medicamentos y/o como agentes terapéuticos. En una realización, un fragmento biológicamente activo comprende o

consiste en al menos 18 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 10 (p. ej., SEQ ID NOS: 11, 16, 23).

Por ejemplo, las realizaciones de la presente invención comprenden el uso de un polinucleótido que codifica un péptido FKBP-L, un fragmento biológicamente activo de un péptido FKBP-L, o derivado biológicamente activo del mismo, en donde el polinucleótido que codifica el polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 30-39.

Además, la presente invención comprende ácidos nucleicos aislados que codifican los péptidos FKBP-L. La molécula de ácido nucleico puede comprender una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia expuesta en los SEQ ID NO: 30-39, o un fragmento del mismo, en donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene la secuencia de los SEQ ID NO: 1-28, o un fragmento de estos polipéptidos. En una realización, un fragmento comprende o consiste en al menos 18 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 10 (p. ej., SEQ ID NO: 11, 16, 23). En ciertas realizaciones, se pueden utilizar moléculas de ácidos nucleicos degenerados, que comprenden una variación degenerada en la tercera posición del codón de aminoácidos de tal manera que el mismo aminoácido está codificado por la secuencia degenerada, para codificar los péptidos FKBP-L, fragmentos y/o derivados de la presente invención. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención puede comprender moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una secuencia idéntica en al menos 70%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 96%, o 97%, o 98%, o 99% a los SEQ ID NO: 30 a 39 o fragmentos de los mismos.

También se describen cebadores que se pueden utilizar para producir fragmentos de polinucleótidos de SEQ ID NO: 31, donde dichos fragmentos codifican los péptidos FKBP-L mostrados en la FIG. 1, incluyendo los cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias que se exponen en los SEQ ID NO: 45 a 58 o una secuencia idéntica en al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos 99% a las mismas.

En otras realizaciones más, la presente invención comprende vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención. En ciertas realizaciones, la presente invención también comprende células transfectadas con tales vectores, de manera que se expresa un polipéptido FKBP-L. Tales realizaciones se describen con más detalle en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria una molécula de ácido nucleico aislada que es antisentido con respecto a la cadena codificante del gen de FKBP-L o una porción del mismo y el uso de tales moléculas para la preparación de medicamentos y/o como agentes terapéuticos, incluyendo un polinucleótido que es idéntico en al menos 70%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 96%, o 97%, o 98%, o 99% a una secuencia de ácido nucleico que es antisentido con respecto a la hebra codificante de un ARNm que codifica un polipéptido FKBP-L de la invención.

Las moléculas antisentido pueden ser utilizadas para promover ventajosamente la angiogénesis y/o la migración celular y en el tratamiento de trastornos mediados por o asociados con al menos una de la angiogénesis o la migración celular. Por ejemplo, se describe en la presente memoria el uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaz de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso como un modulador para promover la angiogénesis y también el uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaces regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso como un modulador para promover al menos uno de hematopoyesis o vasculogénesis. También se describe en la presente memoria el uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso para promover la curación de las heridas. También se describe el uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de al menos uno de úlcera péptica, una fractura ósea, o un queloide.

También se describe en la presente memoria el uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la periodontitis o parodontopatía mediada por la angiogénesis, también el uso de un oligonucleótido antisentido o un RNAip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la regulación del sistema reproductor, tales como la ovulación, la menstruación y la placentación. También se describe el uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la regulación de la disfunción en el cerebro y el sistema nervioso, tal como la causada por un accidente cerebrovascular. El uso de un oligonucleótido antisentido o un ARNip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L puede por lo tanto ser útil en el tratamiento de ciertos tipos de demencia y/o retraso mental.

Otros aspectos de ciertas realizaciones de la presente invención se comentan con más detalle a continuación.

FKBP-L modula la migración celular, la angiogénesis y la metástasis

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar FKBP-L y los fragmentos del mismo para modular la angiogénesis. En una realización, FKBP-L o los fragmentos del mismo se pueden usar para inhibir la angiogénesis. Por ejemplo, la transfección de células con FKBP-L puede inhibir la migración de células endoteliales y la angiogénesis (FIG. 3), indicando que la proteína FKBP-L es una proteína anti-migratoria potencial. El efecto natural dependiente de la dosis de FKBP-L sobre la migración celular se muestra en la FIG. 4. Por lo tanto, se puede observar que una dosis de FKBP-L etiquetado con His completo 10^{-6} M es eficaz para prevenir la migración celular.

En ciertas realizaciones, se puede detectar FKBP-L a partir de ciertos tipos de células tales como las células endoteliales (FIG. 5), y las células tumorales. Por lo tanto, en una realización, la acción anti-angiogénica de FKBP-L puede ser a través de la activación del receptor. La secreción de FKBP-L a partir de células endoteliales indica que la aplicación de la proteína FKBP-L o la expresión en exceso de FKBP-L usando un constructo de ADNc puede ser capaz de ejercer efectos anti-angiogénicos observados tanto *in vitro* como *in vivo*.

En ciertas realizaciones, FKBP-L muestra un efecto sobre la migración celular durante un período de tiempo fisiológicamente relevante. Por ejemplo, las células HMEC-1 tratadas con polipéptido FKBP-L recombinante etiquetado con His completo (SEQ ID NO: 1) pueden mostrar una disminución del cierre de la herida durante un máximo de 2 a 3 días (FIG. 6). Por lo tanto, la aplicación de la proteína FKBP-L puede ser por horas, días o semanas según sea necesario para inhibir la migración celular y/o angiogénesis.

El efecto de FKBP-L sobre la migración celular y/o la angiogénesis puede, en ciertas realizaciones, ser eficaz para cualquier célula que esté influenciada por la migración celular y/o la angiogénesis. Por lo tanto, como se describe con detalle en los Ejemplos en la presente memoria, el FKBP-L recombinante completo (p. ej., SEQ ID NO: 1) muestra una acción anti-migratoria en un intervalo de dosis amplio en una variedad de modelos para la angiogénesis, incluyendo el cierre de herida con HMEC-1 (FIGS. 3, 4 y 6), y la formación de tubos con HMEC-1 (FIG. 7), el ensayo de esponja de ratón (FIGS. 8, 9A y 9B), y el modelo de explante de anillo aórtico (FIG. 10).

Asimismo, en una realización, el efecto de FKBP-L en la movilidad celular y/o la angiogénesis no es debido a la toxicidad del compuesto. Así, cuando las células se exponen a FKBP-L completo recombinante durante un máximo de 48 horas, puede no haber indicios de toxicidad (FIG. 11A y 11B).

Puede haber una variedad de mecanismos por los cuales FKBP-L actúa sobre la célula. En una realización, el mecanismo de inhibición de la migración mediada por FKBP-L puede estar dirigido por el citoesqueleto (FIGS. 12 y 13). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, FKBP-L puede conducir a la interrupción u otros cambios en los filamentos del citoesqueleto.

Los efectos anti-angiogénicos de FKBP-L indican que FKBP-L puede tener actividad antitumoral y/o antimetastásica. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 14, los paneles A, B, y C, el polipéptido FKBP-L recombinante completo puede inhibir la migración de células tumorales de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que FKBP-L puede ser útil como un agente terapéutico para reducir la invasión de células tumorales y la metástasis de células tumorales que dependen de la migración para metastatizar. En ciertas realizaciones, el tratamiento de los tumores *in vivo* con un constructo de expresión que codifica un polipéptido FKBP-L completo mediante terapia génica (FIG. 15) conduce a una reducción en el crecimiento del tumor.

Interacción de FKBP-L con genes implicados en la angiogénesis

Una variedad de rutas bioquímicas puede ser modulada por FKBP-L. En ciertas realizaciones, FKBP-L puede llevar a un aumento en la expresión de ciertos genes asociados con la angiogénesis y/o la migración celular. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la transfección con un ácido nucleico de FKBP-L anti-sentido puede conducir a un aumento en la expresión de PI3K, activación de la GTPasa Rho-oligofrenina 1, ROCK, proteína asociada a microtúbulos 1B, proteína MMP tipo 1, y/o la proteína 1 miembro de la superfamilia de ligandos de TNF (véase el Ejemplo 12 en la presente memoria). Se sabe que la expresión elevada de RhoA, RhoC, ROCK I, y ROCK II está asociada con el progreso tumoral y se ha sugerido que la señalización de Rho y ROCK contribuyen a los cambios morfológicos y el comportamiento metastásico de algunas células tumorales. Por lo tanto, la expresión en exceso de FKBP-L puede inhibir la angiogénesis, y la represión de FKBP-L utilizando oligonucleótidos antisentido puede promover la angiogénesis por la activación de genes asociados con la angiogénesis, tales como Rho y ROCK.

Interacción de FKBP-L con CD44

CD74 es expresado en células presentadoras de antígenos. Una función primaria de CD74 es la clasificación intracelular de moléculas del MHC de clase II. CD74 se expresa en carcinomas de origen renal, pulmonar, gástrico y tímico y en ciertos sarcomas. Además, CD74 puede ser expresado en respuesta a ciertos genes tumorales. Por ejemplo, la expresión en superficie de CD74 inducida por INF- γ en líneas de carcinoma de mama puede ser potenciada por la proteína retinoblastoma. Por lo tanto, la expresión restringida de CD74 por los tejidos normales, y

su rápida internalización pueden hacer de CD74 un agente terapéutico atractivo para el cáncer y las enfermedades inmunológicas.

El factor Inhibidor de Macrófagos (MIF) también puede estar implicado en la tumorigénesis. Se observan elevados niveles de MIF se ven en tumores humanos y se correlacionan con la clasificación y el pronóstico. Además MIF puede estar implicado en la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis a través de una ruta dependiente de Rho (Amin et al., 2006, *Blood*, 107:2252- 2261; Ren et al, 2006, *Oncogene*, 25:3501-3508; Sun et al., 2005, *Clin. Cancer Res.*, 11:1050-1058; Sun et al., 2003, *Int. J. Mol. Med.*, 12: 633-641). La transducción de señales MIF puede ser iniciada por la unión a CD74 (Leng et al., 2003, *J. Exp. Med.*, 197:1467-1476). También se cree que la activación de CD74 requiere la interacción con CD44 (Naujokas et al., 1993, *Cell*, 74:257-268; y Naujokas et al., 1995, *Immunity*, 3:359-372). Se ha demostrado que MIF interacciona en un complejo con CD74 y CD44 y la inhibición de este complejo da como resultado la disminución de la proliferación de células de cáncer de vejiga (Meyer-Siegler et al., 2004, *BMC Cancer*, 12 de Julio, 4:34; véase también Leng et al., 2006, *Cell Res.*, 16: 162-168).

La formación de un complejo entre MIF, CD44 y CD74 puede ser importante para la señalización biológica mediada por MIF (Shi et al., *Immunity*, 2006, 25 (4):595-606).

En ciertas realizaciones, FKBP-L puede actuar mediante la interacción con CD44. En una realización, FKBP-L se puede unir a CD44 y evitar que CD44 interaccione con CD74. Si FKBP-L, o una porción del mismo, es capaz de desplazar CD74 de CD44, el polipéptido FKBP-L puede prevenir la formación del complejo de CD44-CD74-MIF que se requiere para la transducción de señales inducida por MIF. O, en otras realizaciones, FKBP-L puede actuar por medio de mecanismos alternativos.

Se cree CD44 es expresado por la mayoría de las células epiteliales y ha sido implicado en la angiogénesis (Cao et al., 2006, *Am. J. Pathol.*, 169: 325-336). Por lo tanto, en una realización, CD44 puede ser necesaria para la inhibición por FKBP-L de la migración celular endotelial y/o la angiogénesis. Asimismo, en una realización, CD44 puede ser requerida para la inhibición por FKBP-L de la migración de células tumorales. Por lo tanto, como se muestra en las FIGS. 16 y 17A-17E, el FKBP-L recombinante completo, en ciertas realizaciones, puede inhibir la migración de células tumorales en líneas celulares tumorales que expresan CD44 (es decir, CD44 positivas o CD44 + ve), pero no en líneas de células tumorales CD44 negativas (CD44 - ve), lo que sugiere que FKBP-L puede inhibir la metástasis de tumores en un subconjunto de líneas de células tumorales CD44 positivas. Las células HMEC-1 también son positivas para CD44 (no mostrado). En una realización, la inactivación de CD44 (p. ej., utilizando un ARNip específico para CD44) da como resultado la prevención de la inhibición mediada por FKBP-L de la migración de células tumorales (p. ej., FIG. 18), lo que demuestra que CD44 puede estar implicado en la inhibición por FKBP-L de la migración y/o la metástasis de las células tumorales.

En una realización, FKBP-L puede interaccionar directamente con CD44. Por ejemplo, el FKBP-L expresado en exceso exógenamente (p. ej., SEQ ID NO: 1 generado a partir de SEQ ID NO: 31) pueden interaccionar con CD44 endógeno en monocapas heridas (FIG. 19; Ejemplo 16). En una realización, no hay ninguna interacción significativa entre FKBP-L endógeno y CD44 en monocapas no heridas, lo que sugiere que es necesario que se exprese un nivel crítico de FKBP-L antes de que la interacción con CD44 se pueda detectar. Además, esta interacción solo se puede producir en las células endoteliales que están cebadas para la migración (es decir, en monocapas heridas).

Por lo tanto, en realizaciones, el FKBP-L completo es activo contra células endoteliales microvasculares CD44 positivas (FIG. 16) y de ese modo puede dirigirse a estas células dentro de los tumores sólidos para evitar un mayor crecimiento de los microvasos para apoyar el crecimiento del tumor. Como tal, FKBP-L se puede dirigir a la vasculatura en vez de a un tipo específico de tumor, y puede ser activo contra la mayoría, si no todos, los tumores sólidos y los micrometástasis. También, como se discute con más detalle a continuación, los péptidos FKBP-L muestran una actividad similar. Por ejemplo, los aminoácidos 34-57 de FKBP-L (es decir, FKBP-L de "24 unidades"), los aminoácidos 1-57 de FKBP-L (es decir, FKBP-L de "1-57 unidades") y otros péptidos de FKBP-L desde el extremo N de la proteína FKBP-L pueden inhibir la migración de las células tumorales que expresan CD44. De ese modo, el polipéptido FKBP-L y sus derivados pueden inhibir la migración de células endoteliales y/o la migración de células tumorales con implicaciones para la angiogénesis y la invasión de una manera que es compatible con el FKBP-L que interacciona con CD44.

Fragmentos de FKBP-L

Las realizaciones de la presente invención reconocen que ciertas regiones del extremo N de la proteína FKBP-L pueden mostrar actividad biológica. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los constructos de expresión que expresan FKBP-L de tipo salvaje (WT) completo, o, en realizaciones alternativas, mutantes truncados, tales como, pero no limitados a $\Delta 48$, $\Delta 58$, $\Delta 86$, $\Delta 151$, $\Delta 200$ pueden inhibir el cierre de heridas (FIG. 20). La secuencia de aminoácidos de cada uno de estos constructos se muestra en la FIG. 1. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, WT-FKBP-L y $\Delta 58$ inhibieron el cierre de heridas en 36,2% y 48,8%, respectivamente. Puede haber una cantidad mínima de secuencia que se requiere para la actividad. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, FKBP-L $\Delta 34$ truncado puede no lograr inhibir

significativamente el cierre de heridas, lo que sugiere que el dominio activo está suprimido en este mutante. Por tanto, estos experimentos pueden indicar que el dominio activo reside entre los aminoácidos 34 y 57 de FKBP-L completo (p. ej., SEQ ID NO: 2).

- 5 Por lo tanto, como se muestra en la FIG. 20A-20C, en ciertas realizaciones, el dominio importante para su actividad anti-angiogénica puede estar situado entre los aminoácidos 34 a 57 (es decir, en el extremo N) de FKBP-L.

En ciertas realizaciones, la porción de FKBP-L entre los aminoácidos 34 y 57 muestra la misma actividad biológica que el FKBP-L completo. En algunas realizaciones, FKBP-L de 24 unidades puede mostrar un aumento de potencia en comparación con el FKBP-L completo. Por ejemplo, el péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) puede mostrar una actividad biológica similar o más potente en comparación con la de FKBP-L recombinante completo (p. ej., SEQ ID NO: 1) con respecto a la inhibición de la migración de las células endoteliales/cierre de heridas (FIG. 21), la inhibición de la formación de contactos de célula a célula endoteliales en el análisis de formación de tubo de Matrigel (FIG. 22), la ramificación angiogénica (FIG. 23A, 23B, 24A y 24B), la capacidad de las células para invadir (FIG. 25), y/o la capacidad de las células para adherirse (FIG. 26). En ciertas realizaciones, sin embargo, el FKBP-L de 24 unidades y el FKBP-L de 1-57 unidades muestran una mayor potencia en comparación con el FKBP-L completo (véanse, p. ej., las FIGS. 21, 22 y 24).

En ciertas realizaciones, la actividad biológica de FKBP-L puede requerir CD44. Por ejemplo, el péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) puede actuar de una manera similar a la del FKBP-L recombinante completo (rFKBP-L), e inhibir la migración de células tumorales MDA-231 y PC3. Estas células tumorales son ambas CD44 positivas (CD44 + ve) (es decir, expresan la proteína CD44) (FIG. 27A y 27B) indicando que el FKBP-L de 24 unidades puede ser capaz de inhibir la metástasis de tumores en un subconjunto de líneas celulares tumorales CD44 + ve. En una realización, FKBP-L y sus derivados pueden inhibir la migración de células tumorales y la invasión y migración de células endoteliales de una manera que es compatible con la interacción de FKBP-L con CD44.

También en ciertas realizaciones, el péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) es un inhibidor angiostático (FIG. 28a y 28b.). Así, el FKBP-L de 24 unidades puede inhibir el desarrollo de vasos cuando los vasos están maduros o recién incorporados. Sin embargo, en una realización, el polipéptido FKBP-L puede actuar por un mecanismo estático en el que se detiene el desarrollo de vasos cuando se añade, pero tiene poco o ningún efecto residual cuando se retira.

También, en ciertas realizaciones, el FKBP-L de 24 unidades inhibe la angiogénesis *in vivo* usando el ensayo de esponja de ratón (FIG. 29) y también inhibe la migración de células endoteliales de ratón *in vitro* (FIG. 30) en un intervalo amplio de dosis, lo que demuestra que este péptido humano también es activo en el ratón. Esto es apoyado por los datos aportados en las FIGS. 29 y 31.

De un modo similar a la proteína FKBP-L completa, el péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) puede, en ciertas realizaciones, inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo* (FIG. 31A). Asimismo, los ratones tratados con FKBP-L de 24 unidades mostraron una supervivencia significativamente incrementada (FIG. 31 B-D). Por lo tanto, como se muestra en la FIG. 31A, el tratamiento por medio de inyección i.p. con el péptido FKBP-L de 24 unidades a dosis de 0,3 mg/kg/día o 3×10^{-3} mg/kg/día redujo significativamente el crecimiento de los tumores DU145 en ratones SCID en comparación con los tumores tratados con vehículo solamente. En una realización, los tumores tratados con estas dosis de péptido FKBP-L de 24 unidades muestran evidencia de un centro necrótico como es típico de los efectos observados con antiangiogénicos.

En una realización, la actividad del péptido FKBP-L de 24 unidades, como el FKBP-L completo, no es debida a la toxicidad del péptido (FIGS. 31E, 32 y 33).

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar porciones o fragmentos del péptido FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) como agentes terapéuticos. El Ejemplo 29 (FIG. 34) proporciona ejemplos de fragmentos peptídicos de FKBP-L de 24 unidades que puede tener una actividad y una potencia similares a las de FKBP-L 24, FKBP-L 1-57, y FKBP-L completo.

55 Derivados de FKBP-L

Como se ha descrito anteriormente, un derivado de FKBP-L para su uso en la invención representa un polipéptido modificado mediante una variación de la secuencia de aminoácidos de FKBP-L, p. ej., SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 29, o un fragmento del mismo, o un polipéptido idéntico en al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a esta, o péptidos que han sido modificados por la adición de un grupo funcional (p. ej., PEG). La generación de tales péptidos se puede llevar a cabo mediante la manipulación del ácido nucleico que codifica el polipéptido o mediante la alteración de la propia proteína.

En el SEQ ID NO: 2, el inserto de FKBP-L (originalmente clonado en pUC18 por Cambridge Bioscience y ahora

clonado en pcDNA3.1); tenía dos mutaciones puntuales insertadas en comparación con la secuencia que se deposita en la base de datos PUBMED (SEQ ID NO: 29). Existe una mutación puntual a 540 pb (del codón de inicio): TCT a ACT que, por lo tanto, convierte una serina (S) en una Treonina (T) (aminoácido: 181). También hay una mutación puntual a 555 pb (del codón de inicio): AGG a GGG que por lo tanto convierte una Arginina (R) en una Glicina (G) (aminoácido: 186). Ambos polipéptidos FKBP-L (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 29) muestran actividad biológica.

Los derivados de FKBP-L incluyen análogos de la secuencia de aminoácidos de FKBP-L natural y pueden implicar la inserción, adición, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos, a la vez que proporcionan un polipéptido capaz de lograr efectos angiogénicos similares a los de las porciones correspondientes a los mutantes truncados, Δ48 (SEQ ID NO: 7), Δ58 (SEQ ID NO: 6), Δ86 (SEQ ID NO: 5), Δ151 (SEQ ID NO: 4), o Δ200 (SEQ ID NO: 3) (FIG. 1). También se incluyen en los derivados de FKBP-L de la presente invención los polipéptidos derivados de Δ58 (SEQ ID NO: 6), incluyendo el FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO 10) y los péptidos 1-17 (SEQ ID NO: 12 28) que se muestra en la FIG. 1.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el dominio N-terminal (aminoácidos 34-57) de FKBP-L es importante para las propiedades anti-angiogénicas. La FIG. 20C y el Ejemplo 17 muestran un estudio en el que diversos fragmentos de FKBP-L, se compararon para determinar la eficacia en la inhibición de la migración de las células en comparación con controles negativos coincidentes en el tiempo. En una realización, el fragmento Δ58 presenta una actividad inhibidora máxima de los fragmentos sometidos a ensayo.

La porción del polipéptido FKBP-L que proporciona inhibición de la angiogénesis se puede encontrar en el polipéptido que comprende la porción de FKBP-L en común con los péptidos activos Δ48 (SEQ ID NO: 7) y Δ58 (SEQ ID NO: 6). Este polipéptido puede comprender el SEQ ID NO: 10 (FIG. 1).

Por lo tanto, los derivados de FKBP-L utilizados en los métodos y composiciones de la presente invención también incluyen fragmentos biológicamente activos o derivados del FKBP-L de origen natural. En ciertas realizaciones, los fragmentos se seleccionan entre el dominio N-terminal de FKBP-L. En cierta realización, los fragmentos se seleccionan entre los aminoácidos 1 a 85 de FKBP-L completo (p. ej., SEQ ID NO: 2 ó 29). Preferiblemente, tales análogos implican la inserción, adición, delección y/o sustitución de 5 o menos aminoácidos, más preferiblemente de 4 o menos, incluso más preferiblemente de 3 o menos, lo más preferiblemente de solo 1 o 2 aminoácidos.

Los derivados de FKBP-L de acuerdo con la invención también incluyen péptidos multiméricos incluyendo dicho polipéptido FKBP-L, secuencias análogas o fragmentos p. ej., los SEQ ID NO: 1-7, los SEQ ID NO: 10-28, y los profármacos que incluyen tales secuencias. Por ejemplo, en ciertas realizaciones FKBP-L o los fragmentos de FKBP-L pueden formar multímeros mediante la formación de enlaces disulfuro entre monómeros.

Los derivados del polipéptido FKBP-L de la invención pueden incluir el polipéptido unido a un compañero de acoplamiento, p. ej., una molécula efectora, una marca, un fármaco, una toxina y/o una molécula de transporte. Los mecanismos para acoplar los polipéptidos de la invención a compañeros de acoplamiento de peptidilo y no de peptidilo son bien conocidos en la técnica.

Un "fragmento" de un polipéptido FKBP-L representa un tramo de residuos de aminoácidos de al menos 6 aminoácidos.

Los derivados de FKBP-L de la invención incluyen péptidos de fusión. Por ejemplo, los derivados pueden comprender péptidos polipeptídicos de la invención unidos, por ejemplo, a los anticuerpos que dirigen los péptidos al tejido enfermo, por ejemplo, tejido tumoral o de la retina.

El polipéptido FKBP-L o sus análogos se pueden fusionar con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o porciones de las mismas (CH1, CH2, CH3, o cualquier combinación de las mismas), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estos polipéptidos o proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y pueden mostrar un aumento de la vida media *in vivo*. Tales proteínas de fusión pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que los polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismos por sí solos. Véase, p. ej., Fountoulakis et al., J. Biochem, 270: 3958-3964 (1995).

Las proteínas de fusión de la invención también incluyen polipéptidos FKBP-L fusionados con albúmina, por ejemplo albúmina de suero humano recombinante o fragmentos o variantes de los mismos (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5876969, la Patente EP 0413622 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5766883).

El uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas de fusión descritas en la presente memoria también es abarcado por la invención. El uso de un polinucleótido fusionado a un agente citotóxico también es abarcado por la invención. En este caso el polipéptido FKBP-L se puede unir a un receptor y el fármaco citotóxico podría ser internalizado.

Por ejemplo, en realizaciones alternativas, los derivados pueden incluir: PEGilación específica del sitio (o similar) del péptido para aumentar la vida media; o incorporación de aminoácidos no naturales y modificaciones de la cadena principal para la estabilización frente a la proteólisis; o derivados cíclicos (para proporcionar resistencia proteolítica); o para bloquear los extremos N- y C-terminales para prevenir o reducir la actividad exopeptidasa y/o proteinasa; o la unión entre sí de múltiples copias de péptidos, en una cadena contigua a través de una cadena de conectores o en un tipo de enfoque de dendrímeros para aumentar la "avidéz" con el CD44 de la superficie celular. Por ejemplo, se pueden utilizar derivados oligoméricos de 24 unidades unidos covalentemente triméricos como derivados de FKBP-L. O bien, el FKBP-L de 24 unidades se puede unir a un dominio que se homotrimeriza para formar trímeros no covalentes. O se pueden utilizar derivados de biotina de péptidos que formarán complejos tetraméricos con estreptavidina como derivados de FKBP-L. O, el FKBP-L o los fragmentos de FKBP-L pueden formar multímeros por la formación de enlaces disulfuro entre monómeros. Además, FKBP-L puede formar oligómeros a través de asociaciones no covalentes, posiblemente a través de los dominios de repetición de tetratricopéptidos pronosticados dentro de la secuencia de la proteína.

15 Análogos inversos de péptidos

También se describen en la presente memoria análogos inversos o retro-análogos de proteínas FKBP-L naturales, porciones de los mismos o sus derivados sintéticos. Véanse, por ejemplo, la patente EP 0497 366, la Patente de los Estados Unidos 5.519.115 y Merrifield et al., 1995, PNAS, 92: 3449-53. Como se describe en la patente EP 0497 366, los péptidos inversos son producidos por la inversión de la secuencia de aminoácidos de un péptido de origen natural o sintético. Tales péptidos inversos pueden retener la misma estructura tridimensional general (p. ej., hélice alfa) que el péptido parental excepto por la conformación alrededor de los sitios internos sensibles a la proteasa y las características de los extremos N-y C-terminales. Se supone que los péptidos inversos no solo conservan la actividad biológica del péptido no invertido "normal", si no que pueden poseer propiedades mejoradas, incluyendo una mayor actividad biológica. (Véase Iwahori et al., 1997, Biol. Pharm. Bull. 20:267-70). Los derivados para su uso en la presente invención pueden por lo tanto comprender péptidos inversos de proteínas FKBP-L naturales y sintéticas.

Los péptidos (incluyendo péptidos inversos y sus fragmentos) se pueden generar total o parcialmente mediante síntesis química o mediante expresión a partir del ácido nucleico. Los péptidos para su uso en la presente invención se pueden preparar fácilmente de acuerdo con métodos de síntesis de péptidos en fase líquida convencional o, preferiblemente en fase sólida, bien establecidos, conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, J.M. Stewart y J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, segunda edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), en M. Bodanzsky y A. Bodanzsky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Nueva York (1984).

35 Péptidos multiméricos

Como se ha descrito anteriormente, los péptidos pueden estar en forma de multímeros. Por lo tanto los multímeros de 2, 3 o más unidades monoméricas de polipéptidos FKBP-L individuales, o dos o más fragmentos de FKBP-L, están dentro del alcance de la invención.

En una realización, dichos multímeros se pueden utilizar para preparar un péptido monomérico mediante la preparación de un péptido multimérico que incluye la unidad monomérica, y un sitio escindible (es decir, un sitio escindible enzimáticamente) y, a continuación, la escisión del multímero para producir un monómero deseado.

En una realización, el uso de multímeros puede aumentar la afinidad de unión para un receptor.

Los multímeros pueden ser homómeros o heterómeros. Según se utiliza en la presente memoria, el término homómero, se refiere a un multímero que contiene solo polipéptidos correspondientes a una secuencia de aminoácidos específica (p. ej., SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 29), o variantes, variantes de corte y empalme, proteínas de fusión, u otros análogos de FKBP-L o derivados descritos en la presente memoria. Estos homómeros pueden contener péptidos FKBP-L que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. Por ejemplo, los multímeros pueden incluir solo los péptidos FKBP-L que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica, o pueden incluir secuencias de aminoácidos diferentes. El multímero puede ser un homodímero (p. ej., que contiene solamente péptidos FKBP-L, estos a su vez pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes), un homotrímero o un homotetrámero.

Según se utiliza en la presente memoria, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (es decir, péptidos o polipéptidos distintos de FKBP-L) además de los (poli)péptidos de FKBP-L descritos en la presente memoria.

Los multímeros pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden estar unidos indirectamente, mediante, por ejemplo, la formación de liposomas. Por lo tanto, en una realización, los multímeros se forman cuando los péptidos FKBP-L descritos en la presente memoria entran en contacto entre sí en

solución. En otra realización, los heteromultímeros se forman cuando los (poli)péptidos FKBP-L y distintos de FKBP-L entran en contacto con anticuerpos para los (poli)péptidos descritos en la presente memoria (incluyendo anticuerpos para la secuencia de (poli)péptidos heteróloga en una proteína de fusión descrita en la presente memoria) en solución. En otras realizaciones, los multímeros descritos en la presente memoria se pueden formar mediante asociaciones covalentes con y/o entre los péptidos FKBP-L (y opcionalmente péptidos distintos de FKBP-L) descritos en la presente memoria.

Tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más residuos de aminoácidos contenidos en la secuencia de FKBP-L (p. ej., la que se expone en los SEQ ID NO: 1-28. En una realización, las asociaciones covalentes son la consecuencia de una manipulación química o recombinante. Alternativamente, tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más residuos de aminoácidos contenidos en la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión FKBP-L. En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión descrita en la presente memoria (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925). En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de proteínas de fusión descritas en la presente memoria están utilizando secuencias de polipéptidos heterólogos a partir de otra proteína que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, por ejemplo, osteoprotegerina (véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm: WO 98/49305). En otra realización, dos o más polipéptidos descritos en la presente memoria se unen a través de conectores peptídicos. Los ejemplos incluyen aquellos conectores peptídicos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5073627. Las proteínas que comprenden múltiples péptidos FKBP-L separados por conectores peptídicos se pueden producir usando la tecnología de ADN recombinante convencional.

Los multímeros también se pueden preparar mediante fusión de los (poli)péptidos FKBP-L a una cremallera de leucina o secuencia polipeptídica de cremallera de isoleucina. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y los derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de los dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles descritos en la presente memoria son los descritos en la solicitud PCT WO 94/10308. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido descrito en la presente memoria fusionado a una secuencia polipeptídica que dimeriza o trimeriza en solución se pueden expresar en células anfitrionas adecuadas, y la proteína de fusión multimérica soluble resultante se puede recuperar del sobrenadante de cultivo usando mecanismos conocidos en la técnica.

Los multímeros también se pueden generar usando mecanismos químicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos que van a estar contenidos en los multímeros descritos en la presente memoria pueden ser entrecruzados químicamente usando moléculas conectoras y mecanismos de optimización de la longitud de la molécula conectora conocidos en la técnica (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925). Adicionalmente, los multímeros se pueden generar usando mecanismos conocidos en la técnica para formar uno o más entrecruzamientos inter-molécula entre los residuos de cisteína localizados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925). Además, los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden modificar de forma rutinaria mediante la adición de cisteína o biotina al extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido y se pueden aplicar mecanismos conocidos en la técnica para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925). Adicionalmente, se pueden utilizar mecanismos conocidos en la técnica para preparar liposomas que contienen dos o más péptidos C-12-C que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925).

Alternativamente, los multímeros que incluyen solamente aminoácidos de origen natural se pueden formar usando mecanismos de ingeniería genética conocidos en la técnica. Alternativamente, los que incluyen modificaciones post-traduccionales u otras modificaciones se pueden preparar mediante una combinación de mecanismos recombinantes y modificaciones químicas. En una realización, los péptidos FKBP-L se producen de forma recombinante usando tecnología de proteínas de fusión descrita en la presente memoria o conocida de otra manera en la técnica (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925). Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican un homodímero descrito en la presente memoria se pueden generar por ligación de una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido FKBP-L descrito en la presente memoria a la secuencia que codifica un polipéptido conector y después adicionalmente a un polinucleótido sintético que codifica el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa desde el extremo C-terminal original al extremo N-terminal (que carece de la secuencia líder) (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925). Los mecanismos recombinantes descritos en la presente memoria o conocidos de otra manera en la técnica se pueden aplicar para generar (poli)péptidos FKBP-L recombinantes que contienen un dominio transmembrana (o péptido hidrófobo o señal) y que se pueden incorporar mediante mecanismos de reconstitución de membranas en liposomas (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5478925).

Pro-Fármacos

Los polipéptidos descritos en la presente memoria están destinados, por lo menos en algunas realizaciones, a ser administrados a un ser humano u otro mamífero para tratar o prevenir un trastorno asociado con la angiogénesis.

Los péptidos se administran típicamente por vía parenteral, p. ej., por medio de inyección intravenosa, subcutánea, o intramuscular, o a través de la cavidad intranasal, y pueden ser metabolizados fácilmente por las proteasas del plasma. En algunos casos, el péptido FKBP-L puede ser liberado en microcápsulas de poli(DL-lactida-co-glicólido) de liberación controlada durante 30 días.

Se han desarrollado diversos profármacos que permiten la administración parenteral y oral de péptidos terapéuticos. Los péptidos o polipéptidos se pueden conjugar con diversos radicales, tales como radicales poliméricos, para modificar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos peptídicos, por ejemplo, para aumentar la resistencia a la degradación ácida y enzimática y para mejorar la penetración de tales fármacos a través de las membranas mucosas. Por ejemplo, Abuchowski y Davis han descrito varios métodos para la derivatización de enzimas para proporcionar, productos estabilizados in vivo, no inmunogénicos, solubles en agua ("Soluble polymers-Enzyme adducts", *Ezymes as Drugs*, Eds. Holcenberg and Roberts, J. Wiley and Sons, Nueva York, NY (1981)).

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los péptidos FKBP-L se pueden conjugar con polímeros, tales como dextranos, polivinilpirrolidonas, glicopéptidos, polietilenglicol y poliaminoácidos. Los polipéptidos conjugados resultantes conservan sus actividades biológicas y su solubilidad en agua para aplicaciones parenterales. En una realización, los péptidos FKBP-L pueden estar acoplados a polietilenglicol o polipropilenglicol que tiene un peso molecular de 500 a 20.000 Daltons para proporcionar una composición de polipéptido soluble en agua no inmunogénica fisiológicamente activa (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.179.337 y Garman, A.J., y Kalindjian, S.B., *FEBS Lett.*, 1987, 223, 361-365). El polietilenglicol o el polipropilenglicol pueden proteger al polipéptido de la pérdida de actividad y la composición puede ser inyectada en el sistema circulatorio de mamíferos sustancialmente sin respuesta inmunogénica. En otras realizaciones, el FKBP-L está acoplado a un oligómero que incluye restos lipófilos e hidrófilos (véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5681811, 5438040 y 5359030).

Los profármacos se pueden preparar por ejemplo, preparando en primer lugar un reactivo de anhídrido maleico a partir de MPEG5000 polidisperso y luego conjugando este reactivo con los polipéptidos descritos en la presente memoria. La reacción de aminoácidos con anhídridos maleicos es bien conocida. La hidrólisis del enlace maleilo-amida para reformar el fármaco que contiene amina es ayudada por la presencia del grupo carboxilo libre vecino y la geometría del ataque creado por el doble enlace. Los péptidos pueden ser liberados (por hidrólisis de los profármacos) en condiciones fisiológicas.

Los polipéptidos también se pueden acoplar a polímeros, tales como PEG polidisperso, a través de una unión degradable, por ejemplo, la unión degradable mostrada (con respecto al interferón α -2b pegilado) en Roberts, M.J., et al., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 459-476.

Los polipéptidos también se pueden acoplar a polímeros tales como PEG utilizando estrategias de eliminación de 1,6 o 1,4 bencilo (BE) (véanse, p. ej., Lee, S., et al., *Bioconjugate Chem.*, (2001), 12, 163-169; Greenwald, R.B., et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.180.095, 2001; Greenwald, R.B., et al., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3657-3667); el uso de lactonización de bloqueo de trimetilo (TML) (Greenwald, R.B., et al., *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 475-487); el acoplamiento de ácido carboxílico de PEG a un conector de ácido carboxílico terminado en hidroxilo (Roberts, M.J., *J. Pharm. Sci.*, 1998, 87(11), 1440-1445), y profármacos de PEG que implican familias de éteres fenílicos de o MPEG y MPEG benzamidas unidos a un fármaco que contiene amina a través de un carbamato de arilo (Roberts, M.J., et al., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 459-476), incluyendo una estructura de profármaco que implica una relación *meta* entre el carbamato y la amida o éter de PEG (Patente de los Estados Unidos Núm. 6413507 de Bently, et al.); y profármacos que implican un mecanismo de reducción en oposición a un mecanismo de hidrólisis (Zalipsky, S., et al., *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10(5), 703-707).

Los polipéptidos FKBP-L de la presente invención tienen grupos amino, amido, hidroxilo y/o carboxílico, y estos grupos funcionales se pueden utilizar para convertir los péptidos en profármacos. Los profármacos incluyen compuestos en los que un residuo de aminoácido, o una cadena polipeptídica de dos o más (p. ej., dos, tres o cuatro) residuos de aminoácidos están unidos covalentemente a través de enlaces peptídicos a grupos amino, hidroxilo o ácido carboxílico de diversos polímeros, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol.

Los profármacos también incluyen compuestos en los que PEG, carbonatos, carbamatos, amidas y ésteres de alquilo están unidos covalentemente a los péptidos anteriores a través de ácidos carboxílicos C-terminales. Por ejemplo, el Péptido 1 según se utiliza en la presente memoria es un péptido FKBP-L que tiene grupos PEG C-terminales. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención comprenden la adición de PEG específica del sitio.

Los inhibidores enzimáticos se pueden utilizar para disminuir la tasa de degradación de las proteínas y péptidos en el tracto gastrointestinal. O bien, el pH en el tracto digestivo puede ser manipulado para inactivar las enzimas digestivas locales. O bien, se pueden utilizar intensificadores de la penetración para mejorar la absorción de péptidos mediante el aumento de su transporte paracelular y transcelular. O bien, se pueden utilizar nanopartículas como portadores particulados para facilitar la absorción intacta por el epitelio intestinal, especialmente, las placas de

Peyer, y para aumentar la resistencia a la degradación enzimática. En otras realizaciones, se pueden utilizar emulsiones líquidas para proteger el fármaco de la degradación química y enzimática en el lumen intestinal, o se pueden utilizar formulaciones de micelas para fármacos escasamente solubilizados en agua.

Por lo tanto, en realizaciones alternativas, los polipéptidos se pueden proporcionar en una cápsula o comprimido adecuados con un recubrimiento entérico, de modo que el péptido no se libere en el estómago. Alternativamente, o adicionalmente, el polipéptido se puede proporcionar como un profármaco, tales como los profármacos descritos anteriormente. En una realización, los polipéptidos están presentes en estos dispositivos de administración de fármacos como profármacos.

Se considera que los profármacos que comprenden los polipéptidos de la invención o los pro-fármacos a partir de los cuales se liberan o son liberables los péptidos de la invención (incluyendo los análogos y fragmentos) son análogos de la invención.

El uso de péptidos marcados con isótopos o profármacos peptídicos también está incluido en la invención. Tales péptidos o profármacos peptídicos son idénticos a los péptidos o profármacos peptídicos de la invención, pero por el hecho de que uno o más átomos están reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferentes de la masa atómica o el número másico encontrados habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de los isótopos que se pueden incorporar a los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, yodo y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{125}I y ^{35}S , respectivamente. Los polipéptidos de la presente invención, los profármacos de los mismos, y/o los profármacos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de esta invención. Ciertos compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los cuales se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en análisis de distribución en tejidos de fármacos y/o sustratos. Los isótopos tritados, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo aumento de la vida media in vivo o menores requisitos de dosificación y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Los péptidos y profármacos de los mismos marcados isotópicamente se pueden preparar generalmente llevando a cabo procedimientos conocidos fácilmente, incluyendo la sustitución de un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente, *p. ej.*, un aminoácido marcado.

Ácidos nucleicos

Los péptidos para su uso en la presente invención se pueden producir mediante la utilización de ácido nucleico en un sistema de expresión. Por ejemplo, en un aspecto, los ácidos nucleicos que se pueden usar en la invención incluyen cualquier polinucleótido aislado que codifica los polipéptidos de la invención. En una realización preferida, el polinucleótido comprende cualquiera de las secuencias de ácido nucleico que se muestran en los SEQ ID NO: 30-39 (FIG. 2). Las secuencias que codifican fragmentos adicionales de FKBP-L, *p. ej.*, SEQ ID NO: 10-28, pueden derivar de la secuencia de ácido nucleico completa, e incluyen secuencias de ácidos nucleicos degeneradas, como es sabido en la técnica. Los Ejemplos 1, 2 y 17 proporcionan descripciones de los vectores que se pueden usar para expresar polipéptidos FKBP-L de la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos FKBP-L para su uso en la presente invención pueden comprender ADN o ARN. Los constructos de ácido nucleico se pueden producir de forma recombinante, de forma sintética, o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica, incluyendo la clonación utilizando mecanismos convencionales.

La molécula de ácido nucleico se puede insertar en cualquier vector apropiado. Un vector que comprende un ácido nucleico de la invención forma un aspecto adicional de la presente invención. En una realización, el vector es un vector de expresión y el ácido nucleico está unido operablemente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona. Se puede utilizar una variedad de vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados pueden incluir virus (*p. ej.*, virus vaccinia, adenovirus, etc.), baculovirus; vectores de levaduras, fagos, cromosomas, cromosomas artificiales, plásmidos, cósmidos de ADN y liposomas, poliplejos, o células mesenquimales (*p. ej.*, células madre, macrófagos).

Los vectores se pueden utilizar para introducir los ácidos nucleicos de la invención en una célula anfitriona. Se puede utilizar una amplia variedad de células anfitrionas para la expresión del ácido nucleico de la invención. Las células anfitrionas adecuadas para su uso en la invención pueden ser procariotas o eucariotas. Estas incluyen bacterias, *p. ej.*, *E. coli*, levaduras, células de insecto y células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NSO, líneas celulares de mono y humanas y sus derivados y muchas otras.

Se puede utilizar una cepa de células anfitrionas que modula la expresión de, modifica, y/o específicamente procesa el producto génico. Dicho tratamiento puede implicar la glicosilación, la ubiquitinación, la formación de enlaces disulfuro y la modificación post-traducciona general.

Para más detalles relativos a las técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, véanse, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, 2ª ed., Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992 y, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido FKBP-L (o un ácido nucleico que codifica un polipéptido FKBP-L). Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, o tópica.

La formulación puede ser un líquido, por ejemplo, una solución salina fisiológica que contiene un tampón distinto de fosfato a pH 6,8-7,6, o un polvo liofilizado.

Dosis

Las composiciones se administran preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esto suficiente para mostrar un beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y curso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que esté siendo tratado. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones sobre la dosificación, etc., está en última instancia, dentro de la responsabilidad y a discreción de los médicos generales y otros médicos, y típicamente tiene en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de liberación, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos.

En realizaciones alternativas, un rango de dosis del FKBP-L de 24 unidades sería de 30 mg/kg/día a 0,00003 mg/kg/día, o de 3 mg/kg/día a 0,0003 mg/kg/día, o de 0,3 mg/kg/día a 0,03 mg/kg/día. Estas dosis equivalen a de 10^{-5} M a 10^{-12} M o de 10^{-6} M a 10^{-11} M o de 10^{-7} M a 10^{-10} M in vitro, respectivamente.

Administración

A. Péptidos FKBP-L

Los polipéptidos de, y para su uso en, la presente invención se pueden administrar solos, pero se administrarán preferiblemente en forma de una composición farmacéutica, que generalmente comprenderá un excipiente, diluyente o portador farmacéutico adecuado seleccionado dependiendo de la vía de administración deseada.

Los polipéptidos se pueden administrar a un paciente que necesite tratamiento a través de cualquier ruta adecuada. La dosis precisa dependerá de numerosos factores, incluyendo la naturaleza precisa del péptido.

Algunas rutas adecuadas de administración incluyen (pero no se limitan a) la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), subcutánea, vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural).

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la técnica son bien capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de solución de Ringer, inyección de solución de Ringer con lactato añadido. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un coadyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, o aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa

u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

La composición también se puede administrar a través de microesferas, liposomas, otros sistemas de liberación en micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos incluyendo la sangre. Los ejemplos adecuados de portadores de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., supositorios o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen polilactidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919; Patente EP-A-0058481) copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al, Biopolymers 22(1): 547-556, 1985), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o acetato de etilenvinilo (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981 y Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982). Los liposomas que contienen los polipéptidos se preparan por medio de métodos bien conocidos: documentos DE 3.218.121A; Epstein et al., PNAS USA, 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., PNAS USA, 77: 4030-4034, 1980; EP-A-0052522; E-A-0036676; EP-A-0088046; EP-A-0143949; EP-A-0142541; JP-A-83-11808; Patente de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545. Normalmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido lipídico es superior a aproximadamente 30 por ciento en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada a la tasa óptima de fuga de polipéptido.

Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que se pueden utilizar de acuerdo con la invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A. (ed), 1980.

Asimismo, se puede utilizar terapias dirigidas para administrar el agente activo p. ej., el polipéptido más específicamente, p. ej., al tejido neoplásico o al tejido de la retina, mediante el uso de sistemas tales como anticuerpos o ligandos específicos de células.

En otras realizaciones, los péptidos recombinantes o sintéticos purificados se pueden tratar con agentes para adjuntar radicales a la proteína que puedan facilitar el entrecruzamiento. Estos radicales pueden ser agentes de entrecruzamiento fotoactivables tales como benzofenona o entrecruzadores químicos tales como maleimida o ésteres activados. Así, por ejemplo, es posible hacer reaccionar los residuos de cisteína den FKBPL con derivados maleimida de benzofenona, o derivados maleimida de fenilazida para el entrecruzamiento fotoactivable o con agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales que contienen maleimida y un éster activado, por ejemplo. Como es sabido en la técnica, hay una variedad de entrecruzadores hetero- y homobifuncionales que se podría unir a FKBPL y después utilizar para el entrecruzamiento a otras biomoléculas a través de reacciones de formación de amida, tioéter, hidrazona, oxima etc. En una realización, es posible introducir estos agentes de entrecruzamiento en péptidos sintéticos de una manera específica del sitio usando procedimientos de síntesis química totales. Alternativamente, los grupos fotoactivables se pueden introducir específicamente en el extremo C-terminal, o se pueden introducir agentes de entrecruzamiento en FKBPL recombinante de una manera específica utilizando enfoques de ligación de proteínas.

El péptido FKBP-L también se puede administrar con agentes terapéuticos adicionales como se describe con más detalle en la presente memoria.

B. Ácidos nucleicos que codifican FKBP-L

En una realización, la secuencia codificante de un polipéptido o un ácido nucleico FKBP-L se inserta en un vector de expresión. Una secuencia reguladora que comprende un promotor que es operable en la célula anfitriona de interés, luego se puede unir a la secuencia de ADNc usando técnicas moleculares. También se pueden utilizar otras secuencias reguladoras, tales como uno o más de una secuencia intensificadora, un intrón con sitios donadores y aceptores de empalme funcionales, una secuencia señal para dirigir la secreción del polipéptido recombinante, una secuencia de poliadenilación, otras secuencias terminadoras de la transcripción, y una secuencia homóloga al genoma de la célula anfitriona. Otras secuencias, tales como un origen de replicación, se pueden añadir al vector también para optimizar la expresión del producto deseado. Asimismo, se puede incluir un marcador seleccionable en el vector para la selección de la presencia del mismo en las células anfitrionas transformadas.

Las secuencias reguladoras pueden derivar de varias fuentes. Por ejemplo, una o más de ellas pueden estar normalmente asociadas con la secuencia codificante, o puede derivada de, o ser homóloga a, sistemas reguladores presentes en la célula anfitriona de interés. Los diversos componentes del vector de expresión se pueden unir entre sí directamente o mediante conectores que constituyen sitios de reconocimiento por medio de enzimas de restricción como es sabido en la técnica.

Cualquier promotor que permita la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido FKBP-L se puede utilizar en la presente invención. Por ejemplo, las secuencias promotoras de mamífero que se pueden utilizar son aquellas de virus de mamíferos que son altamente expresadas y que tienen una amplia gama de anfitriones.

El promotor puede ser un promotor que se expresa constitutivamente en la mayoría de las células de mamífero. Los

ejemplos de los elementos adecuados que hacen posible la expresión constitutiva en eucariotas son los promotores que son reconocidos por la ARN polimerasa III o los promotores virales, intensificador de CMV, promotor de CMV, promotor de SV40 o promotores de LTR, p. ej., de MMTV (virus de tumor mamario de ratón (p. ej., Lee et al., 1981, Nature, 214, 228-232) y otros promotores virales y secuencias activadoras, derivados de, p. ej., HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV o VIH. Otros ejemplos de elementos que hacen posible la expresión regulada en eucariotas son el operador de tetraciclina combinado con un represor correspondiente (Gossen M., et al., 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5, 516-20). En una realización, la expresión de la secuencia de FKBP-L puede tener lugar bajo el control de promotores específicos de tejido.

Alternativamente, el promotor puede ser un promotor que se activa en un momento particular en el ciclo celular o fase de desarrollo. Por ejemplo, los constructos pueden comprender elementos regulables que hacen posible la expresión específica de tejido en eucariotas, tales como promotores o secuencias activadoras de promotores o intensificadores de aquellos genes que codifican las proteínas que solo se expresan en determinados tipos de células. Los ejemplos de los elementos regulables que hacen posible la expresión específica del ciclo celular en eucariotas son los promotores de los siguientes genes: cdc25A, cdc25B, cdc25C, ciclina A, ciclina E, cdc2, E2F-1 a E2F-5, B-myb o DHFR (véanse pp. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.856.185; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.903.078; y Zwicker J. y Muller R., 1997, Trends Genet., 13, 3-6). El uso de promotores regulados por el ciclo celular se puede emplear cuando la expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos utilizados de acuerdo con la invención ha de ser restringida a las células en proliferación. Otros ejemplos incluyen promotores controlados por la hipoxia, la radiación, el calor, o similares.

En otra realización, un elemento intensificador se puede combinar con una secuencia promotora. Tales intensificadores no solo pueden amplificar, si no que también pueden regular la expresión del gen de interés. Los elementos intensificadores adecuados para su uso en los sistemas de expresión e mamíferos son, por ejemplo, aquellos derivados de virus que tienen una amplia gama de anfitriones, tales como el intensificador del gen temprano de SV40, el intensificador/promotor derivado de la LTR del virus del sarcoma de Rous, y de citomegalovirus humanos. Además, otros intensificadores adecuados incluyen aquellos que se pueden incorporar a las secuencias de promotores que se activan solamente en presencia de un inductor, tal como una hormona, un ión metálico, o un sustrato enzimático, como es sabido en la técnica.

En otra realización de la presente invención, una secuencia de terminación de la transcripción se puede colocar en 3' con respecto al codón de parada de la traducción de la secuencia codificante del gen de interés. Por lo tanto, la secuencia de terminación, junto con el promotor, flanquearían la secuencia codificante.

El vector de expresión también puede contener un origen de replicación de manera que el vector se puede mantener como un replicón, capaz de replicación autónomamente y de mantenimiento estable en un anfitrión. Semejante origen de replicación incluye aquellos que permiten que un vector de expresión sea reproducido a un número elevado de copias en presencia de las proteínas apropiadas dentro de la célula, por ejemplo, 2μ y las secuencias de replicación autónoma que son eficaces en levaduras, y el origen de replicación del antígeno T vital de SV40, que es eficaz en células COS-7. Los sistemas de replicación de mamíferos pueden incluir los derivados de virus animales que requieren factores de transactivación para replicar. Por ejemplo, se pueden utilizar el sistema de replicación de papovavirus, tal como SV40, el poliomavirus que replican a un número extremadamente elevado de copias en presencia del antígeno T vital apropiado, o los derivados de papilomavirus bovino y de virus de Epstein-Barr.

En algunos casos, el vector de expresión puede tener más de un sistema de replicación, permitiendo de ese modo que se mantenga, por ejemplo, en células de mamífero para la expresión y en un anfitrión procariota para clonación y amplificación (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.677.278).

En una realización, se puede hacer que el vector de expresión se integre en el genoma de la célula anfitriona como un vector de integración. El vector de integración en la presente memoria puede contener al menos una secuencia de polinucleótidos que es homóloga al genoma de la célula anfitriona que permite que el vector se integre. Por ejemplo, en una realización, se pueden utilizar secuencias de inserción de bacteriófago o transposón.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se pueden incluir uno o más marcadores seleccionables en el vector de expresión para permitir la selección de las células anfitrionas que han sido transformadas. Los marcadores seleccionables que se pueden expresar en una célula anfitriona incluyen genes que puede hacer la célula anfitriona resistente a fármacos tales como tunicamicina, G418, ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), y tetraciclina. Se pueden utilizar marcadores seleccionables que también incluyen genes biosintéticos, tales como los de las rutas biosintéticas de histidina, triptófano y leucina, tales como ade2, his4, leu2, trp1, o que proporcionan a las células anfitrionas la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tales como un metal.

Se puede utilizar una variedad de métodos para transferir un polinucleótido que codifica el polipéptido FKBP-L y/o un ácido nucleico codificante de ADN anti-sentido de FKBP-L o un ARNip de FKBP-L en las células anfitrionas. Por lo

tanto, las formulaciones de la presente invención pueden comprender componentes específicos que facilitan la transferencia de ácidos nucleicos a células.

Por ejemplo, para permitir la introducción de ácidos nucleicos en una célula eucariota y/o procariota por medio de transfección, transformación o infección, el ácido nucleico puede estar presente en forma de un plásmido, como parte de un vector viral o no viral. Los vectores virales adecuados pueden incluir baculovirus, virus vaccinia, lentivirus (véase, p. ej., Siprashvili y Khavari, *Mol. Ther.*, 2004, 9, 93-100), adenovirus, virus adeno-asociados y herpesvirus. Los ejemplos de vectores que tienen actividad en terapia génica son vectores de virus, por ejemplo vectores adenovirales o vectores retrovirales (Lindemann et al., 1997, *Mol. Med.*, 3, 466 a 76; Springer et al., 1998, *Mol. Cell.*, 2, 549-58). Asimismo, los vectores de expresión eucariotas son apropiados en forma aislada para su uso en terapia génica ya que el ADN desnudo puede penetrar en ciertas células (Hengge et al., 1996, *J. Clin. Invest.*, 97, 2911-6; Yu et al., 1999, *J. Invest. Dermatol.*, 112, 370-5). Se puede obtener otra forma de vectores de terapia génica mediante la aplicación de un ácido nucleico descrito anteriormente a partículas de oro y el disparo de éstos en el tejido, preferiblemente en la piel, o las células con la ayuda de la llamada pistola de genes (Wang et al., 1999, *J. Invest. Dermatol.*, 112, 775-81; Tüting et al., 1998, *J. Invest. Dermatol.*, 111, 183-8).

En realizaciones alternativas, se pueden utilizar liposomas para facilitar la transferencia de un polinucleótido que codifica FKBP-L a las células. Los liposomas son vesículas pequeñas elaboradas artificialmente con una membrana de bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos (Jeschke, M.G. et al., *Gene Ther.*, 12, 1718-1724 (2005); Patente de los Estados Unidos Núm. 6.576.618). Los ácidos nucleicos, las proteínas y otros materiales biológicos pueden estar encerrados en liposomas para la liberación en células de mamíferos a través de la fusión con la membrana plasmática de la célula. Los liposomas pueden ser un sistema de liberación atractivo debido a que no son virales, son estables y pueden interactuar con la membrana celular.

Los liposomas pueden estar compuestos por lípidos catiónicos, aniónicos, o neutros, y mezclas de los mismos (Luo, D. y Saltzman, W.M., *Nat. Biotech.*, 18, 33-37 (1999)). Para la transferencia de ADN, los lípidos también se pueden modificar químicamente para incorporar grupos químicos para facilitar la condensación o la liberación del ADN. Los lípidos catiónicos, tales como los detergentes de amonio cuaternario, los derivados catiónicos de colesterol y diacilglicerol, y los derivados lipídicos de poliaminas, pueden ser favorecidos para la transfección a células debido a que disminuyen la carga neta negativa del ADN y facilitan su interacción con las membranas celulares (Nishikawa, M. y Huang, L., *Hum. Gene Ther.*, 12, 861-70 (2001)). Los lípidos neutros, tales como la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), el dilaurato de glicerol, polioxietilen-10-estearil éter (POE-10), y el colesterol, se pueden añadir como "lípidos coadyuvantes" a los complejos de ADN-lípido catiónico para facilitar la liberación del ADN a partir del endosoma después de captación endocítica del complejo. También se pueden utilizar coadyuvantes que aumentan la transferencia de ADN, tales como polímeros o proteínas que se unen al ADN o a moléculas sintéticas de ADN-péptido que hacen posible el transporte del ADN al núcleo de la célula de manera más eficiente (véase, p. ej., Niidome, T. y Huang, L., *Gene Ther.*, 9, 1647-52 (2002)). Por lo tanto, los polímeros catiónicos, tales como polilisina o protamina, se pueden utilizar en los complejos de lípido y ADN ya que provocan la condensación densa del ADN, lo que evita la agregación del complejo y la degradación por nucleasas. Por ejemplo, la mezcla de liposomas de 1,2-dioleoil-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP) con sulfato de protamina antes de la mezcla con el ADN plasmídico produjo pequeñas partículas de 135 nm, que eran estables y dieron como resultado un elevado nivel de expresión génica en una variedad de tejidos (p. ej., pulmón, hígado, corazón) (Li, S. et al., *Gene Ther.*, 5, 930-37 (1998)). La inclusión de colesterol como un lípido coadyuvante puede aumentar la eficacia de transfección de los complejos de liposoma-péptido-ADN. Asimismo, el ADN del gen de luciferasa o de β -galactosidasa puede ser previamente compactado con péptidos cortos derivados de histona o protamina humanas antes de la adición de un lípido catiónico (Lipofectamine RPR 115335 o RPR 120535) o polímero (polietilenimina) para lograr una mayor eficacia de transfección, incluso en presencia de suero (véase, p. ej., Schwartz, B. et al., *Gene Ther.*, 6, 282-92 (1999)).

Como es sabido en la técnica, los liposomas se pueden elaborar calentando lípidos para formar una fase lipídica (Wu, H. et al., *Int. J. Pharmaceut.*, 221, 23-24 (2001)). Después se puede mezclar una fase acuosa que contiene agua, sales o tampón con la fase lipídica haciendo pasar la mezcla hacia adelante y hacia atrás entre jeringas en condiciones de enfriamiento, seguido de sonicación hasta alcanzar un tamaño de los liposomas final de 100 a 140 nm. El ADN o la proteína que se van a incluir en el liposoma se añade a continuación (en forma de una solución) mezclar por inversión. La elección de los lípidos utilizados, su razón, la concentración de ADN utilizada en la creación de los liposomas y la cantidad de liposomas añadidos generalmente requerirá una determinación empírica para su optimización. Los coadyuvantes para facilitar la transferencia de ADN, tales como péptidos, se pueden mezclar con el ADN antes de la adición a la mezcla de liposomas pero el coadyuvante de ADN debe mantener una solubilidad suficientemente alta para una encapsulación adecuada dentro de la fase lipídica externa del liposoma.

Alternativamente, las pequeñas vesículas unilamelares se pueden preparar por tratamiento ultrasónico de una suspensión de liposomas compuesta por lípidos catiónicos, tales como Cytofectin GS 2888, mezclados con bromuro de 1,2-dioleoilxipropil-3-trimetilamonio (DOTMA) o bromuro de dioleoilfosfatidiletanolamina (DPOE). Después de mezclar por inversión, el ADN o la proteína se pueden unir iónicamente a la superficie de los liposomas, a una razón que mantiene una carga neta positiva en el complejo a la vez que tiene el ADN formando complejo con el 100% de

los liposomas. Asimismo, los detergentes de tiol catiónico dimerizable se pueden usar para preparar liposomas para la liberación de ADN (véase, p. ej., Dauty, E. et al., J. Am. Chem. Soc., 123, 9.227-34 (2001)). Tras la oxidación, los grupos tiol en el lípido se pueden convertir en disulfuros y hacer que el complejo de ADN-lípido forme una partícula nanométrica estable que puede unirse electrostáticamente a los proteoglicanos de heparán sulfato aniónico de la superficie celular para la captación celular. Una vez dentro de la célula, el medio ambiente reductor proporcionado por el glutatión intracelular reduce los disulfuros de nuevo a tioles y libera el ADN.

Anticuerpos terapéuticos

También se describe en la presente memoria el uso terapéutico de un anticuerpo que tiene especificidad inmunológica para FKBP-L (o fragmentos o equivalentes funcionales de los mismos, como se comenta más abajo) para regular a la baja específicamente la actividad de FKBP-L *in vivo*. Tales anticuerpos son útiles en el tratamiento de enfermedades que se benefician de la regulación a la baja específica de la actividad de FKBP-L, en determinadas enfermedades/afecciones que se benefician de estimulación/regulación al alza de la angiogénesis. También se describe en la presente memoria el uso de un anticuerpo que tiene especificidad inmunológica para FKBP-L (o un fragmento o equivalente funcional del mismo) para promover la angiogénesis, también el uso de un anticuerpo que tiene especificidad inmunológica para FKBP-L (o un fragmento o equivalente funcional del mismo) para promover la curación de heridas.

El término "anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria abarca los anticuerpos purificados o aislados de origen natural de cualquier isotipo que tienen la especificidad inmunológica requerida, así como los anticuerpos producidos sintéticamente o análogos estructurales de los mismos. Las preparaciones de anticuerpos pueden ser policlonal o monoclonal. La referencia a un "anticuerpo" tal como se describió anteriormente incluye no solamente moléculas de anticuerpos completas, si no también fragmentos de los mismos que conservan su capacidad de unión al antígeno sustancial (es decir, FKBP-L). No es necesario que cualquiera de las funciones efectoras sea conservada en tales fragmentos, aunque pueden estar incluidas. Los fragmentos de anticuerpos adecuados que se pueden utilizar incluyen, entre otros, fragmentos F(ab')₂, ScAbs, Fv, fragmentos scFv y nanocuerpos etc. Los fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula pueden ser generados por medio de técnicas conocidas, por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan al fragmento F(ab')₂ que se puede producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; fragmentos Fab' que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂ y los fragmentos Fab que se pueden generar tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor. Otros fragmentos de anticuerpos con la actividad de unión a antígeno requerida se pueden preparar por medio de mecanismos de expresión recombinante generalmente conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales humanizados quiméricos y totalmente humanizados se pueden preparar por modificación genética recombinante. Mediante la adición de la cadena constante humana a fragmentos F(ab')₂ es posible crear un anticuerpo monoclonal humanizado que es útil en aplicaciones de inmunoterapia donde los pacientes que elaboraran anticuerpos contra la Ig de ratón estarían de otro modo en desventaja. Breedveld F.C. Therapeutic Monoclonal Antibodies. Lancet 2000 26 de Febrero; 335, P735-40. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos recombinantes se pueden preparar ventajosamente mediante expresión recombinante en células anfitrionas de mamífero (p. ej., células CHO).

Los anticuerpos monoclonales con especificidad inmunológica para FKBP-L se pueden preparar por inmunización de un animal anfitrión adecuado (p. ej., ratón o conejo) con un antígeno de sensibilización adecuado (p. ej., FKBP-L completo o un epítipo del mismo).

Usos Terapéuticos

Los polipéptidos y ácidos nucleicos de, y para su uso en, la invención se pueden usar en el control y/o el tratamiento de una amplia variedad de afecciones clínicas en mamíferos, incluyendo seres humanos. Los polipéptidos y métodos de la invención se pueden utilizar en el tratamiento de una afección o trastorno para el que los agentes anti-angiogénicos pueden ser terapéuticamente útiles.

Según se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" o "terapia" incluye cualquier régimen que puede beneficiar a un ser humano o animal no humano. El tratamiento puede ser con respecto a una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, alivio o profilácticos.

La migración celular, la angiogénesis y las indicaciones relacionadas (p. ej., crecimiento y/o metástasis del tumor) pueden ser inhibidas mediante la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido FKBP-L o un ácido nucleico que codifica dicho péptido a un paciente en necesidad de semejante tratamiento. Los usos se pueden utilizar para tratar tumores, diversos trastornos autoinmunitarios, trastornos hereditarios, y trastornos oculares.

Los usos terapéuticos descritos en la presente memoria implican típicamente la administración de una cantidad eficaz de péptidos, ácidos nucleicos o composiciones que incluyen el polipéptido o ácido nucleico de la invención a

un paciente. La dosis exacta que se va a administrar variará de acuerdo con el uso de las composiciones y la edad, el sexo y las condiciones del paciente, y puede ser determinada fácilmente por el médico a cargo. Las composiciones se pueden administrar en forma de una dosis única o de una manera continua durante un periodo de tiempo. Las dosis se pueden repetir según sea apropiado.

Se describe en la presente memoria el tratamiento de trastornos mediados por angiogénesis incluyendo hemangioma, tumores sólidos, leucemia, metástasis de linfoma, telangiectasia, psoriasis, endometriosis, arteriosclerosis, escleroderma, granuloma piógeno, angiogénesis miocárdica, enfermedad de Crohn, neovascularización de placas, colaterales coronarias, colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis isquémica de la extremidad, enfermedades de la córnea, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, artritis, neovascularización diabética, degeneración macular, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con *Helicobacter*, fracturas, queloides y vasculogénesis. Los trastornos específicos que se pueden tratar, y los compuestos y las composiciones útiles en estos métodos, se describen con más detalle a continuación.

Carcinomas/Tumores

Los tumores que se pueden tratar incluyen aquellos tumores cuyo crecimiento es promovido por la angiogénesis. En una realización dichos tumores pueden expresar CD44. Los carcinomas que se pueden tratar usando los compuestos, composiciones y métodos de la invención pueden incluir carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, en anillo de sello, carcinoma de esófago, tipo intestinal, tipo mucinoso, carcinoma de páncreas, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma renal, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma testicular, carcinoma de ovario, carcinoma de endometrio, carcinoma de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de laringe, mesotelioma, carcinomas neuroendocrinos, tumores neuroectodérmicos, melanoma, gliomas, neuroblastomas, sarcomas, leiomiomasarcoma, MFII, fibrosarcoma, liposarcoma, MPNT y condrosarcoma.

Para el tratamiento del cáncer, se puede administrar FKBP-L con otros agentes quimioterapéuticos y/o quimiopreventivos conocidos en la técnica. Tales agentes pueden incluir, pero no se limitan a antiangiogénicos, endostatina, inhibidores de la angiostatina y VEGF, talidomida, y otros, o fármacos citotóxicos tales como adriamicina, daunomicina, cis-platino, etopósido, taxol, taxótero y alcaloides, tales como vincristina, inhibidores de farnesil transferasa, y antimetabolitos tales como metotrexato. En realizaciones alternativas, los péptidos FKBP-L o polinucleótidos que codifican polipéptidos FKBP-L pueden ser utilizados con agentes terapéuticos para el cáncer tales como los siguientes: (a) inhibidores del crecimiento del cáncer, incluyendo, pero no limitados a bortezumib, erlotinib, gefitinib, imatinib y sorafenib; (b) enfoques de terapia génica, p. ej., usando constructos de ácido nucleico que codifican genes supresores de tumores o ARNip para oncogenes; (c) vacunas contra el cáncer; (d) interferón; (e) Aldesleucina; (f) anticuerpos monoclonales, incluyendo, pero no limitados a 90Y-ibritumomab tiuxetano, ADEPT, Alemtuzumab, Bevacizumab, Cetuximab, Gemtuzumab, yodo 131 tositumomab, Panitumumab, Rituximab, Trastuzumab; (g) fármacos de quimioterapia incluyendo, pero no limitados a Amsacrina, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carmustina, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, Crisantaspasa, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Docetaxel, Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido, Fludarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, implantes de Gliadel, Hidroxicarbamida, Idarrubicina, Ifosfamida, Irinotecan, Leucovorina, doxorubicina liposomal, Daunorrubicina liposomal, Lomustina, Melfalán, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pemetrexed, Pentostatina, Procarbazona, Raltitrexed, Estreptozocina, Tegafur-uracilo, Temozolomida, Tenipósido, Tiotepa, Tioguanina, Topotecan, Treosulfano, Vinblastina, Vincristina, Vindesina y Vinorelbina; (h) radioterapia; (i) terapias hormonales, incluyendo, pero no limitadas a Anastrozol, Bicalutamida, Buserelina, Ciproterona, Dietilestilbestrol, Exemestano, Flutamida, Fulvestrant, Goserelina (Mama), Goserelina (Próstata), Letrozol, Leuporelina, Medroxiprogesterona, Acetato de megestrol, Tamoxifeno, Toremifeno, y Triptorelina; (j) terapias de apoyo, incluyendo, pero no limitadas a bifosfonatos, transfusiones de sangre, Eritropoyetina, factores de crecimiento hematopoyéticos, intercambio de plasma, transfusiones de plaquetas y esteroides; y (k) otros tratamientos, incluyendo, pero no limitados a terapia hiperbárica de oxígeno, tratamiento de hipertermia y terapia fotodinámica. Tales terapias se pueden utilizar con el tratamiento de FKBP-L ya sea solas o como terapias complementarias.

Trastornos oculares mediados por angiogénesis

Varios trastornos oculares están mediados por la angiogénesis, y pueden ser tratados con los compuestos activos, las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria. Un ejemplo de una enfermedad mediada por la angiogénesis es la enfermedad neovascular ocular, que se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo y es la causa más común de ceguera. En la degeneración macular relacionada con la edad, los problemas visuales asociados son causados por un crecimiento interno de capilares corioidales a través de defectos de la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular por debajo del epitelio pigmentario de la retina. En la forma más severa de la degeneración macular relacionada con la edad (conocido como DMAE "húmeda") la angiogénesis anormal se produce debajo de la retina dando como resultado la pérdida irreversible de la visión. La pérdida de la visión se debe a la cicatrización de la retina secundaria a la hemorragia de los vasos

sanguíneos nuevos. Los tratamientos actuales para la DMAE "húmeda" utilizan terapia basada en láser para destruir los vasos sanguíneos invasores. Sin embargo, este tratamiento no es ideal ya que el láser puede dejar cicatrices en la retina suprayacente de forma permanente y los vasos sanguíneos invasores a menudo vuelven a crecer. Una estrategia de tratamiento alternativa para la degeneración macular es el uso de agentes anti-angiogénesis para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos o la angiogénesis que provoca la pérdida visual más severa de la degeneración macular.

El daño angiogénico también se asocia con retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental. Otras enfermedades asociadas con la neovascularización corneal incluyen, pero no se limitan a, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de Vitamina A, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratoconjuntivitis seca, queratotomía radial pemfigoide, y rechazo de injertos de córnea. Las enfermedades asociadas con la neovascularización retinal/coroidea incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, presunta miopía, foveas papilares, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, trauma y complicaciones post-láser. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal del tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la invención, los compuestos activos, las composiciones y los métodos de la invención se pueden usar en el tratamiento de trastornos oculares mediados por angiogénesis, por ejemplo, la degeneración macular.

Inflamación

Se describe en la presente memoria el uso en el tratamiento de otros trastornos mediados por angiogénesis, tales como la inflamación asociada con angiogénesis, incluyendo varias formas de artritis, tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis. En estos métodos, el tratamiento con combinaciones de los compuestos descritos en la presente memoria con otros agentes útiles para el tratamiento de los trastornos, tales como inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), es bien conocido para los expertos en la técnica.

Los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones pueden experimentar angiogénesis. Las células endoteliales forman nuevas redes vasculares y liberan factores y especies reactivas del oxígeno que conducen al crecimiento de pannus y la destrucción del cartílago. Se cree que estos factores contribuyen activamente a la artritis reumatoide y también a la osteoartritis. La activación de los condrocitos por factores relacionados con la angiogénesis contribuye a la destrucción de las articulaciones, y también promueve la formación de hueso nuevo. Los usos pueden ser utilizados como una intervención terapéutica para prevenir la destrucción ósea y la formación de hueso nuevo.

También se cree que la angiogénesis patológica esta involucrada en la inflamación crónica. Los ejemplos de trastornos que se pueden tratar usando los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bartonellosis, y la aterosclerosis.

Terapias combinadas

En el tratamiento de una enfermedad específica usando un polipéptido o ácido nucleico de la invención, en el tratamiento de una enfermedad específica, los péptidos o ácidos nucleicos se pueden combinar con diversos agentes terapéuticos existentes utilizados para esa enfermedad.

Los polipéptidos FKBP-L también se pueden usar combinados con agentes anticancerígenos tales como antiangiogénicos, endostatina, inhibidores de la angiostatina y VEGF y otros, o fármacos citotóxicos tales como adriamicina, daunomicina, cis-platino, etopósido, taxol, taxótero y alcaloides, tales como vincristina, inhibidores de farnesil transferasa, y antimetabolitos tales como metotrexato. Otros agentes anti-cancerosos y métodos terapéuticos tales como un inhibidor del crecimiento del cáncer, una terapia génica, una vacuna contra el cáncer, interferón, Aldesleuquina, un anticuerpo monoclonal, un fármaco de quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal u otras terapias de apoyo que se puede utilizar con FKBP-L se describen en la presente memoria.

Agentes terapéuticos de oligonucleótidos anti-Sentido y ARNip

A. ARN antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son fragmentos cortos de ADN o ARN que tienen secuencias complementarias a una porción de, o a todo, un ARNm. Al ser complementarios a un ARNm diana concreto, los oligonucleótidos antisentido se unen específicamente a ese ARNm. Se sabe modificar químicamente tales moléculas antisentido para facilitar una unión fuerte. Cuando se produce la unión, la capacidad del ARNm para ser leído por maquinaria de traducción de la célula se inhibe, y la síntesis de la proteína que codifica se bloquea. A diferencia de la inactivación

de genes, esta inhibición puede requerir la presencia continua de la molécula antisentido; por lo tanto, es reversible y la porción puede diseñar inhibidores específicos de un gen de interés basándose solamente en el conocimiento de la secuencia del gen.

Se describe en la presente memoria una molécula de ácido nucleico aislada que es antisentido con respecto a la cadena codificante de un ácido nucleico de la invención. También se describe una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es antisentido con respecto a la cadena codificante de un ARNm que codifica un polipéptido de la invención.

El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una hebra codificante entera, o solamente a una parte de la misma, p. ej., toda o parte de la región codificante de proteína (o marco de lectura abierto). Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido con respecto a toda o parte de una región no codificante de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. Las regiones no codificantes ("regiones no traducidas 5' y 3'") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante y no se traducen a aminoácidos.

Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos o más de longitud. Un ácido nucleico antisentido se puede construir usando síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (p. ej., un oligonucleótido antisentido) se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos naturales o nucleótidos diversamente modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y efectores, p. ej., se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N pronosticado-2-carboxiuracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión en el que un ácido nucleico se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado estará en una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido normalmente se pueden administrar a un paciente. Alternativamente, se podría generar *in situ* de tal manera que las mismas hibridan con o se unen a ARNm celular y/o ADN genómico que codifican un polipéptido seleccionado de la invención para inhibir de ese modo la expresión, p. ej., inhibiendo la transcripción y/o traducción.

La hibridación puede ser por complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a un dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una ruta de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido incluye la inyección directa en un sitio de tejido. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico antisentido se pueden modificar para dirigirse a células diana seleccionadas y después administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden ser modificadas de tal manera que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, p. ej., mediante la conexión de las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores de la superficie celular o antígenos. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren los constructos de vectores en los cuales se coloca la molécula de ácido nucleico antisentido control de un promotor fuerte de pol II o pol III.

Los oligonucleótidos que contienen azúcares naturales (D-ribosa y D-2-desoxirribosa) y enlaces fosfodiéster (PO) se degradan rápidamente por las nucleasas intracelulares y el suero, lo que limita su utilidad como agentes terapéuticos eficaces. Las estrategias químicas para mejorar la estabilidad frente a nucleasa incluyen la modificación del radical de azúcar, el radical de base, y/o la modificación o sustitución del enlace fosfodiéster internucleótido. Hasta la fecha, los análogos más ampliamente estudiados son los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato (PS), en los que uno de los átomos de oxígeno que no se unen por puentes en la cadena principal del fosfodiéster es reemplazado por un azufre (Eckstein, F. Ann. Rev. Biochem. 1985, 54, 367). Un ejemplo de direccionamiento de antisentido de FKBP-L es descrito por Robson et al. (Véase Robson et al., (1999) Radiation Research 152, 451-461; Robson, T., et al., (2000) Int. J. Radiat).

B. ARNip

Los ARN de interferencia pequeños (ARNip) son herramientas poderosas para la desactivación de la expresión génica dirigida post-transcripcional en las células de mamíferos (Elbashir et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411: 494-8).

Los ARNip comprenden típicamente una región específica de la diana de doble hebra que corresponde al gen diana que se va a regular a la baja (es decir, FKBP-L). Esta región específica de la diana de doble hebra típicamente tiene una longitud en el intervalo de 19 a 25 pares de bases. En realizaciones no limitantes específicas, se pueden utilizar ARNip que tienen una región específica de la diana de doble hebra de 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de bases correspondientes al gen diana que va a ser regulados a la baja (FKBP-L).

La región específica de la diana tiene típicamente una secuencia 100% complementaria a una porción del gen diana (FKBP-L). Sin embargo, se apreciará que un 100% de identidad de secuencia no es esencial para la inhibición de ARN funcional. También se ha descubierto que las secuencias de ARN con inserciones, deleciones y mutaciones puntuales individuales en relación con la secuencia diana son eficaces para la inhibición de ARN. Por consiguiente se debe interpretar que el término "correspondiente a", cuando se usa para referirse a la correspondencia de secuencia entre la parte específica de la diana del ARNip y la región diana del gen diana (FKBP-L), no requiere en absoluto una identidad de secuencia de 100%. Sin embargo, el % de identidad de secuencia entre el ARN de doble hebra y la región diana será generalmente de al menos 90%, o al menos 95% o al menos 99%.

Por lo tanto, los ARNip capaces de regular a la baja específicamente la expresión de FKBP-L pueden incluir una porción de doble hebra que comprende o consiste en 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 pares de bases consecutivos de la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 29, o una porción de doble hebra de 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases consecutivas que es idéntica en al menos 90%, o al menos en 95%, o al menos en 99% a una porción de la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 29, o que incluye uno o dos emparejamientos erróneos nucleótidos únicos en comparación con una porción de la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2.

El ARNip se puede diseñar para que se dirija a cualquier región adecuada del transcrito de ARNm de FKBP-L. Se encuentran disponibles algoritmos para el diseño de ARNip, basados esencialmente en las características de la secuencia primaria del ARNip (p. ej., Reynolds A., et al. *Nat Biotechnol*. Mar 2004; 22 (3): 326-30. Epub 2004 1 de Febrero). Un ARNip ilustrativo dirigido a FKBP-L es descrito por Jascur et al. 2006, *Molecular Cell*, 17: 237-239.

El término "regulación a la baja de la expresión génica" se refiere a una reducción medible u observable en la expresión génica o una abolición completa de la expresión del gen detectable, a nivel de producto de proteína y/o producto de ARNm del gen diana (p. ej., FKBP-L). La regulación a la baja de la expresión génica es "específica" cuando la regulación a la baja del gen diana (p. ej., FKBP-L) se produce sin efectos evidentes sobre otros genes.

Los ARNip pueden incluir salientes de hebra sencilla en uno o ambos extremos, flanqueando la región específica de la diana de doble hebra correspondiente a FKBP-L. En una realización concreta, el ARNip puede contener nucleótidos salientes 3', tales como dos timidinas salientes 3' (dTdT) o uridinas (UU). Los salientes 3' TT o UU pueden estar incluidos en el ARNip si la secuencia del gen diana inmediatamente aguas arriba de la secuencia incluida en la porción de doble hebra del ARNip es AA. Esto permite que el saliente de TT o UU del ARNip hibride con el gen diana. Aunque también se puede incluir un saliente 3' TT o UU en el otro extremo del ARNip, no es esencial que la secuencia diana aguas abajo de la secuencia incluida en la porción de doble hebra del ARNip tenga AA.

La porción de doble hebra específica de la diana del ARNip se forma típicamente a partir de dos hebras de ARN recodadas compuestas en su totalidad por ribonucleótidos con enlace fosfodiéster. Sin embargo, los ARNip que son quimeras de ARN/ADN también se contemplan. Estas quimeras incluyen, por ejemplo, los ARNip que comprenden un ARN de doble hebra con salientes 3' de bases de ADN (p. ej., dTdT), como se comentó anteriormente, y también "ARN" de doble hebra, que son polinucleótidos en el que una o más de las bases de ARN o ribonucleótidos, o incluso la totalidad de los ribonucleótidos en toda una hebra, se reemplazan por bases de ADN o desoxinucleótidos. En otras realizaciones, la cadena principal de las hebras de "ARN" en el ARNip se puede modificar, por medio de la inclusión de nucleobases no naturales y/o enlaces de la cadena principal no naturales (véase, por ejemplo Soutschek et al. *Nature*. 11 Nov 2004; 432 (7014): 173-8; Zimmermann T.S., et al. *Nature* 441, 111-4). A modo de ejemplo, se pueden incluir modificaciones 2-O-metilo para estabilizar los ARNip (como describen Soutschek et al. *idem.*).

El ARNip se puede preparar de una manera conocida *per se* en la técnica. Por ejemplo, se pueden sintetizar ARNip *in vitro* usando mecanismos de síntesis de polinucleótidos químicos o enzimáticos bien conocidos en la técnica. En un enfoque las dos hebras separadas del ARNip se pueden sintetizar por separado y luego recocer para formar dobles hebras.

Se sabe que los "ARN exógenos" sin modificar son eficaces en el silenciamiento de genes *in vivo* sin la necesidad de reactivos adicionales (Filleur S, et al. *Cancer Res* 63, 3919-22; Duxbury MS, et al. *Oncogene* 23, 465-73). Los

ARNip se pueden utilizar junto con portadores o vehículos de liberación tales como atelocolágeno (Nozawa H, et al. Sci Cáncer. Oct 2006; 97(10): 1115-1124; Takeshita F, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 23 de Agosto de 2005; 102(34): 12177-82. Epub 9 Agosto 2005) o nanopartículas (Schiffelers RM, et al. Nucleic Acids Res. 1 Nov 2004; 32(19): e149) o portadores basados en lípidos incluyendo, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua, micelas, y liposomas que promueven la absorción. Los vehículos de liberación (p. ej., liposomas y nanopartículas) pueden ser dirigidos a un tejido particular mediante el acoplamiento del vehículo a un ligando específico, tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína.

En lugar de estar formado por dos hebras de ARN separadas recocidas juntas, los "ARNip" pueden tener una estructura de tallo-bucle o de horquilla plegada, en donde las secuencias recocidas que forman la porción específica de la diana del ARNip están unidas covalentemente. Las secuencias recocidas pueden estar presentes en una sola hebra de ARN. Los ARN que tienen esta estructura son típicos si el ARNdh se sintetiza mediante expresión *in vivo* o transcripción *in vitro*. La naturaleza exacta y la secuencia del "bucle" que une las dos hebras de ARN en general, no es significativa, excepto que no debe poner en peligro la capacidad de la porción de doble hebra de la molécula para mediar el ARNi. La estructura de "bucle" no tiene por qué necesariamente formarse a partir de ácidos nucleicos.

Los ARNip (o estructuras precursoras que pueden ser procesadas para producir ARNip, por ejemplo por la acción de la enzima "dicer" endógena) se pueden sintetizar mediante la expresión intracelular en una célula u organismo anfitrión a partir de un vector de expresión adecuado.

Se conocen en la técnica numerosos sistemas de expresión no virales (p. ej., plásmidos) o virales para la expresión *in vivo* de ARNip. En general, los ARNip se expresan como tallos-bucle, que pueden ser procesados rápidamente dentro de la célula para producir el ARNip "libre" (véase la revisión de Tuschl, Nature Biotechnology, vol. 20(5), 446-448, 2002). Los sistemas vectores para la expresión de los ARNip menudo se basan en promotores de ARN Pol III, ya que estos son especialmente adecuados para la expresión exacta de las secuencias de ARN muy cortas.

Los sistemas vectores adecuados se describen, por ejemplo, Brummelkamp, T.R. et al., Science, Vol. 296, 550-553, 2002; Lee, N. S. et al., Nature Biotechnology, Vol. 20, 500-505, 2002; Miyagashi, M & Taira, K. Nature Biotechnology, Vol. 20, 497-500, 2002; Paul, C.P. et al., Nature Biotechnology, Vol. 20, 505-508, 2002, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia.

Los ARNip se pueden formular en composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico en combinación con cualquier portador fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptable conocidos en la técnica.

Direccionamiento

Se pueden utilizar terapias dirigidas para liberar el agente activo, p. ej., el polipéptido, más específicamente en tejidos o células concretos, mediante el uso de sistemas de direccionamiento, tales como anticuerpos o ligandos específicos de células. Estos sistemas dirigidos pueden estar unidos covalentemente a la secuencia peptídica, o a un vehículo de administración de fármaco (tal como un liposoma, microesfera, micropartícula, microcápsula y similar). Los polipéptidos también se pueden dirigir a lechos de tumores en crecimiento (que se asocian con lechos capilares adjuntos) mediante la incorporación de los péptidos a micropartículas u otros vehículos de liberación de fármacos que son de tamaño adecuado para que pasen a través de las venas, pero se alojen en los lechos capilares. Cuando se alojan en los lechos, los polipéptidos pueden ser liberados localmente (en lugar de ser liberados sistémicamente) en un lugar en el que son más útiles. Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se extiende además a métodos de terapia génica que utilizan nucleótidos de la invención.

En otra realización, los péptidos FKBP-L se pueden utilizar para dirigir los agentes citotóxicos a las células tumorales. Por lo tanto, en una realización, el péptido FKBP-L se puede conjugar con un agente citotóxico usando métodos conocidos en la técnica. El péptido FKBP-L puede a continuación, por medio de la interacción con CD44, liberar el agente citotóxico para las células que expresan CD44. Cuando el agente citotóxico es un agente que es capaz de inhibir preferentemente el crecimiento de las células tumorales, el agente puede ser activo contra células tumorales CD44 + ve.

Actividad anti- o pro-angiogénesis

Ciertas realizaciones de la presente invención pueden comprender la evaluación de la actividad angiogénica de las composiciones de la invención. La actividad angiogénica se puede evaluar por cualquier medio conocido en la técnica o como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, la actividad de angiogénesis se puede analizar usando cualquier análisis convencional, tal como el análisis de Matrigel y los análisis utilizados en los Ejemplos.

Ejemplos

La invención se puede entender mejor mediante la referencia a los siguientes Ejemplos. La denominación "N"

proporciona el número de experimentos individuales realizados para el ejemplo concreto.

Ejemplo 1: La transfección transitoria de FKBP-L inhibe cierre de heridas (N = 3)

Los experimentos se realizaron para determinar el efecto de FKBP-L (SEQ ID NO: 1; FIG. 1) sobre el cierre de heridas. El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999) The J. of Biol. Chem., 1999, 274: 50, 35562-35570. Las Células Endoteliales Microvasculares Humanas (HMEC1) se sembraron en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia.

La monocapa se transfectó con un constructo de expresión de mamífero pcDNA/FKBP-L que tiene un inserto con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31, en presencia de lipofectina (Invitrogen, Reino Unido). Para preparar el constructo de expresión, el fragmento de ácido nucleico del SEQ ID NO: 31 se escindió de un constructo pUC18 recombinante utilizando BamH1 y se ligó en el sitio de restricción BamH1 de pcDNA3.1 (Invitrogen).

La expresión del inserto de FKBP-L genera el polipéptido recombinante completo en el SEQ ID NO: 2. Al cabo de 6 horas se retiraron los reactivos de transfección y la monocapa se hirió con una punta de pipeta y se volvió a añadir un suplemento de MCDB-131 y se incubó durante 7 horas.

La monocapa se fijó en una solución de paraformaldehído tamponado con PBS al 4% durante 10 minutos. El grado de cierre "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con el tamaño de la herida a tiempo cero.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 3. Se encontró que FKBP-L transfectado transitoriamente produce un péptido equivalente al SEQ ID NO: 2 e inhibe de manera significativa la capacidad de las HMEC-1 para migrar en comparación con lipofectina solamente y control de vector vacío. FKBP-L inhibe la migración de HMEC-1 en 50% en comparación con los controles (reactivos de lipofectina Lipo; vector pcDNA solamente) 7 horas después de la herida. Estos datos sugieren que la proteína FKBP-L es una proteína anti-migratoria potencial.

Ejemplo 2: La proteína FKBP-L recombinante completa inhibe la migración de células endoteliales en el ensayo de cierre de heridas (N = 3)

El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999). Se sembraron HMEC-1 en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se eliminó y la monocapa se hirió. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de proteína FKBP-L etiquetada con His completa recombinante (SEQ ID NO: 1) para proporcionar la concentración final requerida.

Para generar la proteína FKBPL completa recombinante, el ADNc de FKBPL (polinucleótido SEQ ID: 31; variante de polipéptido Thr182, Gly186; SEQ ID NO: 1) se subclonó en pcDNA3.1/FKBPL en los sitios *Bam*HI y *Pst*II del vector pRSET-A (Invitrogen) y se expresó en BL21 (DE3) para proporcionar la proteína etiquetada con poli-histidina (etiqueta de His) N-terminal correspondiente (SEQ ID NO: 1). La expresión se indujo a una DO de 0,6 con IPTG 0,2 mM, cultivando las células durante la noche a 15°C. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se almacenaron a -20°C. La proteína se purificó utilizando purificación IMAC convencional seguido de eliminación de las sales para eliminar cualquier proteína de contaminante de *E. coli* (Véase el ejemplo 32 para obtener una descripción completa). La proteína recombinante expresada tiene un peso molecular calculado de 38 kDa; se encontró que FKBP-L etiquetada con His que tiene un peso molecular calculado de 42.220 Da tenía un peso molecular de 42 kDa según se determinó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).

Las monocapas se incubaron durante 7 horas después de la exposición a la proteína FKBP-L recombinante y a continuación se fijaron en paraformaldehído tamponado PBS al 4%. El grado de cierre "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1mm/100µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles de tratamiento simulado coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 4. Se puede observar que el tratamiento con proteína recombinante FKBP-L dio como resultado una inhibición significativa de la migración, induciendo una concentración óptima de 750 ngml⁻¹ una inhibición de 60% de la migración de HMEC-1 en la zona denudada de la monocapa comparación con los controles coincidentes en el tiempo. Los resultados de este experimento apoyan los resultados observados con FKBP-L transfectado transitoriamente (FIG. 3).

Los resultados también sugieren que FKBP-L puede inhibir la migración de células endoteliales cuando se expresa intercelularmente (como en la FIG. 3 anterior utilizando un constructo de expresión) o extracelularmente (es decir, mediante la adición de proteína recombinante al medio de cultivo de tejidos). Esto implicaba que, o bien FKBP-L está inhibiendo la migración de células endoteliales mediante dos mecanismos diferentes o bien que FKBP-L es secretada desde la célula. Como se muestra en la presente memoria, FKBP-L es secretada de hecho.

Ejemplo 3: La proteína FKBP-L es secretada a partir de células HMEC-1 (N = 1)

Las células humanas endoteliales microvasculares (HMEC1) se sembraron en placas de cultivo de plástico de 35 mm y se cultivaron hasta 100% de confluencia. La monocapa se transfectó con un constructo de expresión de mamífero FKBP-L etiquetado con hemaglutinina (HA)/pcDNA en presencia de lipofectina (Invitrogen, Reino Unido). Esto daría lugar a la expresión del SEQ ID NO: 2 con una etiqueta de HA.

Con el fin de generar el plásmido de FKBP-L etiquetado con HA, el ADNc de FKBP-L (polinucleótido SEQ ID NO: 31; variante de polipéptido Thr182, Gly186; SEQ ID NO: 2) se escindió de pUC18 por medio de digestión con BamH1, se formaron extremos romos y se clonó direccionalmente en un sitio Sal1 con extremos romos del vector de expresión de mamíferos pCMV-HA (Clontech, Reino Unido). Esto da como resultado la expresión del SEQ ID NO: 2, con una etiqueta de HA N-terminal para producir una proteína de 44 kDa.

Después de 6 horas se eliminaron los reactivos de transfección y la monocapa se hirió (los controles no fueron heridos) con una punta de pipeta y se volvió a añadir un suplemento de MCDB-131 y se incubó durante 7 horas adicionales. Se recogió el medio para su análisis y las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en 100 µl de 2X tampón de Laemmli (Sigma) y se calentó a 100°C durante 10 minutos. Los productos lisados celulares y el medio de cultivo fueron sometidos a transferencia en ranura sobre membrana de nitrocelulosa y se sondearon con anticuerpo monoclonal anti-HA (Clontech) (1:1000 dilución) con el fin de detectar la proteína FKBP-L etiquetada con HA, y a continuación sondearon con anticuerpo secundario Ig de conejo unido a HRP (dilución 1:7500) (Amersham Biosciences). La unión del anticuerpo se detectó utilizando reactivo de detección SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce).

Los resultados se muestran en la FIG. 5. La FIG. 5 es una transferencia en ranura/Western que muestra que la transfección de un constructo de ADNc de FKBP-L etiquetado con HA en monocapas de HMEC-1 normales o monocapas heridas da como resultado la secreción, al medio, de la proteína FKBP-L etiquetada con HA 24 h después de transfección. Las transferencias Western se sondearon con un anticuerpo HA.

Estos datos indican que bajo condiciones de crecimiento normales la proteína FKBP-L es secretada activamente, apoyando la hipótesis de que FKBP-L puede estar mediando sus efectos anti-angiogénicos a través de la activación del receptor. Los datos también proporcionan una explicación de por qué tanto la proteína recombinante como la expresión en exceso utilizando un constructo de ADNc son capaces de ejercer los efectos anti-angiogénicos observados tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplo 4: El efecto de la proteína FKBP-L recombinante completa sobre el ensayo de cierre de heridas se midió como una función del tiempo (N = 3)

Se realizaron los siguientes estudios para determinar el efecto de una proteína FKBP-L recombinante etiquetada con His completa en el análisis de cierre de heridas medido como una función del tiempo. De nuevo, el ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999). Se sembraron HMEC-1 en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se eliminó y la monocapa se hirió. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de FKBP-L recombinante completa etiquetada con His (es decir, SEQ ID NO: 1) para proporcionar la concentración final requerida de 750 ngml⁻¹.

Los portaobjetos se retiraron en momentos puntuales fijos hasta el cierre completo de la herida, a continuación se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%. El grado de cierre de "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles de tratamiento simulado coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 6. Se puede observar que el cierre de la herida fue en general inhibido significativamente en las células HMEC-1 tratada con FKBP-L (750 ngml⁻¹) en comparación con los controles. Cierre de la herida 50% se observó en el control a los 7 horas, mientras que el cierre de heridas 50% en el FKBP-L tratado monocapa no se observó hasta 16 horas después de la herida inicial, lo que da como resultado un retraso significativo de 9 horas. Se observó el cierre total de la herida a las 16 horas en los experimentos de control, en contraste con las monocapas tratadas con FKBP-L que se mantuvo abierta hasta 34 horas. Estos resultados

indican que el efecto de una sola administración de FKBP-L puede ser un método extremadamente eficaz de retraso del cierre de la herida en este modelo *in vitro*.

Ejemplo 5: Efecto de la proteína FKBP-L recombinante completa sobre la formación de contactos endoteliales célula a célula en la membrana basal sintética Matrigel (N = 3)

En este experimento, se evaluó el efecto de la proteína FKBP-L recombinante etiquetada con His completa (SEQ ID NO: 1) sobre la formación de endoteliales contactos de célula a célula. Las muestras se ejecutaron por triplicado.

El análisis de formación de túbulos *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999). En resumen, los análisis se realizaron utilizando Placas Multipocillo de 24 pocillos BD BioCoat™ Matrigel™ Matrix Thin Layer (BD Discovery Labware, Oxford, Reino Unido). Matrigel™ se rehidrata con 500 µl de medio MCDB-131 libre de suero y se incubó a 37°C durante 30 minutos. El medio en exceso se eliminó y se sembraron HMEC-1 a una densidad de 1×10^5 y las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂/ 95% de aire durante 1 hora.

Se añadieron concentraciones crecientes de la proteína FKBP-L recombinante (SEQ ID NO: 1) a cada pocillo individual por triplicado (250-1000 ngml⁻¹) y la placa se incubó durante otras 18 horas. El grado de formación de túbulos entre células adyacentes HMEC-1 se evaluó en cada pocillo en cinco campos de visión, contando el número de contactos célula a célula entre las diferentes células HMEC-1 en la zona designada. Un investigador independiente evaluó cada pocillo y los pocillos tratados con FKBP-L se compararon con los controles tratados simuladamente.

Los resultados se muestran en la FIG. 7. Se encontró que la proteína FKBP-L recombinante inhibía la capacidad de las HMEC-1 para formar contactos célula a célula o túbulos en Matrigel en una manera dependiente de la dosis. La concentración óptima para este efecto fue de 750 ngml⁻¹, con una eficacia de 80% y una potencia de EC50 de 314 ngml⁻¹. Estos resultados indican que a estas dosis, FKBP-L es anti-angiogénico, previniendo la formación de tubos por las células HMEC-1.

Ejemplo 6: Efecto del polipéptido FKBP-L recombinante completo sobre la angiogénesis *in vivo* utilizando el análisis de esponja en ratón (N = 1; dos ratones por grupo)

Este experimento mide los efectos de FKBP-L sobre la angiogénesis utilizando otros dos modelos *in vitro*, el análisis de esponja en ratón, y el modelo del anillo aórtico.

En estos experimentos, se implantaron subcutáneamente esponjas de poliéter en ratones negros C57 y se les inyectaron en días alternos 10 ng de factor de crecimiento de fibroblastos bovino (bFGF) o 10 ng de bFGF + 5 µg de polipéptido FKBP-L recombinante etiquetado con His completo (SEQ ID NO: 1). Después de 14 días de tratamiento, las esponjas se recogieron, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Los resultados se muestran en las Figs. 8 y 9. En la FIG. 8A, los eritrocitos, que aparecen como células de color gris oscuro y están indicados por las flechas, se pueden observar dentro de los microvasos de las esponjas tratadas con bFGF. Además, se puede observar que existen grandes cantidades de crecimiento celular (que aparece como color gris claro). Tanto los eritrocitos como el crecimiento celular son mucho menos evidentes en las esponjas también tratadas con FKBP-L (FIG. 8B). Los recuentos de vasos en esponjas a partir de 2 ratones por grupo, contados de una manera ciega a un aumento 40X se muestran en la FIG. 9. Las esponjas tratadas con FKBP-L tuvieron significativamente menos vasos que las tratadas con bFGF solo ($p = 0,0008$).

Los resultados indican que el polipéptido FKBP-L recombinante completo puede inhibir la angiogénesis *in vivo*, y que este polipéptido puede tener valor terapéutico potencial en un entorno clínico.

Ejemplo 7: Efecto de polipéptido FKBP-L recombinante completo sobre el modelo de angiogénesis de explante de anillo aórtico *ex-vivo*, investigando el efecto sobre la longitud media, la longitud máxima y el número de vasos formados (N = 3)

Se sacrificaron ratas Wistar macho y la aorta torácica se retiró asépticamente y se seccionó en anillos de un espesor de 1 cm. Los anillos se lavaron diez veces en medio estéril para eliminar cualquier bacteria y se embebieron en Matrigel en placas de 24 pocillos. A los anillos se les añadió un suplemento de 2 ml de medio y concentraciones crecientes de proteína FKBP-L recombinante etiquetada con His completa (SEQ ID 1). La placa se incubó durante 8 días y después de la incubación, el Matrigel y los anillos se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4% y se almacenaron en PBS. El grado de desarrollo de los vasos fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). Se midió la magnitud de longitud del vaso, longitud máxima del vaso y número de vasos en cada campo de visión y se comparó con controles simulados coincidentes en el tiempo y se calculó el

porcentaje de inhibición (%).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 10. Se observó que FKBP-L es un potente inhibidor de la angiogénesis dependiente de la dosis en este modelo *ex-vivo*. La longitud media del vaso y la longitud máxima del vaso fueron se inhibieron significativamente a 1000 ngml^{-1} exhibiendo 63% y 70% de inhibición, respectivamente, en comparación con los controles coincidentes en el tiempo. El número de vasos formados a partir del explante aórtico fue inhibido óptimamente en 65% después del tratamiento con la proteína FKBL-L a 500 ngml^{-1} .

Ejemplo 8: Efecto del polipéptido FKBP-L recombinante completo sobre la viabilidad o la proliferación de HMEC-1 utilizando el ensayo MTT (N = 3)

Estos experimentos evaluaron si los efectos antiangiogénicos de la proteína FKBP-L completa se debieron a la toxicidad del polipéptido. Se utilizó un ensayo MTT para medir la viabilidad/proliferación celular. En resumen, se sembraron células HMEC-1 ($2,5 \times 10^3$) en placas de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante 5 horas. Las células se trataron con concentraciones crecientes de proteína FKBP-L etiquetada con His recombinante (SEQ ID NO: 1) y se incubaron durante 24 (FIG. 11A.) y 48 horas (FIG. 11B). Las células post-incubación fueron expuestas a una solución de 5 mgml^{-1} de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) durante 4 horas. Las células se aspiraron y se añadieron 200 μl de DMSO para reducir la sal e inducir un cambio de color. Los pocillos se analizaron colorimétricamente a 550 nm y los resultados se compararon con las células de control no tratadas. El experimento se repitió tres veces.

Los resultados se muestran en las Figs. 11A y 11B. Se encontró que FKBP-L no tuvo ningún efecto significativo sobre la proliferación de células HMEC-1 en comparación con los controles coincidentes en el tiempo en cualquiera de los puntos temporales medidos, lo que sugiere que los efectos antiangiogénicos observados en los ensayos anteriores no fueron causados por la inhibición del crecimiento celular o por la toxicidad mediada por FKBP-L.

Ejemplo 9: Cambios en la morfología del citoesqueleto de células endoteliales en migración durante la exposición a 750 mgml^{-1} de polipéptidos FKBP-L recombinante completos (N = 2)

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo para evaluar la morfología del citoesqueleto tras el tratamiento con FKBP-L mediante tinción para tubulina y vimentina. Las HMEC-1 se sembraron en portaobjetos de cámara de cuatro pocillos y se incubaron durante la noche hasta que se hubieron formado monocapas confluentes. Se retiró el medio de cada pocillo y la monocapa se hirió como se describió anteriormente. A las células se les volvió a añadir un suplemento de medio que contenía 750 ngml^{-1} proteína FKBP-L etiquetada con His recombinante (es decir, SEQ ID NO: 1). Las células se incubaron durante 5 horas y las cámaras se retiraron de los portaobjetos y las células se lavaron cuatro veces en PBS seguido por fijación en paraformaldehído tamponado con PBS al 4% tratado con Triton X al 0,1% durante 20 minutos. Las células se lavaron tres veces en PBS, y se bloquearon durante 20 minutos en BSA al 2% que contenía Triton X al 0,1%. Las células bloqueadas se lavaron en PBS y se incubaron con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: (A) anti-tubulina α (1 : 500); y (B) anti-vimentina (1: 200), durante 90 minutos. Las células se lavaron en PBS seguido de una incubación de 1 hora con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (1:30) a temperatura ambiente. Las células fueron montadas con Vectashield que contenía yoduro de propidio y se selló para evitar la deshidratación. Los portaobjetos se cubrieron con papel de aluminio y se almacenaron a 4°C para su análisis mediante microscopía de fluorescencia confocal.

Los resultados se muestran como FIG. 12 (tinción anti-tubulina de las células) y la FIG. 13 (tinción anti-vimentina de las células). En el control de HMEC-1 en migración, los microtúbulos (teñidos utilizando *anti-tubulina α*) (FIG. 12: control) tienen una estructura lineal regular que corre en la dirección de la herida, ayudando así al proceso de migración direccional. Las regiones de tinción densas se pueden observar en la parte delantera del núcleo, y este centro de organización de microtúbulos (MTOC) es un buen indicador de que la migración direccional se produce en el momento de la fijación. En contraste, en las células tratadas con FKBP-L (FIG. 12: FKBP-L) los microtúbulos parecen tener un pequeño alineamiento en la herida. Se puede observar que los microtúbulos parecen ligeramente tortuoso o tenue y alineados de izquierda a derecha, el MTOC aparece asentarse en el lado de la célula, lo que indica que no hay migración direccional activa.

La FIG. 13 muestra los filamentos intermedios de las HMEC-1 teñidas utilizando *anti-vimentina*. Parece de nuevo que las células de control (no tratadas) se organizan, alargan y apuntan en la dirección de la herida una vez más lo que sugiere que las células están migrando activamente (FIG. 13: control). En contraste, los filamentos intermedios en las HMEC-1 no en migración tratadas con FKBP-L aparecen altamente desorganizados, incluso agrupadas y sin mostrar ninguna indicación de que estén migrando activamente en la herida (FIG. 13: FKBP-L).

Los resultados de esta investigación confocal sugieren que el mecanismo de inhibición mediada por FKBP-L de la migración puede ser dirigido al citoesqueleto.

Ejemplo 10: Efecto de FKBP-L recombinante completa sobre PC3, HT29 y migración de células tumorales MDA (N

= 3)

En estos experimentos, se evaluó el efecto de FKBP-L recombinante sobre la migración de células tumorales. El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999) véase más arriba. Las células tumorales PC3, MDA231 y HT29 se sembraron en placa en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se retiró y las monocapas se hirieron. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de la proteína FKBP-L recombinante etiquetada con His (SEQ ID NO: 1) para proporcionar las concentraciones finales mostradas. Las monocapas se incubaron durante 24 horas y a continuación se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%.

El grado de cierre "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μ m) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles coincidentes en el tiempo tratados simultáneamente y se calculó el porcentaje de inhibición del cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Los resultados se muestran en la FIG. 14, paneles A, B, y C. Se encontró que polipéptido FKBP-L recombinante inhibe la migración de células tumorales de una manera dependiente de la dosis. Estos hallazgos indican que FKBP-L puede ser útil como un agente terapéutico para reducir la invasión de células tumorales y la metástasis.

Ejemplo 11: Efecto de la inyección directa de un constructo de ADNc de FKBP-L en la sobre el crecimiento de células tumorales de próstata humana DU145 *in vivo*. (N = 1, 4-7 de ratones por grupo de tratamiento)

Se realizaron experimentos para determinar el efecto de la inyección intra-tumoral directa de un constructo de ADNc de FKBP-L sobre un cultivo celular de células tumorales de próstata humana DU145 *in vivo*.

Cultivo celular

Se obtuvieron células DU145 (carcinoma de próstata) de Cancer Research UK y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%. Todas las líneas celulares se cultivaron en forma de monocapas, se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂.

Construcción de ADN plasmídico

El plásmido FKBP-L/pcDNA3.1 se construyó mediante la escisión del ADNc de FKBP-L utilizando BamHI (polinucleótido SEQ ID NO: 31) a partir de pUC18 y a continuación mediante la ligación direccional de FKBP-L en el sitio de restricción BamHI de pcDNA3.1 (Invitrogen) como se ha descrito en el Ejemplo 1. El plásmido endostatina (para su uso como control anti-angiogénico positivo) hEndo XV/pcDNA3.1, se construyó por medio de digestión del plásmido pBLAST hEndo XV (InVivogen) con HpaI (Promega) y EcoV (Invitrogen) para liberar el inserto XV hEndo. El inserto hEndo XV se ligó direccionalmente en el sitio de restricción EcoRV de pcDNA3.1 (Invitrogen).

Modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata

Se utilizaron 19 ratones macho inmunocomprometidos (inmunodeficiencia combinada grave) (Harlan). Los ratones se aclimataron y se enjaularon en grupos de 5 o menos en un centro de atención de barrera. Las células DU145 (carcinoma de próstata) se cultivaron como se describió anteriormente. Las células subconfluentes se cosecharon y la concentración celular se ajustó a 5x10⁷ células/ml en PBS. El dorso de cada ratón se afeitó. Después de la intervención estética, cada ratón recibió inyecciones intra-dérmicas de 5x10⁶ células tumorales DU145 (100 μ l) bilateralmente en el dorso posterior con una aguja de calibre 26. Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un volumen de 100-125 mm³. Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro regímenes de tratamiento: (a) sin tratamiento (4 ratones); (b) vector vacío (pcDNA3.1) (4 ratones); (c) hEndo XV/pcDNA3.1 (4 ratones); y (d) FKBP-L/pcDNA3.1 (7 ratones). Los ratones recibieron inyecciones intratumorales de complejos de Lipofectamine 2000 (Invitrogen):plásmido, dos veces por semana, cada 3 o 4 días. En resumen los complejos de Lipofectamine 2000:plásmido se realizaron como para cada inyección por animal de la siguiente manera: se añadieron 25 μ l del plásmido (1 μ g/ μ l) a 25 μ l de OptiMEM (Invitrogen) y se añadieron 10 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a 40 μ l de OptiMEM. Las dos soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las 2 soluciones se combinaron y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos adicionales antes de la inyección intra-tumoral en el tumor. Los tumores se midieron antes de cada tratamiento. El volumen del tumor se

calculó como: $4/3\pi r^3$ (donde $r = \frac{1}{2} \text{GMP}$ y $\text{GMP} = \sqrt[3]{\text{Largo} \times \text{Ancho} \times \text{Alto}}$).

Los resultados se muestran en la FIG. 15. Tanto FKBP-L como los tumores tratados con endostatina mostraron evidencia de un centro necrótico, es decir, se veían en forma de rosquilla. Esto es típico de los efectos observados

con antiangiogénicos. Los controles alcanzaron su tiempo de cuadruplicación del volumen en ~35 días, sin embargo el crecimiento de los tumores tratados con FKBP-L resultó inhibido durante más de 3 meses (100 días) después del tratamiento inicial, con tumores solo al 10% de su volumen inicial.

5 Por lo tanto, se encontró que la inyección intratumoral de un constructo de expresión de FKBP-L inhibe crecimiento de xenoinjerto de tumor humano DU145 y es comparable, si no superior, a los efectos observados con endostatina actualmente aprobada al menos en algunos países (p. ej., China) para el tratamiento de cáncer de pulmón. De nuevo, esto demuestra el valor terapéutico potencial de la terapia génica con FKBP-L en un entorno clínico.

10 Ejemplo 12: Genes regulados en células L132 por oligonucleótidos antisentido FKBP-L asociados con la angiogénesis/migración

Análisis de micromatrices de ADNc

15 ARN total fue aislado de las células L132, 8 h después de la exposición a antisentido de FKBP-L (*antisentido de FKBP-L*: 5' ATG GCC AGG CTC CCG CTC 3') (SEQ ID NO: 40) o lipofectina solamente como control. El ARNm poli A+ fue extraído de muestras de ARN total utilizando el kit Qiagen Oligotex (Qiagen, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas muestras de ARNm (800 ng por muestra) fueron enviadas a Incyte Genomics, EE. UU., donde se llevó a cabo un análisis de micromatrices UniGEM 2.0.

20 Los chips Lifearray de Incyte permiten la interrogación de hasta 10.000 genes simultáneamente, lo que da como resultado la comparación de los niveles de expresión génica en dos muestras diferentes. En resumen, se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa convencional para convertir las dos muestras de ARNm en ADNc con colorante de cianina. El ARNm de células L132 tratadas con oligonucleótidos antisentido FKBP-L después de 8 h se utilizó para generar una sonda marcada con Cyanine 3 (verde) y el ARNm de células L132 tratadas con lipofectina solamente después 8 horas se utilizó para producir una sonda marcada con Cyanine 5 (rojo). Las dos muestras de sondas fluorescentes se aplicaron simultáneamente a un solo chip de micromatriz que contenía numerosas sondas de ADNc inmovilizados sobre un soporte sólido en localizaciones específicas, donde reaccionaban competitivamente con las moléculas de ADNc dispuestas. Después de la incubación, la micromatriz se enjuagó en una serie de baños para asegurar la eliminación de cualquier muestra no hibridada. A continuación, el la micromatriz fue capturada en forma de una imagen que fue adquirida utilizando un escáner para la detección de la señal fluorescente. Este escáner genera datos sobre la intensidad de cada punto mediante la excitación de los fluorocromos en la matriz. Cada elemento del chip fue escaneado para la marca fluorescente Cy3 (verde) y después Cy5 (rojo) para crear imágenes electrónicas para ambos canales de colorante. Las imágenes de matrices finales fueron analizadas utilizando el paquete de soporte lógico GEMTools de Incyte.

Los genes que son regulados al alza asocian con un aumento en la angiogénesis (Tabla 1). Se sabe que la expresión de RhoA, RhoC, ROCK I, y ROCK II elevada se asocia con la progresión tumoral a estadios más avanzadas y se ha sugerido que la señalización Rho y ROCK contribuye a los cambios morfológicos y comportamiento metastásico de algunas células tumorales. Esto es compatible con la hipótesis de que la expresión en exceso de FKBP-L inhibe la angiogénesis y la represión de FKBP-L utilizando oligonucleótidos antisentido podría promover la angiogénesis mediante la activación de Rho y el ROCK. Los datos implican que la modificación genética para disminuir la expresión de FKBPL con antisentido o un ARNip dirigido podría promover la angiogénesis y podría utilizarse para promover la curación de heridas crónicas.

Tabla 1

Genes expresados diferencialmente tras la exposición a oligonucleótidos antisentido FKBP-L	
Genes	Multiplicidad Aumento (↑) o Disminución (↓)
PI3K	↑ 3,1
proteína activadora de Rho GTPasa	↑ 2,0
oligofrenina 1	↑ 1,7
ROCK	↑ 1,6
Proteína asociada a microtúbulos 1B	↑ 1,6
MMP tipo 1	↑ 1,5
Miembro 1 de la superfamilia de ligandos de TNF	
CYR61	↓ 2,4
Tubulina γ	↓ 1,6

Genes expresados diferencialmente tras la exposición a oligonucleótidos antisentido FKBP-L	
Genes	Multiplicidad Aumento (↑) o Disminución (↓)
Anexina 2	↓ 1,6
Tubulina β	↓ 1,5
Tubulina α	↓ 1,5

Ejemplo 13: La inhibición de la migración celular es dependiente de CD44 en HMEC-1 y líneas de células tumorales DU145, PC3, HT29, MCF-7, MDA-231, RT-PCR para detectar la expresión del ARNm de CD74

- 5 Las células Du145, HMEC-1, HT29, PC3, MCF-7 y MDA-231 se sembraron en matraces de cultivo de tejido T25 y se dejaron crecer hasta que alcanzaron 70% de confluencia. Se aisló el ARN de las células utilizando el kit RNAqueous (Ambion, Núm. de Cat. AM1912), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN fue tratado con Turbo DNA-free™ (Ambion, Núm. de Cat. 1906) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el fin de eliminar el ADN contaminante. El ADNc se preparó a partir de las muestras de ARN utilizando el Kit ImProm II™ Reverse
- 10 Transcription (Promega, Cat A3800). En resumen, se prepararon 0,5 µg de ARN, 0,5 µg de cebador oligo dT hasta 5 µl con agua libre de nucleasa, se incubaron a 70°C durante 5 min antes de incubarlo en hielo durante 5 min. Después se añadieron los siguientes reactivos: agua libre de nucleasa (5,3 µl), 5X Tampón de Reacción ImProm II™ (4 µl), MgCl₂ 25 mM (3,2 µl) mezcla de dNTP 10 mM (1 µl) transcriptasa reversa ImProm II™ (1 µl) e inhibidor de la ribonucleasa Recombinant RNasin (0,5 µl). Las reacciones de transcripción inversa se incubaron a 25°C durante 5
- 15 min, 42°C durante 1 h y finalmente a 70°C durante 15 min.

Para cada reacción de PCR: se combinaron ADNc (2 µl), 10X tampón de PCR (5 µl), mezcla de dNTP 10 mM (2 µl), MgCl₂ 50 mM, ADN polimerasa Taq (5 U/l) (0,25 l) (Invitrogen Núm. de Cat. 18038-018), agua de grado molecular (34,75 µl), y 2 µl de cebadores directos e inversos adecuados (10 µM) (véase la Tabla 2). Las muestras se

20 amplificaron utilizando el siguiente programa de temperatura: 1 ciclo de 94°C durante 1 min, 40 (CD74) o 25 (GAPDH) ciclos de 94°C durante 45 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 90 s; seguido de 1 ciclo de 72°C durante 10 min.

Tabla 2: Secuencias de los cebadores CD74 y GAPDH

	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
CD74	5'-CTTCCCAAGCCTCCCAAG-3'	41
	5'-AGAAGACGGGTCCTCCAGTT-3'	42
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	43
	5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'.	44

- 25 Transferencia Western para detectar MIF y CD44
- Todas las líneas celulares incluyendo la línea 2H-11 de células endoteliales de ratón (para la prueba MIF solamente) fueron evaluadas para determinar su estado CD44 y MIF utilizando transferencia Western. Las células se cosecharon en tampón de Laemmli (Sigma) y se calentaron a 90°C durante 10 min. Las muestras se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE utilizando el sistema Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución de leche al 1% y se sondearon con el anticuerpo anti-CD44H monoclonal (R & D Systems, Núm. de Cat. BBA10) a una dilución 1:500, o el anticuerpo anti-MIF (R & D Systems, Núm. de Cat. AF-289-PB) a una dilución 1:500 y anticuerpos anti-β-actina
- 30 (Sigma, Núm. de Cat. A 4700) a una dilución 1:5000. Las transferencias se sometieron a ensayo a continuación con anticuerpo secundario Ig de ratón conjugado con HRP (GE Healthcare, Reino Unido, Cat NA931V) a una dilución 1:3500 cuando se sondeó para CD44 o β-actina o anticuerpo secundario Ig de cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Núm. de Cat. sc-2020) cuando se sondeó para MIF. La unión del anticuerpo se detectó utilizando SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Núm. de Cat. 34080).

- 40 Los resultados se muestran en la FIG. 16. Se encontró que CD74 y MIF se expresaron en todas las líneas celulares previamente evaluadas para determinar la inhibición mediada por FKBP-L de cierre de heridas. Sin embargo, CD44 estuvo presente en PC3, MDA-231, HT29 y HMEC-1, pero ausente en Du145 y MCF-7. La ausencia de CD44 se correlacionó con la incapacidad de FKBP-L para inhibir cierre de heridas en DU145 y MCF-7 (mostrado en el
- 45 Ejemplo 14 a continuación). Los datos apoyan la hipótesis de que FKBP-L se une a CD44 e interfiere en la unión de CD74/MIF dando como resultado la inhibición de las respuestas de señalización de estos receptores angiogénicos.

Ejemplo 14: Efecto del polipéptido FKBP-L recombinante completo sobre la migración de células tumorales en PC3

(CD44 + ve), MDA (CD44 + ve), HT29 (CD44 + ve), MCF-7 (CD44-ve) y DU145 (CD44-ve) (N = 3)

El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al. (1999) véase más arriba. Se sembraron PC3 (línea celular tumoral de próstata; positiva para CD44; CD44 + ve), (línea celular tumoral de mama; CD44 + ve) MDA231, HT29 (línea celular tumoral colorrectal; CD44 + ve), MCF-7 (línea celular tumoral de mama; negativa para CD44 ; CD44 -ve) y DU145 (línea celular tumoral de próstata; CD44 -ve) en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se retiró y las monocapas se hirieron. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de proteína FKBP-L etiquetada con His recombinante (SEQ ID NO: 1) para proporcionar la concentración final requerida. Las monocapas se incubaron durante 24 h y a continuación se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%.

El grado de cierre "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles de tratamiento simulado coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Las líneas celulares también fueron evaluadas para determinar su estado de CD44 mediante análisis de transferencia Western (FIG. 16). Las células se recogieron en tampón de Laemmli (Sigma) y se calentó a 90°C durante 10 min. Las muestras se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE utilizando el sistema Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución de leche al 1% y se sondearon con el anticuerpo anti-CD44H monoclonal (R & D Systems, Núm. de Cat. BBA10) a una dilución 1:500 y anticuerpo anti-β-Actina (Sigma, Núm. de Cat. A 4700) a una dilución 1:5000 a continuación se sondearon con anticuerpo secundario Ig de ratón conjugado con HRP (GE Healthcare, Reino Unido, Cat. NA931V) a una dilución 1:3500 cuando se sondeó para CD44 o β-actina o anticuerpo secundario Ig de cabra ligado a HRP (Santa Cruz Biotechnology, Núm. de Cat. sc-2020) cuando se sondeó para MIF. La unión del anticuerpo se detectó mediante SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Núm. de Cat. 34080).

Resultados del ensayo de cierre de heridas se muestran en la FIG. 17A-17E. Se puede observar que FKBP-L recombinante puede inhibir la migración de células tumorales en líneas de células tumorales CD44 + ve, pero no en líneas de células tumorales CD44 - ve. Los datos sugieren que FKBP-L podría inhibir las metástasis tumorales en un subconjunto de línea de células tumorales CD44 + ve.

Ejemplo 15: Modificación genética para reducir la expresión de CD44 en células PC3 a través de un enfoque dirigido a ARNip inhibe la inhibición mediada por FKBP-L de la migración PC3 (N = 2)

Se transfectaron células PC3 durante 72 horas, con ARNip no dirigido siControl (ARNip SCR) (Dharmacon, Núm. de Cat. D-001210-01-05) o con ARNip dirigido a CD44 (CD44ARNip) (Dharmacon, Núm. de Cat. 009999). En resumen, se sembraron $1,2 \times 10^6$ células PC3 en dos placas P90 y se incubaron a 37°C durante 24 h. Para la transfección, se añadieron 150 µl del ARNip no dirigido siControl o de ARNip dirigido a CD44 (2 µM) a 450 µl de medio libre de suero (Tubo 1). Se añadieron 18 µl de reactivo de transfección Dharmafect 2 (Dharmacon, Núm. de Cat. T-2002-03) a 582 µl de medio libre de suero por duplicado (Tubo 2). Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. El contenido de los tubos 1 y 2 se mezcló y se incubó durante otros 20 min a temperatura ambiente. Durante este período de incubación, las dos placas P90 de células PC3 se lavaron y se añadieron 4,8 ml de medio completo a cada placa. Después se añadió la mezcla de transfección de ARNip apropiada gota a gota y las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C. Las células transfectadas se sembraron en portaobjetos con cámaras ($1,25 \times 10^5$ células/cámara) y se incubaron durante 24 horas adicionales a 37°C. Las monocapas se hirieron y se añadieron a las monocapas FKBP-L etiquetado con His recombinante completo (SEQ ID NO: 1) (1500 ng/ml) o medio completo. La monocapa se fijó al cabo de 24 h adicionales y el grado de cierre de la herida fue evaluado a ciegas utilizando una escala calibrada. Se calculó el porcentaje de inhibición de cierre de la herida en monocapas tratadas con FKBP-L en comparación con monocapas no tratadas. FKBP-L inhibió la migración de las células tratadas ARNip SCR en 21,7%, pero no tuvo efecto sobre las células tratadas con ARNip CD44.

Se llevó a cabo una análisis de transferencia Western para confirmar la modificación genética para reducir la expresión de CD44 en células PC3. Ciento cuarenta y cuatro horas después de la transfección con cualquiera de ARNip no dirigido siControl (50 nM) o ARNip dirigido a CD44 (50 nM) las células se cosecharon en tampón de Laemmli (Sigma) y se calentaron a 90°C durante 10 min. Las muestras se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE utilizando el sistema Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución de leche 1% y se sondearon con anticuerpo monoclonal anti-CD44H (R & D Systems, Núm. de Cat. BBA10) a una dilución 1:500, y anticuerpo anti-β-actina (Sigma, Núm. de Cat. A 4700) a una dilución 1:5000. A continuación, la transferencia se sondeó con el anticuerpo secundario Ig de ratón conjugado con HRP (GE Healthcare, UK, Cat NA931V) a una dilución 1:3500. La unión del anticuerpo se

detectó mediante el SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Núm. de Cat. 34080).

Los resultados se muestran en la FIG. 18. Se encontró que FKBP-L puede inhibir la migración en la línea celular CD44 + ve, PC3, en presencia del ARNip de control. La modificación genética para reducir la expresión de CD44 con ARNip de CD44 (véase la calle de ARNip de CD44), se encontró que la inhibición mediada por FKBP-L de la migración es dependiente de la presencia de CD44. Estos datos también se correlacionan con la necesidad de CD44 endógena en líneas celulares tales como HMEC-1, PC3, MDA-231 y HT29 con el fin de promover la inhibición de la migración mediada por FKBP-L. Tal inhibición de la migración mediada por FKBP-L no se detecta en líneas celulares que carecen de CD44 es decir, MCF-7 y DU145.

Ejemplo 16: FKBP-L interactúa con CD44 endógeno en monocapas HMEC-1 heridas

Se sembraron cuatro placas de cultivo de tejidos P90 con células HMEC-1, de manera que fueran confluentes en 90% al cabo de 24 h. Las cuatro placas P90 de células HMEC-1 fueron transfectadas con el constructo de ADN FKBP-L/pADNc3.1. En resumen los complejos de Lipofectina: plásmido FKBP-L/pADNc3.1 se elaboraron para cada placa p90 de la siguiente manera: se añadieron 4 µg de plásmido a Optimem (Invitrogen) a un volumen final de 400 µl y se añadieron 40 µl de lipofectina (Invitrogen) a 360 µl de Optimem. Las dos soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Las 2 soluciones se combinaron y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante otros 15 min. Durante este período de incubación, las placas P90 se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 3,2 ml de Optimem a cada plato. Los complejos de lipofectina/plásmido se añadieron cuidadosamente a las placas y se incubaron a 37°C durante 6 h. A continuación se eliminó el medio de transfección de las células y se reemplazó por medio completo. Las células se incubaron durante 18 h adicionales a 37°C. Las monocapas de HMEC-1 se hirieron (3 heridas por placa P90) y se incubaron a 37°C durante 7 h. Las células se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo. y se recogieron en tampón de lisis celular (PBS, Igepal al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, molibdato de sodio 10 mM, 1 comprimido libre de EDTA); 300 µl por placa P90. El producto lisado celular se incubó a 4°C con rotación durante 30 min. El producto lisado celular se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C, con el fin de eliminar los desechos celulares. El sobrenadante se pre-aclaró a continuación mediante incubación con cuentas de agarosa G prelavadas durante 1 hora a 4°C con rotación. El producto lisado celular pre-aclarado se dividió en 3, 1/3 se añadió a conjugado de agarosa G-anticuerpo contra CD44, 1/3 se añadió a producto conjugado de agarosa G-anticuerpo contra FKBP-L y 1/3 se añadió a cuentas prelavadas (control negativo). Las mezclas de anticuerpo-agarosa G/producto lisado celular se incubaron durante la noche a 4°C con rotación. Las cuentas se lavaron 3 veces con tampón de lisis celular enfriado con hielo y 3 veces con PBS enfriado con hielo. Las cuentas se reconstituyeron en 60 µl de tampón de Laemmli.

Se llevó a cabo la transferencia Western de las muestras inmunoprecipitadas para confirmar las interacciones entre FKBP-L y CD44. Las muestras se calentaron a 90°C durante 10 min. Las muestras se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE utilizando el sistema Xcell SureLock Mini-cell (Invitrogen), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente en solución de leche al 1% y se sondearon con anticuerpo monoclonal anti-CD44H (R & D Systems, Núm. de Cat. BBA10) a una dilución 1:500 y anticuerpo anti-FKBP-L (Proteintech) a una dilución 1:1000 y después se sondearon con anticuerpo secundario anti-Ig de ratón (CD44) o conejo (FKBP-L) conjugado con HRP (GE Healthcare, Reino Unido, Cat. NA931V) a 1:3500. La unión del anticuerpo se detectó mediante SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Núm. de Cat. 34080).

Los resultados se muestran en la FIG. 19. Por lo tanto, se encontró que el uso de inmunoprecipitación que expresaba en exceso exógenamente FKBP-L interactúa con CD44 endógeno en monocapas heridas. Una interacción entre FKBP-L y CD44 endógeno solo pudo ser detectada en monocapas heridas, pero no en monocapas no heridas (datos no mostrados). Esto sugiere que se necesita expresar un nivel crítico de FKBP-L antes de que se pueda detectar la interacción con CD44. Además, esta interacción se produce solo en las células endoteliales que están cebadas para la migración en monocapas heridas.

Ejemplo 17: El dominio N-terminal de FKBP-L es importante para las propiedades anti-angiogénicas de FKBP-L (N-3)

Preparación de los constructos mutantes de FKBP-L truncados

Para construir los 5 constructos plasmídicos mutantes truncados de FKBP-L (Δ34FKBP-L/pADNc3.1, Δ40FKBP-L/pADNc3.1, Δ48FKBP-L/pADNc3.1, Δ58FKBP-L/pADNc3.1, Δ86FKBP-L/pADNc3.1, Δ151FKBP-L/pADNc3.1 y Δ200FKBP-L/pADNc3.1); se introdujeron codones de parada en la posición de aminoácido 34, 40, 48, 58, 86, 151 o 200 mediante mutagénesis dirigida al sitio (kit Quikchange, Stratagene).

Para cada reacción de mutagénesis dirigida al sitio: se combinaron pADNc3.1/FKBP-L/DIRI (10 ng), 10X tampón de reacción (5 µl), dNTP 10 mM (2 µl), ADN polimerasa Pfu Turbo (2,5 U/µl) (1µl), agua de grado molecular (37 µl), QuikSolution (3 µl) y 1µl de los cebadores directos e inversos apropiados (125 ng/µl). Las muestras se amplificaron utilizando el siguiente programa de temperatura: 1 ciclo de 95°C durante 1 minuto, 18 ciclos de 95°C durante 50

segundos, 60°C durante 50 segundos y 68°C durante 16 minutos; seguido de 1 ciclo de 68°C durante 7 minutos.

Tabla 3 - Cebadores utilizados para preparar constructos mutantes truncados de FKBP-L

Mutante truncado de FKBP-L	Secuencia de Cebador	SEQ ID NO:
Δ34FKBP-L/pADNc3.1	5'-GAACCTTGATTGAGTTATTTAGATTAGGCAGCAGCCCCG-3'	45
	5'-CGGGGCTGCTGCCTAATCTAAATAACTGAATCAAGGTTC-3'	46
Δ40FKBP-L/pADNc3.1	5'-CAGATTAGGCAGCAGCCCTGAGACCTCCTACCGAAAC-3'	47
	5'-GTTTCGGTAGGAGGGTCTCAGGGCTGCTGCCTAATCTG-3'	48
Δ48FKBP-L/pADNc3.1	5'-CCTACCGAAACGCTTTAGCTGGAAGTAAGCC-3'	49
	5'-GGCTTACTTCCAGCTAAAGCGTTTCGGTAGG-3'	50
Δ58FKBP-L/pADNc3.1	5'-CCCAGATCCAGCCAGCTAAATTCTAGAGCATAC-3'	51
	5'-GTATGCTCTAGAATTTAGCTGGCTGGATCTGGG-3'	52
Δ86FKBP-L/pADNc3.1	5'-CATGGATCAACCAGTTAGATGCCAGAGGCC-3'	53
	5'-GGGCCTCTGGCATCTAACTGGTTGATCCATG-3'	54
Δ151FKBP-L/pADNc3.1	5'-GGCGTAGGGCCATGAAGGGAGGAACTTG-3'	55
	5'-CAAGTTTCCTCCCTTCATGGCCCTACGCC-3'	56
Δ200FKBP-L/pADNc3.1	5'-CCGAGACTCCTGGTAGCTGGAGACTAGC-3'	57
	5'-GCTAGTCTCCAGCTACCAGGAGTCTCGG-3'	58

- 5 La endonucleasa de restricción Dpn I (10 U/l) (1μl) se añadió directamente a cada reacción de amplificación y se incubó a 37°C durante 1 hora para digerir el ADN parental (no mutado). Las reacciones de amplificación de producto digerido se transformaron en células XL-10-Gold Ultracompetent y se sembraron en placas de agar LB que contenían ampicilina (100 μg/ml). Una colonia se recogió y se cultivó en 200 ml de caldo LB que contenía ampicilina (100 μg/ml). Cada constructo de ADN mutante de FKBP-L truncado se purificó utilizando el kit Qiagen Plasmid Maxi.
- 10 Los cambios de secuencia en los constructos mutados fueron confirmados mediante secuenciación automática de ADN (Fusión Antibodies Ltd) (véase, por ejemplo, la FIG. 20A y 20B).

Los siete constructos mutantes truncados de FKBP-L fueron transfectados para expresar los polipéptidos (SEQ ID NOS: 3-9) que se muestran en la FIG. 1.

15 Análisis de migración *in vitro*

El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999). Se sembraron HMEC-1 en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 20 90% de confluencia. La monocapa se transfectó con 1 μg de constructo FKBP-L/pADNc de tipo salvaje (para expresar el polipéptido del SEQ ID 1), Δ34FKBP-L/pADNc3.1, Δ40FKBP-L/pADNc3.1, Δ48FKBP-L/pADNc3.1, Δ58FKBP-L/pADNc3.1, Δ86FKBP-L/pADNc3.1, Δ151FKBP-L/pADNc3.1 o Δ200FKBP-L/pADNc3.1 (para expresar los polipéptidos mostrados en la FIG. 1) en presencia de lipofectina. Después de 6 horas se retiraron los reactivos de transfección y la monocapa se hirió con una punta de pipeta y se le volvió a añadir un suplemento de MCDB-131 y 25 se incubó durante 7 horas.

La monocapa se fijó en solución de paraformaldehído tamponada con PBS al 4% durante 10 minutos. El grado de cierre de la "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μm) a un aumento 20x (Olympus BX 50).

30 Los resultados se muestran en la FIG. 20C. Se encontró que FKBP-L de tipo salvaje completo y los mutantes truncados, Δ48, Δ58, Δ86, Δ151, Δ200 inhibieron el cierre de la herida. WT-FKBP-L y Δ58 inhibieron el cierre de la herida en 36,2,6% y 48,8% respectivamente. Δ34 y Δ40 no lograron inhibir significativamente el cierre de la herida, lo que sugiere que el dominio activo se eliminó en estos mutantes y que el dominio anti-angiogénico activo reside 35 entre los aminoácidos 34 y 57 de FKBP-L completo.

Ejemplo 18: Evaluación de péptidos candidatos que abarcan el dominio activo de FKBP-L utilizando el ensayo de raspado de la herida: comparación con FKBP-L recombinante (N = 3)

40 El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton

et al. (1,999) véase más arriba. Se sembraron HMEC-1 en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se eliminó y la monocapa se hirió. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de los siguientes péptidos para lograr un intervalo de dosis de 10^{-14} - 10^{-6} M.

FKBP-L de 24 unidades (aa-34-57)	NH ₂ -QIRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS-COOH
SEQ ID NO: 10	
FKBP-L, 1-57	NH ₂ METPPVNTIGEKDTSQPQQEWKLNLENLDSVIQI RQQPRDPPTETLELEVSPDPAS-COOH
SEQ ID NO: 6	

5 Las monocapas se incubaron durante 7 h y a continuación se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%. El grado de cierre de la "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μ m) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles de tratamiento simulado
10 coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

15 Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 21. En el intervalo de dosis más baja (10^{-14} - 10^{-9} M) los FKBP-L de 24 unidades y de 1-57 unidades fueron potentes inhibidores del cierre de la herida. La inhibición máxima se observó entre 10^{-10} y 10^{-9} M, y la CE50 fue muy similar para cada péptido. Estos dos péptidos mostraron una mayor potencia en comparación con la proteína recombinante completa en una base en moles/moles. En conclusión, los oligómeros de 24 unidades y de 1-57 unidades son potentes inhibidores de la migración de las células endoteliales.

20 Ejemplo 19: Evaluación de péptidos candidatos que abarcan el dominio activo de FKBP-L en la formación de contactos endoteliales célula a célula utilizando la membrana basal sintética Matrigel en el ensayo de formación de tubos: comparación con FKBP-L recombinante (N = 3)

25 Métodos:

El ensayo *in vitro* de formación de túbulos utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al. (1,999). En resumen, los ensayos se realizaron utilizando Placas Multipocillo de 24 pocillos BD BioCoat™ Matrigel™ Matrix Thin Layer (BD Discovery Labware, Oxford, Reino Unido). El Matrigel™ se rehidrató con 500 μ l de medio libre de suero MCDB-131 y se incubó a 37°C durante 30 min. El medio en exceso se eliminó y las
30 HMEC-1 se sembraron a una densidad de 1×10^5 y las placas se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂/95% de aire durante 1 h. Se utilizaron concentraciones crecientes de FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) y de 1-57 unidades (SEQ ID NO: 6) a partir de 10^{-14} - 10^{-6} M.

35 La placa se incubó durante 18 h adicionales. El grado de formación de túbulos entre células HMEC-1 adyacentes se evaluó en cada pocillo en cinco campos de visión, contando el número de contactos célula a célula entre las diferentes células HMEC-1 en la zona designada. Un investigador independiente evaluó cada pocillo y los pocillos tratados con FKBP-L se compararon con los controles tratados simuladamente.

40 Los resultados se muestran en la FIG. 22. Tanto FKBP-L de 24 unidades como de 1-57 unidades inhibieron la capacidad de las HMEC-1 para formar los contactos células a célula o los túbulos en Matrigel en una forma dependiente de la dosis. El oligómero de 1-57 unidades fue más eficaz en este ensayo con una CE50 = 0,7 pM en comparación con 30 pM para el oligómero de 24 unidades. En conclusión, los datos sugieren que el FKBP-L de 24 unidades y el FKBP-L 1-57 unidades son potentes inhibidores de la formación de tubo endotelial.

45 Ejemplo 20: Efecto de los péptidos candidatos que abarcan el dominio activo de FKBP-L sobre la brotación angiogénica utilizando el ensayo de anillo aórtico de rata. El efecto sobre la longitud media, la longitud máxima y el número de vasos formados (n = 3); comparación con la proteína recombinante completa

50 Se sacrificaron ratas Wistar macho y la aorta torácica se retiró asépticamente y se seccionó en anillos de 1 cm de espesor. Los anillos se lavaron diez veces en medio estéril para eliminar cualquier bacteria y se embebieron en Matrigel en placas de 24 pocillos. A los pocillos se les añadió un suplemento de 2 ml de medio y concentraciones crecientes de FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) y FKBP-L de 1-57 unidades (SEQ ID NO: 6) y FKBP-L recombinante (SEQ ID NO: 1).

55 La placa fue evaluado a ciegas por un investigador independiente y se cuantifico utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μ m) a un aumento 20x (Olympus BX 50). Se midió la magnitud de longitud del vaso,

longitud máxima del vaso y número de vasos en cada campo de visión y se comparó con controles simulados coincidentes en el tiempo y se calculó el porcentaje de inhibición (%).

Los resultados de estos experimentos se muestran en las FIGS. 23-24. Se encontró que tanto el FKBP-L de 24 unidades como el FKBP-L de 1-57 unidades eran activos en este ensayo cuando se evaluaron mediante los tres parámetros, es decir, la longitud del vaso, la longitud máxima de vaso y el número de vasos (FIG. 23A y 23B, respectivamente). Sin embargo, en este ensayo el oligómero de 24 unidades era más potente especialmente en términos de número de vasos, con una CI50: 0,2 pM en comparación con 0,53 nM para el oligómero de 1-57 unidades y 1,56 nM para FKBP-L recombinante completo (FIG. 24A y 24B). El oligómero de 24 unidades también muestra cierta actividad bifásica. Estos datos sugieren que el oligómero de 24 unidades puede ser más potente en la inhibición de la ramificación de vasos inicial y por lo tanto en la disminución en el número de vasos. En resumen, el FKBP-L de 24 unidades, de 1-57 unidades, y el FKBP-L recombinante son potentes inhibidores de la angiogénesis.

Ejemplo 21: Efecto del FKBP-L de 24 unidades en la invasión de células en un sistema de cámara de Boyden modificada (N = 3).

Este ensayo mide la capacidad de las células para migrar e invadir. Las células endoteliales microvasculares necesitan migrar e invadir la matriz extracelular (MEC) después de los estímulos angiogénicos. Además, las células tumorales deben migrar e invadir la MEC con el fin de difundirse/metastatizarse a otros sitios. Se evaluaron HMEC-1 (células endoteliales microvasculares; CD44 + ve) y dos líneas de células tumorales, MDA-231 (mama; CD44 + ve) y PC3 (próstata; CD44 + ve) para determinar su potencial invasivo en presencia del FKBP-L de 24 unidades.

Insertos en policarbonato en placa de doce pocillos se dividieron en dos grupos dejando la mitad sin recubrir y recubriendo la mitad con 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Matrigel. Los insertos revestidos se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente en una campana de cultivo de tejido estéril. A la línea celular requerida; HMEC-1, PC3 o MDA231 se le añadió tripsina, se resuspendió en medio de nueva aportación y se calculó el número de células. Se añadieron 5×10^5 células, en un volumen total de 500 μl , al inserto (cámara superior) y se añadieron 1,5 ml de medio completo a la cámara inferior de la placa como un estímulo para la invasión. El FKBP-L de 24 unidades se añadió tanto a la cámara superior como a la inferior de la placa a la concentración requerida en los pocillos experimentales. La placa se incubó durante 24 h (PC3 o MDA231) o 48 h (HMEC-1).

Los insertos se retiraron cuidadosamente de su placa de 12 pocillos y los insertos sin recubrimiento de Matrigel se colocaron directamente en fijador de Carnoy. La superficie superior del inserto, en los insertos que se habían recubierto con Matrigel, se limpió tres veces con un bastoncillo de algodón para eliminar las células no invasoras. Los insertos se colocaron a continuación en Carnoy y se dejaron durante 10 min.

Los insertos se retiraron de la solución de Carnoy y se dejaron secar al aire durante 20 min. Los insertos secos se tiñeron en Hoescht ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) durante 30 min antes del lavado en agua destilada.

Los insertos en policarbonato fueron cortadas de los soportes y se colocaron en un medio de montaje sobre un portaobjetos de microscopio. Se aplicó un cubreobjetos y se selló con el barniz de uñas. Los portaobjetos se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Se capturaron diez imágenes de cada inserto y se analizó el número de células fluorescentes por imagen mediante soporte lógico Lucia Imaging. La proporción de células visibles sobre los insertos no recubiertos en comparación a las células visibles sobre los insertos recubiertos con Matrigel se expresó como % de invasión. A continuación, el porcentaje (%) de invasión en el control se comparó con las células tratadas con el oligómero de 24 unidades.

Los resultados se muestran en la FIG. 25. Se puede observar que el FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) es un potente inhibidor de la invasión de células HMEC-1, PC3 y MDA-231. Además de proporcionar más datos para apoyar la inhibición de la migración de HMEC-1, los datos indican que el FKBP-L de 24 unidades también puede inhibir la invasión a través de Matrigel; una etapa importante en el procedimiento angiogénico. Los datos también indican que la metástasis de los tumores CD44+ve puede ser inhibida en un entorno clínico.

Ejemplo 22: Efecto del FKBP-L de 24 unidades sobre la adherencia celular (N = 3)

Este ensayo mide la capacidad de las células para adherirse. Ésta es una característica importante de la angiogénesis y la metástasis. Importantes mediadores del reclutamiento de leucocitos y de la adherencia al endotelio incluyen E-selectina, VCAM-1, e ICAM-1 que son regulados al alza durante la inflamación, iniciando la adhesión de leucocitos al endotelio, y en última instancia contribuyen a la progresión de la enfermedad o al daño tisular.

Una placa de 96 pocillos se pre-recubrió con una fina capa de Matrigel, que se dejó reposar durante la noche. Los pocillos de la placa se bloquearon con BSA al 0,5% durante 1 hora a 37°C en una incubadora con 95% de aire/5%

de CO₂. A las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) se les añadió tripsina y se resuspendieron en medio de nueva aportación y se sembraron a una densidad de 20000 células por pocillo. Las placas se colocaron a 4°C durante 10 min para permitir que las células se sedimenten en el fondo de los pocillos. La cantidad requerida de medio con un suplemento del FKBP-L de 24 unidades se añadió a cada pocillo y la placa se incubó durante 1 h a 37°C. El exceso de medio y de células no unidas se retiró y los pocillos se lavaron tres veces con PBS estéril. A los pocillos se les añadió un suplemento de medio de nueva aportación y se les añadió MTT (5 mgml⁻¹). La placa se incubó durante otras 4 h a 37°C. Se añadió DMSO a cada pocillo para solubilizar el MTT a formazano y la placa se leyó a 540 nm, comparando la absorbancia relativa de los pocillos de control con los pocillos suplementados con FKBP-L de 24 unidades.

Los resultados se muestran en la FIG. 26. Se puede observar que el FKBP-L de 24 unidades es un potente inhibidor de la adherencia de HMEC-1. Además de proporcionar datos adicionales para apoyar la inhibición de la migración y la invasión HMEC-1, este ensayo también indica que el FKBP-L de 24 unidades puede inhibir la adherencia, un paso importante en el proceso angiogénico y otros estados de enfermedad.

Ejemplo 23: El efecto de la 24mer FKBP-L en MDA-231 y migración de células tumorales PC3 (N = 3)

El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al. (1999) véase más arriba. Se sembraron células MDA231 (línea celular de tumor de mama; CD44 + ve) y PC3 (línea celular de tumor de próstata; CD44 + ve) en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se retiró y las monocapas se hirieron. A la monocapa se le añadió un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) para proporcionar la concentración final requerida (10⁻¹⁴-10⁻⁷M). Las monocapas se incubaron durante 24 h y después se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%.

El grado de cierre "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles de tratamiento simulado coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Los resultados se muestran en la FIG. 27A (células MDA-23) y 27B (células PC3). Se encontró que FKBP-L de 24 unidades puede inhibir la migración de células tumorales MDA-231 y PC3. Éstos son líneas de células tumorales CD44 + ve, lo que indica de nuevo que FKBP-L puede actuar a través de CD44, de una manera similar a la observada con la proteína recombinante completa (FIG. 17). Los datos sugieren que el FKBP-L de 24 unidades podría inhibir las metástasis tumorales en un subconjunto de líneas de células tumorales CD44 + ve.

Ejemplo 24: El FKBP-L de 24 unidades es un inhibidor angiostático (N = 3)

Con el fin de determinar si el FKBP-L de 24 unidades ejerce un efecto permanente o estático sobre la gemación de nuevas células endoteliales se utilizó el ensayo del anillo aórtico de rata. Se sacrificaron ratas Wistar macho y la aorta torácica se retiró asépticamente y se seccionó en anillos de 1 cm de espesor. Los anillos se lavaron diez veces en medio estéril para eliminar cualquier bacteria y se embebieron en Matrigel en placas de 24 pocillos. A los pocillos se les añadieron 2 ml de medio. Las placas se incubaron durante hasta 15 días. Cada día los anillos de Matrigel fueron fotografiados y devolvieron a su incubadora. Se llevaron a cabo otros dos experimentos: (A) adición de FKBP-L de 24 unidades al medio después de que los vasos hubieran crecido durante siete días; y (B) adición de FKBP-L de 24 unidades al medio en la etapa inicial de incorporación, con posterior eliminación después de siete días y reposición con medio de nueva aportación durante otros siete días. El grado de desarrollo de los vasos se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50), y se midió electrónicamente utilizando soporte lógico de formación de imágenes Lucia. La longitud del vaso se midió y se comparó con controles simulados coincidentes en el tiempo y se calculó el porcentaje de inhibición (%).

Los resultados se muestran en la FIG. 28A y 28B. En condiciones de control, se observó el desarrollo de vasos entre los días 3 y 14 alcanzando un máximo de 1400 µm, el día 14. En un experimento paralelo se permitió que se desarrollaran los vasos durante siete días (aprox. 800 µm) y el medio se retiró y se le volvió a añadir un suplemento de medio que contenía FKBP-L de 24 unidades 10⁻⁹M. La adición de oligómero de 24 unidades causó la inhibición completa del desarrollo de los vasos cuando se comparó con los controles coincidentes en el tiempo (FIG. 28A).

En un experimento inverso (FIG. 28B), los anillos aórticos se expusieron inicialmente a medio con un suplemento del FKBP-L de 24 unidades y se incubaron durante siete días. El FKBP-L de 24 unidades casi inhibió completamente el desarrollo de vasos. Se retiró el medio con el suplemento de FKBP-L de 24 unidades de los anillos y añadió medio de nueva aportación, lo que da como resultado el crecimiento continuado de los vasos.

Estos experimentos sugieren que el FKBP-L de 24 unidades inhibe el desarrollo de vasos de una manera

angiostático y cuando los vasos son o bien maduros o recién incorporados.

Ejemplo 25: El FKBPL de 24 unidades (SEQ IN NO: 10) inhibe la angiogénesis *in vivo* utilizando el ensayo de esponja; comparación con FKBPL recombinante completo (N = 1, 3 ratones por grupo)

Este experimento evaluó la capacidad del FKBP-L de 24 unidades para inhibir la angiogénesis utilizando el ensayo de esponja en ratón. Se implantaron subcutáneamente esponjas de poliéter en ratones C57 de color negro en día 0 y se les inyectaron en días alternos (a) 10 ng de control de bFGF (3 ratones) (b) 10 ng de factor de crecimiento de fibroblastos bovino (bFGF) + 5µg FKBPL recombinante etiquetado con His completo (equivalente a $3,2 \times 10^{-6}$ M *in vitro*) (3 ratones) (c) 10 ng de bFGF + 0,35 g de FKBPL de 24 unidades (equivalente molar de 5 µg de FKBPL recombinante completo) (3 ratones) o (d) 0,11 ng de FKBPL de 24 unidades (equivalente a 10^{-9} M *in vitro*) (3 ratones).

Todos los ratones se sacrificaron el día 21. Las esponjas se retiraron, se fijaron y se embebieron en parafina. Se tiñeron con hematoxilina y eosina secciones de 5 µm. Los vasos fueron contados ciegamente por 3 evaluadores independientes utilizando un aumento x40 en 10 campos por sección. A continuación, el recuento promedio por esponja/ratón fue representado por cada evaluador.

Los resultados se muestran en la FIG. 29. Se puede observar que la inyección de bFGF solo dio como resultado un número significativo de crecimiento de vasos en la esponja (media no de vasos/campo x40 = 10). Se observó una reducción de 50% en el número de vasos en las esponjas tratadas tanto con bFGF como con 5 µg de FKBPL recombinante completo. Se observó una reducción de 80% en el número de vasos en las esponjas tratadas tanto con bFGF como con 0,35 µg de FKBPL de 24 unidades. Incluso la dosis más baja de FKBPL de 24 unidades redujo el número de vasos en 70% en comparación con las esponjas tratadas con bFGF solo. Estos resultados muestran que el FKBPL de 24 unidades puede inhibir la angiogénesis *in vivo*, lo que sugiere un potencial valor terapéutico en un entorno clínico. Los datos también indican que el FKBPL de 24 unidades puede ser más potente que la proteína FKBPL completa en la inhibición de la angiogénesis.

Ejemplo 26: Evaluación del péptido FKBPL de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) en una línea celular endotelial de ratón utilizando el ensayo de raspado de la herida

Este experimento evaluó la capacidad del FKBP-L de 24 unidades para inhibir la migración de células endoteliales a lo largo de un intervalo de dosis que oscila de 10^{-14} M a 10^{-7} M. El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al (1999) véase más arriba. En este ensayo las células endoteliales de ratón, 2H-11, se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection y se cultivaron en D-MEM que contenía FCS al 10%. Éstas se sembraron en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se retiró y la monocapa se hirió. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido del péptido FKBPL de 24 unidades para lograr un intervalo de dosis de 10^{-14} - 10^{-7} M. Las monocapas se incubaron durante 7 horas y después se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%.

El grado de cierre "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 µm) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L de 24 unidades se comparó con controles de tratamiento simulado coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 30. Se puede observar que el FKBPL de 24 unidades inhibe el cierre de heridas en las células endoteliales de ratón. La inhibición máxima se observó entre 10^{-9} y 10^{-11} M. Los datos demuestran que el FKBPL de 24 unidades inhibe la migración de las células endoteliales del ratón y, como tal, puede ser un inhibidor de la migración celular, la angiogénesis y la metástasis. Los datos apoyan los experimentos *in vivo* llevados a cabo en ratones descritos en la presente memoria (p. ej., Figuras: 8, 9, 15, 29 y 31)

Ejemplo 27: El péptido FKBP-L de 24 unidades (QIRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS) es un potente inhibidor del crecimiento de tumor DU145 *in vivo* después de la inyección IP diaria (n = 1, 6 ratones por grupo de tratamiento)

Cultivo celular

Se obtuvieron células DU145 (carcinoma de próstata) de Cancer Research UK y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%. Todas las líneas celulares se cultivaron en forma de monocapas, se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂.

Modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata

Se utilizaron 24 ratones machos inmunocomprometidos (inmunodeficiencia combinada grave) (Harlan). Los ratones se aclimatan y se enjaularon en grupos de 5 o menos en un aislador. Se cultivaron células DU145 (carcinoma de próstata) como se describió anteriormente. Las células sub-confluentes se cosecharon y la concentración celular se ajustó a 5×10^7 células/ml en PBS. El dorso de cada ratón se afeitó. Después de la intervención estética, cada ratón recibió inyecciones intradérmicas de células tumorales 5×10^6 DU145 (100 μ l) bilateralmente en el dorso posterior con una aguja de calibre 26. Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un volumen de 150 a 175 mm³. Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento: (a) Control: PBS solamente (8 ratones); (b) péptido FKBPL de 24 unidades: 0,3 mg/kg/día (6 ratones); (c) péptido FKBPL de 24 unidades: 3×10^{-3} mg/kg/día (6 ratones); y (d) péptido FKBPL de 24 unidades: 3×10^{-4} mg/kg/día (5 ratones).

Los ratones recibieron inyecciones IP diarias (100 μ l) de los tratamientos anteriores. El peso y el volumen del tumor de cada ratón se registraron cada 2 días. El volumen del tumor se calculó como: Largo x Ancho x Alto x 0,5236. Veintiún días después del tratamiento inicial se sacrificaron los siguientes animales: FKBPL de 24 unidades 0,3 mg/kg/día (2 ratones), 3×10^{-3} mg/kg/día (2 ratones), 3×10^{-4} mg/kg/día (1 ratón) y PBS (2 ratones). Los tumores se extirparon y se almacenaron en solución de formalina salina para futuros análisis histopatológicos.

Los resultados se muestran en la FIG. 31. Se puede observar que el tratamiento mediante inyección i.p. con el péptido FKBPL de 24 unidades a dosis de 0,3 mg/kg/día o 3×10^{-3} mg/kg/día redujo significativamente el crecimiento de los tumores DU145 en ratones SCID en comparación con los tumores tratados con vehículo solamente (FIG. 31A). Varios tumores tratados con las dosis más eficaces de péptido FKBPL de 24 unidades mostraron evidencia de un centro necrótico, es decir, se veían rosquilla en forma. Esto es típico de los efectos observados con antiangiogénicos.

Un conjunto completo de datos se muestra en la (FIG. 31A). Obsérvese que dos animales de control tratados con PBS fueron excluidos de los datos mostrados en la FIG. 31A. El primer animal de control fue excluido debido a que su tumor fue comido por otro animal; el otro animal control fue excluido debido a su tumor se implantó demasiado cerca de la cola por error, que se sabe que restringe el crecimiento.

Se trazaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier utilizando el tiempo para que los tumores alcanzaran 3 veces su volumen de tratamiento como criterio para el sacrificio (Figs. 31B-D). Se puede observar claramente que los tumores de los animales tratados con el FKBPL de 24 unidades, tanto a 0,3 mg/kg/día (FIG. 31B) como a 0,003 mg/kg/día (FIG. 31D) alcanzaron 3 veces su volumen de tratamiento significativamente más tarde que los controles. Todos menos dos tumores (de 6) del grupo de tratamiento de 0,3 mg/kg/día y uno (de 6) del grupo de tratamiento de 0,003 mg/kg/día no lograron llegar a triplicar su volumen dentro del plazo de duración del experimento. Sin embargo, aquellos tumores que alcanzaron 3 veces su volumen de tratamiento fueron claramente necróticos siguiendo el examen macroscópico. Estos tumores por lo tanto también estaban respondiendo, pero su mayor tamaño fue causado por la necrosis masiva en lugar de por las células tumorales viables. Los tumores en animales tratados con la dosis más baja de 0,0003 mg/kg/día no fueron significativamente diferentes de los controles.

Ninguno de los animales perdió peso después del tratamiento diario con el oligómero de 24 unidades lo que sugiere que es bien tolerado y no manifiestamente tóxico (FIG. 31E).

Ejemplo 28: Efecto de los péptidos candidato que abarcan el dominio activo de FKBP-L sobre la viabilidad o la proliferación de HMEC-1 utilizando el ensayo MTT (N = 3)

Se utilizó un ensayo MTT para medir la viabilidad y/o la proliferación celular. En resumen, se sembraron las células HMEC-1 ($2,5 \times 10^3$) en placas de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante 5 h. Las células se trataron con FKBP-L de 24 unidades (SEQ ID NO: 10) (10^{-5} - 10^{-10} M), de 1-57 unidades (SEQ ID NO: 6) (10^{-9} M y 10^{-10} M) o medio (control).

Después de la incubación las células se expusieron a una solución de 5 mgml⁻¹ de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) durante 4 h. Las células se aspiraron y se añadieron 200 μ l de DMSO para reducir la sal e inducir un cambio de color. Los pocillos se analizaron colorimétricamente a 550 nm y los resultados se compararon con las células control no tratadas.

Los resultados se muestran en las FIGS. 32 y 33. La FIG. 32 muestra un rango de dosis para el tratamiento de células con el FKBP-L de 24 unidades y las FIGS. 33A y 33B muestran el efecto del FKBP-L de 24 unidades y de FKBP-L de 1-57 unidades (oligómero de 57 unidades) después de 24 horas y 48 horas, respectivamente. Se puede observar que ninguno de los péptidos tuvo ningún efecto significativo sobre la proliferación de células HMEC-1 en comparación con los controles coincidentes en el tiempo en cualquiera de los puntos temporales medidos, lo que sugiere que los efectos antiangiogénicos observados en los ensayos anteriores no fueron causados por la inhibición del crecimiento celular o por la toxicidad mediada por péptidos.

Ejemplo 29: Análisis de péptidos basados en el oligómero de 24 unidades truncado con el fin de evaluar la importancia de cada péptido en términos de inhibición de la migración celular utilizando el ensayo de raspado de la herida

El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton et al. (1999) véase más arriba. Se sembraron HMEC-1 en cámaras individuales sobre un portaobjetos de vidrio y se cultivaron hasta 90% de confluencia durante la noche. El medio se retiró y las monocapas se hirieron. A la monocapa se le volvió a añadir un suplemento de medio de nueva aportación y se añadió el volumen requerido de cada péptido (es decir, péptidos 1-17, SEQ ID NOS: 12-28; Tabla 4 de más abajo) para proporcionar la concentración final requerida (10^{-14} - 10^{-6} M).

Para preparar el Péptido 1, el fluoróforo Alexa488 (Invitrogen) se ancló a la funcionalidad sulfhidrilo de la cadena lateral de un residuo de cisteína que se colocó en el extremo C-terminal de la secuencia del oligómero de 24 unidades. Se utilizó un espaciador de PEG para conectar este residuo de cisteína C-terminal al extremo C-terminal de la secuencia del oligómero de 24 unidades. Esto se realizó durante la síntesis del péptido mediante la incorporación del elemento constitutivo disponible comercialmente ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, un espaciador de polietilenglicol (NeoMPS) para proporcionar un espaciador de PEG entre la secuencia del oligómero de 24 unidades y la cisteína marcada con Alexa C-terminal. El espaciador de PEG/fluoróforo tiene la estructura: -NH-(CH₂)₂O-(CH₂)₂O-(CH₂)₂-CO-Cys (Alexa488). Los otros péptidos también se prepararon hicieron mediante la incorporación de elementos constitutivos disponibles en el mercado para generar los péptidos 2-17 de más abajo.

Tabla 4

Péptidos FKBP-L		
Péptidos	Secuencia	SEQ ID NO:
1	QIRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS-PEG-C (Alexa488)	12
2	PiroGlu-IRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS-OH	13
3	IRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS-OH	14
4	QIRQQPRDPPTETLELEVSPD-OH	15
5	QIRQQPRDPPTETLELEV-OH	16
6	QIRQQPRDPPTETLE-OH	17
7	QIRQQPRDPTE-OH	18
8	QQPRDPPTETLELEVSPDPAS-OH	19
9	RDPPTETLELEVSPDPAS-OH	20
10	PTETLELEVSPDPAS-OH	21
11	TLELEVSPDPAS-OH	22
12	RQQPRDPPTETLELEVSPD-OH	23
13	RQQPRDPPTETLELEVSP-OH	24
14	RQQPRDPPTETLELEVS-OH	25
15	PRDPPTETLELEVSPD-OH	26
16	RDPPTETLELEVSPD-OH	27
17	Ac-QIRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS-NH ₂	28

Las monocapas se incubaron durante 24 h y a continuación se fijaron en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%. El grado de cierre de la "herida" fue evaluado a ciegas microscópicamente por un investigador independiente y se cuantificó utilizando una escala ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μ m) a un aumento 20x (Olympus BX 50). El grado de cierre en los portaobjetos tratados con FKBP-L se comparó con controles de tratamiento simulado coincidentes en el tiempo y se calculó el % de inhibición de cierre de la herida en comparación con los controles coincidentes en el tiempo.

Los resultados para los péptidos 1 a 12 se muestran en la FIG. 34A-L, respectivamente y en la Tabla 5.

Tabla 5

Péptidos	actividad a dosis baja	actividad a dosis alta
oligómero de 24 unidades	+++	+++
Pep1	+++	+++
QIRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS (488)		
Pep 2	-	-
pQIRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS		
Pep 3	+++	+
IRQQPRDPPTETLELEVSPDPAS		
Pep 4	+++	-
QIRQQPRDPPTETLELEVSPD		
Pep 5	++	+
QIRQQPRDPPTETLELEV		
Pep 6	-	++
QIRQQPRDPPTETLE		
Pep 7	+	-
QIRQQPRDPPTTE		
Pep 8	++++	-
QQPRDPPTETLELEVSPDPAS		
Pep 9	++++	++
RDPPTETLELEVSPDPAS		
Pep 10	-	++
PTETLELEVSPDPAS		
Pep 11	-	++
TLELEVSPDPAS		
Pep 12	+++	+++
RQQPRDPPTETLELEVSPD-OH		

Se encontró que el Péptido 12 mostraba actividad que era aproximadamente la misma que la del FKBP-L de 24 unidades. Estos datos sugieren que algunos péptidos derivados FKBP-L exhiben una respuesta a la dosis bifásica. Los datos también sugieren que la subregión -QQPRDPPTETLELEVSPD- (SEQ ID NO: 11) puede ser un potente dominio anti-angiogénico. Los datos indican adicionalmente que un fragmento del SEQ ID NO: 10, que incluye 18 o más aminoácidos contiguos (véase, p. ej., el Péptido 5, SEQ ID NO: 16; el Péptido 12, SEQ ID NO: 23, y SEQ ID NO: 11) puede ser activo como agente anti-angiogénico. Los péptidos adicionales que incluyen este dominio se muestran en la FIG. 1.

5 Ejemplo 30: Análisis de FKBP-L recombinante purificado

Expresión de la proteína FKBP-L recombinante

15 FKBP-L (variante Thr181, Gly186), clonado en los sitios *Bam*HI y *Pst*I del vector pRSET-A, se expresó en BL21 (DE3) para proporcionar la correspondiente proteína etiquetada con poli-histidina N-terminal (SEQ ID NO: 1). La expresión se indujo a una DO de 0,6 con IPTG 0,2 mM, cultivando las células durante la noche a 15°C. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se almacenaron a -20°C.

20 Purificación de FKBP-L recombinante

La purificación de la proteína se realizó bajo condiciones de desnaturalización, con una etapa de replegamiento en la columna. Las células se lisaron en tampón de lisis (NaH₂PO₄ 100 mM de pH 8,0, Tris 10 mM, urea 8 M, NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 5 mM) mediante sonicación en hielo durante 3x 2 minutos con enfriamiento. Los desechos

celulares y el material insoluble se eliminaron por centrifugación a 31100 rcf durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró con jeringa a través de filtros de 0,45 µm.

Una columna HisTrap HP de 5 ml se equilibró en tampón de unión (urea 8 M, NaCl 0,5 M, tampón de fosfato de sodio 20 mM de pH 8,0, β-mercaptoetanol 5 mM) y el producto lisado celular se cargó en la columna. La columna se lavó con 10 volúmenes de la columna de tampón de lavado (urea 8 M, NaCl de 0,5 M, tampón de fosfato de sodio 20 mM de pH 8,0, imidazol 20 mM, β-mercaptoetanol 5 mM), a continuación se reequilibró en el tampón de unión.

La proteína unida se replegó lentamente en un gradiente lineal de 30 ml de tampón de replegamiento al 0-100% (imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, tampón de fosfato de sodio 20 mM de pH 7,4, β-mercaptoetanol 1 mM), seguido de 5 min en tampón de replegamiento al 100%.

Las proteínas unidas se eluyeron en un gradiente lineal de 30 ml de tampón de elución al 0-100% (imidazol 500 mM, NaCl 0,5 M, tampón de fosfato de sodio 20 mM de pH 7,4, β-mercaptoetanol 1 mM). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y se agruparon en consecuencia. Para reducir las concentraciones de imidazol, NaCl y β-mercaptoetanol, la proteína se dializó frente a tampón de fosfato de sodio 20 mM de pH 7,4 con NaCl 150 mM (Figura 35A) o se hizo correr a través de una columna prep HiLoad 26/60 Superdex 75 26/60 en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM (FIG. 35C y la FIG. 36). Las muestras de FKBP-L recombinante se compararon mediante SDS PAGE (FIGS. 35A y 35B) y PAGE nativa (FIG. 35C, recuadro).

HPLC analítica y espectrometría de masas

Se hicieron correr muestras de 50 µg de FKBP-L recombinante con y sin DTT 100 mM en una columna analítica Jupiter 5u c5 con un gradiente de acetonitrilo al 0-73% durante 30 minutos. Los picos se recogieron y se analizaron mediante espectrometría de masas por electropulverización.

Análisis de penetración en gel

Los siguientes patrones de peso molecular se llevaron a cabo en una columna Superose2 10/300 GL en tampón (NaH₂PO₄ 20 mM de pH 7,4, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM): azul de dextrano, alcohol deshidrogenasa, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica y citocromo c. Se utilizaron los volúmenes de elución de los picos para calcular Kav para el FKBP-L recombinante completo, del cual se podría calcular la masa molecular a partir de la curva de calibración.

El Kav se calculó como

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

donde Ve es el volumen de elución, Vo es el volumen vacío (volumen de elución de azul dextrano) y Vt es el volumen total de la columna. Kav se representó frente a log de peso molecular para proporcionar una línea recta de la cual se extrajo la ecuación y se utilizó para estimar el peso molecular para un Ve dado.

Para el análisis, se hicieron circular 140 g de muestras de FKBP-L recombinante con y sin DTT 100 mM en las mismas condiciones y se estimaron las masas moleculares estimadas a partir del Ve como se ha descrito anteriormente. Además, la columna se equilibró en tampón de DTT 1 mM y se hizo circular una muestra adicional de FKBP-L pretratado con DTT en estas condiciones (FIG. 36).

Entrecruzamiento de proteínas utilizando glutaraldehído

Se añadió una concentración final al 1% de glutaraldehído a 25 µg de FKBP-L recombinante (dializado) en 500 µl de tampón (NaH₂PO₄ 20 mM de pH 7,4, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM) durante 30 segundos. La reacción se sofocó mediante la adición de NaBH₄, la proteína se precipitó con desoxicolato de Na y TCA y se analizó mediante SDS PAGE en condiciones reductoras (FIG. 37).

Estos experimentos muestran que la proteína FKBP-L recombinante expresada y purificada y dializada aquí mostró una pureza de una sola banda en el análisis SDS PAGE en condiciones reductoras (FIG. 35A). El análisis mediante SDS PAGE y el análisis mediante PAGE nativa de FKBP-L (FIG. 35B y la FIG. 35C, respectivamente) en condiciones no reductoras (FIG. 35B calle 3 y FIG. 35C) y en condiciones reductoras (FIG. 35B calle 4 y FIG. 35C) muestra que FKBP-L forma especies multiméricas de mayor peso molecular a través de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre los residuos de cisteína dentro de la proteína.

El análisis de HPLC analítica de FKBP-L recombinante seguido de espectrometría de masas por electropulverización proporcionó una masa de 42.257 (esperada 42.220) para el FKBP-L reducido, confirmando la identidad de la

proteína.

Se utilizó el análisis de penetración en gel para intentar obtener información acerca de la estructura cuaternaria de FKBP-L recombinante (FIG. 36). En las condiciones descritas, el FKBP-L reducido eluye con un volumen de elución medio de 12 ml. A partir de la calibración de la columna con una serie de patrones de peso molecular, un volumen de elución de 12 ml corresponde a una masa de 99 KDa. Del mismo modo el entrecruzamiento con glutaraldehído de FKBP-L recombinante en presencia de DTT mostró consistentemente una banda en el análisis SDS PAGE ejecutado a 97 kDa (FIG. 37). Estos resultados indican que FKBP-L puede formar especies homodiméricas y/o homotrimérica a través de asociación no covalente. Esto es compatible con la presencia de repeticiones de tetratricopéptido pronosticadas dentro de la secuencia de aminoácidos FKBP-L, que se sabe que inducen la trimerización en otras proteínas.

Ejemplo 31: Generación de anticuerpos FKBP-L

El FKBP-L (variante Thr181, Gly186, clonada en los sitios BamHI y PstI del vector pRSET-A, se expresó en BL21 (DE3) para proporcionar la correspondiente proteína etiquetada con poli-histidina N-terminal (SEQ ID NO: 1). Un clon de secuencia verificada se transformó en células de E. coli BL21(DE3) y se cultivó hasta la fase logarítmica, y la expresión de la proteína diana se indujo mediante la adición de isopropil-BD-tiogalactósido (IPTG, 1 mM) y se incubó durante otras 4 horas a 37°C. Los sedimentos celulares se volvieron a suspender y se lisaron en NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, que contenía urea 8 M, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM. El producto lisado bruto desnaturalizado se clarificó mediante centrifugación (10.000 g, 60 minutos a 4°C), antes de la aplicación a una columna IMAC cargada con iones Ni²⁺ con una columna HiTrap de 1 ml (GE Healthcare). El material unido no específicamente se lavó de la columna utilizando NaH₂PO₄, 50 mM, pH 8,0, que contenía urea 8 M, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, seguido de replegamiento en columna por reducción de la urea a partir de 8 a 0 M más sobre 200 volúmenes de columna. El material unido replegado en columna se lavó con 20 volúmenes de columna de NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, a continuación, se eluyó con NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, e imidazol 250 mM. Las fracciones de proteína se recogieron y se desalaron en PBS.

Se inmunizaron conejos (siguiendo las directrices estándar del Ministerio del Interior del Reino Unido) con la proteína recombinante y se administraron refuerzos cada 3 semanas hasta que se completaron cuatro refuerzos. Se recogió el suero y se evaluó frente a FKBP-L recombinante (generado como antígeno) mediante análisis de transferencia Western. Se detectó un grupo FKBP-L de aproximadamente el 39 kDa.

Las realizaciones de la presente invención, por tanto, proporcionan métodos y composiciones que comprenden FKBP-L. En ciertas realizaciones, FKBP-L y sus fragmentos peptídicos son polipéptidos con utilidad clínica como agentes anti-angiogénicos y/o anti-metastáticos para el uso en el tratamiento de cáncer y/o otras afecciones donde se esperaría que tal terapia tuviera un resultado de pronóstico positivo. El polipéptido tiene efectos inhibidores del crecimiento demostrables sobre las células cancerosas seleccionadas indicativos de un efecto terapéutico secundario o primario potencial sobre los tumores especificados.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Almac Sciences Limited Robson, Tracy San Valentín, Andrea O'Rourke, Martin Hirst, David

<120> FKBP-L y usos del mismo

5 <130> 56178-343800

<150> UK 0611405.2

<151> 2006-06-09

<160> 58

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 385

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

15 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys
35 40 45

Asp Thr Ser Gln Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn
50 55 60

Leu Asp Ser Val Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr
65 70 75 80

Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Gln Ile Leu
85 90 95

Glu His Thr Gln Gly Ala Glu Lys Leu Val Ala Glu Leu Glu Gly Asp
100 105 110

Ser His Lys Ser His Gly Ser Thr Ser Gln Met Pro Glu Ala Leu Gln
115 120 125

Ala Ser Asp Leu Trp Tyr Cys Pro Asp Gly Ser Phe Val Lys Lys Ile
130 135 140

ES 2 548 332 T3

Val Ile Arg Gly His Gly Leu Asp Lys Pro Lys Leu Gly Ser Cys Cys
145 150 155 160

Arg Val Leu Ala Leu Gly Phe Pro Phe Gly Ser Gly Pro Pro Glu Gly
165 170 175

Trp Thr Glu Leu Thr Met Gly Val Gly Pro Trp Arg Glu Glu Thr Trp
180 185 190

Gly Glu Leu Ile Glu Lys Cys Leu Glu Ser Met Cys Gln Gly Glu Glu
195 200 205

Ala Glu Leu Gln Leu Pro Gly His Thr Gly Pro Pro Val Gly Leu Thr
210 215 220

Leu Ala Ser Phe Thr Gln Gly Arg Asp Ser Trp Glu Leu Glu Thr Ser
225 230 235 240

Glu Lys Glu Ala Leu Ala Arg Glu Glu Arg Ala Arg Gly Thr Glu Leu
245 250 255

Phe Arg Ala Gly Asn Pro Glu Gly Ala Ala Arg Cys Tyr Gly Arg Ala
260 265 270

Leu Arg Leu Leu Leu Thr Leu Pro Pro Pro Gly Pro Pro Glu Arg Thr
275 280 285

Val Leu His Ala Asn Leu Ala Ala Cys Gln Leu Leu Leu Gly Gln Pro
290 295 300

Gln Leu Ala Ala Gln Ser Cys Asp Arg Val Leu Glu Arg Glu Pro Gly
305 310 315 320

His Leu Lys Ala Leu Tyr Arg Arg Gly Val Ala Gln Ala Ala Leu Gly
325 330 335

Asn Leu Glu Lys Ala Thr Ala Asp Leu Lys Lys Val Leu Ala Ile Asp
340 345 350

Pro Lys Asn Arg Ala Ala Gln Glu Glu Leu Gly Lys Val Val Ile Gln
355 360 365

Gly Lys Asn Gln Asp Ala Gly Leu Ala Gln Gly Leu Arg Lys Met Phe
370 375 380

Gly
385

<210> 2

<211> 349

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

5

ES 2 548 332 T3

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
 1 5 10 15
 Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
 20 25 30
 Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
 35 40 45
 Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Gln Ile Leu Glu His Thr Gln
 50 55 60
 Gly Ala Glu Lys Leu Val Ala Glu Leu Glu Gly Asp Ser His Lys Ser
 65 70 75 80
 His Gly Ser Thr Ser Gln Met Pro Glu Ala Leu Gln Ala Ser Asp Leu
 85 90 95
 Trp Tyr Cys Pro Asp Gly Ser Phe Val Lys Lys Ile Val Ile Arg Gly
 100 105 110
 His Gly Leu Asp Lys Pro Lys Leu Gly Ser Cys Cys Arg Val Leu Ala
 115 120 125
 Leu Gly Phe Pro Phe Gly Ser Gly Pro Pro Glu Gly Trp Thr Glu Leu
 130 135 140
 Thr Met Gly Val Gly Pro Trp Arg Glu Glu Thr Trp Gly Glu Leu Ile
 145 150 155 160
 Glu Lys Cys Leu Glu Ser Met Cys Gln Gly Glu Glu Ala Glu Leu Gln
 165 170 175
 Leu Pro Gly His Thr Gly Pro Pro Val Gly Leu Thr Leu Ala Ser Phe
 180 185 190
 Thr Gln Gly Arg Asp Ser Trp Glu Leu Glu Thr Ser Glu Lys Glu Ala
 195 200 205

ES 2 548 332 T3

Leu Ala Arg Glu Glu Arg Ala Arg Gly Thr Glu Leu Phe Arg Ala Gly
210 215 220

Asn Pro Glu Gly Ala Ala Arg Cys Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Leu Leu
225 230 235 240

Leu Thr Leu Pro Pro Pro Gly Pro Pro Glu Arg Thr Val Leu His Ala
245 250 255

Asn Leu Ala Ala Cys Gln Leu Leu Leu Gly Gln Pro Gln Leu Ala Ala
260 265 270

Gln Ser Cys Asp Arg Val Leu Glu Arg Glu Pro Gly His Leu Lys Ala
275 280 285

Leu Tyr Arg Arg Gly Val Ala Gln Ala Ala Leu Gly Asn Leu Glu Lys
290 295 300

Ala Thr Ala Asp Leu Lys Lys Val Leu Ala Ile Asp Pro Lys Asn Arg
305 310 315 320

Ala Ala Gln Glu Glu Leu Gly Lys Val Val Ile Gln Gly Lys Asn Gln
325 330 335

Asp Ala Gly Leu Ala Gln Gly Leu Arg Lys Met Phe Gly
340 345

<210> 3

<211> 199

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
35 40 45

Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Gln Ile Leu Glu His Thr Gln
50 55 60

10

ES 2 548 332 T3

Gly Ala Glu Lys Leu Val Ala Glu Leu Glu Gly Asp Ser His Lys Ser
65 70 75 80

His Gly Ser Thr Ser Gln Met Pro Glu Ala Leu Gln Ala Ser Asp Leu
85 90 95

Trp Tyr Cys Pro Asp Gly Ser Phe Val Lys Lys Ile Val Ile Arg Gly
100 105 110

His Gly Leu Asp Lys Pro Lys Leu Gly Ser Cys Cys Arg Val Leu Ala
115 120 125

Leu Gly Phe Pro Phe Gly Ser Gly Pro Pro Glu Gly Trp Thr Glu Leu
130 135 140

Thr Met Gly Val Gly Pro Trp Arg Glu Glu Thr Trp Gly Glu Leu Ile
145 150 155 160

Glu Lys Cys Leu Glu Ser Met Cys Gln Gly Glu Glu Ala Glu Leu Gln
165 170 175

Leu Pro Gly His Thr Gly Pro Pro Val Gly Leu Thr Leu Ala Ser Phe
180 185 190

Thr Gln Gly Arg Asp Ser Trp
195

<210> 4

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
35 40 45

Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Gln Ile Leu Glu His Thr Gln
50 55 60

Gly Ala Glu Lys Leu Val Ala Glu Leu Glu Gly Asp Ser His Lys Ser
65 70 75 80

10

ES 2 548 332 T3

His Gly Ser Thr Ser Gln Met Pro Glu Ala Leu Gln Ala Ser Asp Leu
85 90 95

Trp Tyr Cys Pro Asp Gly Ser Phe Val Lys Lys Ile Val Ile Arg Gly
100 105 110

His Gly Leu Asp Lys Pro Lys Leu Gly Ser Cys Cys Arg Val Leu Ala
115 120 125

Leu Gly Phe Pro Phe Gly Ser Gly Pro Pro Glu Gly Trp Thr Glu Leu
130 135 140

Thr Met Gly Val Gly Pro
145 150

<210> 5

<211> 85

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
35 40 45

Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Gln Ile Leu Glu His Thr Gln
50 55 60

Gly Ala Glu Lys Leu Val Ala Glu Leu Glu Gly Asp Ser His Lys Ser
65 70 75 80

His Gly Ser Thr Ser
85

<210> 6

10 <211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
35 40 45

Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
50 55

15 <210> 7

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 548 332 T3

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu
35 40 45

<210> 8
<211> 39
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 8
Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro
35

<210> 9
<211> 33
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
1 5 10 15

Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
20 25 30

Ile
15 <210> 10
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu
1 5 10 15

Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
20

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser
1 5 10 15

Pro Asp
25 <210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <220>
<221> UNIÓN
<222> (24) ..(25)
<223> Hay una conexión PEG (polietilenglicol) entre el residuo 24 (serina) y 25 (cistina).
<220>

<221> MOD_RES
 <222> (25) ..(25)
 <223> Hay un fluoróforo (Alexa488) anclado al residuo final (cistina)
 <400> 12
 Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu
 1 5 10 15

 Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Cys
 5 20 25
 <210> 13
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ..(1)
 <223> El ácido glutámico se modifica para que sea Ácido Piroglutámico (PiroGlu)
 <400> 13
 Glu Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu
 1 5 10 15

 Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
 15 20
 <210> 14
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 14
 Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu
 1 5 10 15

 Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
 20
 <210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu
 1 5 10 15

 Glu Val Ser Pro Asp
 20
 <210> 16
 <211> 18
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu
 1 5 10 15

 Glu Val
 <210> 17
 35 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
 1 5 10 15
 40 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 21
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser
 1 5 10 15

 Pro Asp Pro Ala Ser
 20
 <210> 20
 10 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro
 1 5 10 15
 15
 Ala Ser
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
 1 5 10
 <210> 23
 30 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val
 1 5 10 15

 Ser Pro Asp
 35 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val
 1 5 10 15

 Ser Pro
 40 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 25
 Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val
 1 5 10 15

 Ser

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 26
 Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser Pro Asp
 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu Glu Val Ser Pro Asp
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 24
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ..(1)
 20 <223> ACETILACION
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24) ..(24)
 <223> El residuo final (Serina) termina en un grupo amida en lugar de un ácido.
 25 <400> 28
 Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu Leu
 1 5 10 15

 Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser
 20
 <210> 29
 <211> 349
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 29

ES 2 548 332 T3

Met Glu Thr Pro Pro Val Asn Thr Ile Gly Glu Lys Asp Thr Ser Gln
 1 5 10 15
 Pro Gln Gln Glu Trp Glu Lys Asn Leu Arg Glu Asn Leu Asp Ser Val
 20 25 30
 Ile Gln Ile Arg Gln Gln Pro Arg Asp Pro Pro Thr Glu Thr Leu Glu
 35 40 45
 Leu Glu Val Ser Pro Asp Pro Ala Ser Gln Ile Leu Glu His Thr Gln
 50 55 60
 Gly Ala Glu Lys Leu Val Ala Glu Leu Glu Gly Asp Ser His Lys Ser
 65 70 75 80
 His Gly Ser Thr Ser Gln Met Pro Glu Ala Leu Gln Ala Ser Asp Leu
 85 90 95
 Trp Tyr Cys Pro Asp Gly Ser Phe Val Lys Lys Ile Val Ile Arg Gly
 100 105 110
 His Gly Leu Asp Lys Pro Lys Leu Gly Ser Cys Cys Arg Val Leu Ala
 115 120 125
 Leu Gly Phe Pro Phe Gly Ser Gly Pro Pro Glu Gly Trp Thr Glu Leu
 130 135 140
 Thr Met Gly Val Gly Pro Trp Arg Glu Glu Thr Trp Gly Glu Leu Ile
 145 150 155 160
 Glu Lys Cys Leu Glu Ser Met Cys Gln Gly Glu Glu Ala Glu Leu Gln
 165 170 175
 Leu Pro Gly His Ser Gly Pro Pro Val Arg Leu Thr Leu Ala Ser Phe
 180 185 190
 Thr Gln Gly Arg Asp Ser Trp Glu Leu Glu Thr Ser Glu Lys Glu Ala
 195 200 205
 Leu Ala Arg Glu Glu Arg Ala Arg Gly Thr Glu Leu Phe Arg Ala Gly
 210 215 220

ES 2 548 332 T3

Asn Pro Glu Gly Ala Ala Arg Cys Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Leu Leu
225 230 235 240

Leu Thr Leu Pro Pro Pro Gly Pro Pro Glu Arg Thr Val Leu His Ala
245 250 255

Asn Leu Ala Ala Cys Gln Leu Leu Leu Gly Gln Pro Gln Leu Ala Ala
260 265 270

Gln Ser Cys Asp Arg Val Leu Glu Arg Glu Pro Gly His Leu Lys Ala
275 280 285

Leu Tyr Arg Arg Gly Val Ala Gln Ala Ala Leu Gly Asn Leu Glu Lys
290 295 300

Ala Thr Ala Asp Leu Lys Lys Val Leu Ala Ile Asp Pro Lys Asn Arg
305 310 315 320

Ala Ala Gln Glu Glu Leu Gly Lys Val Val Ile Gln Gly Lys Asn Gln
325 330 335

Asp Ala Gly Leu Ala Gln Gly Leu Arg Lys Met Phe Gly
340 345

<210> 30

<211> 1050

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 30

```
atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag      60
tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga      120
gaccctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ccaaattcta      180
gagcatactc aaggagctga aaaactggtt gctgaacttg aaggagactc tcataagtct      240
catggatcaa ccagtcagat gccagaggcc cttcaagctt ctgatctctg gtactgcccc      300
gatgggagct ttgtcaagaa gatcgtaatc cgtggccatg gcttggacaa acccaaacta      360
ggctcctgct gccgggtact ggctttgggg ttctcttctg gatcagggcc gccagagggc      420
tggacagagc taactatggg cgtagggcca tggagggagg aaacttgggg ggagctcata      480
gagaaatgct tggagtccat gtgtcaaggt gaggaagcag agcttcagct gcctgggcac      540
tctggacctc ctgtcaggct cacactggca tcttctactc aaggccgaga ctcttgggag      600
ctggagacta gcgagaagga agccttgccc agggaagaac gtgcaagggg cacagaacta      660
tttcgagctg ggaacctga aggagctgcc cgatgctatg gacgggctct tcggctgctc      720
ctgactttac cccacctgg ccctccagaa cgaactgtcc ttcattgcaa tctggctgcc      780
tgtcagttgt tgctagggca gcctcagttg gcagcccaga gctgtgaccg ggtgttgagg      840
cgggagcctg gccatttaaa ggccttatac cgaagggggg ttgcccaggc tgccttggg      900
aacctggaaa aagcaactgc tgacctcaag aaggtgctgg cgatagatcc caaaaaccgg      960
gcagcccagg aggaactggg gaaggtggtc attcagggga agaaccagga tgcagggctg     1020
gctcagggtc tgcgcaagat gtttggtgta                                     1050
```

<210> 31

<211> 1050

10

	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 31	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gacctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ccaaattcta	180
	gagcatactc aaggagctga aaaactgggt gctgaacttg aaggagactc tcataagtct	240
	catggatcaa ccagtcagat gccagaggcc cttcaagctt ctgatctctg gtactgcccc	300
	gatgggagct ttgtcaagaa gatcgtaatc cgtggccatg gcttggacaa acccaaacta	360
	ggctcctgct gccgggtact ggctttgggg ttccctttcg gatcagggcc gccagagggc	420
	tggacagagc taactatggg cgtagggcca tggaggaggg aaacttgggg ggagctcata	480
	gagaaatgct tggagtccat gtgtcaaggt gaggaagcag agcttcagct gcctgggcac	540
	actggacctc ctgtcgggct cacactggca tccttcactc aaggccgaga ctctggggag	600
	ctggagacta gcgagaagga agccctggcc agggaagaac gtgcaagggg cacagaacta	660
	tttcgagctg ggaacctga aggagctgcc cgatgctatg gacgggctct tcggctgctc	720
	ctgactttac cccacactgg ccctccagaa cgaactgtcc ttcattgcaa tctggctgcc	780
	tgtcagttgt tgctagggca gcctcagttg gcagcccaga gctgtgaccg ggtgttgag	840
	cgggagcctg gccatttaaa ggctttatc cgaagggggg ttgcccaggc tgccttggg	900
	aacctggaaa aagcaactgc tgacctcaag aaggtgctgg cgatagatcc caaaaaccgg	960
	gcagcccagg aggaactggg gaaggtggtc attcagggga agaaccagga tgcagggctg	1020
	gctcagggtc tgcgcaagat gtttggctga	1050
5	<210> 32	
	<211> 102	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Homo Sapiens	
	<400> 32	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattt ag	102
	<210> 33	
	<211> 119	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Homo Sapiens	
	<400> 33	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
20	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccg	119
	<210> 34	
	<211> 143	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Homo Sapiens	
	<400> 34	

	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gaccctccta ccgaaacgct tga	143
	<210> 35	
	<211> 174	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Homo sapiens	
	<400> 35	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gaccctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ctaa	174
10	<210> 36	
	<211> 258	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Homo sapiens	
	<400> 36	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gaccctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ccaaattcta	180
	gagcatactc aaggagctga aaaactggtt gctgaacttg aaggagactc tcataagtct	240
	catggatcaa ccagttag	258
	<210> 37	
	<211> 453	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Homo sapiens	
	<400> 37	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gaccctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ccaaattcta	180
	gagcatactc aaggagctga aaaactggtt gctgaacttg aaggagactc tcataagtct	240
	catggatcaa ccagtcagat gccagaggcc cttcaagctt ctgatctctg gtactgcccc	300
	gatgggagct ttgtcaagaa gatcgtaatc cgtggccatg gcttggaaca acccaacta	360
	ggctcctgct gccgggtact ggctttgggg tttcctttcg gatcagggcc gccagagggc	420
25	tggacagagc taactatggg cgtagggcca tga	453
	<210> 38	
	<211> 600	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Homo sapiens	
	<400> 38	

	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gaccctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ccaaattcta	180
	gagcatactc aaggagctga aaaactgggt gctgaacttg aaggagactc tcataagtct	240
	catggatcaa ccagtcagat gccagaggcc cttcaagctt ctgatctctg gtactgcccc	300
	gatgggagct ttgtcaagaa gatcgtaatc cgtggccatg gcttggacaa acccaaacta	360
	ggctcctgct gccgggtact ggctttgggg ttctcttctg gatcagggcc gccagagggc	420
	tggacagagc taactatggg cgtagggcca tggagggagg aaacttgggg ggagctcata	480
	gagaaatgct tggagtccat gtgtcaagggt gaggaagcag agcttcagct gcctgggcac	540
	tctggacctc ctgtcaggct cacactggca tccttcactc aaggccgaga ctcttggtag	600
5	<210> 39	
	<211> 600	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Homo sapiens	
10	<400> 39	
	atggagacgc caccagtcaa tacaattgga gaaaaggaca cctctcagcc gcaacaagag	60
	tgggaaaaga accttcggga gaaccttgat tcagttattc agattaggca gcagccccga	120
	gaccctccta ccgaaacgct tgagctggaa gtaagcccag atccagccag ccaaattcta	180
	gagcatactc aaggagctga aaaactgggt gctgaacttg aaggagactc tcataagtct	240
	catggatcaa ccagtcagat gccagaggcc cttcaagctt ctgatctctg gtactgcccc	300
	gatgggagct ttgtcaagaa gatcgtaatc cgtggccatg gcttggacaa acccaaacta	360
	ggctcctgct gccgggtact ggctttgggg ttctcttctg gatcagggcc gccagagggc	420
	tggacagagc taactatggg cgtagggcca tggagggagg aaacttgggg ggagctcata	480
	gagaaatgct tggagtccat gtgtcaagggt gaggaagcag agcttcagct gcctgggcac	540
	actggacctc ctgtcgggct cacactggca tccttcactc aaggccgaga ctcttggtag	600
	<210> 40	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Homo sapiens	
	<400> 40	
	atggccaggc tccgctc	18
20	<210> 41	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Homo sapiens	
	<400> 41	
	cttcccaagc ctcccaag	18
	<210> 42	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Homo sapiens	
	<400> 42	
35	agaagacggg tcctccagtt	20

<210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 43
 gagtcaacgg atttggtcgt 20
 <210> 44
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 15 <400> 44
 ttgattttgg agggatctcg 20
 <210> 45
 <211> 39
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 45
 gaaccttgat tcagttattt agattaggca gcagccccg 39
 25 <210> 46
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Homo sapiens
 <400> 46
 cggggctgct gcctaacta aataactgaa tcaagggtc 39
 <210> 47
 <211> 38
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 47
 40 cagattaggc agcagccctg agaccctct accgaaac 38
 <210> 48
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 48
 gtttcggtag gagggctca gggctgctgc ctaatctg 38
 <210> 49
 50 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 55 <400> 49
 cctaccgaaa cgcttagct ggaagtaagc c 31
 <210> 50
 <211> 31
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 50
 ggcttacttc cagctaaagc gtttcggtag g 31

<210> 51
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 51
 cccagatcca gccagctaaa ttctagagca tac 33
 <210> 52
 10 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 15 <400> 52
 gtatgctcta gaatttagct ggctggatct ggg 33
 <210> 53
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 53
 ccagttagat catggatcaa gccagaggcc c 31
 25 <210> 54
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Homo sapiens
 <400> 54
 ggcctctgg catctaactg gttgatccat g 31
 <210> 55
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 55
 40 ggcgtagggc catgaaggga ggaaactg 29
 <210> 56
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 56
 caagttcct ccctcatgg ccctacgcc 29
 <210> 57
 50 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 55 <400> 57
 ccgagactcc tggtagctgg agactagc 28
 <210> 58
 <211> 28
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 58
 gctagtctcc agctaccagg agtctcgg 28
 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica tal polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado para su uso como un inhibidor de la angiogénesis, o para uso en el tratamiento de trastornos oculares mediados por la angiogénesis, en donde el derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 70% a la secuencia de aminoácidos mostrada en uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 28.
- 10 2. Un compuesto activo que comprende un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o (ii) un polinucleótido que codifica tal polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado para su uso en el tratamiento del cáncer, o para uso como un inhibidor de la migración y/o metástasis de células tumorales, o para su uso como un inhibidor del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, en donde el derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 70% a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 28.
- 15 3. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el polipéptido FKBP-L, fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L o fragmento del mismo se proporcionan combinados con al menos un agente quimioterapéutico o quimiopreventivo adicional o radioterapia.
- 20 4. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el al menos un agente quimioterapéutico o quimiopreventivo adicional comprende al menos uno de un antiangiogénico, endostatina, angiostatina, un inhibidor de VEGF, un agente citotóxico, un alcaloide, un antimetabolito, un inhibidor del crecimiento del cáncer, un agente terapéutico para terapia génica, una vacuna contra el cáncer, interferón, Aldesleucina, un anticuerpo monoclonal, un fármaco quimioterapéutico, radioterapia, terapia hormonal u otra terapia de apoyo.
- 25 5. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido FKBP-L comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10.
- 30 6. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el polipéptido FKBP-L comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1, el SEQ ID NO: 2, o el SEQ ID NO: 29.
- 35 7. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el fragmento biológicamente activo de FKBP-L comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 3 a 7, 10 a 28.
- 40 8. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 28, o una secuencia que consiste en al menos 18 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 10, o una secuencia idéntica en al menos 90% a la misma.
- 45 9. Un compuesto activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polinucleótido que codifica dicho polipéptido FKBP-L, fragmento o derivado comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 30 a 39, o al menos 54 nucleótidos contiguos de los SEQ ID NO: 30 a 39, o una secuencia idéntica en al menos 90% a la misma.
- 50 10. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en el SEQ ID NO: 10, o una secuencia idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 10, en donde dicho polipéptido incluye no más de 200 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 29, y en donde dicho polipéptido exhibe actividad antiangiogénica.
- 55 11. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 3 a 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 3 a 28.
- 60 12. Un polipéptido aislado que comprende un fragmento de FKBP-L biológicamente activo, en donde dicho fragmento consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en al menos uno de los SEQ ID NO: 3 a 7, 10 a 28, en ausencia de cualquier otra secuencia de aminoácido contigua de FKBP-L.
13. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 12, que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en al menos uno de los SEQ ID NO: 3 a 7 o 10 a 28.

14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
- 5 15. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 14, que comprende al menos los nucleótidos 100 a 172 del SEQ ID NO: 31 para codificar un péptido del SEQ ID NO: 10.
16. Un vector, tal como un vector de expresión, que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 14 o la reivindicación 15.
- 10 17. Una célula anfitriona transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 16.
18. Un método para producir un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, cuyo método comprende cultivar una célula anfitriona transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 16 bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y recuperar el polipéptido expresado.
- 15 19. Una composición que comprende un polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 20. Un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L, o un derivado biológicamente activo de tal polipéptido FKBP-L o fragmento para su uso como un medicamento, en donde el derivado biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 70% a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 28.
- 25 21. Un polipéptido FKBP-L aislado o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido FKBP-L para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho polipéptido FKBP-L o fragmento se define como en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.

FIG. 1A

SEQ ID NO: 1	MRGSHHHHHGASMTGCGQNGRDLYDDDDKDRGSMETPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVI QIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQSLIHTQGAELVAELEGDSHSHGSHGTSQMPALQASDIWYCPDG SFVKIVIRGHGLDKPKLGSCCRVLALGFPFGSGPEGTWGLTGWGFWRETTWGLTTEKLESMCQGE EALQLPGHTGPPVGLTYLASFTQGRDSWELETSEKRALAREERARGTELFRAQNPGEAARCYGRALRL LTLPPGPPERTVLHANLAACQLIGQPLAAQSCDRVLEREPGHLKALYRRGVAQAALGNLEKATADL KKVLAIDPNRAAQEELGKVIQGGKQDAGLAQGLRKMFG	
SEQ ID NO: 2	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQSLIHTQGAELV AELEGDSHSHGSHGTSQMPALQASDIWYCPDGSFVKIVIRGHGLDKPKLGSCCRVLALGFPFGSGPEG WTELTWGVGFWRETTWGLTEKLESMCQGEAELQLPGHTGPPVGLTYLASFTQGRDSWELETSEKRA REERARGTELFRAQNPGEAARCYGRALRLTLPPGPPERTVLHANLAACQLIGQPLAAQSCDRVLE REPGHLKALYRRGVAQAALGNLEKATADLKKVLAIDPNRAAQEELGKVIQGGKQDAGLAQGLRKMFG	A200 FKBP-L
SEQ ID NO: 3	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQSLIHTQGAELV AELEGDSHSHGSHGTSQMPALQASDIWYCPDGSFVKIVIRGHGLDKPKLGSCCRVLALGFPFGSGPEG WTELTWGVGFWRETTWGLTEKLESMCQGEAELQLPGHTGPPVGLTYLASFTQGRDSW	A151 FKBP-L
SEQ ID NO: 4	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQSLIHTQGAELV AELEGDSHSHGSHGTSQMPALQASDIWYCPDGSFVKIVIRGHGLDKPKLGSCCRVLALGFPFGSGPEG WTELTWGVGFWRETTWGLTEKLESMCQGEAELQLPGHTGPPVGLTYLASFTQGRDSW	A86 FKBP-L
SEQ ID NO: 5	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQSLIHTQGAELV AELEGDSHSHGSHGTS	A58 FKBP-L
SEQ ID NO: 6	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQSLIHTQGAELV	A48 FKBP-L
SEQ ID NO: 7	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPRDPTTETL	A40 FKBP-L
SEQ ID NO: 8	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVIQIRQPR	A34 FKBP-L
SEQ ID NO: 9	METPPVNTTIGEKDTSQPOQEWKKNLRNLDSDVI	FKBP-L
SEQ ID NO: 10	QIRQPRDPTTETLEEVSPDPAQ	FKBP-L 24 unidades

SEQ ID NO: 11	QQPRDPPTTETLELVSPD	Péptido 1
SEQ ID NO: 12	QIRQQPRDPPTTETLELVSPDPAS-PEG-C(Alexa488)	Péptido 2
SEQ ID NO: 13	PyroGlu-IRQQPRDPPTTETLELVSPDPAS	Péptido 3
SEQ ID NO: 14	IRQQPRDPPTTETLELVSPDPAS	Péptido 4
SEQ ID NO: 15	QIRQQPRDPPTTETLELVSPD	Péptido 5
SEQ ID NO: 16	QIRQQPRDPPTTETLEV	Péptido 6
SEQ ID NO: 17	QIRQQPRDPPTTETLE	Péptido 7
SEQ ID NO: 18	QIRQQPRDPPTTE	Péptido 8
SEQ ID NO: 19	QQPRDPPTTETLELVSPDPAS	Péptido 9
SEQ ID NO: 20	RDPPTTETLELVSPDPAS	Péptido 10
SEQ ID NO: 21	PTTETLELVSPDPAS	Péptido 11
SEQ ID NO: 22	TLELVSPDPAS	Péptido 12
SEQ ID NO: 23	RQQPRDPPTTETLELVSPD	Péptido 13
SEQ ID NO: 24	RQQPRDPPTTETLELVSP	Péptido 14
SEQ ID NO: 25	RQQPRDPPTTETLEVVS	Péptido 15
SEQ ID NO: 26	PRDPPTTETLELVSPD	Péptido 16
SEQ ID NO: 27	RDPPTTETLELVSPD	

FIG. 1B

SEQ ID NO: 28	AC-QIRQQPRDPPTTETLELVSPDPAS-NH ₂	Péptido 17
SEQ ID NO: 29	METPPVNTIGEKDTSQPPQEWENKRLRENLDSVIQIRQQPRDPPTTETLELVSPDPASQILEHTQGAEKLV AELEGDSHKSHGSTSQMPEALQASDLWYCPDGSFVKKIVIRGHGLDKPKLGSCCRVLAIGFPFGSGPPEG WTELTMGVGVPWRREETWGHLLIEKCLESMCQEEAEIQLPCHSGPPVRLTTLASTTQGRDSWELETSEKEALA REERARGTELFRAGNPEGAARCYGRALRLLLTLPPPGPPERTVLHANLAACQLLGGPQLAAQSCDRVLE REPGHLKALYRRGVAQAALGNLEKATADLKKVLAIDPKNRAAQEEIGKVVIOGKNQDAGLAQGLRKMFG	Base datos PUBMED

FIG. 1C

SEQ ID NO: 30

FIG. 2A

FIG. 2A

SEQ ID NO: 31 ADNc de FKBPL completo

ATGGAGACGCCACACAGTCAATACAAATGGAGAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAGA
ACCTTCGGGAGAACCTTGATTTCAGTTATTTCAGATTAGGCAGCAGCCCCGAGACCCCTCCTACCGAAACGCT
TGAGCTGGAAAGTAAGCCAGATCCAGCCAGCCAAATTCTAGAGCATACTCAAGGAGCTGAAAAACTGGTT
GCTGAACCTTGAAGGAGACTCTCATAGTCTCATGGATCAACCATCAGATGCCAGAGGCCCTTCAAGCTT
CTGATCTCTGGTACTGCCCGATGGGAGCTTTGTCAAGAAGATCGTAATCCGTGGCCATGGCTTGGACAA
ACCCAAACTAGGCTCCTGTGCCGGGTACTGGCTTTGGGGTTTCCCTTCGGATCAGGGCCGCCAGAGGGC
TGGACAGAGCTAACTATGGGCGTAGGGCCATGGAGGGAGGAAACTTGGGGGAGCTCATAGAGAAATGCT
TGGAGTCCATGTGTCAAGGTAGGAAGCAGAGCTTCAGCTGCCCTGGGCACACTGGACCTCCTGTCTGGGCT
CACACTGGCATCCTTCACTCAAGCCGAGACTCCTGGGAGCTGGAGACTAGCGAGAAGGAGCCCTGGCC
AGGGAAGAACGTCAGGGGCACAGAACTATTTCGAGCTGGGAACCTGAAGGAGCTGCCCGATGCTATG
GACGGGCTCTTCGGCTGCTCTGACTTTACCCCTCCAGAACGAAGTGTCTTCATGCCAA
TCTGGCTGCCCTGTCACTGTGTCTAGGGCAGCCCTCAGTTGGCAGCCAGAGCTGTGACCCGGGTGTGGAG
CGGAGCCCTGGCCATTAAAGGCCCTTATACCGAAGGGGGTTGCCAGGCTGCCCTTGGGAACCTGGAAA
AAGCAACTGCTGACCTCAAGAAGGTGCTGGCGATAGATCCCAAAACCGGGCAGCCAGGAGGAACCTGGG
GAAGGTGGTCAATTCAGGGGAAGAACCAAGGATGCAGGGCTGGCTCAGGGTCTGCGCAAGATGTTTGGCTGA

FIG. 2B

SEQ ID NO: 32 Δ34 FKBPL
 ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAAG
 AACCTTCGGGAGAACCTTGATTCAGTTATTAG

SEQ ID NO: 33 Δ40 FKBPL
 ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAAG
 AACCTTCGGGAGAACCTTGATTCAGTTATTTCAGTTATTAGGAGCAGCCCCCG

SEQ ID NO: 34 Δ48 FKBPL
 ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAAG
 AACCTTCGGGAGAACCTTGATTCAGTTATTTCAGTTATTAGGAGCAGCCCCCGAGACCCCTCTACCGAAACG
 CTTGA

SEQ ID NO: 35 Δ58 FKBPL
 ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAAG
 AACCTTCGGGAGAACCTTGATTCAGTTATTTCAGTTATTAGGAGCAGCCCCCGAGACCCCTCTACCGAAACG
 CTTGAGCTGGAAGTAAGCCAGATCCAGCCAGATCCAGCCAGTAA

SEQ ID NO: 36 Δ86 FKBPL
 ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAAG
 AACCTTCGGGAGAACCTTGATTCAGTTATTTCAGTTATTAGGAGCAGCCCCCGAGACCCCTCTACCGAAACG
 CTTGAGCTGGAAGTAAGCCAGATCCAGCCAGATCCAGCCAGTAACTCAAGGAGCTGAAAAAACTG
 GTGCTGAACCTTGAAGGAGACTCTCATAGTCTCATGGATCAACCACTTAG

FIG. 2C

SEQ ID NO: 37

A151 FKBPL

ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAG
AACCTTCGGGAGAACCTTGATTTCAGTTATTAGATTAGGCAGCAGCCCGAGACCCCTCTACCGAAACG
CTTGAGCTGGAAGTAAGCCAGATCCAGCCAGCCAAATTTAGAGCATACTCAAGGAGCTGAAAAACTG
GTTGCTGAACCTTGAAGGAGACTCTCATTAAGTCTCATGGATCAACCAGTCAGATGCCAGAGGCCCTTCAA
GCTTCTGATCTCTGGTACTGCCCCGATGGGAGTGTGTCAAGAAAGATCGTAATCCGTGGCCATGGCTTG
GACAAACCCAAACTAGGCTCCTGCTGCCGGGTACTGGCTTTGGGTTTCCCTTTCGGATCAGGGCCGCCA
GAGGCTGGACAGAGCTAACTATGGGCGTÀGGGCCATGA

SEQ ID NO: 38

A200 FKBPL (Base de datos PUBMED)

ATGGAGACGCCACCAGTCAATACAATTGGAGAAAGGACACCTCTCAGCCGCAACAAGAGTGGGAAAAG
AACCTTCGGGAGAACCTTGATTTCAGTTATTAGATTAGGCAGCAGCCCGAGACCCCTCTACCGAAACG
CTTGAGCTGGAAGTAAGCCAGATCCAGCCAGCCAAATTTAGAGCATACTCAAGGAGCTGAAAAACTG
GTTGCTGAACCTTGAAGGAGACTCTCATTAAGTCTCATGGATCAACCAGTCAGATGCCAGAGGCCCTTCAA
GCTTCTGATCTCTGGTACTGCCCCGATGGGAGCTTTGTCAAGAAGATCGTAATCCGTGGCCATGGCTTG
GACAAACCCAAACTAGGCTCCTGCTGCCGGGTACTGGCTTTGGGTTTCCCTTTCGGATCAGGGCCGCCA
GAGGCTGGACAGAGCTAACTATGGGCGTAGGCCCATGGAGGAGGAAACTTTGGGGGAGCTCATAGAG
AAATGCTTGGAGTCCATGTGTCAAGGTGAGGAAGCAGACTTCAGCTGCCTGGGCACCTCTGGACCTCCT
GTCAGGCTCACACTGGCATCCTTCACTCAAGGCCGAGACTCCTGGTAG

FIG. 2D

SEQ ID NO: 39 Δ200 FKBPL que fue clonado en pcDNA3.1

ATGGAGACGCCACCCAGTCAATACAAATTGGAGAAAGGACACCTCTCAGCCCGCAACAAGAGTGGGAAAAGA
ACCTTCGGGAGAACCTTGATTTCAGTTATTTCAGATTAGGCAGCAGCCCGGAGACCCTCCTACCGAAACGCT
TGAGCTGGAAGTAAGCCAGATCCAGCCAGCCAAATTTCTAGAGCATACTCAAGGAGCTGAAAACTGGTT
GCTGAACTTGAAGGAGACTCTCATAAGTCTCATGGATCAACCAGTCAGATGCCAGAGGCCCTTCAAGCTT
CTGATCTCTGGTACTGCCCCGATGGGAGCTTTGTCAAGAAGATCGTAATCCGTGGCCATGGCTTGGACAA
ACCCAAACTAGGCTCCTGTGCCGGTACTGGCTTTTGGGTTTCTTCGGATCAGGGCCGCCAGAGGGC
TGGACAGAGCTAACTATGGGGCTAGGGCCATGGAGGGAGGAAACTTGGGGGGAGCTCATAGAGAAATGCT
TGGAGTCCATGTGTCAAGGTGAGGAAGCAGAGCTTTCAGTGCCTGGGCACACTGGACCTCCTGTCTGGGCT
CACACTGGCATCCTTTCACCTCAAGGCCGAGACTCCTGGTAG

FIG. 2E

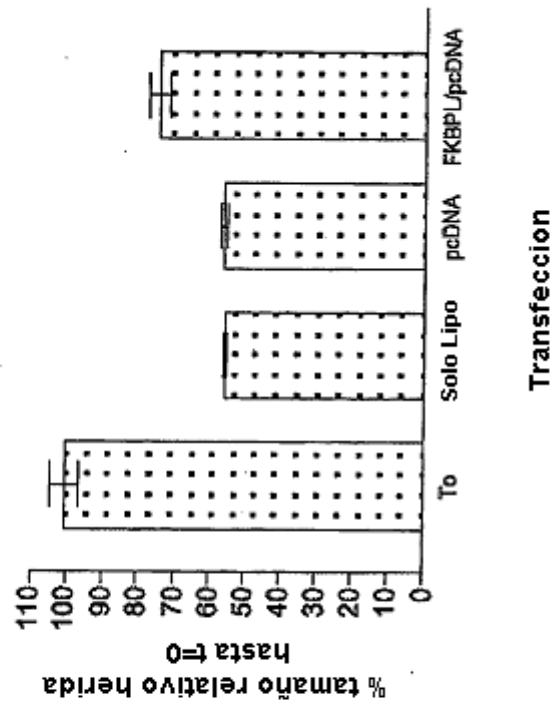


FIG. 3

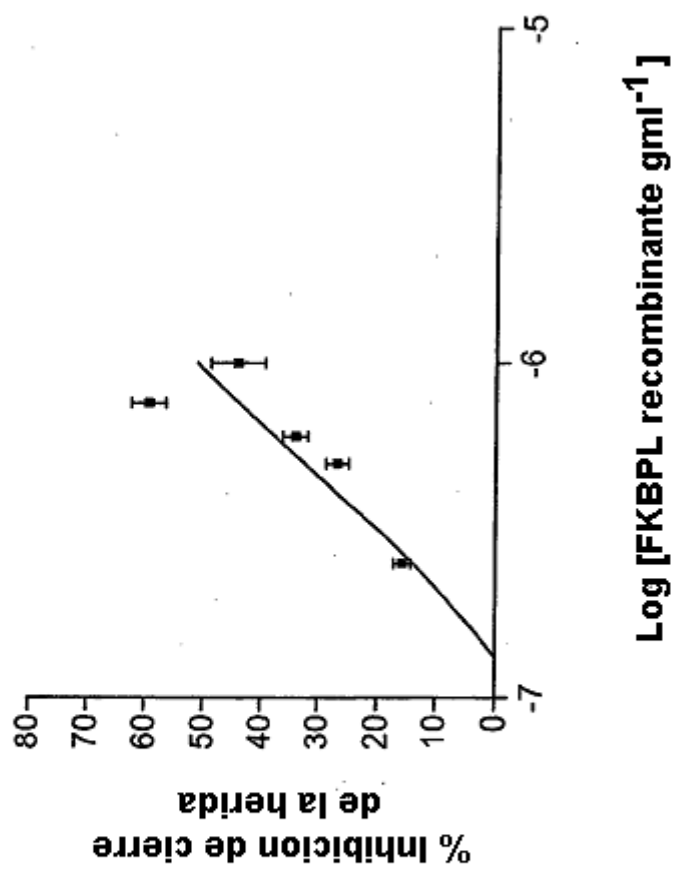


FIG. 4

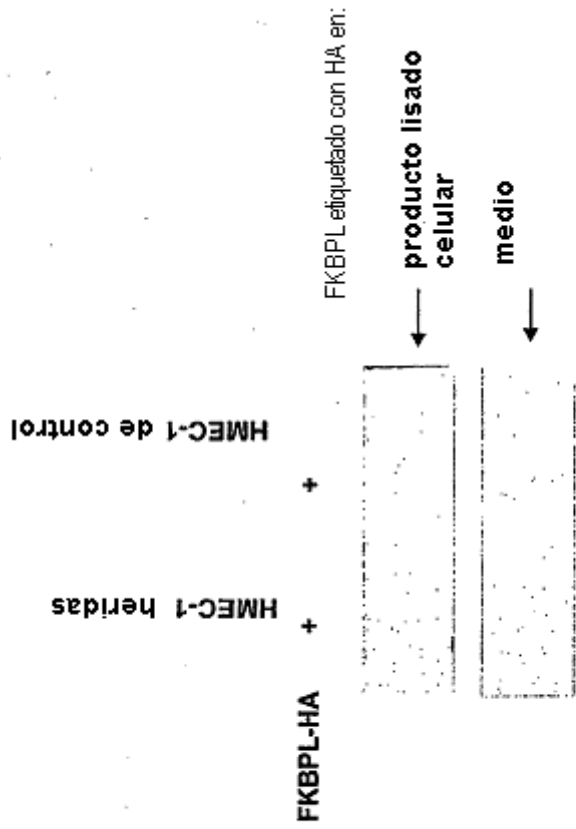


FIG. 5

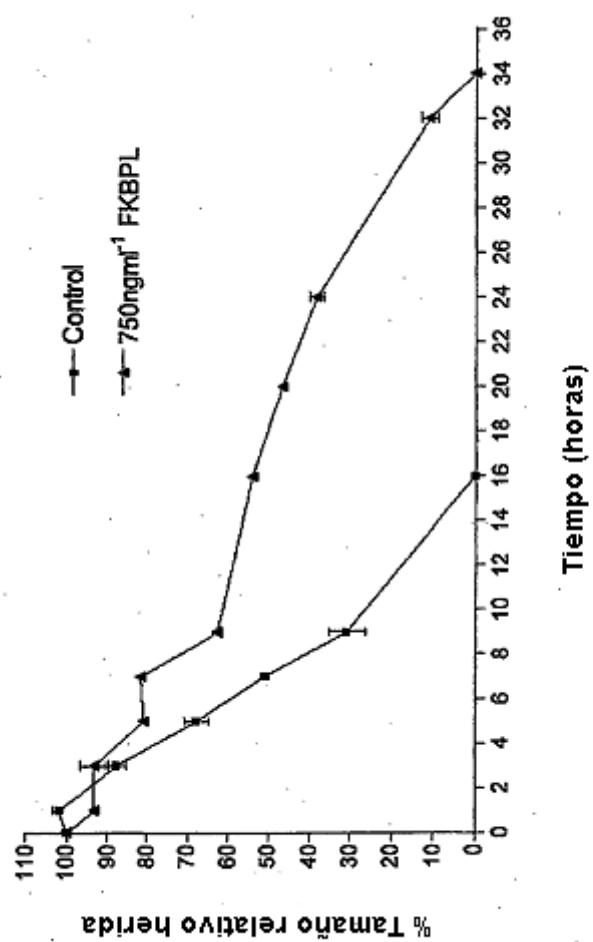


FIG. 6

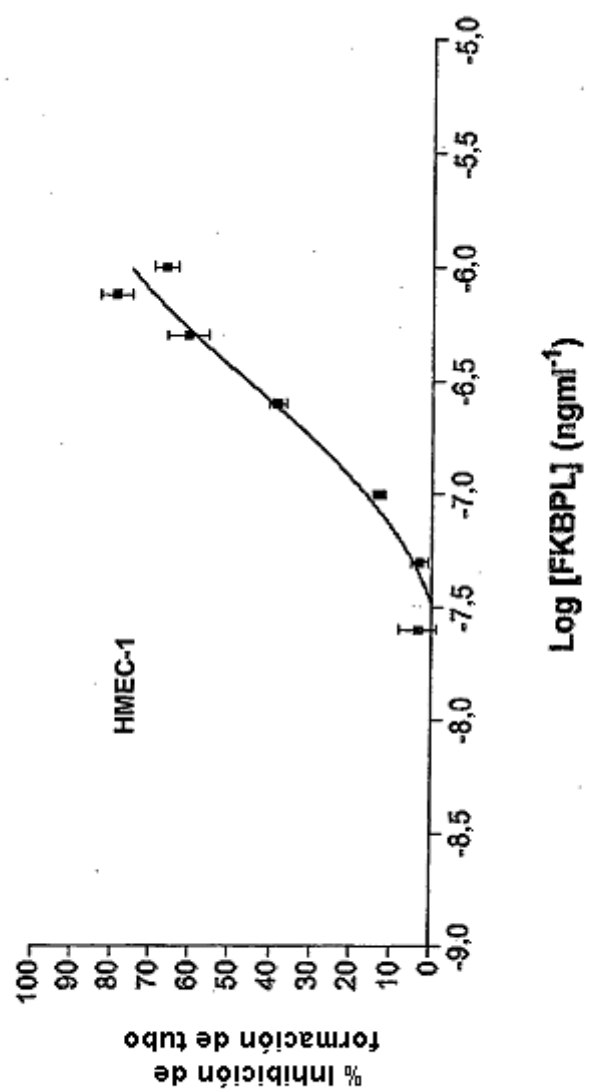


FIG. 7



FGF SOLO (H + E)

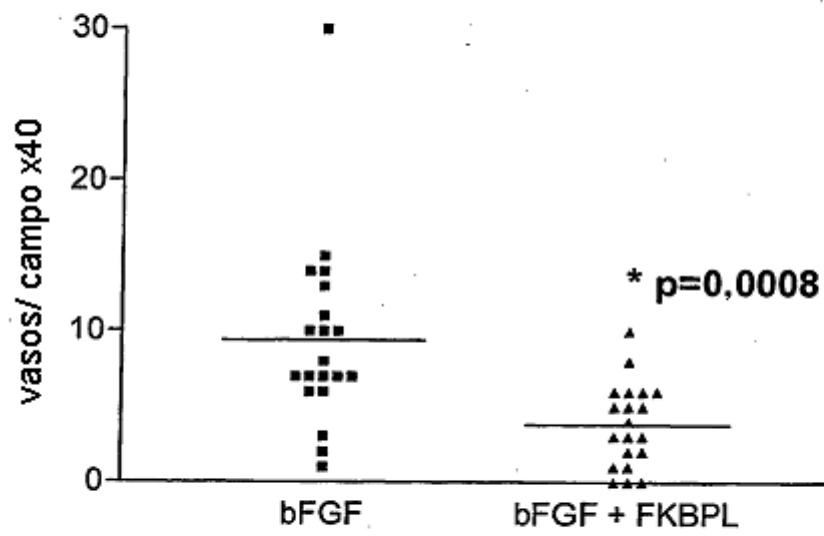


FGF + FKBPL (H + E)

FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 9



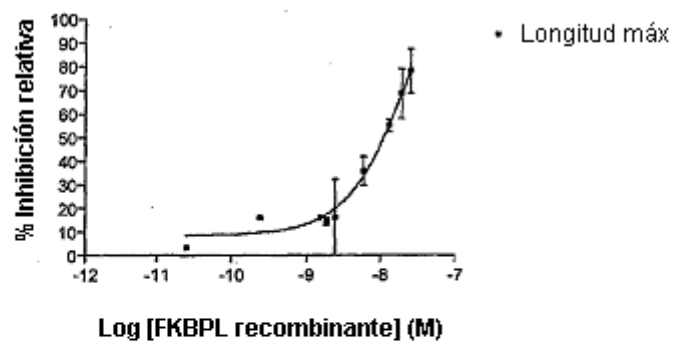
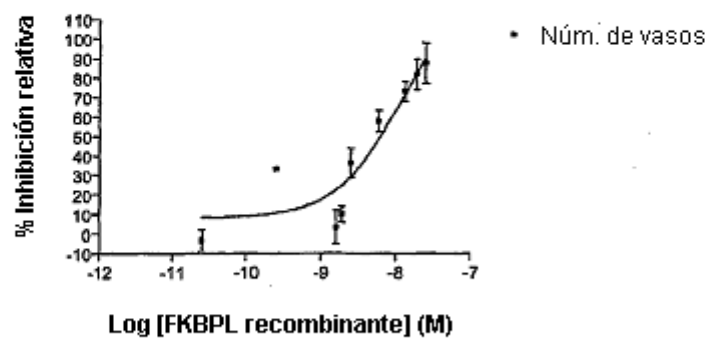
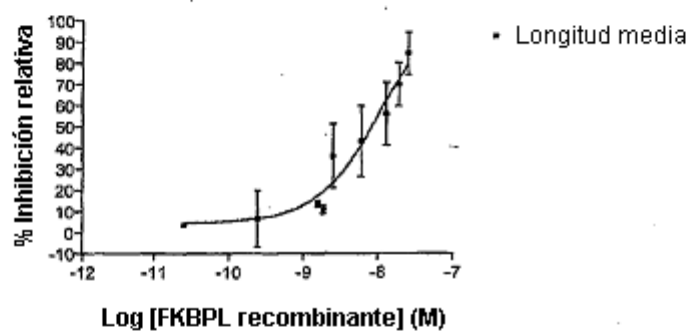


FIG. 10



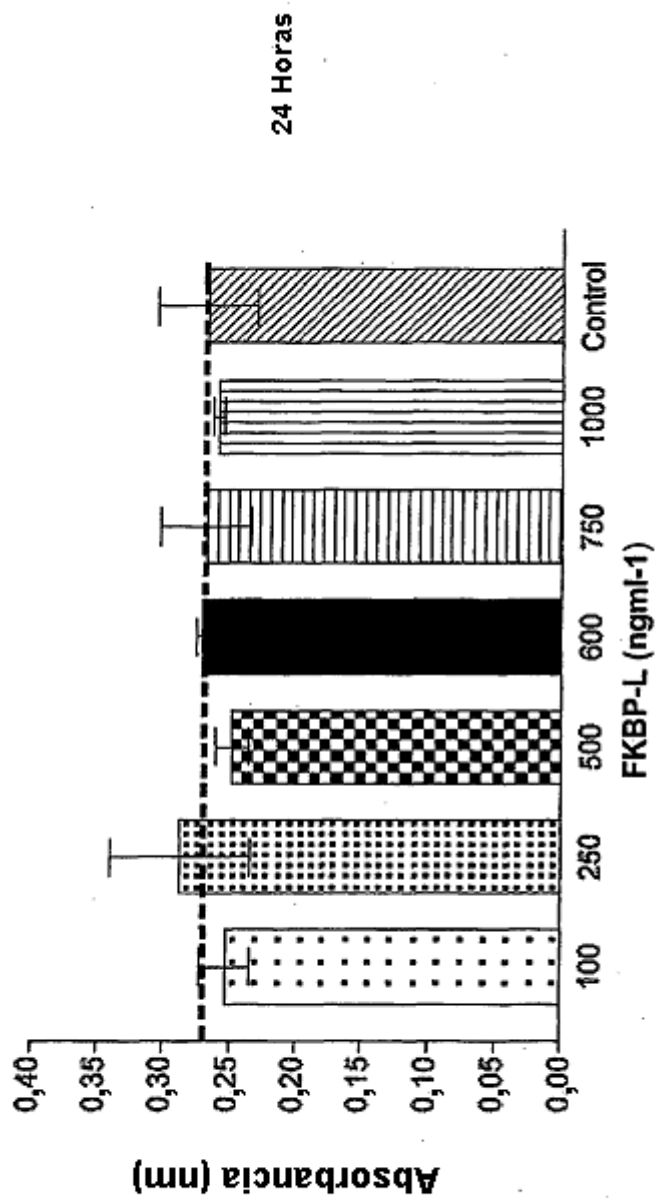


FIG. 11A

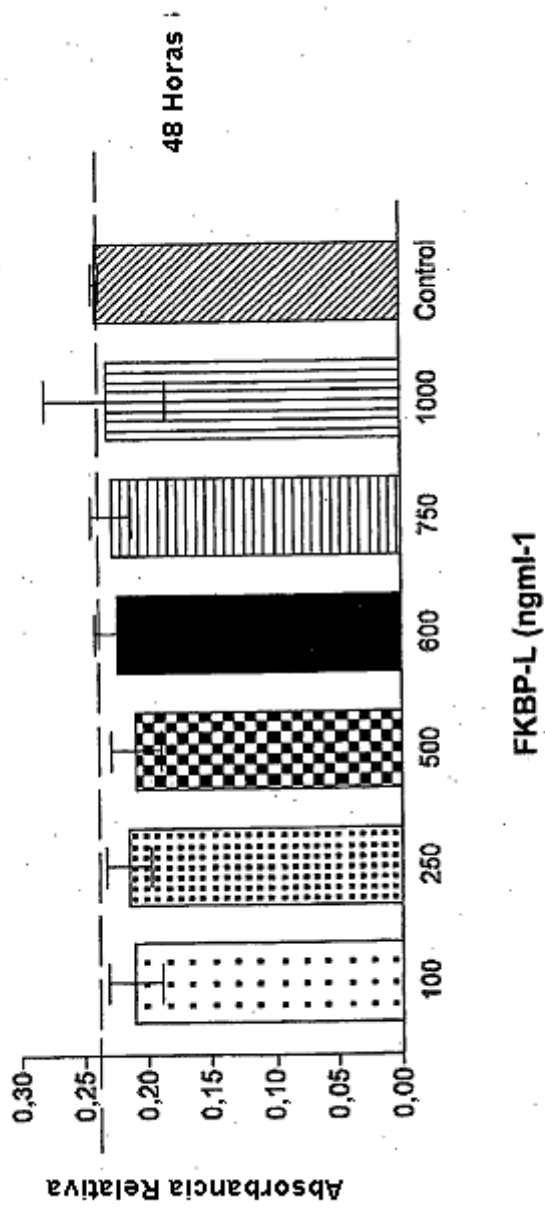
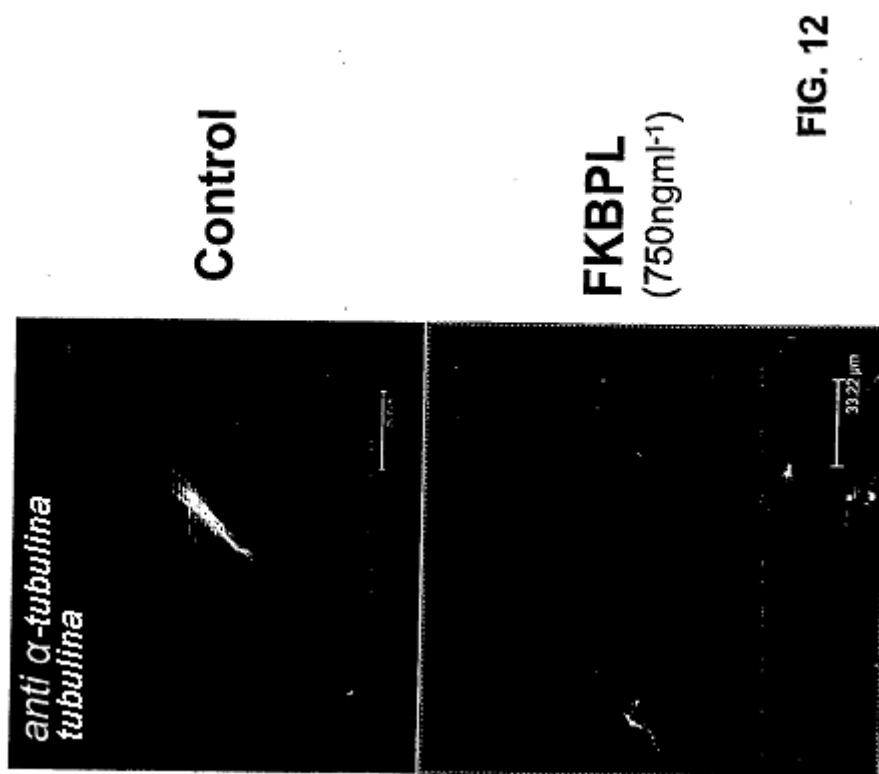
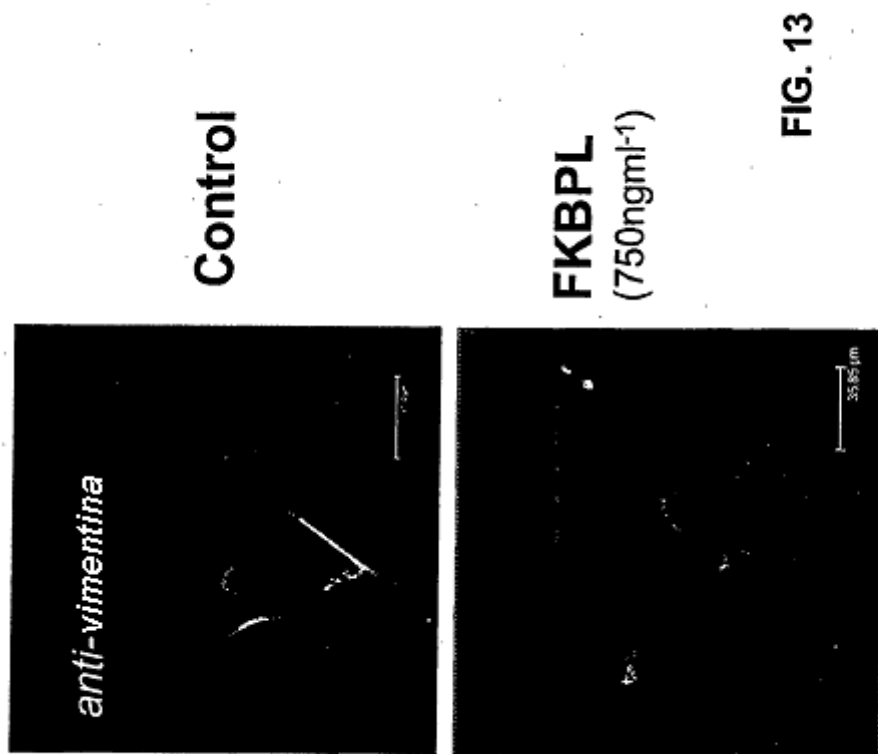


FIG. 11B





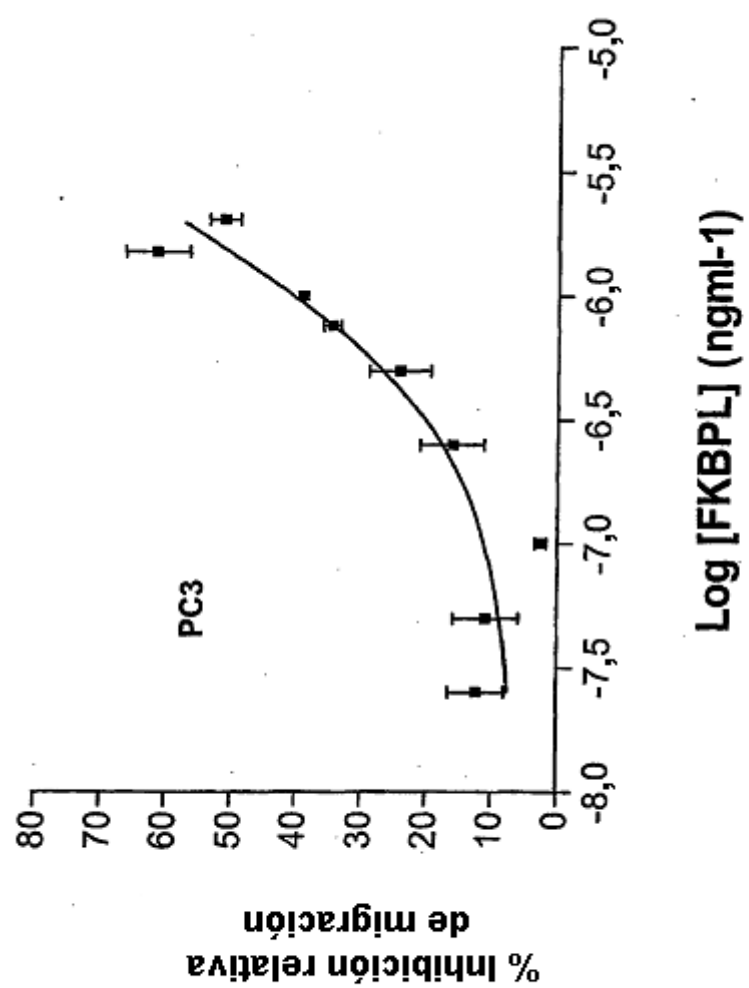


FIG. 14A

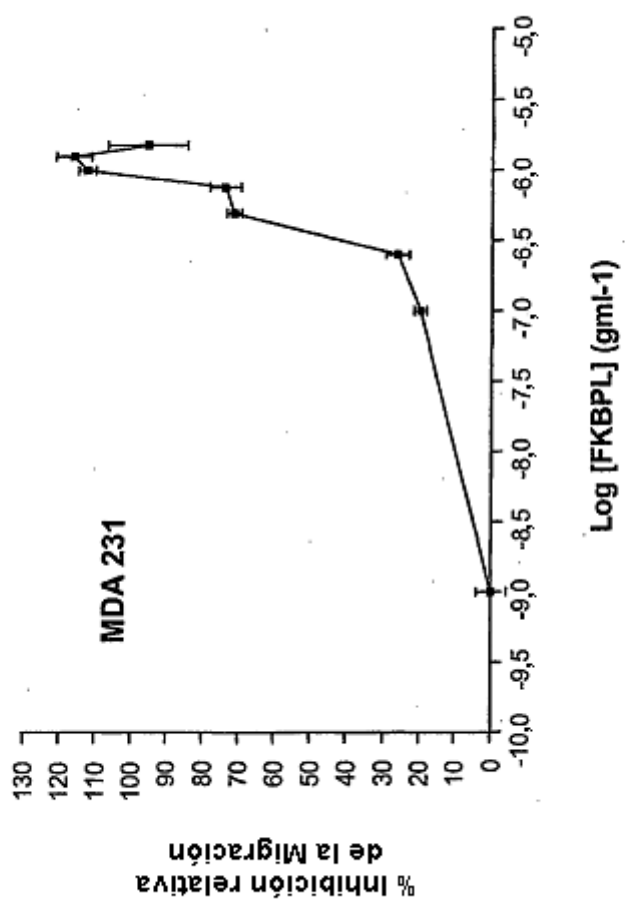


FIG. 14B

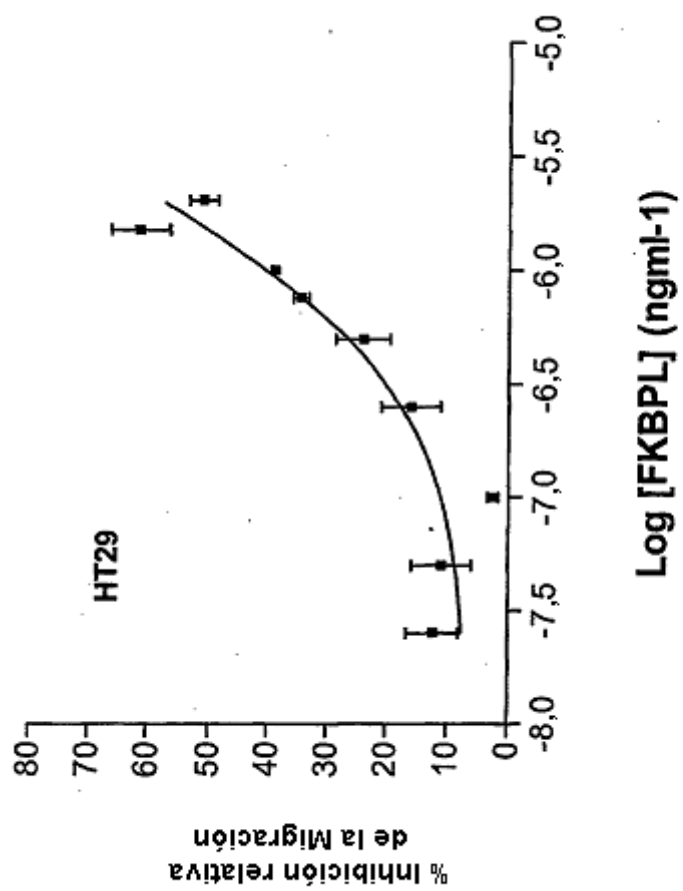


FIG. 14C

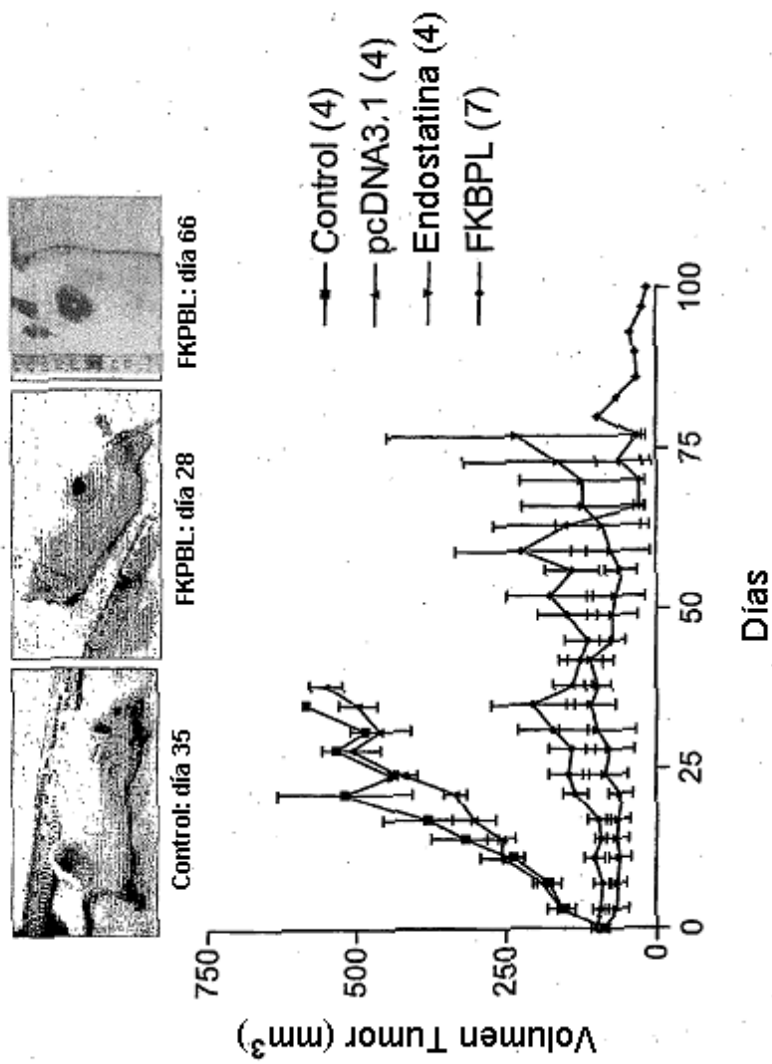
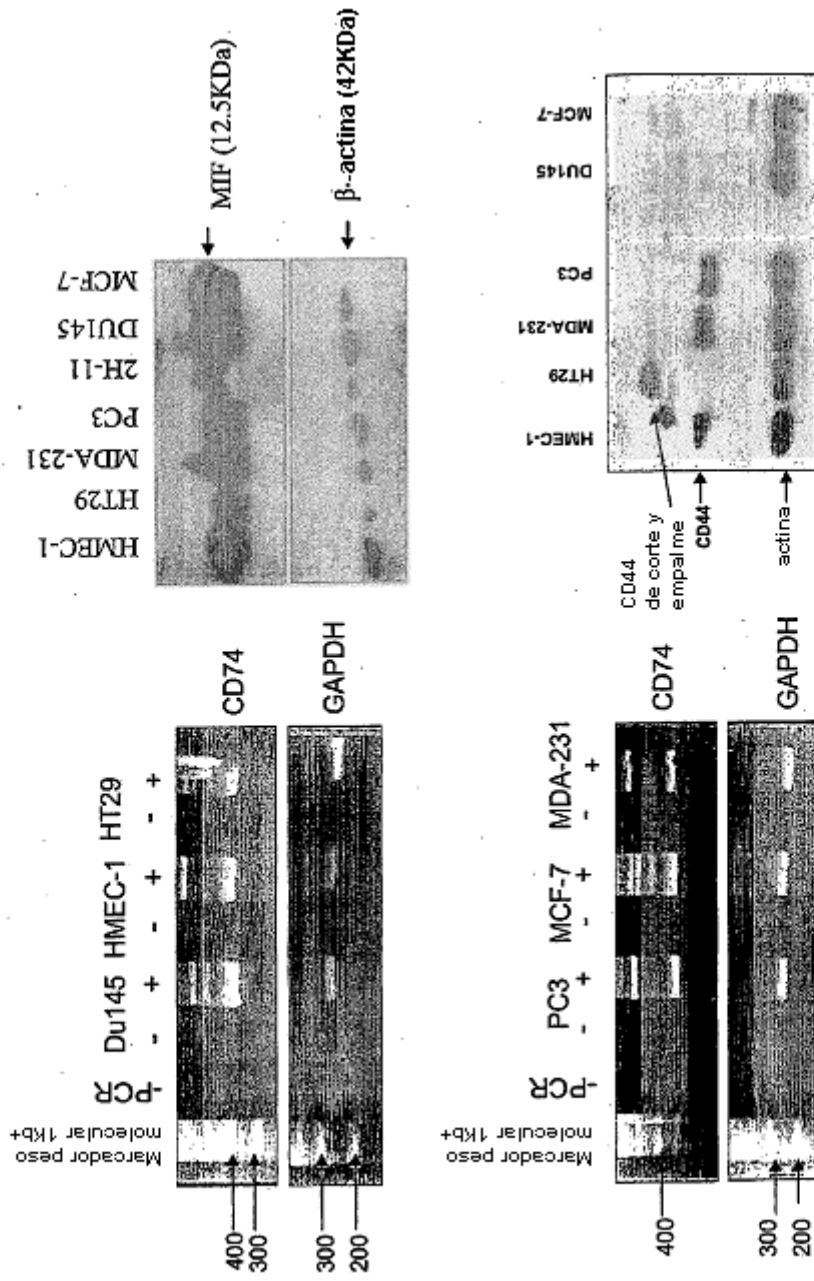


FIG. 15

FIG. 16



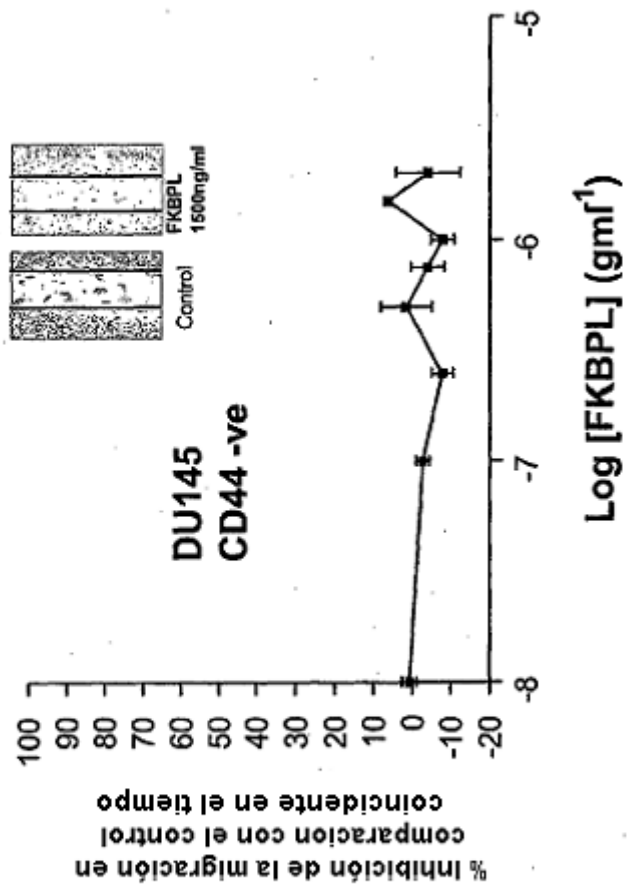


FIG. 17A

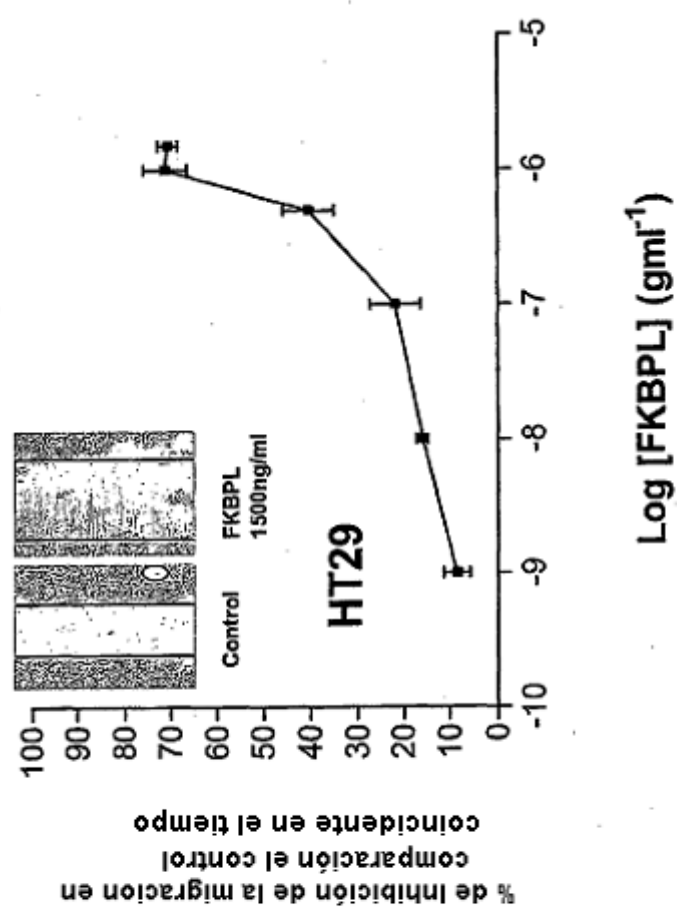


FIG. 17B

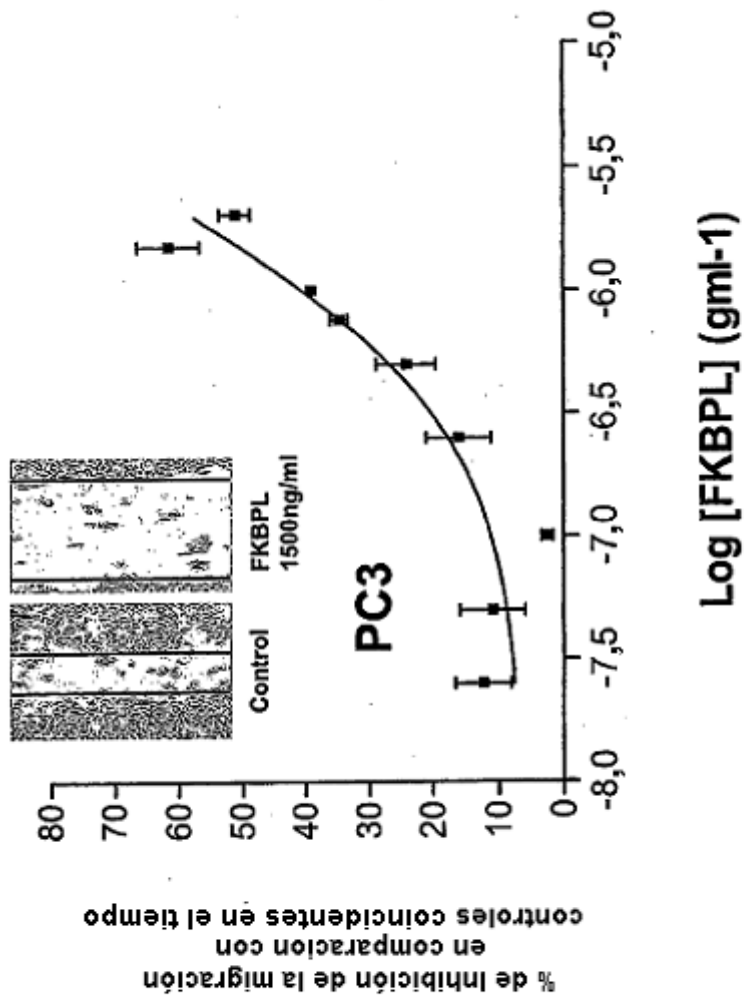


FIG. 17C

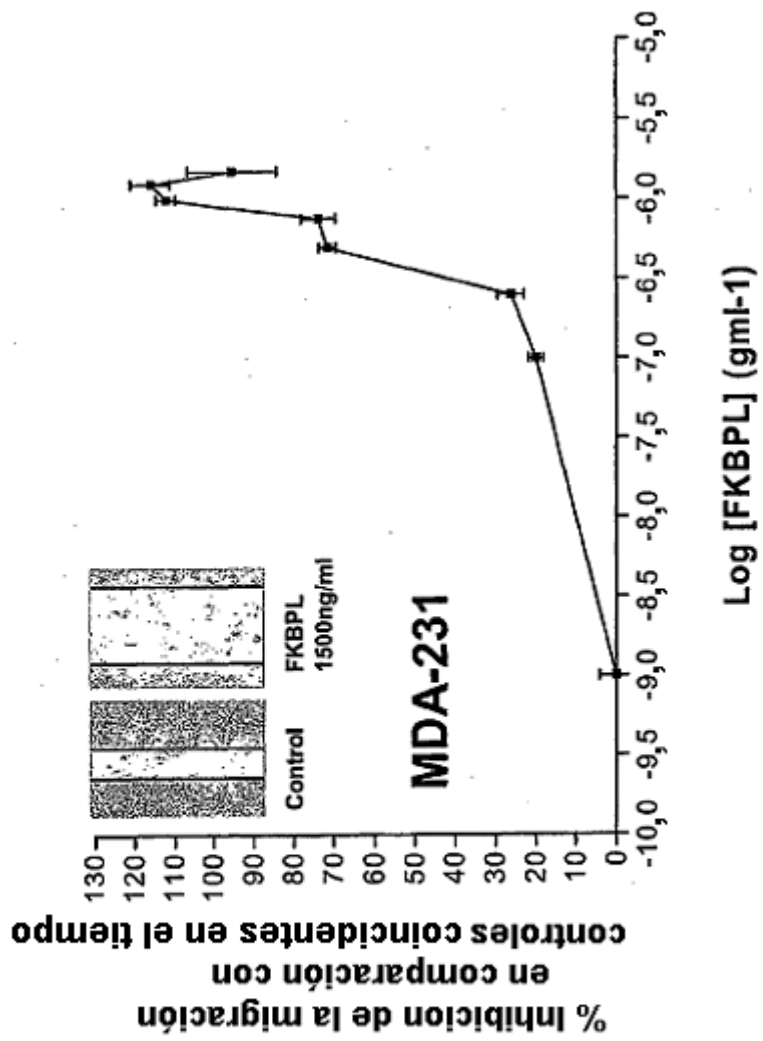


FIG. 17D

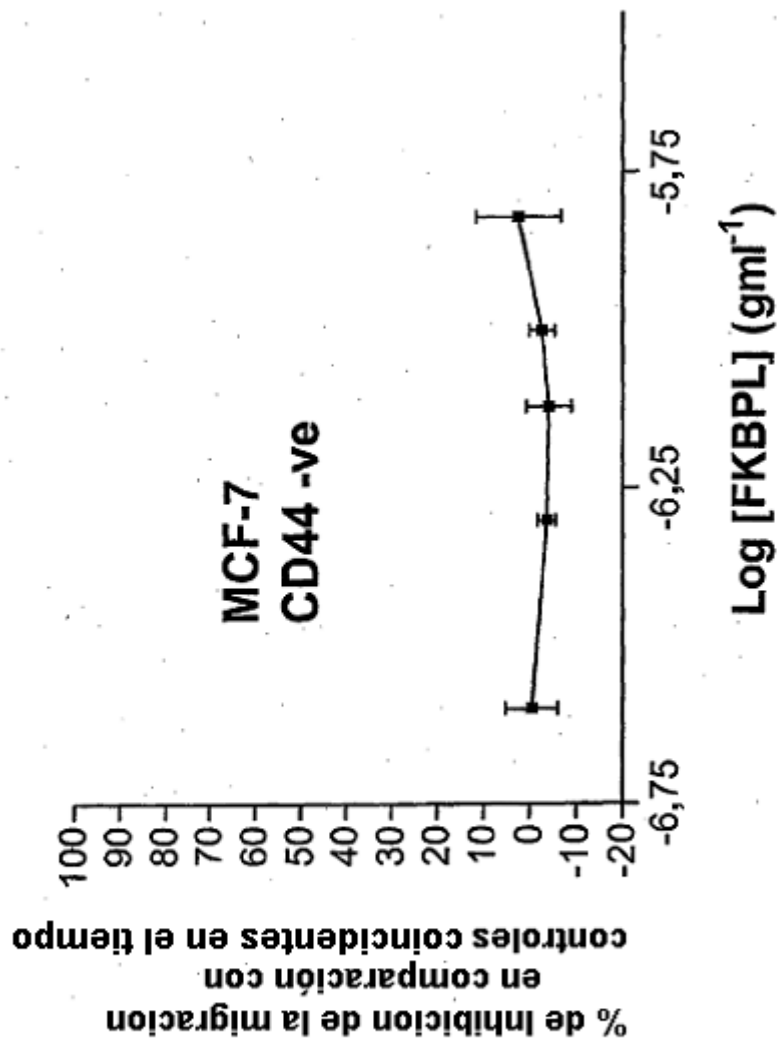


FIG. 17E

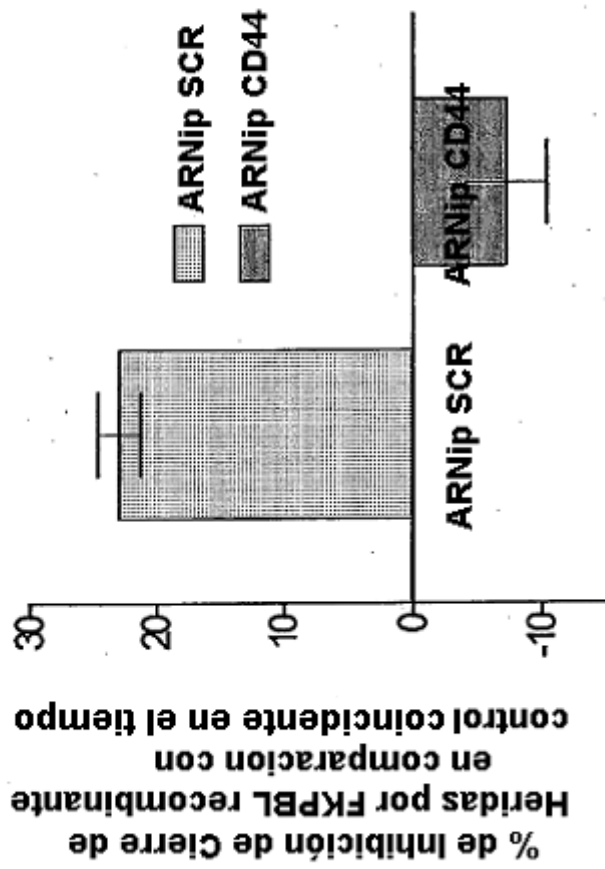
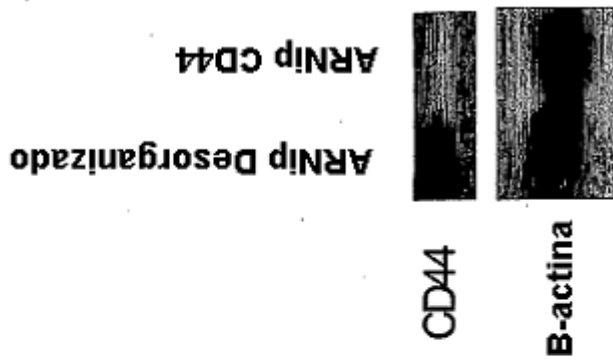


FIG. 18

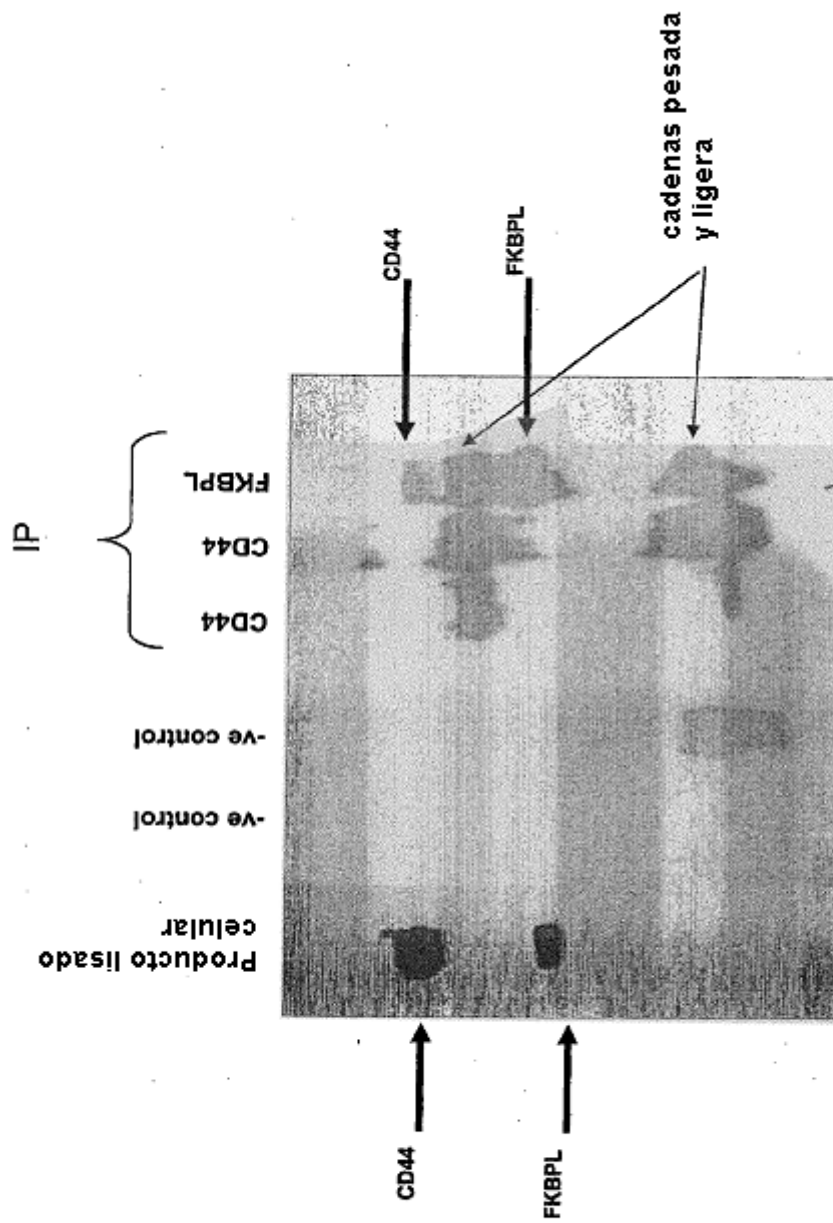


FIG. 19

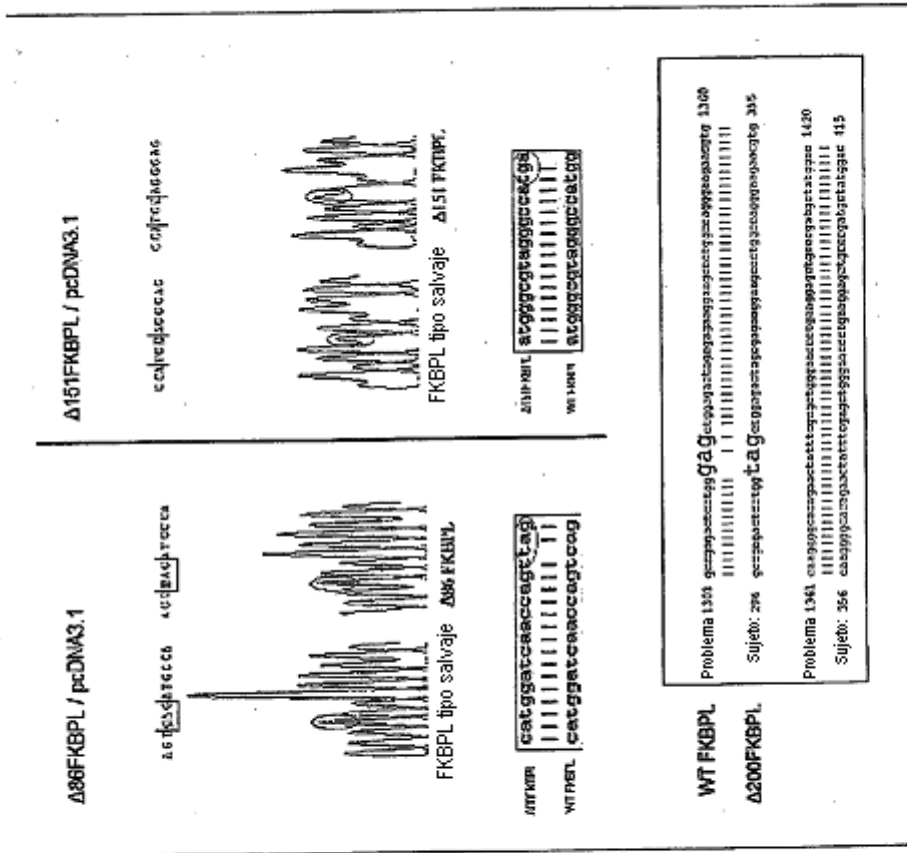


FIG. 20A

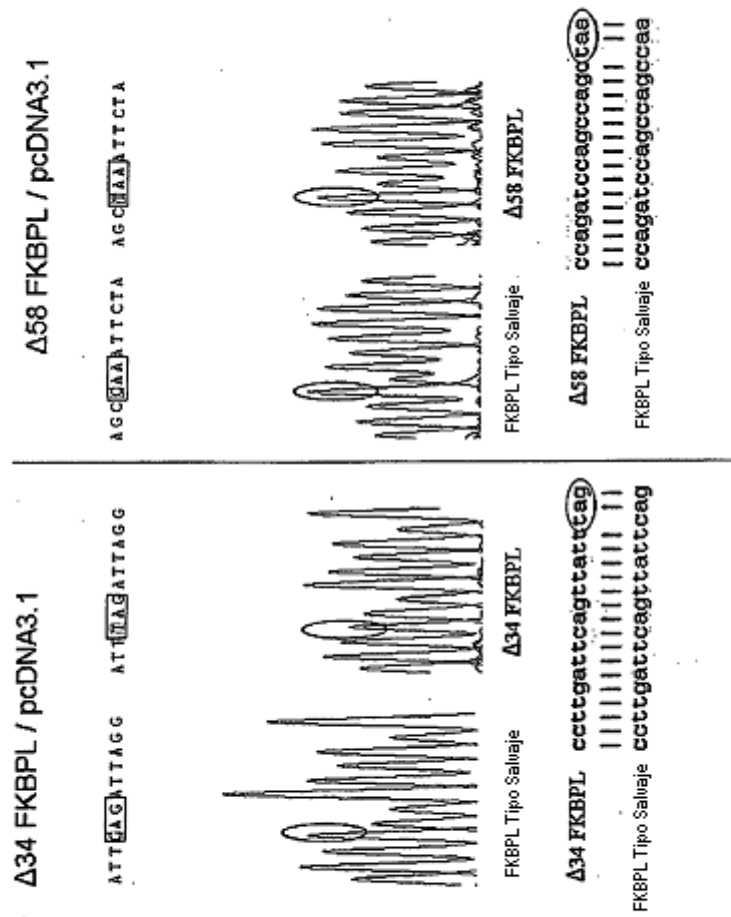


FIG. 20B

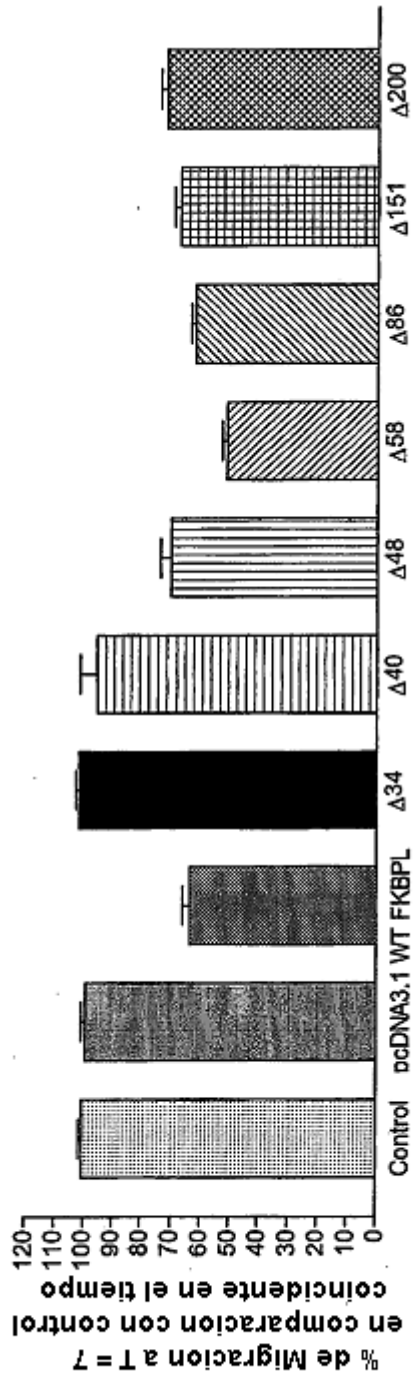


FIG. 20C

Fig 21

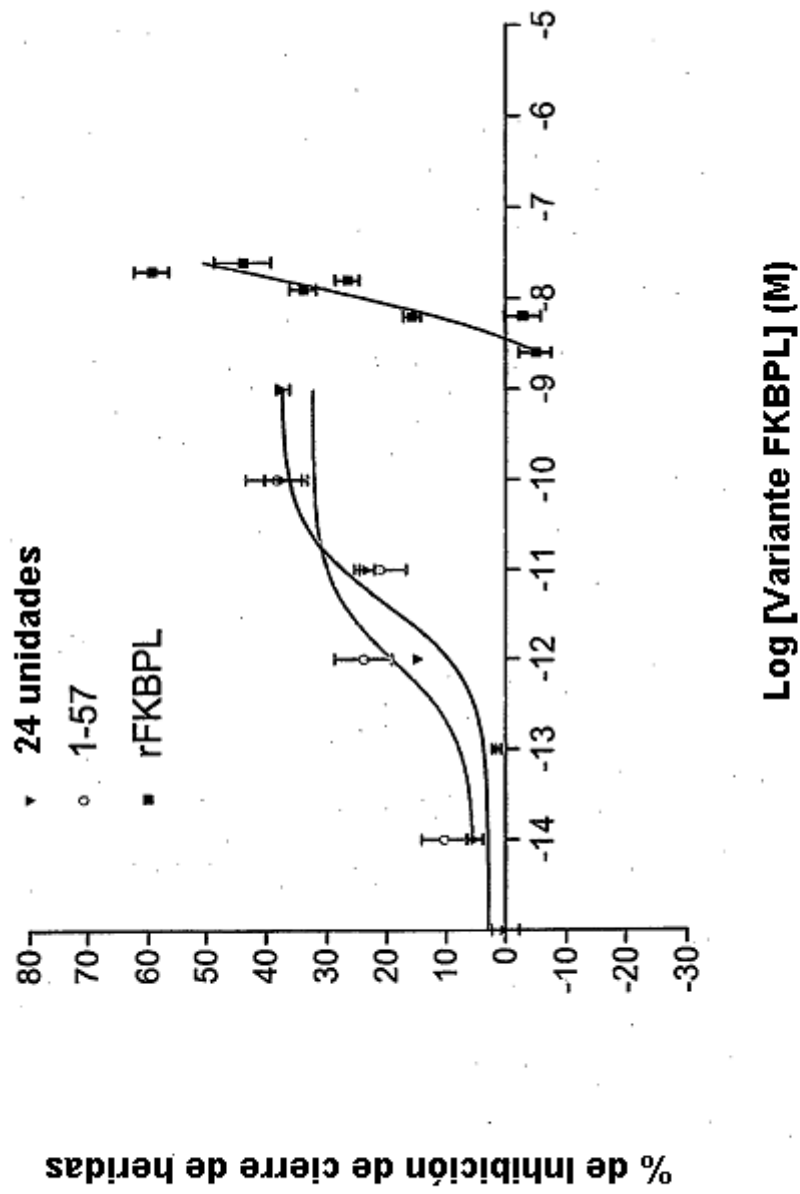
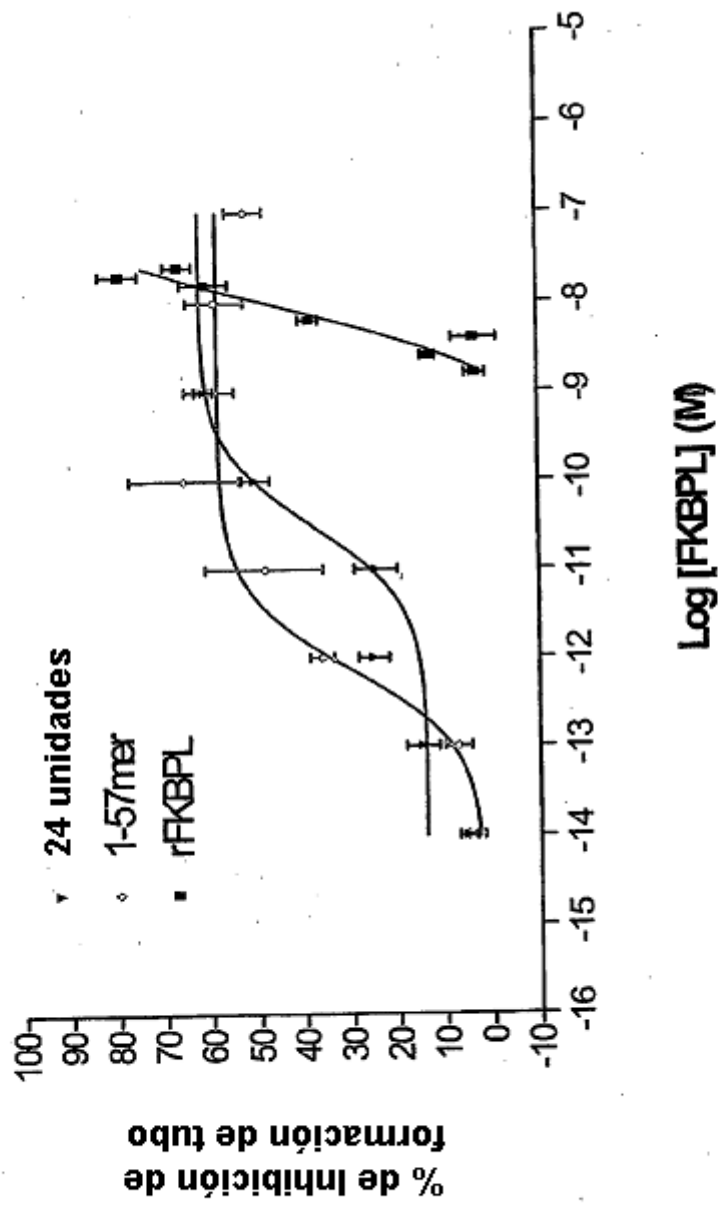


Fig 22



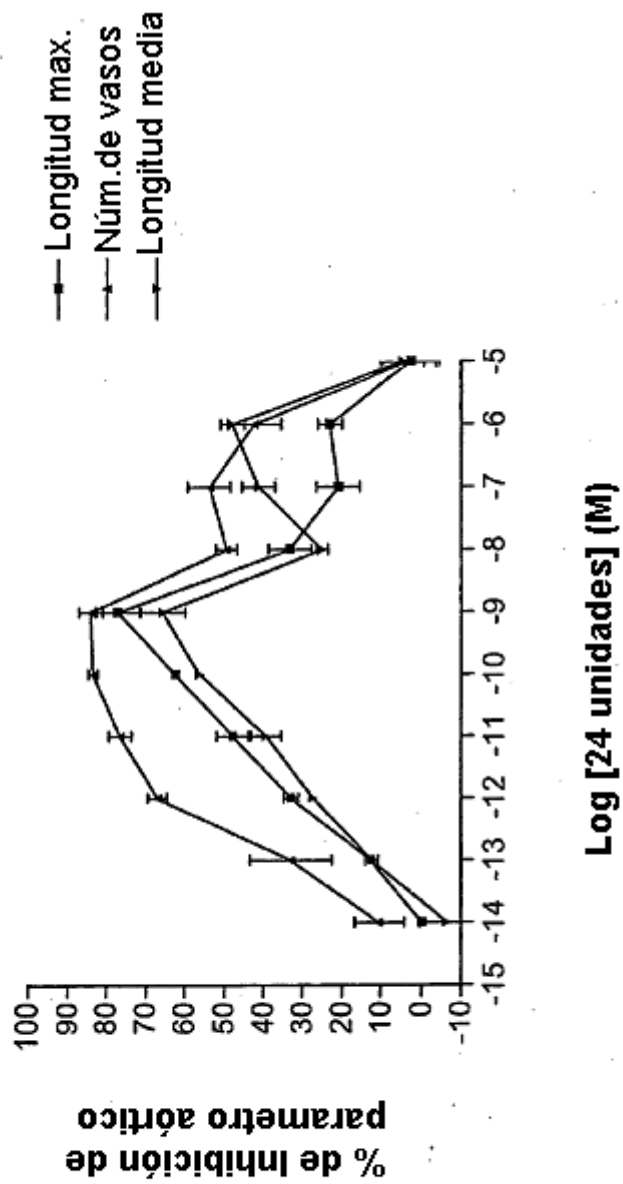


FIG. 23A

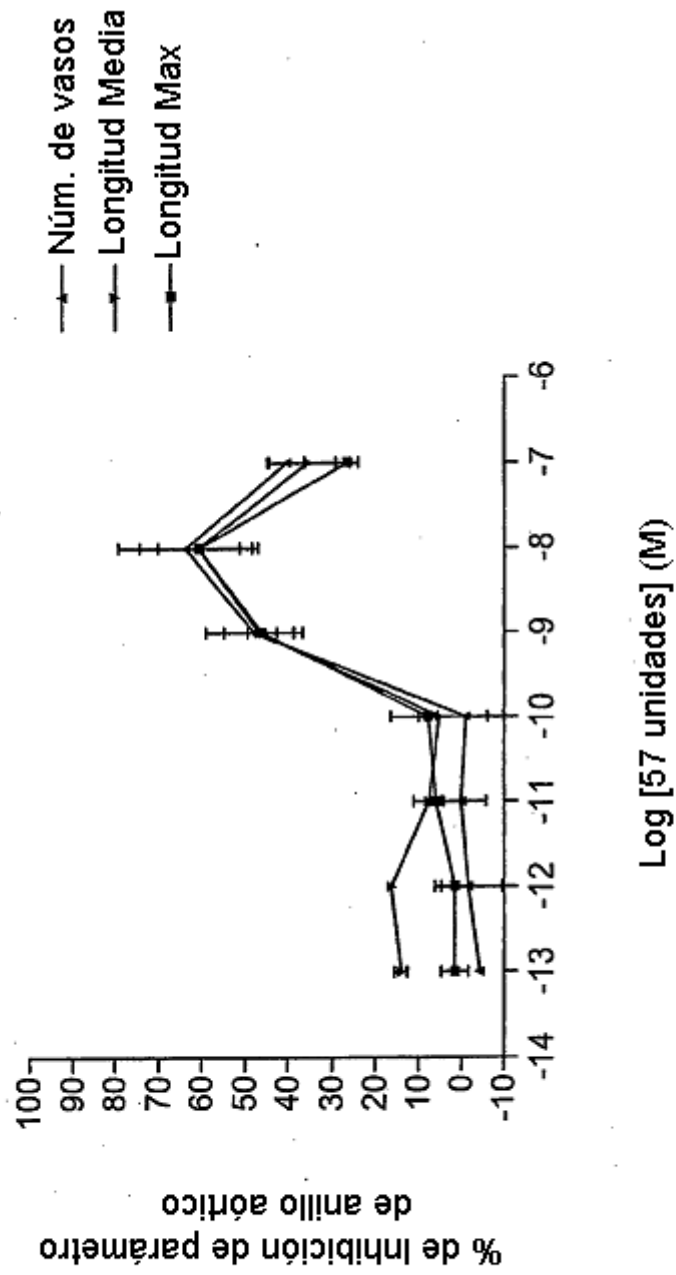


FIG. 23B

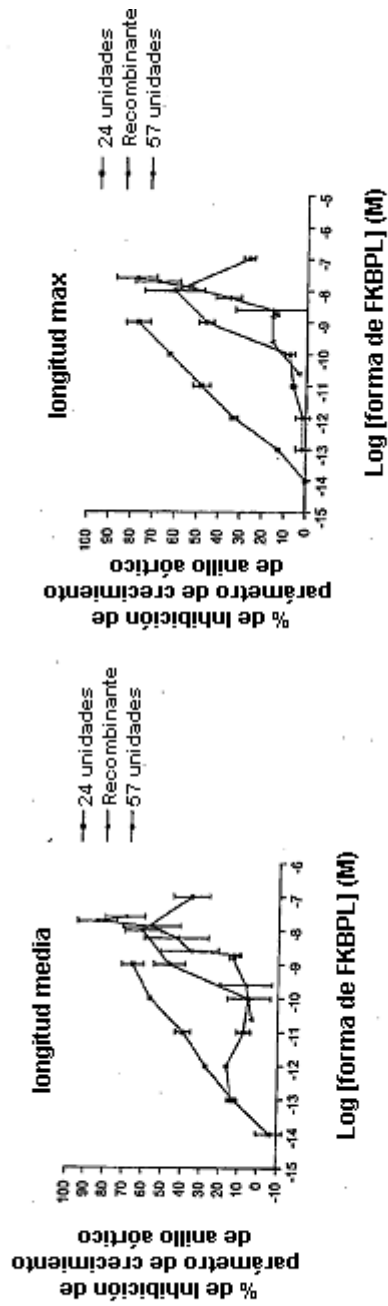
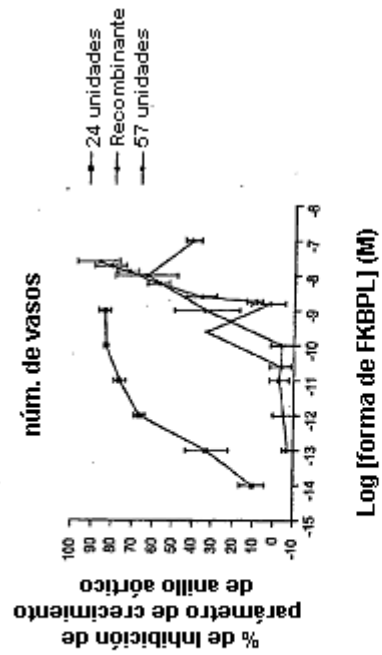


FIG. 24A



Compuesto	Longitud Media	Longitud Max.	Núm. de Vasos
rFKBP-L	8,79nM	8,55nM	1,16nM
57 unidades	0,32nM	0,2nM	0,53nM
24 unidades	2,2pM	1,96pM	0,2pM

FIG. 24B

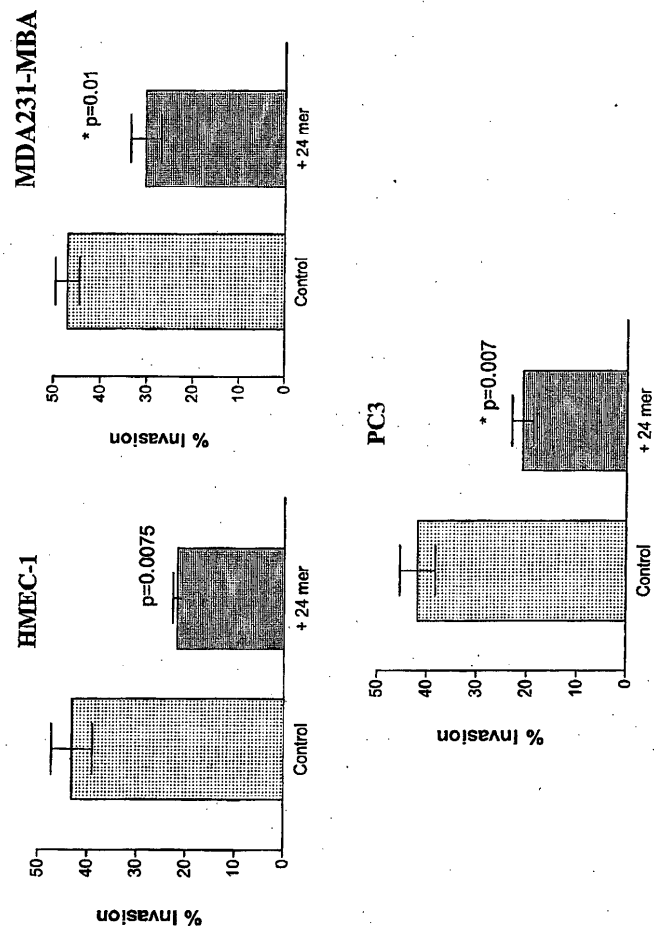


FIG. 25

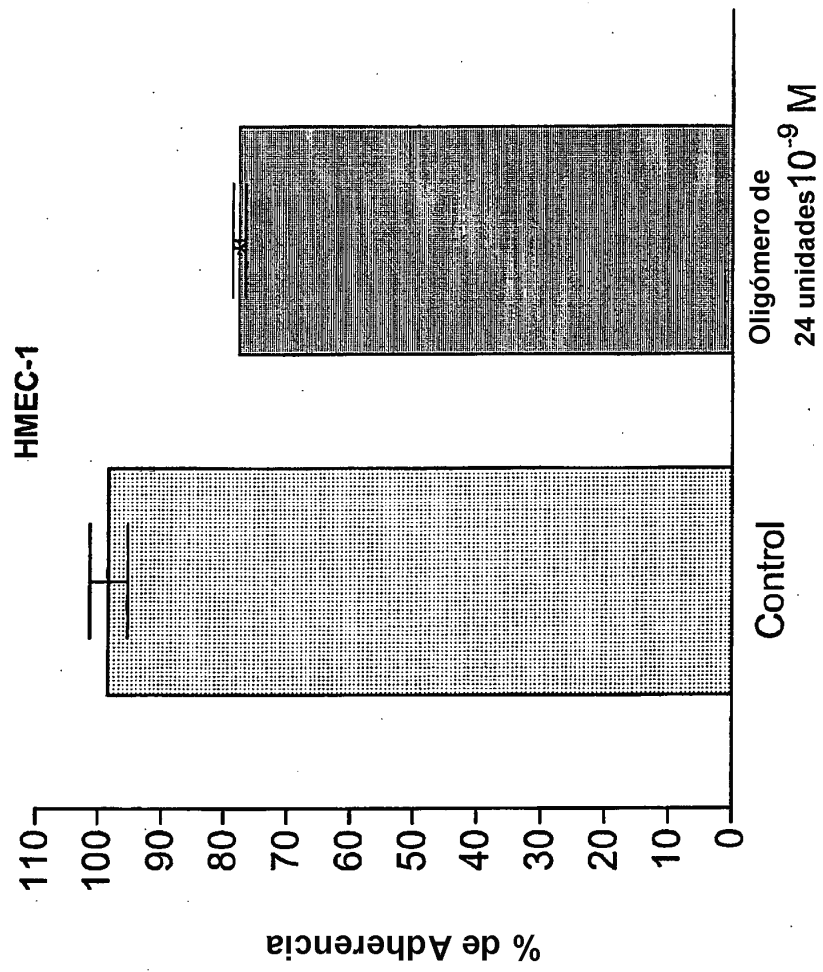


FIG. 26

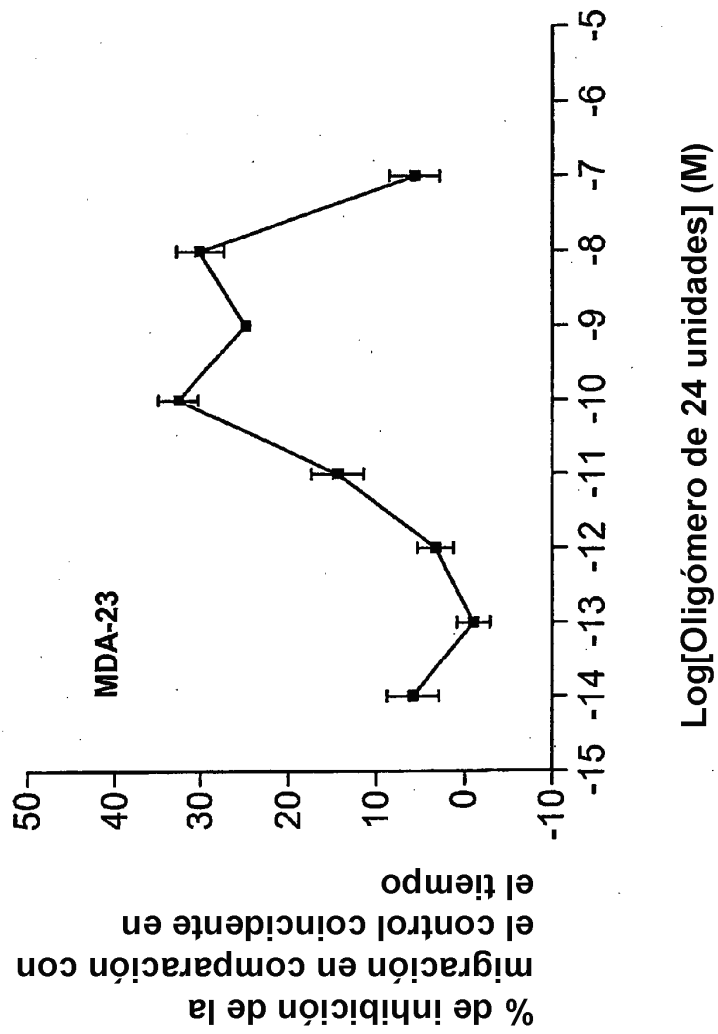


FIG. 27A

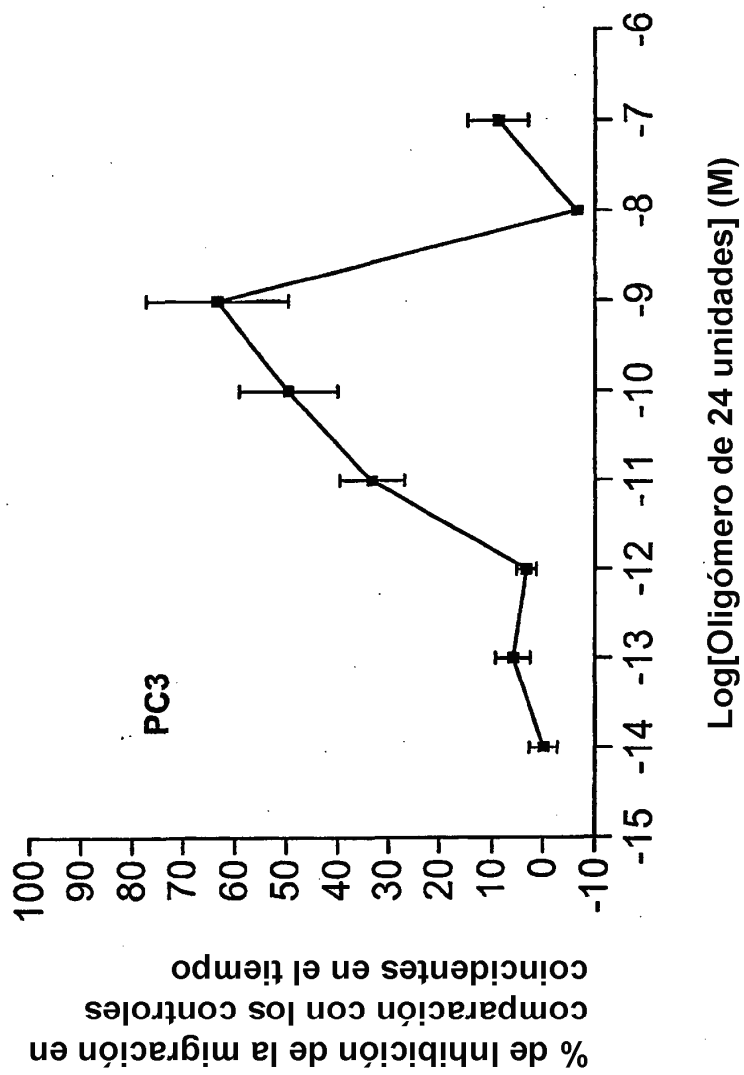


FIG. 27B

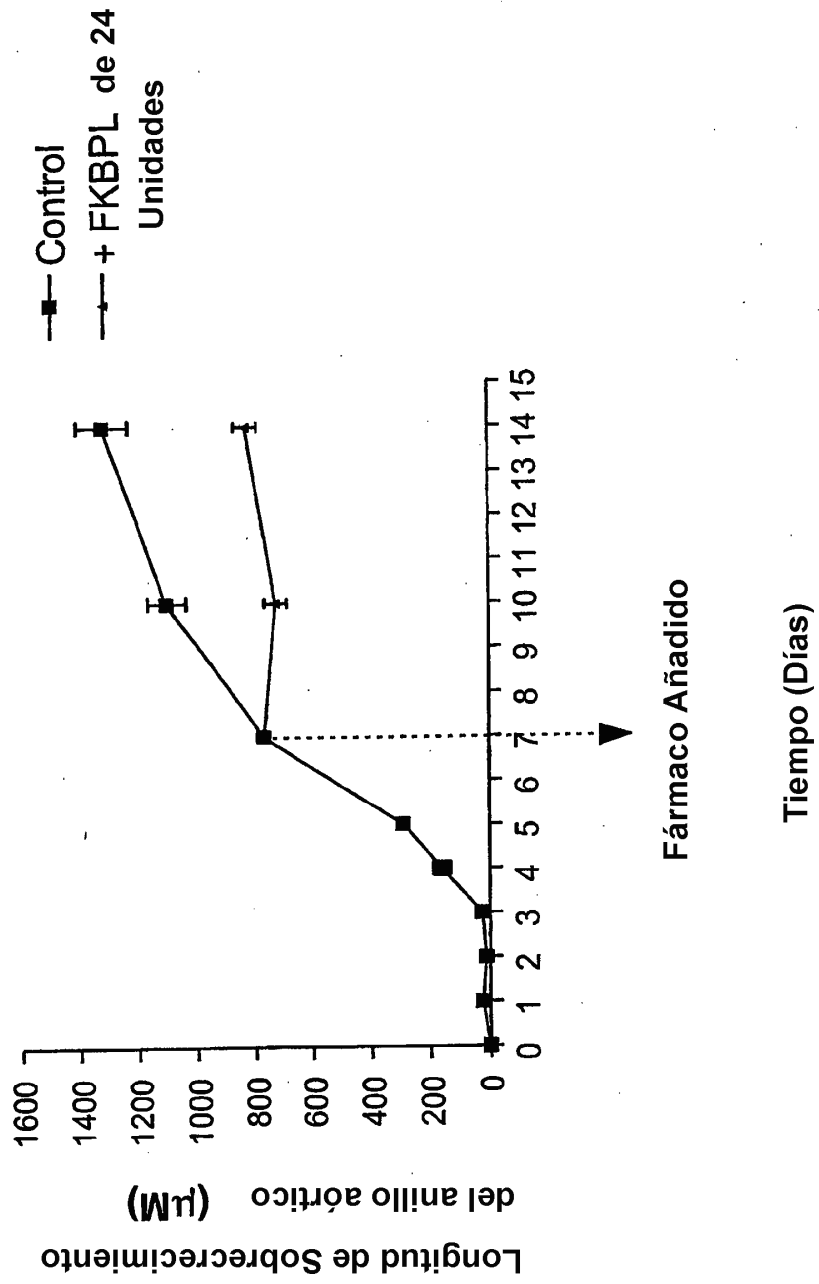


FIG. 28A

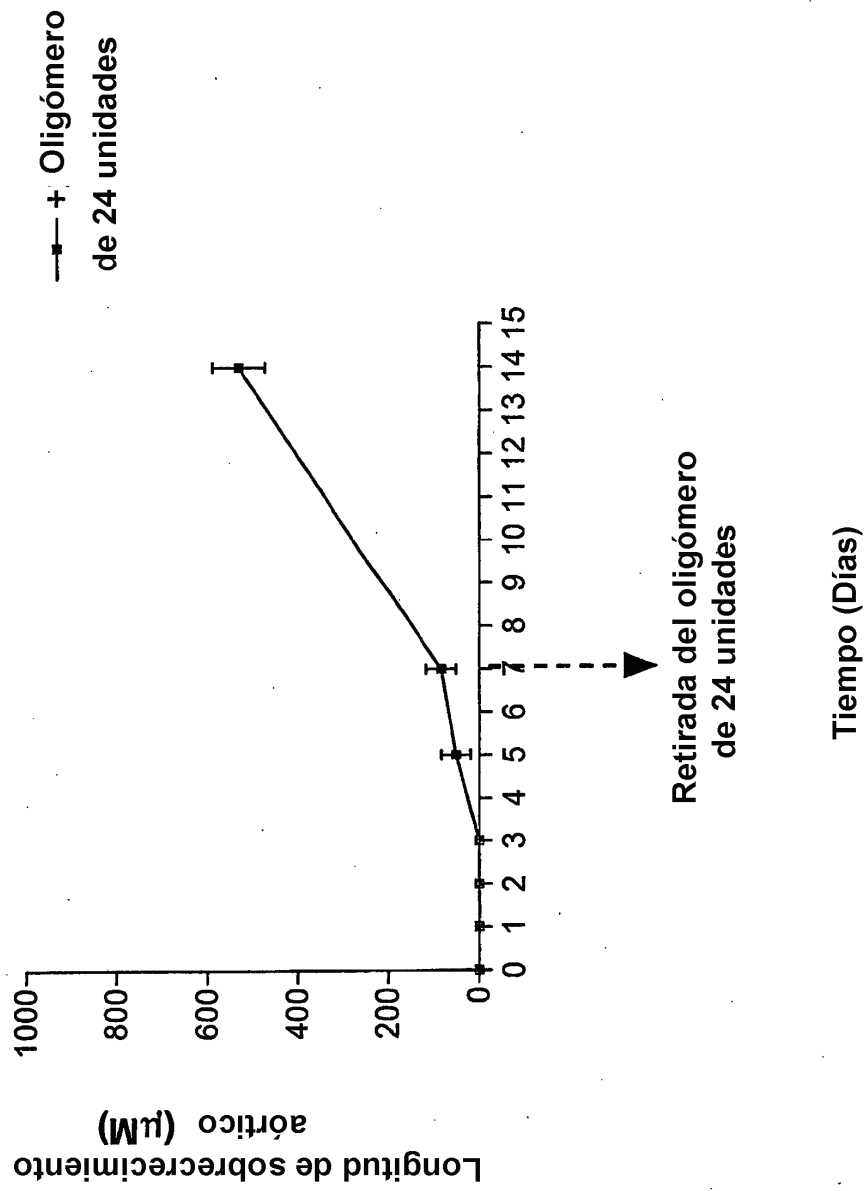
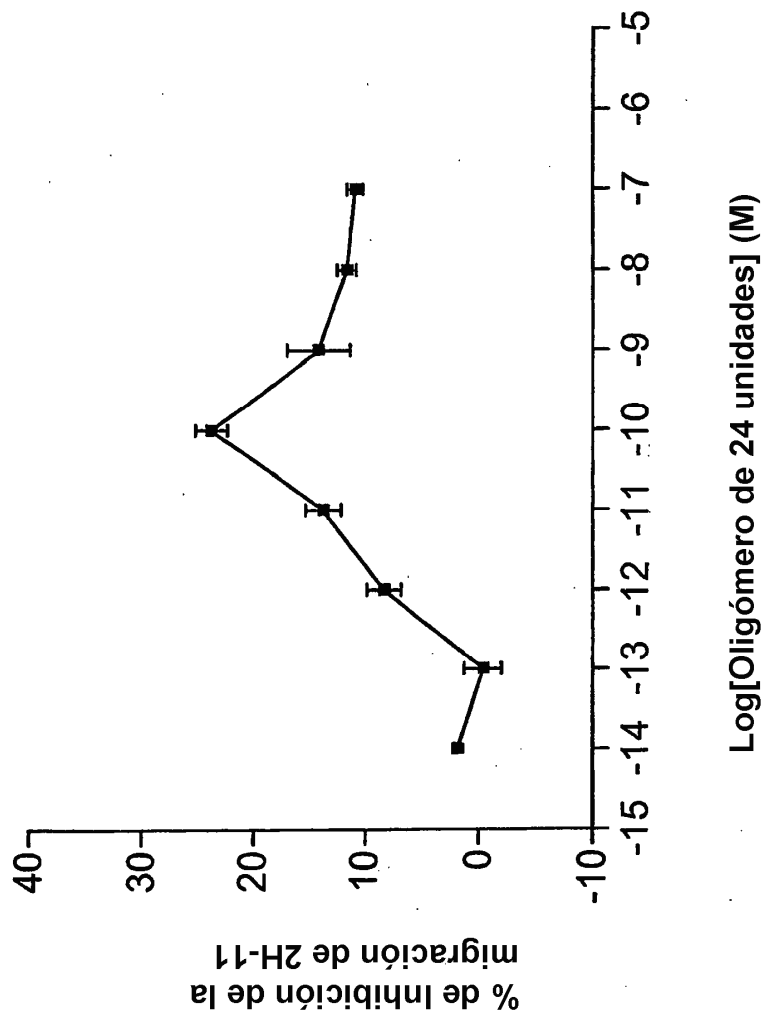


FIG. 28B

FIG. 30



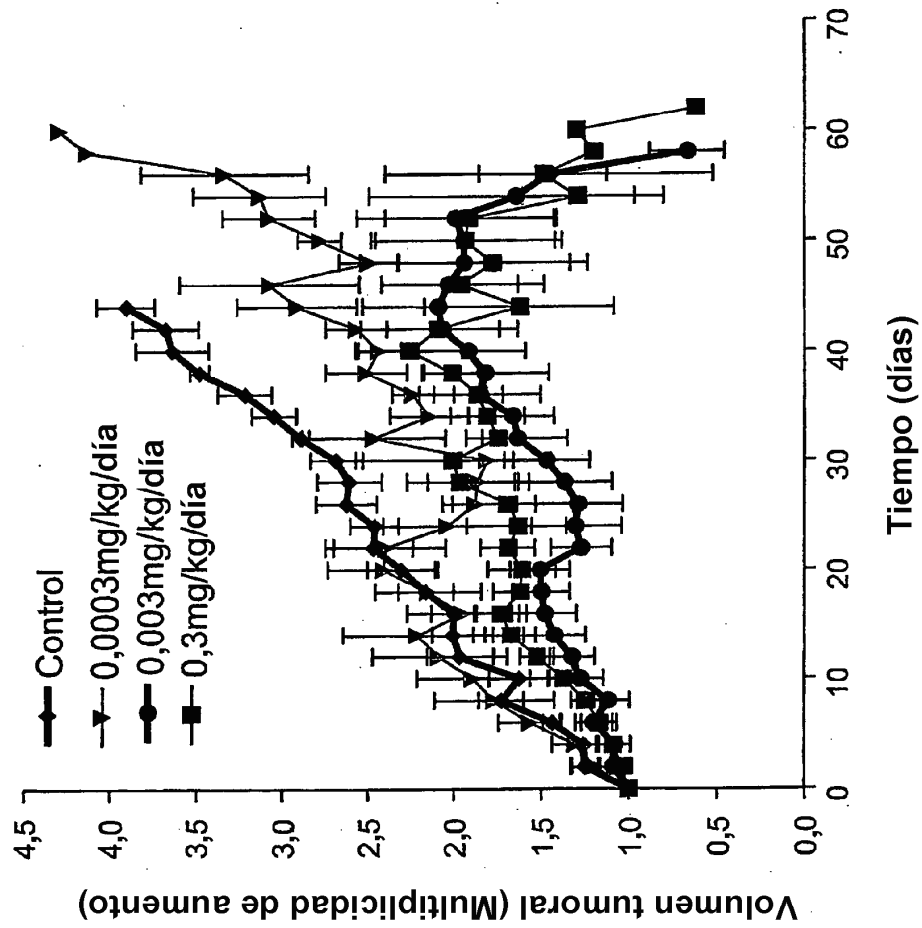


FIG. 31A

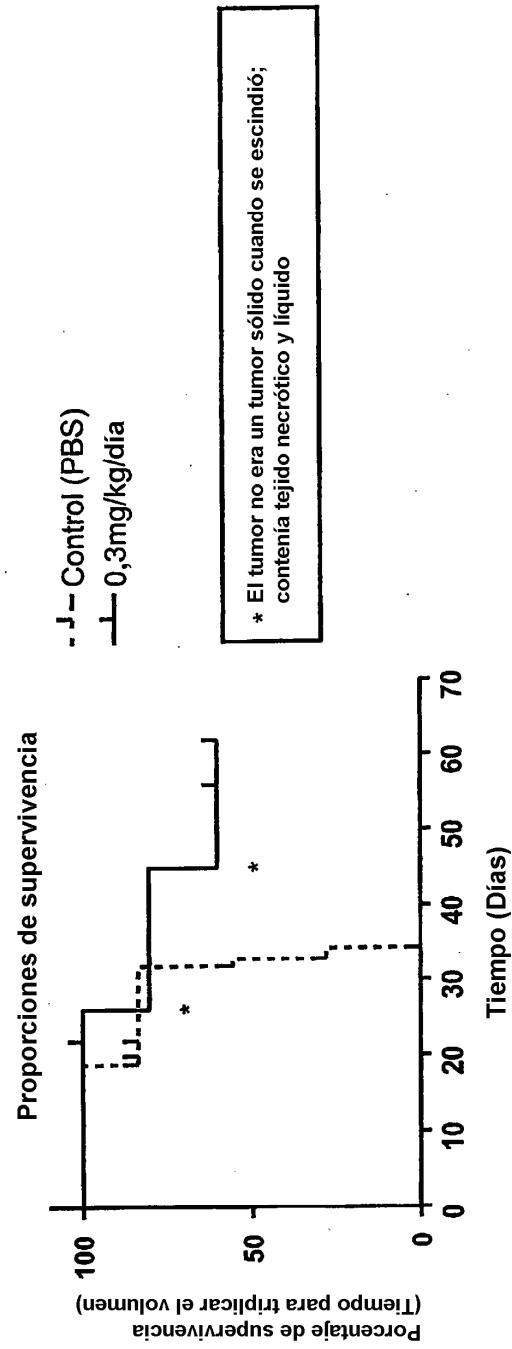


FIG. 31B

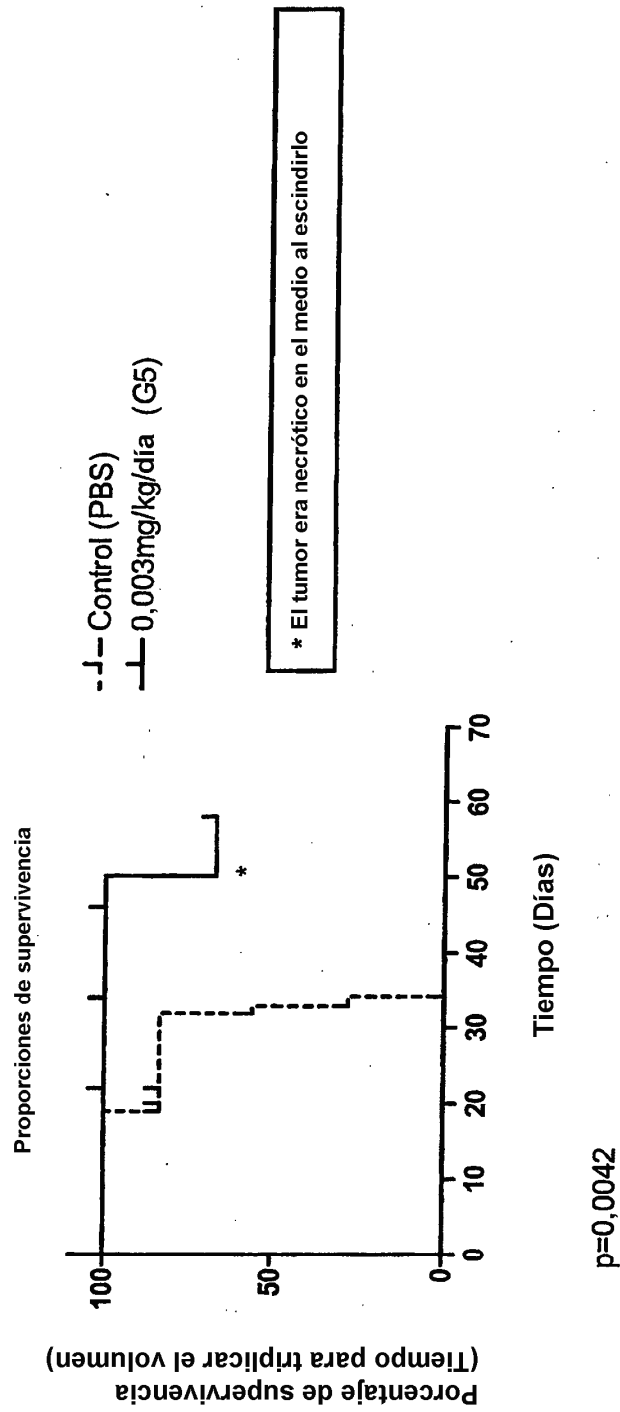


FIG. 31C

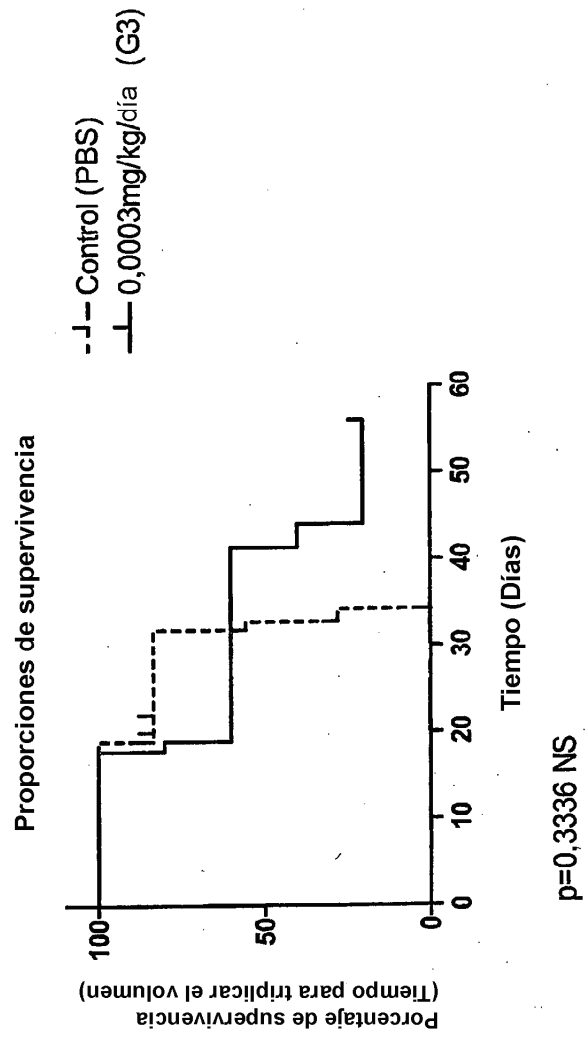


FIG. 31D

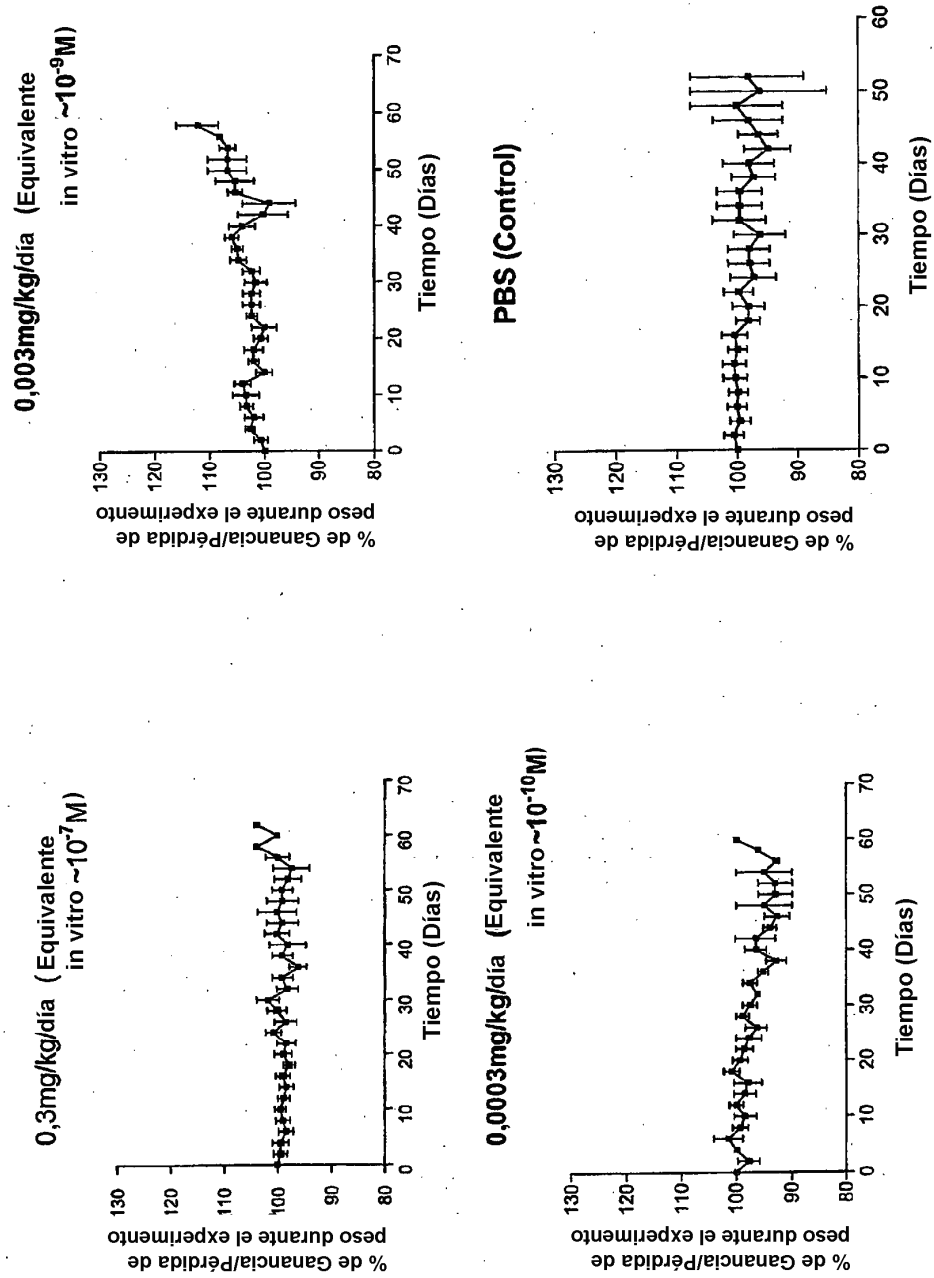


FIG. 31E

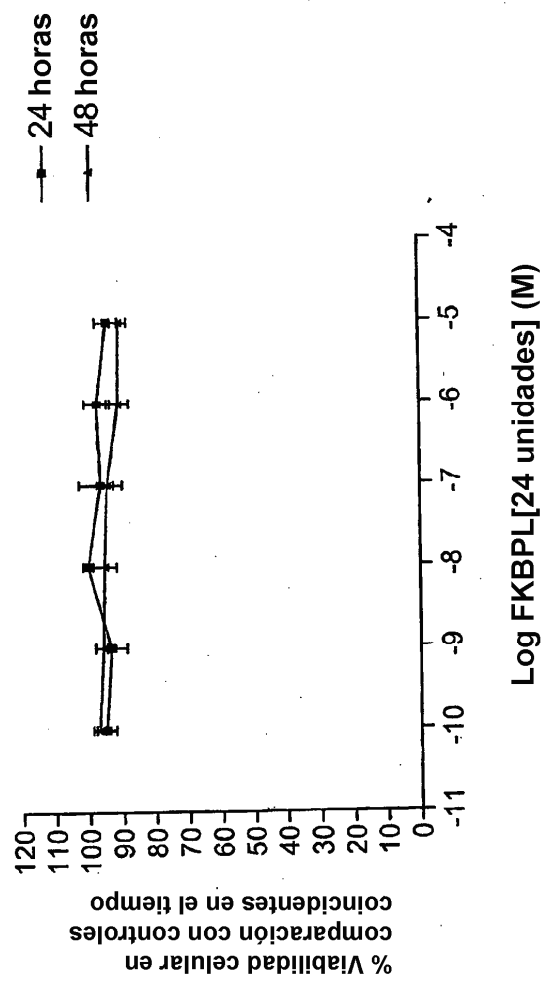
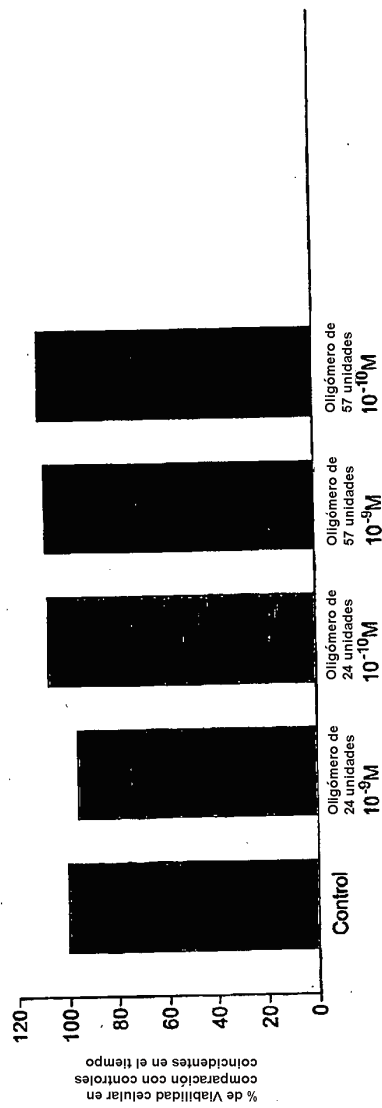


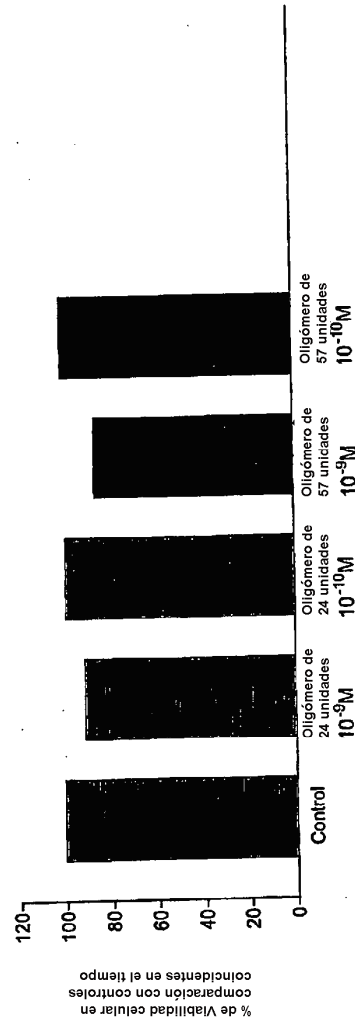
FIG. 32

FIG 33 A



MTT 24hr

FIG 33 B



MTT 48hr

FIG. 34A

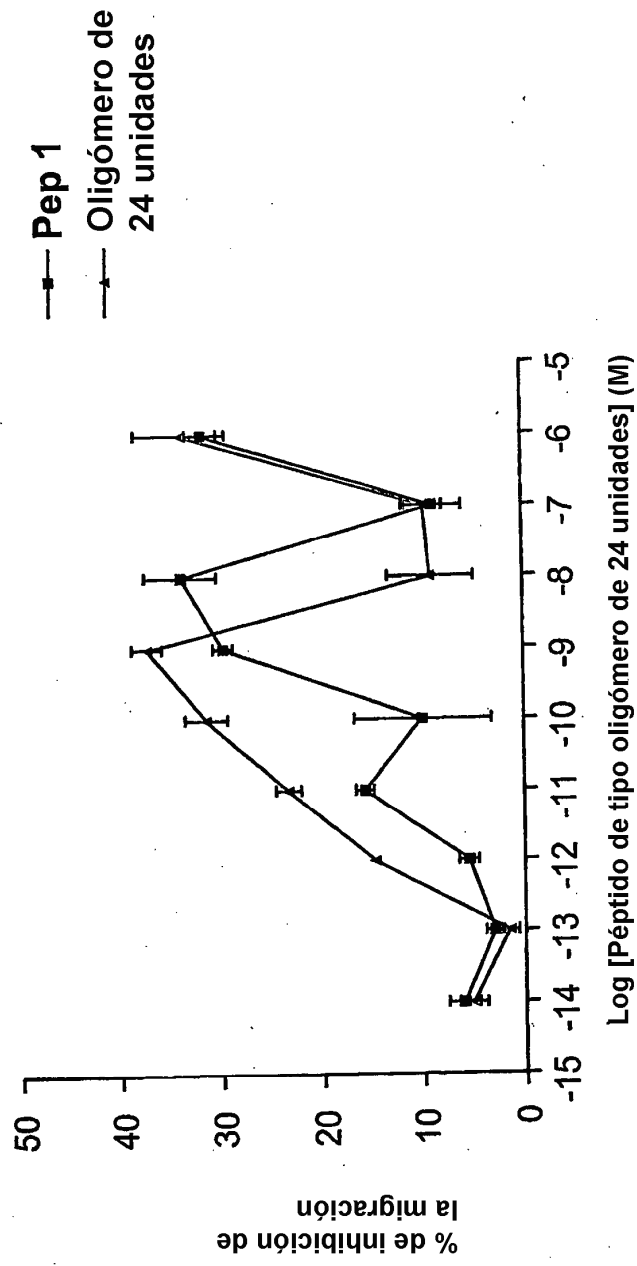


FIG. 34B

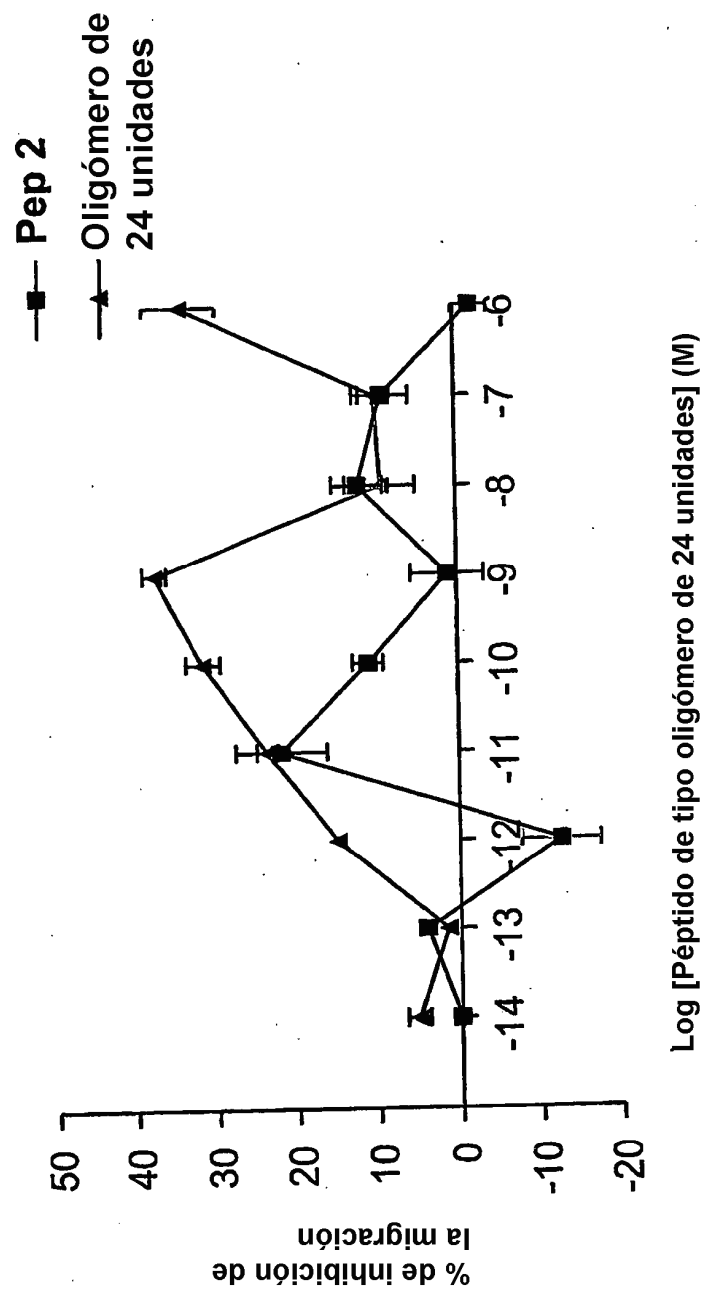


FIG. 34C

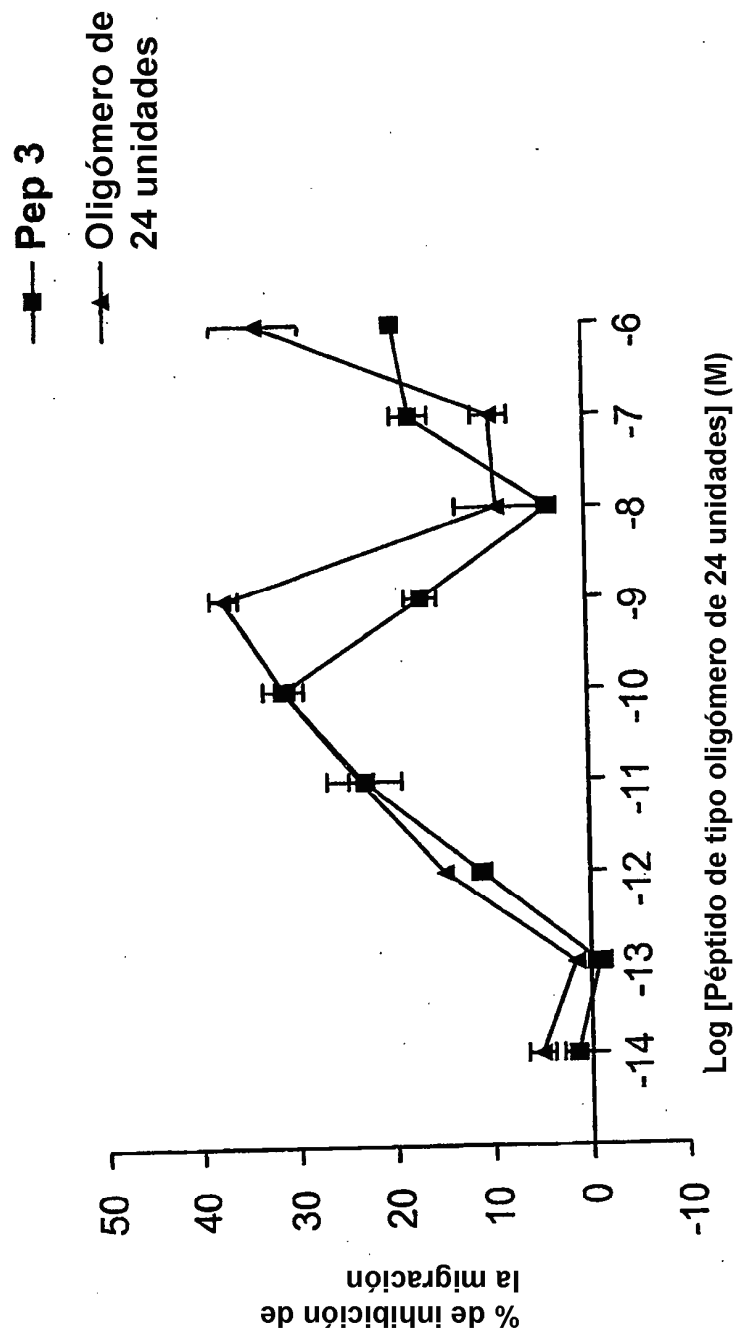


FIG. 34D

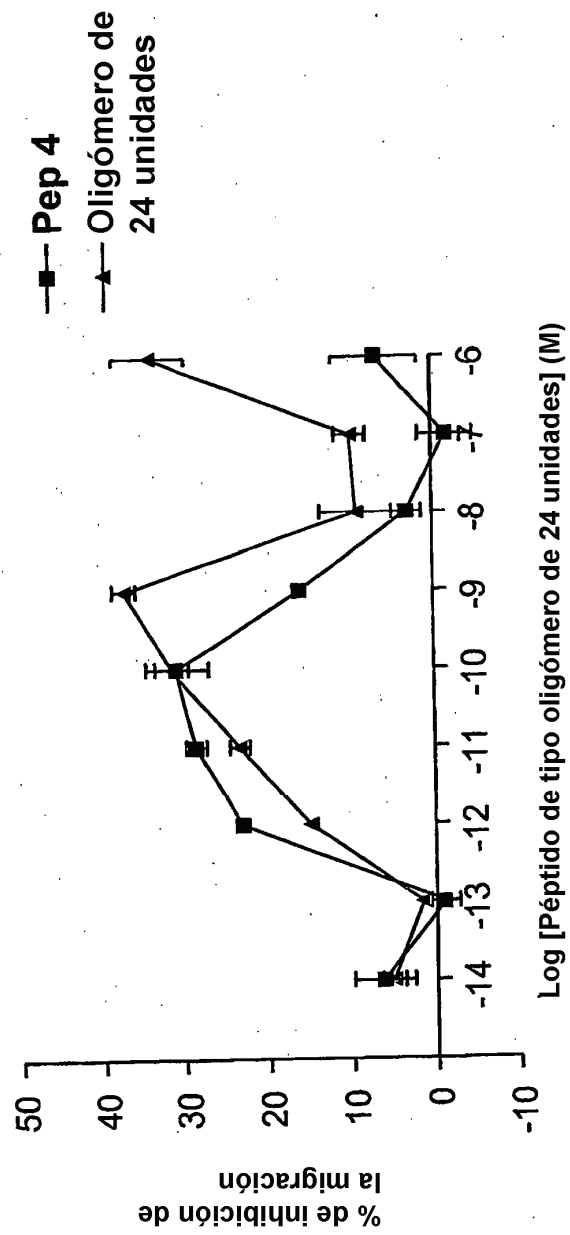


FIG. 34E

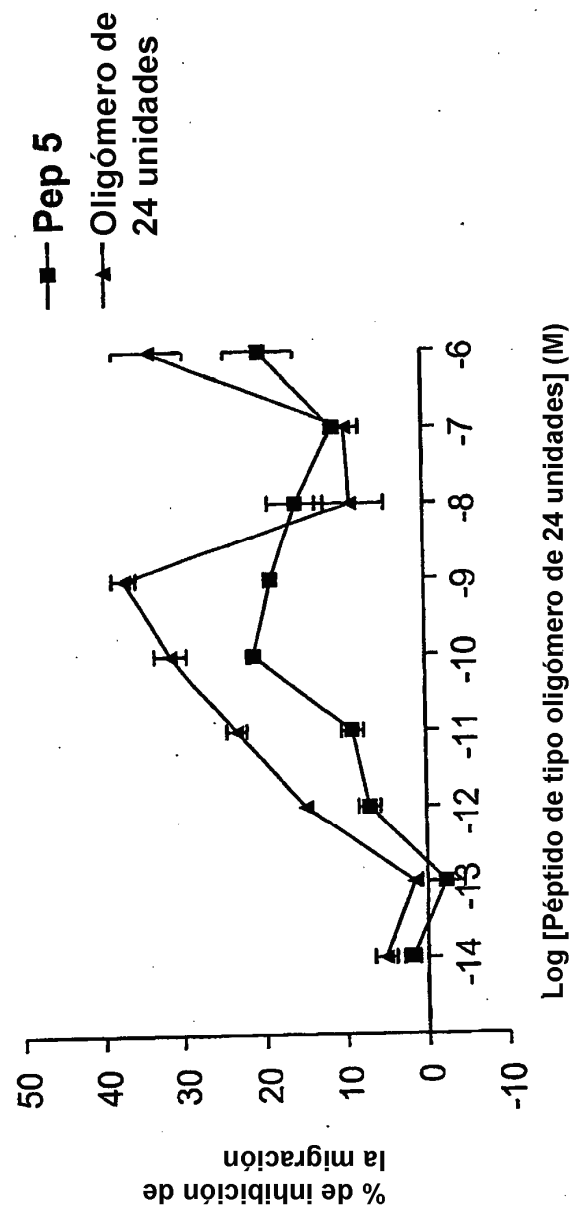


FIG. 34F

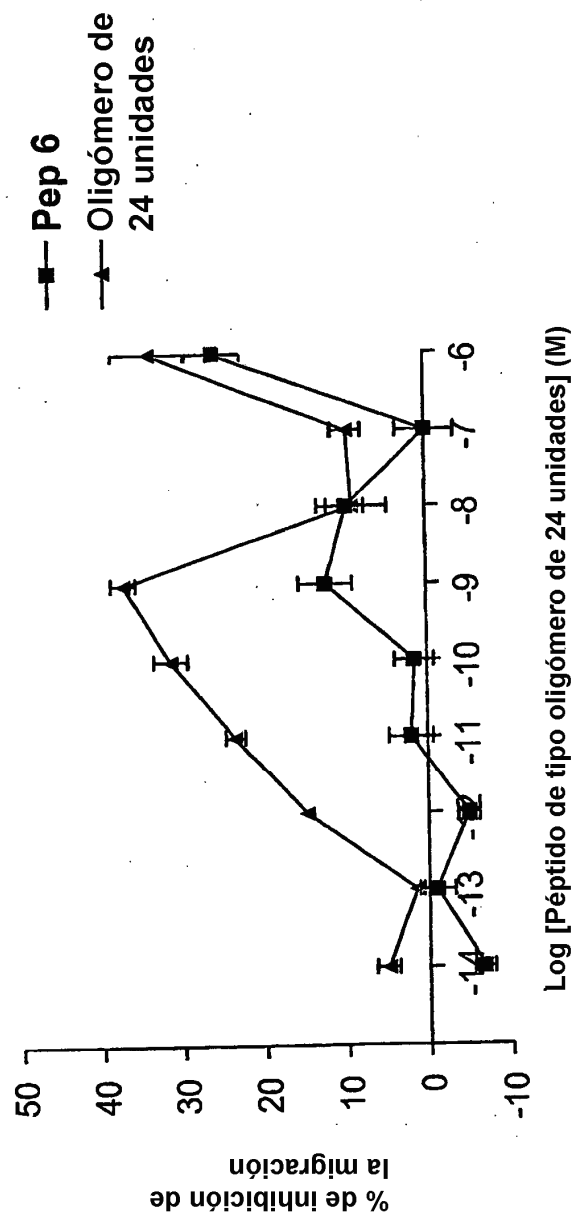


FIG. 34G

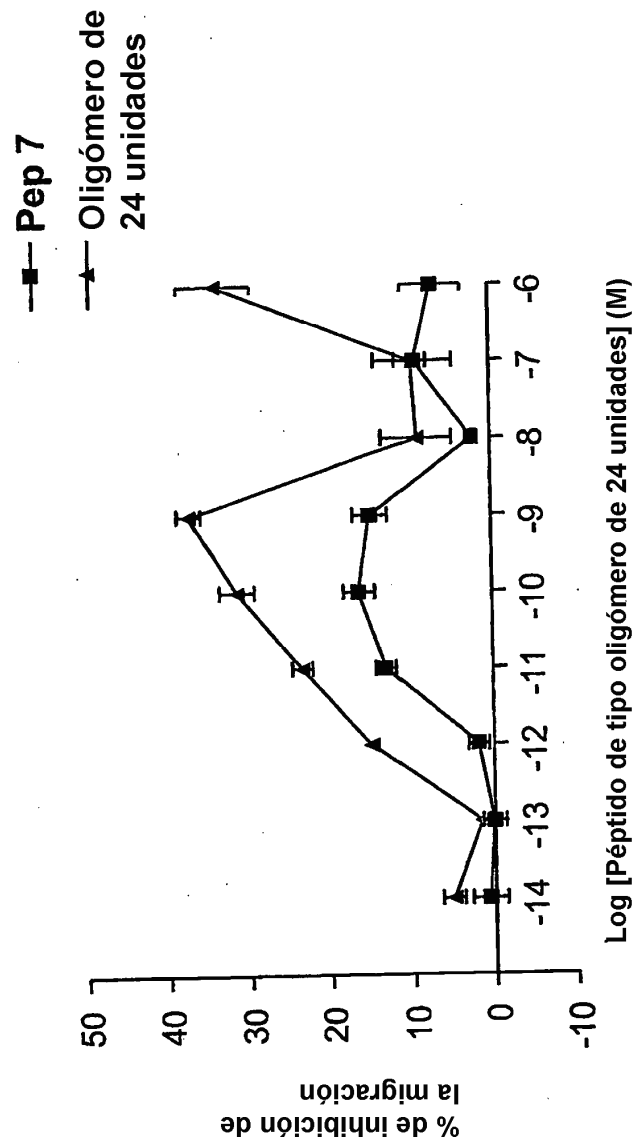


FIG. 34H

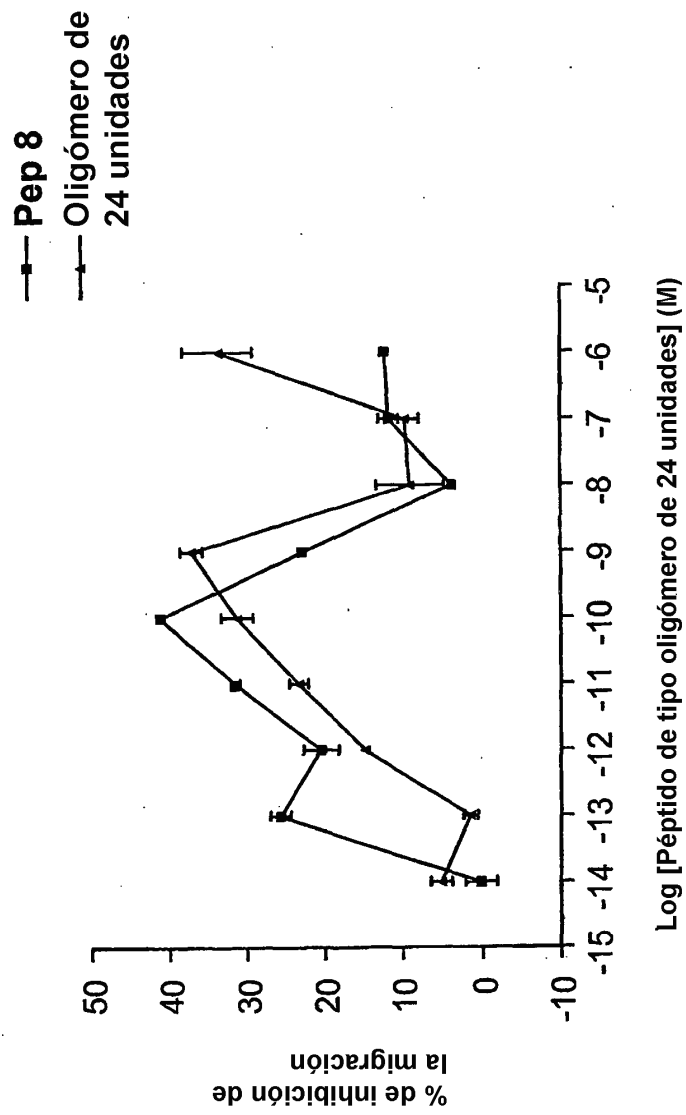


FIG. 34I

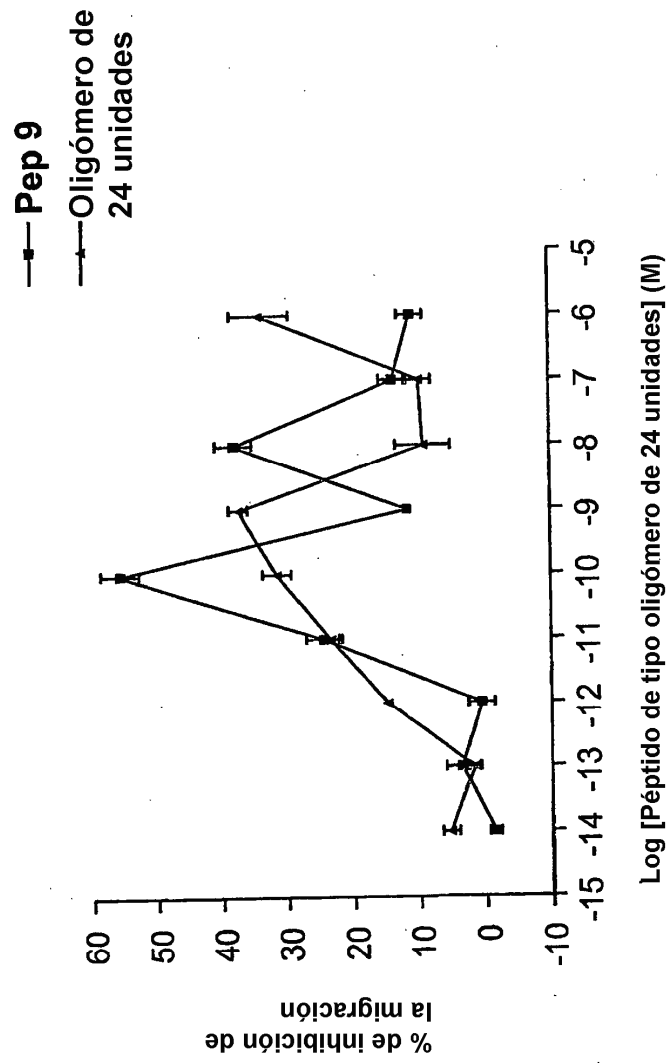


FIG. 34J

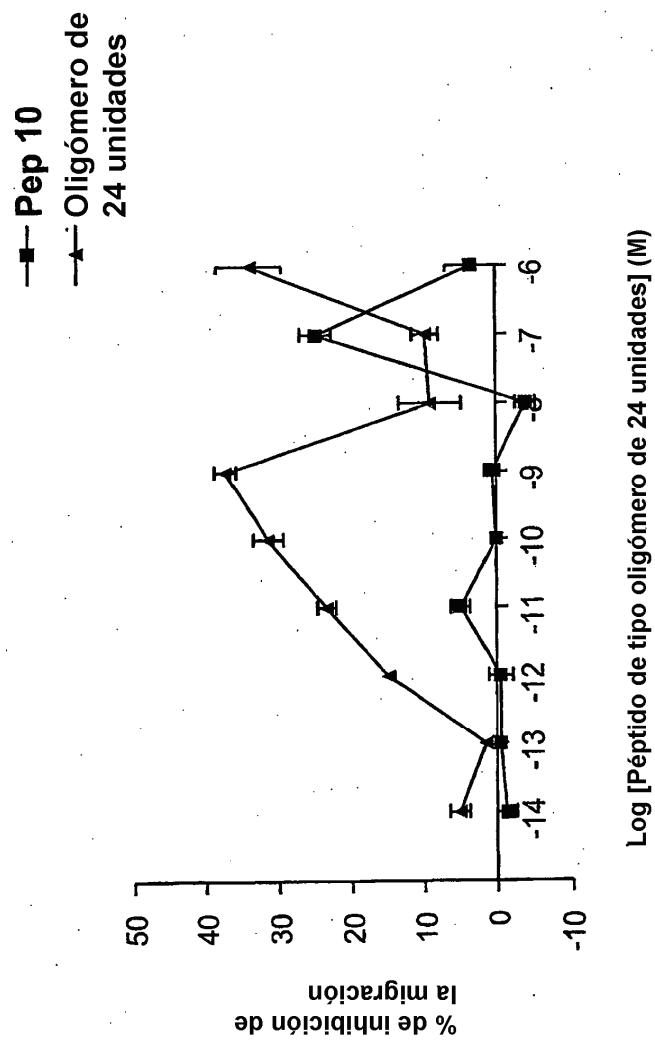


FIG. 34K

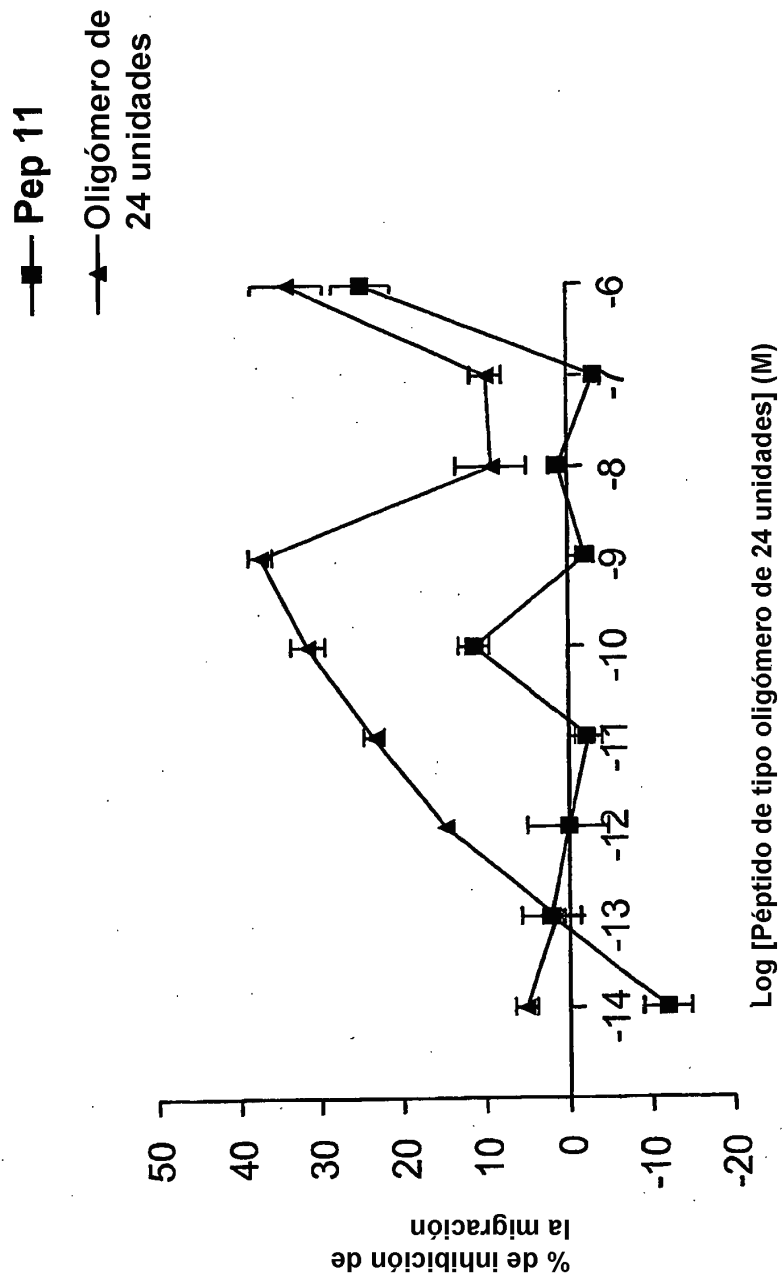
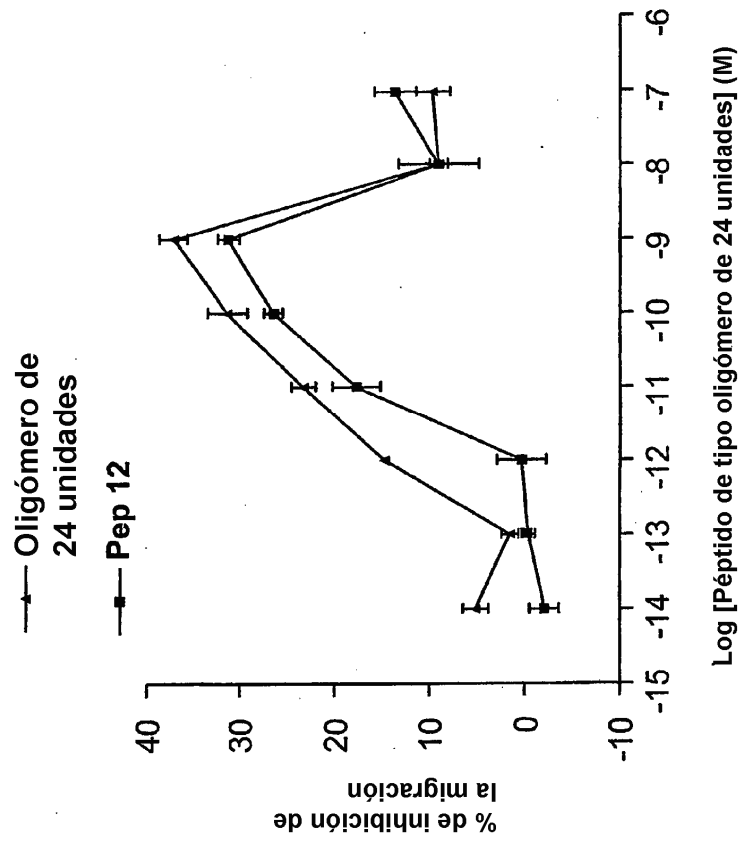


FIG. 34L



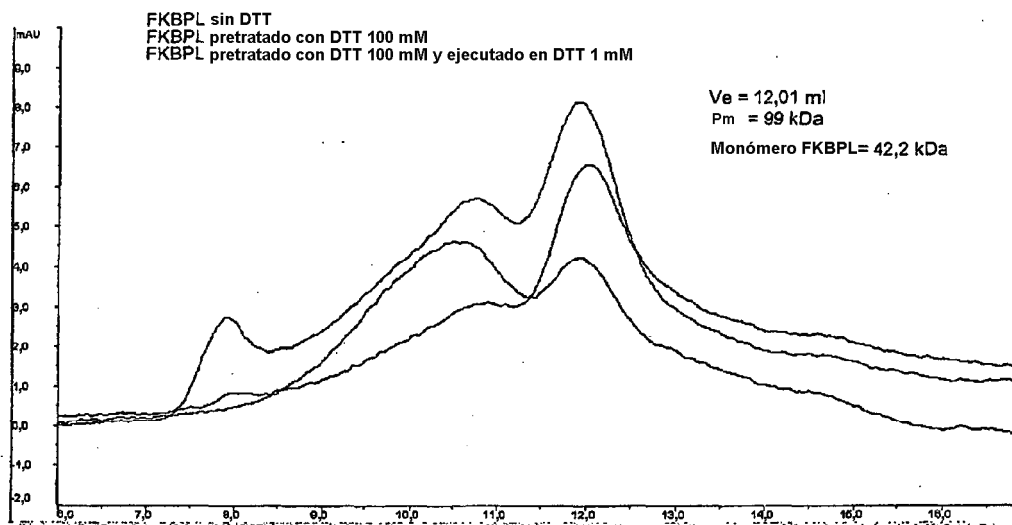
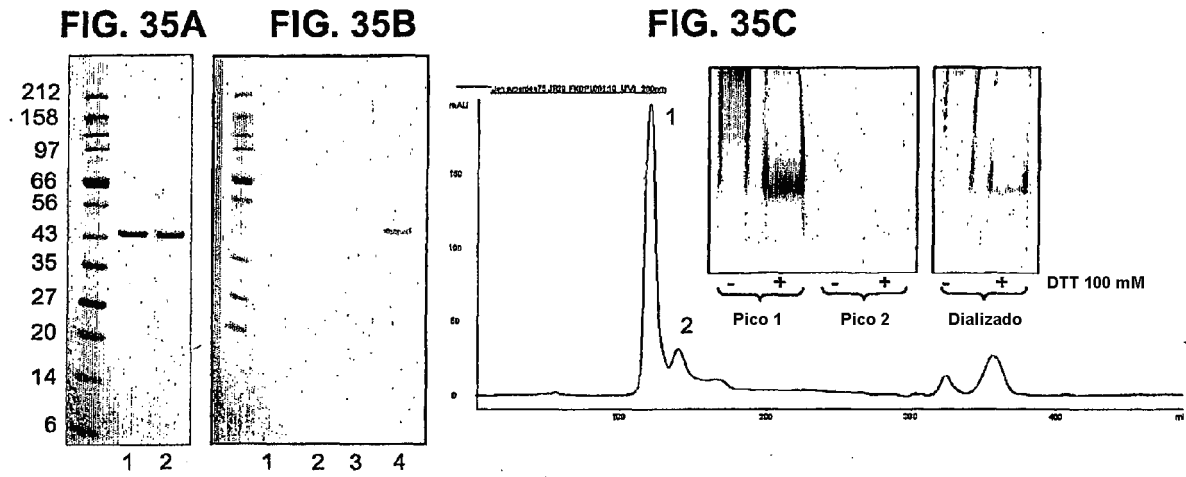


FIG. 36

FIG. 37

