

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 955**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2008 E 12173418 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2527441**

54 Título: **Composiciones y usos para el tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar**

30 Prioridad:

**15.07.2007 IL 18462707**

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

**03.06.2016**

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT  
FOUNDATION LTD. (100.0%)  
Senate House, Technion City  
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**NEUFELD, GERA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 572 955 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**

5 Composiciones y usos para tratar proteinosis alveolar pulmonar

**ANTECEDENTES**

10 La lisil oxidasa (LO o LOX) es una oxidasa de amina que contiene cobre que oxida sustratos de amina primaria a aldehídos reactivos. La LOX cataliza la desaminación oxidativa de residuos de peptidil lisina y de hidroxilisina en colágenos, y de residuos de peptidil lisina en elastina, y ayuda en la formación de la matriz extracelular. Los peptidilaldehídos resultantes normalmente condensan y experimentan reacciones de oxidación para formar las reticulaciones covalentes derivadas de lisina requeridas para la integridad estructural normal de la matriz extracelular. Habitualmente se liberan peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y amonio en cantidades estequiométricas con el producto de peptidilaldehído.

15 La LOX puede oxidar ciertos residuos de lisina en colágeno y elastina fuera de la célula; sin embargo, también puede actuar intracelularmente, donde puede regular la expresión génica. Además, la LOX puede inducir la quimiotaxia de monocitos, fibroblastos y células del músculo liso. La propia LOX puede ser inducida por varios factores y esteroides tales como TGF-β, TNF-α e interferón (Csiszar, Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32 (2001)). La LOX también se ha implicado en diversas funciones biológicas tales como la regulación del desarrollo, la supresión de tumores, la movilidad celular y la senescencia celular. La diversas funciones de la LOX y sus recientemente descubiertos miembros de la familia de las amino oxidasas, la lisil oxidasa o las proteínas de tipo lisil oxidasa (LOR o LOXL), pueden desempeñar importantes funciones con respecto a su localización intracelular y extracelular.

20 La expresión o la implicación de LOX y LOXL en enfermedades también puede variar. Esto puede ser debido a varias razones, tales como la diferencia en la distribución tisular, los dominios de procesado, la regulación de la actividad, así como a otras diferencias entre las proteínas. Por ejemplo, LOX y LOXL participan en enfermedades fibróticas, ya que tanto LOX como LOXL son altamente expresadas en los miofibroblastos que rodean las áreas fibróticas (Kagen, Pathol. Res. Pract. 190:910-919 (1994); Murawaki et al., Hepatology 14:1167-1173 (1991); Siegel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2945-2949 (1978); Jourdan Le-Saux et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:587-592 (1994); Kim et al., J. Cell Biochem. 72:181-188 (1999)). La LOX y las diversas LOXL también participan en varios cánceres. Por ejemplo, LOXL y LOXL4 han mostrado estar silenciadas epigenéticamente y pueden inhibir la vía de señalización de la cinasa regulada por ras/señal extracelular en cáncer de vejiga humano (Wu et al., Cancer Res. 67:4123-4129 (2007)). Otros han mostrado regulación por incremento selectiva y una amplificación del gen LOXL4 en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gorough et al., J. Pathol. 212:74-82 (2007)). LOX y LOX2 también participan en varios tumores, tales como cáncer de colon y de esófago (Csiszar, Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32 (2001)). En cáncer de mama, la LOX y los miembros de la familia de las LOXL se han relacionado con el cáncer (Kirschmann et al., Cancer Res. 62:448-4483 (2002)).

25 Tazawa et al., Respirology (2006) 11, S61-S64, describen un estudio piloto de terapia de inhalación de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos para pacientes con proteinosis alveolar pulmonar idiopática.

30 Por lo tanto, hay una necesidad de composiciones y métodos para modular la actividad de LOX y LOXL. Uno de tales métodos es mediante el uso de interferencia por ARN (iARN). iARN se refiere a métodos de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos de secuencia, que está mediado por un ARN bicatenario (ARNbc) denominado ARN interferente corto (ARNic). La iARN es un mecanismo endógeno que usa pequeños ARN no codificantes para silenciar la expresión génica. Cuando se introduce un ARNic en una célula, se une a la maquinaria de la iARN endógena para alterar el nivel del ARNm que contiene secuencias complementarias con alta especificidad. La respuesta de la iARN implica un complejo de endonucleasa conocido como el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media en la escisión de un ARN monocatenario complementario a la hebra antisentido del dúplex de ARNic. La escisión del ARN diana tiene lugar en el centro de la región complementaria a la hebra antisentido del dúplex de ARNic (Elbashir et al., Genes Dev. 15:188-200, (2001)).

35 Como resultado, hay una necesidad de composiciones que modulen LOX y LOXL, tal como mediante el uso de iARN. También son necesarios métodos de uso de tales composiciones para tratar y diagnosticar afecciones. La presente divulgación trata estas necesidades y proporciona también otras ventajas.

**SUMARIO**

40 La expresión de la LOXL2 está correlacionada con la proteinosis alveolar pulmonar, y como tal puede usarse para un diagnóstico y tratamiento precisos de la proteinosis alveolar pulmonar (PAP).

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona un agente para su uso en inhibir la proteinosis alveolar pulmonar (PAP) en un sujeto, en el que el agente modula la expresión o actividad de la proteína LOXL2, en el que el agente comprende un polinucleótido que comprende una primera secuencia hibridable con un polinucleótido que codifica

LOXL2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia, en el que la primera secuencia comprende SEQ ID NO: 21. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

5 Además de la presente invención, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas y métodos útiles para modular la angiogénesis y fibrosis, y para tratar cáncer, inhibiendo las metástasis y tumores en un sujeto, tal como tumores primarios. Composiciones y métodos adicionales proporcionados por la presente divulgación se tratan en este documento a continuación.

10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica LOXL2 o la SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia. La secuencia de enlace puede formar una estructura de bucle en horquilla. La primera secuencia puede comprender la SEQ ID NO. 20 o 21. También se proporciona un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.  
15 20 o 21. El polinucleótido aislado puede tener al menos dos veces la longitud de SEQ ID NO. 20 o 21.

El polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO. 20 puede comprender adicionalmente una segunda secuencia complementaria a ella. Alternativamente, el polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO. 21 puede comprender adicionalmente una segunda secuencia complementaria a ella. Los polinucleótidos aislados que comprenden SEQ ID NO. 20 o 21 también pueden comprender una estructura de bucle en horquilla. Adicionalmente se proporcionan vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos aislados, así como células huésped que comprenden los vectores de expresión.

20 En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un polinucleótido que comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica LOXL2 o SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia; y un excipiente farmacéutico. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un polinucleótido que comprende SEQ ID NO. 20 o 21; y un excipiente farmacéutico.

25 La presente divulgación también proporciona métodos de administración de las composiciones descritas en este documento. También se desvelan métodos para inhibir el crecimiento tumoral primario, la metástasis, la fibrosis o la angiogénesis en un sujeto. Los métodos pueden comprender administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir el crecimiento tumoral primario, la metástasis, la fibrosis o la angiogénesis en el sujeto. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica LOXL2 o SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia. El polinucleótido puede comprender una secuencia de enlace que forma una estructura de bucle en horquilla. La primera secuencia puede comprender SEQ ID NO. 20 o 21. Los métodos también engloban la administración a un sujeto de un polinucleótido que comprende SEQ ID NO. 20 o 21 para inhibir el crecimiento tumoral primario, la metástasis, la fibrosis o la angiogénesis en el sujeto.

30 También se proporcionan métodos para tratar PAP en un sujeto. La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente para inhibir PAP, en los que el agente modula la expresión o la actividad de una lisil oxidasa o una proteína de tipo lisil oxidasa. También se proporcionan métodos para detectar PAP en un sujeto, en los que al sujeto se le administra un agente que detecta la expresión o la actividad de una lisil oxidasa o de una proteína de tipo lisil oxidasa, en la que la expresión o la actividad se usan para diagnosticar PAP en el sujeto. El nivel o la actividad de la lisil oxidasa puede ser el de LOXL2, LOXL3, o ambas, y el agente usado para tratar o diagnosticar PAP puede ser un anticuerpo, una molécula pequeña, molécula antisentido, ribozima, una ADNzima, oligonucleótidos formadores de triple hélice, ARNic o ARNph. El agente puede ser un inhibidor de la lisil oxidasa o proteína de tipo lisil oxidasa, tal como LOXL2, LOXL3, o ambas.

35 La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO: 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia.

40 La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado, en el que la secuencia de enlace forma una estructura de bucle en horquilla.

45 La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado, en el que la primera secuencia comprende SEQ ID NO. 20 o 21.

50 La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO. 20. La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido aislado es al menos dos veces la longitud de SEQ ID NO. 20.

55 La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende además una secuencia

complementaria a SEQ ID NO. 20.

La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido comprende una estructura de bucle en horquilla.

5

La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO. 21.

La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido aislado es al menos dos veces la longitud de SEQ ID NO. 20.

10

La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende además una secuencia complementaria a SEQ ID NO. 21.

15

La presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido comprende una estructura de bucle en horquilla.

La presente divulgación proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido de SEQ ID NO. 2, 20 o 21.

20

La presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión que comprende un polinucleótido de SEQ ID NO. 2, 20 o 21.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende:

25

- (a) un polinucleótido que comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a dicha primera secuencia, y una secuencia de enlace que une dicha primera secuencia con dicha segunda secuencia; y,
- (b) un excipiente farmacéutico.

30

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- (c) un polinucleótido que comprende SEQ ID NO. 20 o 21; y,
- (d) un excipiente farmacéutico.

35

La presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir el crecimiento tumoral, en el que el polinucleótido comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia.

40

La presente divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la metástasis, en el que el polinucleótido comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia.

45

La presente divulgación proporciona un método para inhibir la fibrosis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la fibrosis, en el que el polinucleótido comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia. La presente divulgación proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la angiogénesis, en el que el polinucleótido comprende una primera secuencia hibridable con una secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO. 2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de enlace que une la primera secuencia con la segunda secuencia.

50

55

La presente divulgación proporciona un método, en el que la secuencia de enlace forma una estructura de bucle en horquilla.

60

La presente divulgación proporciona un método, en el que la primera secuencia comprende SEQ ID NO. 20 o 21.

65

La presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir crecimiento tumoral en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 20 o 21. La presente divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir metástasis en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 20 o 21.

La presente divulgación proporciona un método para inhibir la fibrosis en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la fibrosis en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 20 o 21.

5 La presente divulgación proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la angiogénesis en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 20. La presente divulgación proporciona un método en el que el polinucleótido es al menos dos veces la longitud de SEQ ID NO. 20.

10 La presente divulgación proporciona un método, en el que el polinucleótido comprende además una secuencia complementaria a SEQ ID NO. 20.

15 La presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir el crecimiento tumoral en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 21.

20 La presente divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la metástasis en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 21.

25 La presente divulgación proporciona un método para inhibir la fibrosis en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la fibrosis en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 21.

30 La presente divulgación proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido para inhibir la angiogénesis en el sujeto, en el que el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 21. La presente divulgación proporciona un método, en el que el polinucleótido es al menos dos veces la longitud de SEQ ID NO. 21.

La presente divulgación proporciona un método, en el que el polinucleótido comprende además una secuencia complementaria a SEQ ID NO. 21.

35 La presente divulgación proporciona un método, en el que el polinucleótido comprende una estructura de bucle en horquilla.

La presente divulgación proporciona un método para tratar proteinosis alveolar pulmonar (PAP) en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente para inhibir PAP en el sujeto, en el que el agente modula la expresión o actividad de una lisil oxidasa o proteína de tipo lisil oxidasa.

40 La presente divulgación proporciona un método para detectar proteinosis alveolar pulmonar (PAP) en un sujeto que comprende administrar al sujeto un agente que detecta una expresión o actividad de una lisil oxidasa o proteína de tipo lisil oxidasa, en el que la expresión o actividad se usa para diagnosticar PAP en el sujeto.

45 La presente divulgación proporciona un método, en el que la proteína de tipo lisil oxidasa es LOXL2 o LOXL3.

La presente divulgación proporciona un método, en el que el agente es un anticuerpo, una molécula pequeña, molécula antisentido, ribozima, ADNzima, oligonucleótidos formadores de triple hélice, ARN<sub>i</sub> o ARN<sub>ph</sub>.

50 La presente divulgación proporciona un método, en el que el agente es un inhibidor de la lisil oxidasa o proteína de tipo lisil oxidasa.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 Puede obtenerse una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada, que establece realizaciones ilustrativas en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de la misma:

60 La **FIG. 1** ilustra las secuencias del ARN<sub>ph</sub> de LOXL2. Cada secuencia forma una horquilla y las secuencias subrayadas en cada una son hebras sentido/antisentido. Los ARN<sub>ph</sub> se expresan usando el vector pLKO.1-puro (disponible de Sigma) para permitir la transfección transitoria o estable del ARN<sub>ph</sub>, así como la producción de partículas lentivirales.

La **FIG. 2** es un esquema que ilustra el ensayo de invasión tumoral.

65 La **FIG. 3** ilustra la expresión de LOXL2 en **(A)** células cancerosas MDA-MDB 231/LM2-4 y HT1080 y en **(B)** células de cáncer de mama MDA-MB 231 y de melanoma YU/PAC2, infectadas con vectores lentivirales que dirigen la expresión del ARN<sub>ph</sub> específico de LOXL2 195 o 197 (también denominados sh.Loxl2.195 o

sh.Loxl2.197, respectivamente)

La **FIG. 4** es una microfotografía que ilustra el cambio morfológico en las células infectadas con vectores lentivirales que dirigen la expresión de sh.Loxl2.195 o de sh.Loxl2.197.

La **FIG. 5** es **(A)** una microfotografía que ilustra el efecto de los vectores lentivirales que dirigen la expresión de sh.Loxl2.195 o sh.Loxl2.197 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de fibrosarcoma HT1080 en el ensayo de invasión tumoral. **(B)** es una transferencia Western que muestra el silenciamiento de la expresión de LOXL2 y **(C)** que muestra el número de células invasoras por campo.

La **FIG. 6** es una microfotografía que ilustra la expresión de LOXL2 y LOXL3 en tejido de pulmón normal y con PAP.

La **FIG. 7** ilustra la tinción con rodamina faloidina de células MDA-231. **(A)** Células MDA-231 no mutantes y células MDA-231 estables lentivirales infectadas de control con tinción con faloidina de F-actina revelan largas fibrillas típicas de una célula que ha experimentado una transición epitelial-mesenquimatosa (EMT). **(B)** Células MDA-231 infectadas con sh.Loxl2.195 están empobrecidas en LOXL2 y revelaron un efecto "borde" cerca de la membrana celular, más típico de una célula epitelial normal.

La **FIG. 8** ilustra el desarrollo de un tumor primario en ratones inyectados con células MDA-231 si-control (si-c) o con sh.Loxl2.195 (si-195). Las células MDA-231 se infectaron con ARNph de control que codifica lentivirus o el vector de expresión de lentivirus sh.Loxl2.195. Las células se seleccionaron con puromicina y se determinó la expresión de Loxl2 antes de la inyección en los panículos adiposos mamarios de ratones hembras balb/c nu/nu. **(A)** El volumen del tumor se midió 6, 11, 14, 18, 22, 25 y 27 días después de la inyección. **(B)** Ilustra el peso del tumor de ratones MDA-231 si-control frente a sh.Loxl2.195 (si-195) 27 días después de la inyección.

La **FIG. 9** ilustra los genes de células cancerosas afectadas por la expresión en exceso de LOXL2 o inhibición de la expresión de Loxl2. **(A)** Genes regulados por incremento en células MCF-7 que expresan en exceso LOXL2 recombinante. La expresión génica se midió por RT-PCR y transferencia Western. Las células se transfectaron con una construcción regulada por tetraciclina que expresa la LOXL2 (clones 12 y 14), el vector lentiviral de control que contiene un ARNph (WT) no relacionado o un mutante de LOXL2 que es enzimáticamente inactivo debido a una mutación en su motivo LTQ (Y689F). **(B)** Infección con la expresión dirigida de lentivirus de ARNph dirigida contra Loxl2. C = ARNph de control, L2 = sh.Loxl2.195

La **FIG. 10** ilustra que la expresión de LOXL2 se potencia por hipoxia. **(A)** Las células se incubaron en una cámara de hipoxia. El control se incubó en condiciones normóxicas (estufa de incubación normal). El ARN se preparó a partir de las células al final del experimento, y se amplificó por RT-PCR. PC = células que expresan LOXL2 recombinante, NC = PCR sin RT. **(B)** Se evaluaron los niveles de LOXL2 por transferencia Western. Las células se estimularon durante los tiempos indicados con la concentración indicaba de CoCl<sub>2</sub>. Se prepararon concentraciones iguales de lisados celulares con tampón de lisis. Los lisados celulares se separaron sobre un gel SDS/PAGE en gradiente, se transfirieron y se sondaron con los anticuerpos anti-LOXL2 de los presentes inventores. Se rasparon las membranas y se volvieron a sonar con un anticuerpo dirigido contra actina β para verificar que la carga era igual.

La **FIG. 11** ilustra la expresión de un receptor de LOXL2 unido a la superficie celular en células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC). **(A)** Se yodó LOXL2 y se ensayaron cuatro líneas celulares diferentes para su unión específica a LOXL2. Se añadió LOXL2 yodada a cada pocillo y se hizo competición con LOXL2 no marcada. **(B)** LOXL2 no se une específicamente a gelatina, laminina ni fibronectina. Se añadió LOXL2 yodada a cada pocillo y la competición se hizo con LOXL2 no marcada. No hubo unión específica, demostrando que la unión observada a las células no está causada por la unión a los componentes de ECM fibronectina, laminina o gelatina. **(C)** Se añadió LOXL2 yodada a cada pocillo y se hizo competición con LOXL2 no marcada. En ausencia, o con la adición de 100 ug/ml de heparina (la heparina no inhibe la unión) o después de una digestión previa con heparinasa (no afecta la unión al posible receptor).

La **FIG. 12** ilustra la expresión de LOXL2 y LOXL3 en células neuronales del sistema nervioso central (SNC). Se realizó hibridación *in situ* sobre secciones de tejido de corteza cerebral humana normal usando sondas dirigidas a LOX, LOXL1, LOXL2, o LOXL3. S = sentido, as = antisentido.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los principios y la operación de la presente divulgación pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y la descripción adjuntos. Debe entenderse que la divulgación no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos descritos en la sección de Ejemplos. La divulgación es susceptible de otras realizaciones o de ser llevada a la práctica o a cabo de diversas formas. Por tanto, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleada en este documento es con fines descriptivos, y no deberían interpretarse como limitantes.

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas y métodos que pueden usarse para modular la angiogénesis y para inhibir el crecimiento tumoral, la invasividad tumoral y la fibrosis tumoral. Por ejemplo, la presente divulgación puede usarse para suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis, así como para tratar y diagnosticar trastornos tales como, por ejemplo, artritis, retinopatía diabética, psoriasis, vasculitis y PAP.

Los innovadores métodos y las composiciones descritas incluyen el uso de un inhibidor de LOX o LOXL, tales como agentes que inhiben LOXL2. Un ejemplo de LOX o LOXL incluye la enzima que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido expresado o traducido a partir de una de las siguientes secuencias: EMBL/

accesos de GenBank: M94054; AAA59525.1 -- ARNm; S45875; AAB23549.1 - ARNm; S78694; AAB21243.1 - ARNm; AF039291; AAD02130.1 - ARNm; BC074820; AAH74820.1 - ARNm; BC074872; AAH74872.1 - ARNm; M84150; AAA59541.1 -- ADN genómico. Ejemplos particulares de LOXL se describen en Molnar et al., *Biochim Biophys Acta*. 1647: 220-24 (2003); Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70:1-32 (2001); y en el documento WO 01/83702. (Se menciona que en estas 3 publicaciones, "LOXL1" hacía referencia a "LOXL", mientras que en la presente invención "LOXL" se refiere a una proteína de tipo lisil oxidasa en general, no solo a LOXL1.) Estas enzimas incluyen LOXL1, codificada por el ARNm depositado en GenBank/EMBL BC015090; AAH15090.1; LOXL2, codificada por el ARNm depositado en GenBank/EMBL U89942; LOXL3 codificada por el ARNm depositado en GenBank/EMBL AF282619; AAK51671.1; y LOXL4, codificada por el ARNm depositado en GenBank/EMBL AF338441; AAK71934.1.

LOX o LOXL también engloban un fragmento funcional o un derivado que aún conserva sustancialmente su actividad enzimática, catalizando la desaminación de residuos de lisilo. Normalmente, un fragmento o derivado funcional retiene al menos el 50 % de su actividad de lisil oxidasa. Un fragmento o derivado funcional puede retener al menos el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % de su actividad de lisil oxidasa. Una LOX o LOXL pueden incluir sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad. Sustituciones conservativas de aminoácidos son conocidas por los expertos en esta técnica y pueden hacerse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Aquellos expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica.

Los inhibidores usados pueden incluir inhibidores de la familia de enzimas de lisil oxidasas, que catalizan la formación de reticulaciones covalentes entre residuos de lisina en fibrillas adyacentes de colágeno o de elastina. Se sabe que existen al menos cinco lisil oxidasas diferentes tanto en seres humanos como en ratones, LOX y cuatro LOX relacionadas, o proteínas de tipo LOX: LOXL1 (o LOL), LOXL2 (o LOR-1), LOXL3 (o LOR-2) y LOXL4 (o Lox-C). Las cinco formas de las lisil oxidasas residen en cinco cromosomas diferentes. Los miembros de esta familia muestran cierto solapamiento en estructura y función, pero parecen tener también funciones distintas. Por ejemplo, LOX parece ser letal en el parto de ratones (Hornstra et al., *J. Biol. Chem.* 278:14387-14393 (2003)), mientras que una deficiencia de LOXL no provoca fenotipo de desarrollo grave (Bronson et al., *Neurosci. Lett.* 390:118-122 (2005)). La familia de las lisil oxidasas incluye cuatro genes, tales como aquellos con SEC ID NO. 1, 4, 5 o 7, o enzimas con las secuencias de aminoácidos en SEC ID NO: 2, 3, 6, 8 o 9.

LOX tiene dominios de proteínas altamente conservados, conservados en varias especies que incluyen al ser humano, ratón, rata, pollo, peces y *Drosophila*. La familia humana de las LOX tiene una región del extremo C altamente conservada que contiene el dominio catalítico de LOX de 205 aminoácidos. La región conservada contiene la unión al cobre (Cu), el dominio de tipo receptor de citocina (CRL) y el sitio del cofactor de lisil-tirosilquinona (LTQ). También se han conservado similarmente 20 residuos de cisteína, estando dos presentes en la región del prepropéptido y diez en la forma procesada catalíticamente activa de LOX (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1 - 32 (2001)).

La región del prepropéptido de LOX contiene un péptido de señalización que es escindido. Se ha predicho que el sitio de escisión está entre Cys21-Ala22, generando una secuencia señal de 16 (o 21) y una forma de propéptido de aminoácido de 48 kDa de LOX, que, sin ceñirse a teoría alguna, todavía es inactivo. Sin quedar limitado por la teoría, el propéptido se N-glucosila durante su paso a través del Golgi, produciendo una proenzima inactiva de 50 kDa que es secretada al entorno extracelular, donde la proenzima, o el propéptido, es escindido entre Gly168-Asp169 por una metaloendoproteasa, una proteinasa C de procolágeno, que son productos de los genes *Bmp1*, *Tll1* y *Tll2*. La BMP I (proteína morfogenética ósea I) es una proteinasa C de procolágeno que procesa el propéptido dando una enzima funcional de 30 kDa y un propéptido de 18 kDa. La secuencia que codifica del propéptido está normalmente moderadamente conservada (aproximadamente el 60-70 %), mientras que la secuencia que codifica la región de 30 kDa del extremo C de la proenzima en la que está localizado el sitio activo está habitualmente altamente conservada (aproximadamente el 95 %). (Kagan y Li, *J. Cell. Biochem.* 88: 660-672 (2003); Kagan et al., *J. Cell Biochem.* 59:329-38 (1995)). Las unidades de N-glucosilo son habitualmente posteriormente eliminadas.

Se han predicho posibles péptidos señal similares en los extremos amino de LOXL, LOXL2, LOXL3 y LOXL4. Los sitios de escisión señal predichos están entre Gly25-Gln26 para LOXL, entre Ala25-Gln26 para LOXL2 y entre Gly25-Ser26 para LOXL3. El consenso para la escisión de BMP-1 en procolágenos y pro-LOX está entre Ala/Gly-Asp, y frecuentemente está seguido de un residuo ácido o cargado. Un posible sitio de escisión para generar LOXL activa es Gly303-Asp304, sin embargo, a continuación está seguido por una atípica Pro. LOXL3 también tiene un posible sitio de escisión en Gly44y-Asp448, que está seguido por una Asp, el procesamiento en este sitio puede producir un péptido activo de un tamaño similar a LOX activa. También se identificó un posible sitio de escisión de BMP-1 dentro de LOXL4, en los residuos Ala569-Asp570 (Kim et al., *J. Biol. Chem.* 278: 52071-52074 (2003)). La proteína LOXL2 también puede procesarse análogamente a los otros miembros de la familia de LOX.

Una característica que puede diferir entre las lisil oxidasas y las proteínas de tipo lisil oxidasas son los receptores con dominios ricos en cisteínas de tipo *scavenger* (SRCR). LOX y LOXL parecen carecer de dominios SRCR, mientras que las LOXL2, LOXL3 y LOXL4 tienen cada una cuatro dominios SRCR en el extremo N. Los dominios SRCR median en la unión del ligando de varias proteínas secretadas y de receptor (Hoheneste et al., *Nat. Struct.*

Biol. 6: 228-232 (1999); Sasaki et al., EMBO J. 17: 1606-1613 (1998)). Otro dominio que parece ser el único de las LOXL es la presencia de un dominio rico en prolina (Molnar et al., Biochimica Biophysica Acta 1647: 220-224 (2003)).

5 La distribución tisular también puede diferir entre LOX y las diversas LOXL. Por ejemplo, como se muestra en la **FIG. 12**, LOXL2 y LOXL3 están altamente expresadas en células neuronales, mientras que LOX y LOXL1 no lo están. Así, en un aspecto, la presente divulgación engloba la modulación de la expresión de LOX o LOXL en el SNC, tal como en el cerebro, o más específicamente, en células neuronales.

10 Cada miembro de la familia de enzimas de las LOX incluye un dominio de lisil oxidasa altamente conservado, cuya actividad es altamente dependiente de la presencia de cobre. La eliminación de cobre de los tejidos tumorales conduce a la inhibición de la angiogénesis (Rabinovitz, J. Natl. Cancer Inst. 91: 1689-1690 (1999); Yoshida et al., Neurosurgery 37: 287-292 (1995)). Esto apoya adicionalmente la función de la familia de enzimas de las lisil oxidasas en la angiogénesis, ya que sin ceñirse a teoría alguna, la eliminación de cobre conduce a la inhibición de las lisil oxidasas.

15 Un apoyo adicional a la actividad angiogénica de las lisil oxidasas se proporciona por los ensayos de unión de PF4-LOXL2. El PF4 es un inhibidor de la angiogénesis. Como tal, la actividad antiangiogénica mostrada por PF4 puede ser, sin ceñirse a teoría alguna, efectuada por la inhibición de LOXL2, que se expresa altamente en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos. Así, según un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos de modulación de la angiogénesis.

### **Angiogénesis**

25 En un adulto, la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejidos normales o enfermos está normalmente regulada por dos procesos, la vasculogénesis recapitulada (la transformación de arteriolas preexistentes en pequeñas arterias musculares) y la angiogénesis, el brote de vasos sanguíneos existentes (que se produce tanto en el embrión como en el adulto). Adicionalmente, la expresión de LOXL2 se induce en condiciones hipóxicas (FIG. 10), ya que se cree que la angiogénesis es estimulada en los cánceres para superar las condiciones hipóxicas.

30 El proceso de la angiogénesis está regulado por estímulos biomecánicos y bioquímicos. Factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) son liberados por células vasculares, macrófagos y células que rodean a los vasos sanguíneos. Estos factores angiogénicos activan proteasas específicas que participan en la degradación de la membrana basal. Como resultado de esta degradación, las células vasculares migran y proliferan, conduciendo así a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Se reclutan células peri-endoteliales, tales como los pericitos en los capilares, las células de músculo liso en vasos mayores y los miocitos cardíacos en el corazón, para proporcionar funciones de mantenimiento y de modulación al vaso que se forma.

40 El establecimiento y la remodelación de los vasos sanguíneos están controlados por señales paracrinas, muchas de las cuales están mediadas por ligandos de proteínas que modulan la actividad de los receptores de la tirosina cinasa transmembranarios. Entre estas moléculas están el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus familias de receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1 y neuropilina-2), las angiopoyetinas 1-4 (Ang-1, Ang-2, etc.) y sus receptores respectivos (Tie-1 y Tie-2), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

50 El crecimiento de tumores sólidos está limitado por la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Cuando las células dentro de los tumores sólidos comienzan a producir factores angiogénicos o cuando disminuyen los niveles de los inhibidores de la angiogénesis, se perturba el equilibrio entre las influencias antiangiogénicas y angiogénicas, iniciando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular existente en el tumor. Este acontecimiento en la progresión del tumor se conoce como cambio angiogénico. Los inhibidores de la angiogénesis tumoral son capaces de inhibir el crecimiento tumoral en ratones, en algunos casos, parecen inhibir completamente el crecimiento tumoral e inhibir también la metástasis tumoral, un proceso que se basa en el estrecho contacto entre la vasculatura y las células tumorales. La angiogénesis desempeña una función importante en la progresión del cáncer de mama.

55 Tales hallazgos han motivado el uso de factores antiangiogénicos conocidos en la terapia del cáncer de mama (Klauber et al., Cancer Res. 57:81-86 (1997); Harris et al., Breast Cancer Res. Treat. 38, 97-108 (1996); Weinstatsaslow et al., Cancer Res. 54: 6504-6511 (1994)). Durante la pasada década se han aislado varios inhibidores de la angiogénesis novedosos, que incluyen los inhibidores de la señalización por el VEGF (Neufeld et al., FASEB J. 13:9-22 (1999)) e inhibidores de procesos que conducen a la maduración y la estabilización de nuevos vasos sanguíneos. Se han usado anticuerpos anti-integrinas como inhibidores de la maduración de los vasos sanguíneos (Brooks et al., Cell 79:1157-1164 (1994); Brooks et al., Cell 92: 391 - 400 (1998)).

65 Aunque ahora están disponibles comercialmente varios fármacos antiangiogénicos, los mecanismos antiangiogénicos de la mayoría de estos fármacos (por ejemplo, angiostatina y endostatina) siguen siendo confusos

(O'Reilly et al., Cell 88: 277-285 (1997); O'Reilly et al., Nature Med. 2: 689-692 (1996)). Dado que la angiogénesis puede ser iniciada por muchos factores angiogénicos (posiblemente compensatorios), es probable que los factores antiangiogénicos que se dirigen a los últimos procesos en la respuesta antiangiogénica, tal como la maduración de los vasos, o una combinación de factores antiangiogénicos, sean eficaces para detener la formación de vasos.

El factor plaquetario 4 (PF4) es una proteína antiangiogénica normalmente secuestrada en las plaquetas (Tanaka et al., Nature Med. 3:437-442 (1997); Maione et al., Science 247:77-79 (1990); Neufeld et al., The Cytokine Reference: A compendium of cytokines and other mediators of host defence (Oppenheim, J. J. y Feldmann, M. eds) Academic Press (2000)). El PF4 inhibe la angiogénesis usando mecanismos poco definidos (Gengrinovitch et al., J. Biol. Chem. 270:15059-15065 (1995); Brown y Parish, Biochemistry 33:13918-13927 (1994); Gupta y Singh, J. Cell Biol. 127:1121-1127 (1994); Watson et al., J. Clin. Invest. 94:261-268 (1994)). Previamente se había especulado con que el PF4 se une a los proteoglicanos de sulfato de heparano de la superficie celular, y de esta forma inhiben la actividad de los factores de crecimiento angiogénicos tales el factor básico de crecimiento de fibroblastos (Watson et al., J. Clin. Invest. 94: 261-268 (1994)).

Por ejemplo, las composiciones y los métodos descritos en la presente divulgación pueden usarse para suprimir el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis, o mediante la inhibición directa del crecimiento tumoral (tal como del crecimiento tumoral primario), suprimiendo la metástasis, así como para tratar y diagnosticar trastornos tales como, por ejemplo, artritis, retinopatía diabética, psoriasis y vasculitis, y proteinosis alveolar pulmonar primaria.

### ***Tumores metastásicos y primarios***

La prevención, la reducción y el diagnóstico de tumores son importantes en la prevención y el tratamiento del cáncer. La transición desde un tumor localizado hasta un tumor invasivo y metastásico representa un punto de referencia en el desarrollo de la enfermedad maligna, ya que habitualmente está asociado con un pronóstico notablemente peor. La comprensión de los procesos que gobiernan esta transición es, por tanto, de importancia fundamental, y las funciones de LOX y LOXL en estos procesos pueden usarse no solo para una comprensión adicional de este proceso, sino usarse también para tratar, prevenir o diagnosticar tumores primarios y metastásicos.

Por ejemplo, la expresión de LOXL2 puede disminuirse en células de cáncer de mama, células de melanoma y células de fibrosarcoma usando ARNph o ARNic (FIGS. 3, 5B). La administración de ARNph o ARNic que se dirijan a LOXL2 conducen a una transición de tipo EMT hacia MET (FIG. 4, FIG. 7), así como a una disminución en la invasión celular (FIG. 5), apoyando además la función de LOXL2 en la metástasis tumoral, y la modulación de la expresión de LOXL2 puede ayudar a inhibir la actividad metastásica. La inhibición de LOXL2 también puede usarse en inhibir el crecimiento tumoral y reducir tumores primarios. La inhibición del crecimiento tumoral puede ser preventiva. Alternativamente, la inhibición del crecimiento tumoral primario puede ser una reducción de la masa del tumor, por ejemplo, puede reducirse la masa del tumor en comparación con el tamaño o el volumen del tumor cuando se detectó inicialmente. La inhibición puede ser en la velocidad de crecimiento del tumor primario, por ejemplo, la masa o el volumen del tumor primario aumenta a una velocidad menor en comparación con un sujeto no tratado con las composiciones desveladas en este documento, por ejemplo, como se muestra en la FIG. 8.

### ***Cáncer de mama***

En el cáncer de mama, la transición desde un tumor localizado hacia un tumor invasivo/metastásico está asociada en muchos casos a la formación de focos fibróticos y desmoplasia, que es la presencia de estroma de colágeno excepcionalmente denso, dentro del tumor primario (Colpaert et al., Am. J. Surg. Pathol. 25, 1557 (2001); Hasebe et al., Pathology International 50: 263-272 (2000)). Puede existir una correlación similar en otros tipos de cánceres, tales como los cánceres de colon y de páncreas (Nishimura et al., Virchows Arch. 433:517-522 (1998); Ellenrieder et al., Int. J. Cancer 85:14-20 (2000)). Estas observaciones representan aparentes paradojas a primera vista, dado que la invasividad se ha asociado durante mucho tiempo con la destrucción de matriz extracelular por enzimas de degradación de la matriz extracelular como las metaloproteasas (Stamenkovic, Semin. Cancer Biol. 10:415-433 (2000); Duffy et al., Breast Cancer Res. 2: 252-257 (2000)) y la heparanasa (Vlodavsky y Friedmann, J. Clin. Invest 108:341-347 (2001)). Sin embargo, es posible que la deposición de exceso de matriz extracelular pueda estimular a su vez la expresión de las enzimas de degradación de la matriz extracelular, que contribuirá en ciertas circunstancias a la invasión tumoral. De hecho, existen ciertas pruebas de que un aumento en la deposición de matriz extracelular puede efectivamente influir en la producción de enzimas de degradación de la matriz extracelular (Schuppan et al., Semin. Liver Dis. 21:351-372 (2001); Swada et al., Int. J. Oncol. 19:65-70 (2001)).

### ***Cáncer de colon***

El cáncer del tracto gastrointestinal (GI), especialmente el cáncer de colon, es una enfermedad altamente tratable y a menudo curable cuando está localizada en el intestino. La cirugía es el tratamiento primario y produce una curación en aproximadamente el 50 % de los pacientes. Las recidivas tras la cirugía es un problema importante y a menudo es la causa final de la muerte. Prácticamente todos los casos de cáncer colorrectal surgen a partir de pólipos adenomatosos, algunos de los cuales maduran hacia pólipos grandes, que experimentan un crecimiento y un

desarrollo anormales, y finalmente progresan hasta cáncer. Esta progresión parecería tardar al menos 10 años en la mayoría de los pacientes, convirtiéndola en una forma fácilmente tratable de cáncer si se diagnostica tempranamente, cuando el cáncer está localizado.

- 5 Los procedimientos estándar habitualmente usados para establecer un diagnóstico definitivo de un cáncer del tracto GI incluyen estudios con bario, endoscopia, biopsia y tomografía computerizada (Brennan et al., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Cuarta Edición, págs. 849-882, Filadelfia, Pa.: J. B. Lippincott Co. (1993)).

10 El pronóstico del cáncer de colon está normalmente relacionado con el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de una implicación ganglionar. Estas dos características forman habitualmente la base de los sistemas de estadificación desarrollados para esta enfermedad. La estadificación se realiza habitualmente por un patólogo sobre secciones tisulares obtenidas mediante biopsia y/o cirugía y tiene como objetivo determinar la extensión anatómica de la enfermedad. La estadificación precisa es crítica para predecir el desenlace del paciente y proporcionar criterios para diseñar una terapia óptima. Una estadificación poco precisa puede producir malas decisiones terapéuticas, y es un problema clínico importante en el cáncer de colon.

### Proteinosis alveolar primaria (PAP)

20 La PAP es un trastorno pulmonar raro de etiología desconocida caracterizado por alveolos llenos de material floculado que se tiñe positivamente usando el método del ácido peryódico-Schiff (PAS) y se deriva de fosfolípidos tensioactivos y componentes de proteína. Es probable que LOXL2 y LOXL3 desempeñen una función en PAP, ya que ambas se expresan en tejido de PAP, pero no en tejido pulmonar normal (**FIG. 6**).

25 Se reconocen dos formas, (1) la primaria (idiopática) y (2) la secundaria (debida a infecciones pulmonares; tumores malignos hematológicos; e inhalación de polvos de minerales tales como sílice, óxido de titanio, aluminio e insecticidas). La incidencia de la PAP es elevada en pacientes con tumores malignos hematológicos y SIDA, lo que sugiere una relación con una disfunción inmunitaria.

30 En la PAP los alveolos están llenos de material proteináceo, que ha sido ampliamente analizado y se ha determinado que es tensioactivo normal compuesto de lípidos y las proteínas asociadas a tensioactivo A, B, C y D (SP-A, SP-C, SP-D). Existen pruebas de un defecto en el mecanismo homeostático bien de la producción del tensioactivo o bien en su eliminación por los macrófagos alveolares y el elevador mucociliar. Se ha demostrado una clara relación entre la PAP y una alteración en la maduración de macrófagos.

35 La PAP tiene una prevalencia estimada de 1 caso por 100.000 de población, y previamente se ha informado de tasas de mortalidad tan altas como del 30 % durante varios años desde el inicio de la enfermedad. La tasa de mortalidad real puede ser menor del 10 %. La incidencia en machos es 4 veces mayor que en hembras. Los pacientes tienen normalmente 20-50 años de edad en el momento de presentación.

40 Los pacientes con PAP normalmente se presentan con un inicio gradual de los síntomas. Tanto como el 30 % de los pacientes son asintomáticos, incluso con anomalías difusas en una radiografía de tórax (CXR). Los síntomas pueden incluir tos seca persistente (o producción de esputo escaso), disnea progresiva, fatiga y malestar, pérdida de peso, febrícula intermitente y/o sudoración nocturna, dolor pleurítico de pecho, cianosis y hemoptisis.

45 La etiología de la PAP es desconocida. Las causas pueden incluir inhalación de polvo de sílice (silicoproteinosis aguda), exposición a insecticidas, polvo de aluminio, dióxido de titanio y otros polvos inorgánicos, tumores malignos hematológicos, trastornos mieloides, intolerancia a la proteína lisinúrica, infección por VIH (SIDA), caso clínico de leflunomida y terapia de la artritis reumatoide modificadora de la enfermedad. Los diagnósticos diferenciales pueden incluir neumonitis por hipersensibilidad, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcelular (microcítico), neumonía por *Pneumocystis carinii*, edema pulmonar y sarcoidosis cardiogénica. El diagnóstico puede realizarse mediante un lavado si se requiere una tinción de PAS. Por lo tanto, la PAP está probablemente subdiagnosticada.

50 Clásicamente se usan biopsias pulmonares en el diagnóstico de la PAP: los alveolos llenos de un material no espumoso. Las biopsias transbronquiales son adecuadas, y no se requiere biopsia abierta de pulmón.

55 El tratamiento de la PAP depende de la progresión de la enfermedad, infecciones coexistentes y grado de deterioro fisiológico. El tratamiento de referencia de la PAP es la eliminación mecánica del material lipoproteináceo mediante lavado pulmonar completo, que a menudo se repite. Históricamente, los pacientes ha sido tratados con esteroides sistémicos, mucolíticos (en aerosol) y proteinasa (en aerosol) sin mucho éxito. En la PAP secundaria también se garantiza el apropiado tratamiento de la causa subyacente. Se ha mostrado que el GM-CSF mejora la PAP en varios pacientes, y se está investigando. La PAP congénita responde favorablemente al trasplante de pulmón.

60 El trasplante de pulmón es el tratamiento de elección en pacientes PAP congénita y en pacientes adultos con fibrosis intersticial en estadio terminal y cardiopatía pulmonar. Las principales complicaciones son infecciones de pulmón por *N. asteroides*, *Pneumocystis carinii* y/o *Mycobacterium avium-intracellulare*. La fibrosis pulmonar y/o la cardiopatía

pulmonar también pueden complicar la PAP.

Así, para aumentar la precisión de la terapia y la tasa de supervivencia de los pacientes con PAP hay una necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico y de tratamiento precisos de la PAP, y las composiciones y los métodos descritos en este documento pueden usarse en el diagnóstico y el tratamiento de la PAP.

### **Métodos y composiciones**

Los métodos descritos en este documento se efectúan administrando a un sujeto composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula capaz de modificar un nivel tisular y/o la actividad de al menos un tipo de LOX para así modular la angiogénesis en el tejido de mamífero. La administración puede ser en el tejido de un mamífero. La modificación del nivel tisular y/o actividad de al menos un tipo de LOX o LOXL puede modular la angiogénesis, el desarrollo de un tumor primario, la metástasis tumoral y/o la PAP. También puede detectarse el nivel de expresión o actividad de LOX o LOXL y usarse para diagnosticar una afección, tal como PAP.

Como se usa en este documento, la expresión "nivel tisular" se refiere al nivel de proteína LOX o LOXL presente en el tejido en un momento de tiempo dado. A veces puede ser ventajoso medir los niveles tisulares de las formas activas de LOX o LOXL. Los niveles de proteína se determinan mediante factores tales como las tasas de transcripción y/o de traducción, el recambio de ARN o de proteínas y/o la localización de proteínas dentro de la célula. Como tal, cualquier molécula que efectúe cualquiera de estos factores puede modificar el nivel tisular de LOX o LOXL.

Como se usa en este documento, el término "actividad" se refiere a una actividad enzimática de LOX o LOXL. Una molécula que puede modificar la actividad enzimática puede alterar directa o indirectamente la especificidad de sustrato de la enzima o la actividad del sitio catalítico de la misma.

Existen numerosos ejemplos de composiciones que pueden comprender moléculas que pueden modificar específicamente el nivel tisular y/o la actividad de una lisil oxidasa. Tales moléculas pueden clasificarse en "reguladores por disminución" o "reguladores por incremento" de la lisil oxidasa.

#### **Reguladores por disminución**

Un ejemplo de un agente capaz de regular por disminución una proteína lisil oxidasa es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a la lisil oxidasa o al menos a parte de la proteína lisil oxidasa (por ejemplo, región que atraviesa el sitio catalítico) y de inhibir su actividad cuando se introduce en el tejido de mamífero. Como tal puede usarse un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido a una lisil oxidasa para suprimir o detener la formación de vasos sanguíneos, y para inhibir la fibrosis y la metástasis tumoral.

El anticuerpo puede unirse específicamente a al menos un epítipo de LOX o LOXL. Como se usa en este documento, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico sobre un antígeno al que se une el parátipo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de hidratos de carbono, y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" incluye moléculas intactas, así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv, que son capaces de unirse a los macrófagos. Estos fragmentos funcionales de anticuerpos se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse mediante la digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) F(ab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector de polipéptido adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

Los fragmentos de anticuerpos según la presente divulgación pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del

anticuerpo o por la expresión en *E. coli* o células de mamífero (tal como en cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse mediante la escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueante de los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce directamente dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Porter, *Biochem. J.* 73:119-126 (1959), y las patentes de EE.UU. N.º 4.036.945 y 4.331.647, y referencias contenidas en esos documentos. También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos de cadenas ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de los fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede no ser covalente, como se describe en Inbar et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2659-62 (1972). Alternativamente, las cadenas variables pueden estar conectadas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por compuestos químicos tales como glutaraldehído. Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas VH y VL conectadas mediante un conector de péptidos. Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias (sFv) pueden prepararse construyendo un gen estructural que comprenda secuencias de ADN que codifican los dominios de VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido individual con un péptido conector que une los dos dominios V. Los métodos de producción de sFv se describen, por ejemplo, por Whitlow y Filpula, *Methods* 2:97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y patente de EE.UU. N.º 4.946.778.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una región determinante de la complementariedad (CDR) individual. Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras del anticuerpo, por ejemplo, como se describe en Larrick y Fry, *Methods*, 2:106-10 (1991).

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos), que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos que forman una CDR del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la secuencia de la CDR o de la región estructural importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente de dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones de CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos importados, que normalmente se toman de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de expresión en fago (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)). También están disponibles las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. para la preparación de

anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86-95 (1991)). Similarmente, pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación génica, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Como se describe a continuación, pueden usarse varios enfoques para reducir o anular la transcripción o la traducción de una lisil oxidasa.

### **Polinucleótidos**

Un enfoque es el uso de polinucleótidos para regular por disminución la expresión o actividad de LOX o LOXL. "Polinucleótido", "nucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable en este documento. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir del análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones a la estructura del nucleótidos pueden impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. Un oligonucleótido puede estar aislado, de forma que el oligonucleótido se separa de los otros constituyentes, celulares y demás, que normalmente están asociados en la naturaleza con el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos.

En la presente invención pueden usarse polinucleótidos modificados. Los polinucleótidos modificados pueden tener semividua y/o penetración en la membrana mejoradas. En las técnicas se conoce un gran número de variaciones en los esqueletos de polinucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser modificados en la base, en el azúcar o en la fracción de fosfato. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, el uso de metilfosfonatos, monotiofosfatos, ditiofosfatos, fosforamidatos, ésteres de fosfato, fosforotioatos con puentes, fosforamidatos con puentes, metileno fosfonatos con puentes, análogos de desfosfointernucleótidos con puentes de siloxano, puentes de carbonato, puentes de carboximetil éster, puentes de carbonato, puentes de carboximetil éster, puentes de acetamida, puentes de carbamato, puentes de tioéter, puentes de sulfoxi, puentes de sulfono, varios ADN "plásticos", puentes anoméricos y derivados de borano, tal como en Cook, *Anti-Cancer Drug Design* 6: 585 (1991).

La solicitud de patente internacional WO 89/12060 desvela varios elementos estructurales para sintetizar análogos de oligonucleótidos, así como análogos de oligonucleótidos formados uniendo tales elementos estructurales en una secuencia definida. Los elementos estructurales pueden ser tanto "rígidos" (es decir, que contienen una estructura anular) como "flexibles" (es decir, que carecen de una estructura anular). En ambos casos, los elementos estructurales contienen un grupo hidroxilo y un grupo mercapto, a través de los que los elementos estructurales se dice que se unen para formar análogos de oligonucleótidos. El residuo de enlace en los análogos de oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en sulfuro (-S-), sulfóxido (-SO-) y sulfona (-SO<sub>2</sub>-).

La solicitud de patente internacional WO 92/20702 describe un oligonucleótido acíclico que incluye un esqueleto peptídico sobre el que están encadenadas cualquiera de las nucleobases o análogos químicos seleccionados y sirve como caracteres codificantes al igual que lo hacen en ADN o ARN natural. Estos nuevos compuestos, conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), no solo son más estables en las células que sus homólogos naturales, sino que también se unen al ADN y ARN natural entre 50 y 100 veces más estrechamente que los ácidos nucleicos naturales se adhieren entre sí. Los oligómeros de PNA pueden sintetizarse a partir de los cuatro monómeros protegidos que contienen timina, citosina, adenina y guanina mediante síntesis peptídica en fase sólida de Merrifield. Con el fin de aumentar la solubilidad en agua y prevenir la agregación, puede colocarse un grupo lisinoamida en la región del extremo C.

Una secuencia lineal, o secuencia, es un orden de nucleótidos en un polinucleótido en una dirección 5' a 3' en la que los residuos que son vecinos entre sí en la secuencia están contiguos en la estructura primaria del polinucleótido. Una secuencia parcial es una secuencia lineal de parte de un polinucleótido que se sabe que comprende residuos adicionales en una o ambas direcciones.

Una secuencia lineal de nucleótidos es idéntica a otra secuencia lineal si el orden de nucleótidos en cada secuencia es el mismo, y aparece sin ninguna sustitución, delección o sustitución de material. Se entiende que las bases nitrogenadas de purina y pirimidina con estructuras similares pueden ser funcionalmente equivalentes en términos de apareamiento de bases de Watson-Crick; y la intersustitución de bases nitrogenadas similares, particularmente de uracilo y de timina, o la modificación de bases nitrogenadas, tal como mediante metilación, no constituye una sustitución de material. Un polinucleótido de ARN y uno de ADN tienen secuencias idénticas cuando la secuencia para el ARN refleja el orden de bases nitrogenadas en los polirribonucleótidos, la secuencia para el ADN refleja el orden de bases nitrogenadas en los polidesoxirribonucleótidos, y las dos secuencias satisfacen los otros requisitos de esta definición. Cuando uno o ambos de los polinucleótidos que se están comparando es bicatenario, las secuencias son idénticas si una hebra del primer polinucleótido es idéntica a una hebra del segundo polinucleótido.

Un vector puede comprender los polinucleótidos de la presente divulgación. El vector, una molécula de ácido nucleico que normalmente es autorreplicante, transfiere una molécula de ácido nucleico insertada dentro y/o entre células huésped. Los vectores incluyen aquellos que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula, la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o la traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Un vector de expresión es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido(s). Un sistema de expresión habitualmente connota una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

Las células huésped en las que se ha introducido un vector o polinucleótido de la invención, por ejemplo, un vector de expresión o una molécula de ácido nucleico aislada de la divulgación, se refieren no solo a la célula particular, sino también a la progenie o posible progenie que una célula tal. Una célula huésped puede ser cualquier célula procarionta o eucariota. Por ejemplo, las células huésped pueden incluir células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas son conocidas por aquellos expertos en la técnica. Aquellos expertos en la técnica conocen muchos métodos para introducir ácidos nucleicos en células huésped, tanto *in vivo* como *in vitro*, e incluyen, sin limitación, precipitación con fosfato cálcico, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección y transferencia de ácidos nucleicos mediada por virus. Las estrategias de administración se describen en Luft, J. Mol. Med. 76:75-76 (1998); Kronenwett et al., Blood 91:852-862 (1998); Rajur et al., Bioconjug. Chem. 8:935-940 (1997); Lavigne et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 237:566-571 (1997) y Aoki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 231:540-545 (1997). La administración de los polinucleótidos de la presente divulgación también puede realizarse a sujetos, incluyendo mamíferos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden suministrarse o administrarse a tejidos de mamífero.

Los polinucleótidos de la presente divulgación incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ADNzimas, moléculas de ARN<sub>ic</sub> que incluyen ARN<sub>ph</sub> y oligonucleótidos formadores de hélices triples, para regular por disminución la expresión o la actividad de una o más lisil oxidasas.

### **Polinucleótidos antisentido**

Según un aspecto, la regulación por disminución de los niveles o actividad de LOX o LOXL puede efectuarse usando un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm que codifica LOX o LOXL, tal como LOXL2.

El diseño de moléculas antisentido que pueden usarse para regular eficazmente por disminución LOX o LOXL2 se efectúa normalmente teniendo en consideración dos aspectos o factores usados en el enfoque antisentido. El primer aspecto es la administración del oligonucleótido dentro del citoplasma de las células apropiadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se une específicamente al ARNm designado dentro de las células de una forma que inhiba la traducción del mismo.

Normalmente se tienen en cuenta varias consideraciones cuando se diseñan oligonucleótidos antisentido. Para la eficaz inhibición *in vivo* de la expresión génica usando oligonucleótidos antisentido o análogos, los oligonucleótidos o análogos normalmente cumplen los siguientes requisitos (i) especificidad suficiente en la unión a la secuencia diana; (ii) solubilidad en agua; (iii) estabilidad frente a nucleasas intra y extracelulares; (iv) capacidad de penetración a través de la membrana celular; y (v) cuando se usan para tratar un organismo, baja toxicidad. Están disponibles algoritmos para identificar aquellas secuencias con la mayor afinidad de unión predicha para su ARNm diana basándose en un ciclo termodinámico que tiene en cuenta la energía de alteraciones estructurales tanto en el ARNm diana como en el oligonucleótido, por ejemplo, como se describe en Walton et al., Biotechnol Bioeng 65: 1-9 (1999).

Tales algoritmos se han usado con éxito para implementar un enfoque antisentido en células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton et al. permitió a los científicos diseñar con éxito oligonucleótidos antisentido para globina  $\beta$  de conejo (RBG) y transcritos del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  de ratón (TNF  $\alpha$ ). El mismo grupo de investigación también ha informado de que la actividad antisentido de oligonucleótidos elegidos racionalmente contra

tres ARNm diana modelos (deshidrogenasa de lactato humana A y B y gp130 de rata) en cultivo celular, como se evalúa mediante una técnica de PCR cinética, demostró ser eficaz en prácticamente todos los casos, incluyendo los ensayos frente a tres dianas diferentes en dos tipos de células con químicas de oligonucleótidos de fosfodiéster y fosforotioato.

5 Además, también se han publicado varios enfoques para diseñar y predecir la eficiencia de oligonucleótidos específicos usando un sistema *in vitro* (Matveeva et al., Nature Biotechnology 16: 1374-1375 (1998)).

10 Una molécula antisentido que puede usarse con la presente divulgación incluye un polinucleótido o un análogo de polinucleótido de al menos 10 bases, por ejemplo, entre 10 y 15, entre 15 y 20 bases, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 22, al menos 25, al menos 30, o incluso al menos 40 bases, que es hibridable *in vivo*, en condiciones fisiológicas, con una porción de una hebra de un polinucleótido que codifica un polipéptido homólogo al menos el 50 % a SEQ ID NO: 1, 4, 5 o 7, u homólogo al menos el 75 % a una porción del extremo N de las mismas, como se determina usando el software BestFit del paquete de análisis de secuencias Wisconsin, utilizando el algoritmo de Smith y Waterman, en el que la penalización por la creación de huecos es igual a 8 y la penalización por la extensión de huecos es igual a 2.

15 Los oligonucleótidos antisentido usados por la presente divulgación pueden expresarse a partir de una construcción de ácido nucleico administrada en el tejido, en cuyo caso pueden usarse promotores inducibles, de forma que la expresión antisentido pueda ser activada y desactivada, o alternativamente, tales oligonucleótidos puedan sintetizarse químicamente y administrarse directamente en el tejido como parte de, por ejemplo, una composición farmacéutica.

20 La capacidad de sintetizar químicamente oligonucleótidos y análogos de los mismos que tienen una secuencia predeterminada seleccionada ofrece un medio para modular por disminución la expresión génica. Pueden considerarse cuatro tipos de estrategias de modulación de la expresión génica.

25 Al nivel de la transcripción, los oligonucleótidos antisentido o sentido, o los análogos que se unen al ADN genómico mediante un desplazamiento de hebra o la formación de una hélice triple, pueden prevenir la transcripción. Al nivel del transcrito, los oligonucleótidos antisentido o los análogos que se unen a las moléculas de ARNm diana, conducen a la escisión enzimática del híbrido mediante una RNasa H intracelular. En este caso, mediante la hibridación con el ARNm diana, los oligonucleótidos o los análogos de oligonucleótidos proporcionan un híbrido dúplex reconocido y destruido por la enzima RNasa H. Alternativamente, tal formación del híbrido puede conducir a interferencia con el correcto corte y empalme. Como resultado, en ambos casos, el número de transcritos intactos de ARNm diana listos para su traducción se reduce o se elimina.

30 Al nivel de la traducción, los oligonucleótidos antisentido o los análogos que se unen a las moléculas de ARNm diana previenen, mediante impedimento estérico, la unión de factores de traducción esenciales (ribosomas), al ARNm diana, un fenómeno conocido en la técnica como detención de la hibridación, inactivando la traducción de tales ARNm.

35 Los oligonucleótidos no modificados no son normalmente prácticos para su uso como secuencias antisentido ya que tienen semividas *in vivo* cortas, durante las cuales son degradados rápidamente por nucleasas. Adicionalmente, a menudo son difíciles de preparar en cantidades mayores de miligramos. Además, tales oligonucleótidos son habitualmente malos penetrantes de la membrana celular. Así, los análogos de oligonucleótidos se conciben habitualmente de una forma adecuada.

40 Por ejemplo, los problemas que surgen en relación con el reconocimiento de ADN bicatenario (ADNbc) a través de la formación de la hélice triple han sido disminuidos mediante un inteligente enlace químico de "conmutación inversa", por el cual se reconoce una secuencia de polipurina en una hebra, y mediante "conmutación inversa", puede reconocerse una secuencia de homopurina en la otra hebra. Es decir, se ha obtenido una buena formación de hélices usando bases artificiales, mejorando así las condiciones de unión con respecto a la fuerza iónica y el pH.

45 También pueden usarse oligonucleótidos de ARN para la inhibición antisentido, ya que forman un dúplex de ARN-ARN estable con la diana, sugiriendo una inhibición eficiente. Sin embargo, debido a su baja estabilidad, los oligonucleótidos de ARN se expresan normalmente dentro de las células usando vectores diseñados para este fin. Este enfoque puede usarse cuando se intenta dirigirse a un ARNm que codifica una proteína abundante y de vida larga.

50 Pueden usarse terapéuticos antisentido para tratar muchas enfermedades potencialmente mortales con varias ventajas sobre los fármacos tradicionales. Normalmente, los fármacos tradicionales intervienen después de formarse una proteína causante de enfermedad. Sin embargo, los terapéuticos antisentido, pueden bloquear la transcripción/traducción de ARNm e intervenir antes de que se forme la proteína, y dado que los terapéuticos antisentido solo se dirigen a un ARNm específico, pueden ser más eficaces con menores efectos secundarios que la actual terapia de inhibición de proteínas.

55

60

65

Numerosos ensayos clínicos han demostrado la seguridad, viabilidad y actividad de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, se han usado con éxito oligonucleótidos antisentido adecuados para el tratamiento del cáncer (Holmund et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1:372-385 (1999)), mientras que el tratamiento de tumores malignos hematológicos mediante oligonucleótidos antisentido que se dirigen al gen *c-myc*, *p53* y *Bcl-2* ha entrado en ensayos clínicos y ha demostrado ser tolerado por los pacientes (Gerwitz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 297-306 (1999)).

Más recientemente se ha informado de que la supresión mediada por antisentido de la expresión del gen de la heparanasa humana inhibe la diseminación pleural de las células de cáncer humanas en un modelo de ratón (Uno et al., *Cancer Res* 61: 7855-60 (2001)).

El primer fármaco antisentido ha sido recientemente aprobado por la FDA. El fármaco, Fomivirsén, fue desarrollado por Isis, y está indicado para el tratamiento local de citomegalovirus en pacientes con SIDA que son intolerantes o que tienen una contraindicación a otros tratamientos para la retinitis por CMV o que no respondían lo suficiente a tratamientos previos para retinitis por CMV (Pharmacotherapy News Network).

Así, el consenso actual es que los recientes desarrollos en el campo de la tecnología antisentido que, como se ha descrito anteriormente, han conducido a la generación de algoritmos de diseño antisentido altamente precisos y una gran variedad de sistemas de administración de oligonucleótidos, permiten que un experto habitual en la técnica de diseño e implemente enfoques antisentido adecuados para la regulación por disminución de la expresión de secuencias conocidas sin tener que recurrir a experimentación de ensayo y error indebida.

### **Ribozima**

Otro agente capaz de regular por disminución una lisil oxidasa es una molécula de ribozima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm que codifica una LOX o LOXL. Las ribozimas están siendo cada vez más usadas para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de ARNm que codifican proteínas de interés (Welch et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:486-496 (1998)). La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico las ha convertido en valiosas herramientas tanto en la investigación básica como en aplicaciones terapéuticas. En el área terapéutica, se han explotado ribozimas para dirigirlas contra ARN virales en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos (Welch et al., *Clin. Diagn. Virol.* 10:163-171 (1998)). Lo más notable, varios protocolos de terapia génica con ribozimas para pacientes con VIH ya están en ensayos de fase 1. Más recientemente se han usado las ribozimas para la investigación con animales transgénicos, la validación de dianas génicas y la elucidación de vías. Varias ribozimas están en diversas etapas de ensayos clínicos. ANGIOZYME fue la primera ribozima químicamente sintetizada en ser estudiada en ensayos clínicos humanos. ANGIOZYME inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), un componente clave en la vía de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras compañías, han demostrado la importancia de la terapéutica antiangiogénesis en modelos animales. HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el ARN del virus de la hepatitis C (VHC), se encontró eficaz en disminuir el ARN viral de la hepatitis C en ensayos con cultivos celulares (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.).

### **ADNzima**

Otro agente capaz de regular por disminución una lisil oxidasa es una molécula de ADNzima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm o secuencia de ADN de LOX o LOXL. Las ADNzimas son polinucleótidos monocatenarios que son capaces de escindir secuencias diana tanto monocatenarias como bicatenarias (Breaker y Joyce, *Chemistry and Biology*, 2:655-660 (1995); Santoro y Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4262-4266 (1997)). Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su ARN de sustrato en uniones de purina:pirimidina (Santoro y Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4262 -4266 (1997); Khachigian, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4:119-121 (2002)).

Ejemplos de construcción y amplificación de ADNzimas manipuladas por ingeniería sintéticas que reconocen sitios de escisión diana mono y bicatenarios se han desvelado en la patente de EE.UU. N.º 6.326.174. Recientemente se observó que las ADNzimas de diseño similar dirigidas contra el receptor de la urocinasa humano inhiben la expresión del receptor de la urocinasa, e inhiben con éxito la metástasis de células de cáncer de colon *in vivo* (Itoh et al., 2002, Abstract 409, *Ann Meeting Am. Soc. Gen. Ther.* [www.as-gt.org](http://www.as-gt.org)). En otra aplicación, ADNzimas complementarias a oncogenes *bcr-ab1* tuvieron éxito en inhibir la expresión de oncogenes en células de leucemia, y en disminuir las tasas de recaídas en trasplantes autólogos de médula ósea en casos de CML y ALL.

### **ARNic**

Otro mecanismo de regulación por disminución de una lisil oxidasa al nivel del transcrito es interferencia por ARN (iARN), un enfoque que utiliza moléculas de ARNbc interferente pequeño (ARNic o ARN pequeño en horquilla, ARNph) que son homologas al ARNm diana y conducen a su degradación (Carthew, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 244-

248 (2001)). Por ejemplo, la infección de diversos tipos de células cancerosas con la expresión de un ARNph específico para una LOXL2 es eficaz en alterar tanto su morfología como invasividad (Ejemplo 1).

La interferencia por ARN es normalmente un proceso en dos etapas. En la primera etapa, que se denomina etapa de iniciación, se digiere ARNbc de entrada en ARN interferentes pequeños (ARNic) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente por la acción de Dicer, un miembro de la familia de la RNasa III de las ribonucleasas específicas de ARNbc, que procesa (escinde) el ARNbc (introducido directamente o a través de un transgén o un virus) de una forma dependiente del ATP. Sucesivos episodios de escisión degradan el ARN a dúplex de 19-21 pb (ARNic), cada uno con salientes de 2 nucleótidos en 3' (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002); Bernstein, *Nature* 409:363-366 (2001)).

En la etapa efectora, los dúplex de ARNic se unen a un complejo de nucleasa para formar el complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Se requiere desenrollar el dúplex de ARNic dependiente de ATP para la activación del RISC. Entonces el RISC activo se dirige al transcrito homólogo mediante las interacciones de apareamiento de bases y normalmente escinde el ARNm en aproximadamente 12 fragmentos de nucleótidos desde el extremo 3' del ARNic (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002); Hammond et al., *Nat. Rev. Gen.* 2:110-119 (2001); Sharp, *Genes. Dev.* 15:485-490 (2001)). Aunque el mecanismo de escisión todavía está por elucidar, la investigación indica que cada RISC contiene un ARNic individual y una RNasa (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002)).

Debido a la notable potencia de la iARN, se ha sugerido una etapa de amplificación en la vía de la iARN. La amplificación podría producirse mediante el copiado de los ARNbc de entrada, que generarían más ARNic, o mediante la replicación de los ARNic formados. Alternativamente o adicionalmente, la amplificación podría efectuarse mediante múltiples episodios de recambio del RISC (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002); Hammond et al., *Nat. Rev. Gen.* 2:110-119 (2001); Sharp, *Genes. Dev.* 15:485-490 (2001)). La iARN también se describe en Tuschl, *Chem. Biochem.* 2: 239-245 (2001); Cullen, *Nat. Immunol.* 3:597-599 (2002); y en Brantl, *Biochem. Biophys. Act.* 1575:15-25 (2002).

La síntesis de moléculas de iARN adecuadas para su uso con la presente divulgación puede efectuarse como sigue. En primer lugar, se escanea la secuencia del ARNm de LOX o LOXL en la dirección 3' del codón de inicio AUG para secuencias de dinucleótidos AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3' se registra como posibles sitios diana de ARNic. Los sitios diana de ARNic se seleccionan del marco de lectura abierto, ya que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en sitios de unión de la proteína reguladora. Las proteínas de unión a las UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo ARNic-endonucleasa (Tuschl, *Chem. Biochem.* 2: 239-245 (2001)). Se apreciará, por tanto, que los ARNic dirigidos a regiones no traducidas también pueden ser eficaces, como se demostró para la GAPDH, en el que el ARNic dirigido al UTR en 5' medió en una disminución de aproximadamente el 90 % del ARNm de la GAPDH celular y suprimió completamente el nivel de proteína ([www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html](http://www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)). En segundo lugar, los posibles sitios diana se comparan con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, humana, de ratón, de rata, etc.) usando cualquier software de alineación de secuencia, tal como el software BLAST disponible del servidor del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Se filtran posibles sitios diana que muestran homología significativa con otras secuencias codificantes.

Las secuencias diana clasificadas se seleccionan como molde para la síntesis de ARNic. Las secuencias seleccionadas pueden incluir aquellas con bajo contenido de G/C, ya que se ha mostrado que éstas son más eficaces en mediar en el silenciamiento génico en comparación con aquellas con contenido de G/C superior al 55 %. Pueden elegirse varios sitios diana a lo largo de la longitud del gen diana para su evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNic seleccionados se usa conjuntamente un control negativo. Los ARNic de control negativo pueden incluir la misma composición de nucleótidos que los ARNic, pero carecen de una homología significativa con el genoma. Así, puede usarse una secuencia de nucleótidos desordenados del ARNic, siempre que no muestre ninguna homología significativa por cualquier otro gen.

Las moléculas de ARNic de la presente divulgación pueden transcribirse a partir de vectores de expresión que puedan facilitar la expresión estable de los transcritos de ARNic una vez introducidos en una célula huésped. Estos vectores se manipulan para expresar ARNph, que son procesados *in vivo* en moléculas de ARNic capaces de llevar a cabo el silenciamiento específico de genes (Brummelkamp et al., *Science* 296:550-553 (2002); Paddison et al., *Genes Dev.* 16:948-958 (2002); Paul et al., *Nature Biotech.* 20:505-508 (2002); Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6047-6052 (2002)).

Los ARNph son polinucleótidos monocatenarios con una estructura de bucle en horquilla. El polinucleótido monocatenario tiene un segmento de bucle que une el extremo 3' de una hebra en la región bicatenaria y el extremo 5' de la otra hebra en la región bicatenaria. La región bicatenaria está formada de una primera secuencia que es hibridable con una secuencia diana, tal como un polinucleótido que codifica LOXL2, o un ARNm de LOXL2, y una segunda secuencia que es complementaria a la primera secuencia, así, la primera y segunda secuencia forman una región bicatenaria en la que la secuencia de enlace conecta los extremos para formar una estructura de bucle en horquilla. La primera secuencia puede ser hibridable con cualquier porción de un polinucleótido que codifica LOXL2.

El dominio bicatenario de tallo del ARNph comprende un sitio de una endonucleasa de restricción.

La estructura de tallo-bucle de los ARNph puede tener salientes de nucleótidos opcionales, tales como salientes de 2 pb, por ejemplo, salientes en 3' de UU. Aunque puede haber variación, los tallos normalmente varían de aproximadamente 15 a 49, aproximadamente 15 a 35, aproximadamente 19 a 35, aproximadamente 21 a 31 pb, o aproximadamente 21 a 29 pb, y los bucles pueden variar de aproximadamente 4 a 30 pb, por ejemplo, aproximadamente 4 a 23 pb.

Para la expresión de los ARNph dentro de las células pueden emplearse vectores de plásmidos que contienen tanto el ARN de la polimerasa III H1 como del promotor U6, un sitio de clonación para el inserto de ARN de tallo-bucle, y una región de terminación de la transcripción de 4 5-timidina. Los promotores de la polimerasa III generalmente tienen sitios de iniciación y de detención bien definidos, y sus transcritos carecen de colas de poli(A). La señal de terminación para estos promotores está definida por un cordón de politimidina, y el transcrito normalmente se escinde después de la segunda uridina. La escisión en esta posición genera un saliente en 3' de UU en el ARNph expresado, que es similar a los salientes en 3' de los ARNc sintéticos. Métodos adicionales para expresar el ARNph en células de mamífero se describen en las referencias citadas anteriormente.

Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es pSUPER™, que incluye el promotor del gen H1-ARN de la polimerasa III con un inicio de la transcripción y una señal de terminación bien definidos, que consisten en cinco timidinas en una fila (T5) (Brummelkamp et al., Science 296:550-553 (2002)). La escisión del transcrito en el sitio de terminación es en un sitio que sigue a la segunda uridina, produciendo así un transcrito que se parece a los extremos de ARNc sintéticos, que también contienen salientes de nucleótidos. El ARNc se clona de forma que incluya la secuencia de interés, es decir, LOX o LOXL, separada por un separador corto a partir del complemento inverso de la misma secuencia. El transcrito resultante se pliega sobre sí mismo hasta formar una estructura de tallo-bucle, que media en la iARN de LOX o LOXL. Por ejemplo, las secuencias que comprenden una secuencia de ADN que codifica el ARNph para LOXL2, tal como SEO ID NO: 20 (sh.LOXL2.197 o si-197), o SEO ID NO: 21 (sh.LOXL2.195, o si-195), pueden mediar en la iARN de LOXL2. Las secuencias que median en la iARN de LOXL2 también pueden comprender SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, o porciones de las mismas.

Otro vector de expresión adecuado para el ARNc codifica el ARNc sentido y antisentido bajo la regulación de promotores polIII individuales (Miyagishi y Taira, Nature Biotech. 20:497-500 (2002)). El ARNc generado por este vector también incluye una señal de terminación de cinco timidinas (T5).

Dado que los enfoques para introducir ARNc sintético en células mediante lipofección pueden producir bajas eficacias de transfección en algunos tipos de células y/o persistencia a corto plazo de los efectos del silenciamiento, se han desarrollado métodos mediados por vector.

Así, las moléculas de ARNc utilizadas por la presente divulgación pueden administrarse a células usando retrovirus. La administración de ARNc usando retrovirus proporciona numerosas ventajas sobre métodos tales como la lipofección, dado que la administración retroviral normalmente es más eficaz, uniforme y selecciona inmediatamente células "silenciadas" estables (Devroe y Silver, BMC Biotechnol. 2:15 (2002)).

Publicaciones científicas recientes han validado la eficacia de tales moléculas bicatenarias cortas de ARN en la inhibición de la expresión de ARNm diana, y así han demostrado claramente el potencial terapéutico de tales moléculas. Por ejemplo, se ha utilizado iARN para inhibir la expresión de células de hepatitis C (McCaffrey et al., Nature 418:38-39 (2002)), VIH-1 (Jacque et al., Nature 418:435-438 (2002)), de cáncer de cuello de útero (Jiang y Milner, Oncogene 21:6041-6048 (2002)) y de células de leucemia (Wilda et al., Oncogene 21, 5716-5724 (2002)).

**Oligonucleótidos formadores de hélices triples (TFO)**

Un método adicional para regular la expresión de LOX o LOXL en células es a través de oligonucleótidos formadores de tríplex (TFO). Estudios recientes han demostrado que pueden diseñarse TFO que pueden reconocer y unirse a regiones de polipurina/polipirimidina en el ADN helicoidal bicatenario de una forma específica de secuencia. Estas reglas de reconocimiento se explican resumidamente por Maher III et al., Science 245:725-730 (1989); Moser et al., Science 238:645-630 (1987); Beal et al., Science 251:1360-1363 (1992); Cooney et al., Science 241:456-459 (1988); y Hogan et al., publicación EP 375408. La modificación de los oligonucleótidos, tal como la introducción de intercalantes y sustituciones de esqueleto, y la optimización de las condiciones de unión (pH y concentración de cationes) han ayudado a superar los obstáculos inherentes a la actividad de TFO tales como la repulsión de cargas y la inestabilidad, y recientemente se demostró que los oligonucleótidos sintéticos pueden ser dirigidos a secuencias específicas (véase Seidman y Glazer, J. Clin. Invest. 112: 487-494 (2003)).

En general, el oligonucleótido formador de tríplex tiene la correspondencia de secuencia:

oligo	3'--A	G	G	T
dúplex	5'--A	G	C	T
dúplex	3'--T	C	G	A

Sin embargo, se ha demostrado que los tripletes A-AT y G-GC tienen la mayor estabilidad en triple hélice (Reither y Jeltsch, BMC Biochem, 12 de setiembre de 2002, Epub). Los mismos autores demostraron que los TFO diseñados según la regla A-AT y G-GC no forman tríplex no específicos, que indica que la formación de tríplex es específica de secuencia.

Así, para cualquier secuencia dada en la región reguladora de LOX o LOXL, puede contemplarse una secuencia formadora de tríplex. Los oligonucleótidos formadores de tríplex pueden tener al menos 15, 25, 30 o más nucleótidos de longitud. También pueden tener hasta 50 o 100 pb.

La transfección de células (por ejemplo, a través de liposomas catiónicos) con TFO, y la formación de la estructura en triple hélice con el ADN diana, induce cambios estéricos y funcionales, bloqueando el inicio de la transcripción y la elongación, permitiendo la introducción de cambios de secuencia deseados en el ADN endógeno y produciendo la regulación por disminución específica de la expresión génica. Ejemplos de tal supresión de la expresión génica en las células tratadas con TFO incluyen la inactivación de los genes supFG1 episomales y HPRT endógenos en células de mamífero (Vasquez et al., Nucl Acids Res. 27:1176-1181 (1999); Puri et al., J Biol. Chem. 276:28991-28998 (2001)), y la regulación por disminución específica de secuencia y de diana de la expresión del factor de transcripción Ets2, importante en la etiología del cáncer de próstata (Carbone et al., Nucl. Acid Res. 31: 833-843 (2003)), y el gen proinflamatorio ICAM-1 (Besch et al., J. Biol. Chem. 277:32473-32479 (2002)). Además, Vuyisich y Beal han demostrado que las TFO específicas de secuencia pueden unirse al ARNbc, inhibiendo la actividad de las enzimas dependientes de ARNbc, tales como las cinasas dependientes de ARN (Vuyisich y Beal, Nuc. Acids Res. 28: 2369-2374 (2000)).

Adicionalmente, los TFO diseñados según los principios mencionados anteriormente pueden inducir la mutagénesis dirigida capaz de efectuar la reparación del ADN, proporcionando así tanto la regulación por disminución como la regulación por incremento de la expresión de genes endógenos (Seidman y Glazer, J. Clin. Invest. 112:487-494 (2003)). Puede encontrarse una descripción detallada del diseño, síntesis y administración de TFO eficaces en las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 2003/017068 y 2003/0096980 de Froehler et al., y 2002 0128218 y 2002 0123476 de Emanuele et al., y la patente de EE.UU. N.º 5.721.138 de Lawn.

Los reguladores por disminución descritos anteriormente son útiles para inhibir la angiogénesis en tejido tumoral. Se ha demostrado que PF4, una proteína de unión a la lisil oxidasa que inhibe la angiogénesis en tejido tumoral, se acumula específicamente en vasos sanguíneos recién formados de los tumores (vasos angiogénicos), pero no en vasos sanguíneos establecidos (Hansell et al., Amer. J. Physiol-Heart. Circ. Phy. 38:H829-H836 (1995); Reiser et al., FASEB J. 6: 2439-2449 (1992)).

Los vasos sanguíneos angiogénicos recién formados son normalmente más permeables a las proteínas que los vasos sanguíneos establecidos, porque el principal inductor de la angiogénesis en muchas enfermedades angiogénicas es VEGF, un factor de crecimiento que también funciona como un potente factor permeabilizante de los vasos sanguíneos (VPF) (Neufeld et al., FASEB J. 13:9-22 (1999)). Los vasos sanguíneos asociados al tumor están, por tanto, normalmente en un estado permanente de hiperpermeabilidad debido a la expresión en exceso desregulada de VEGF, y como tal, una molécula reguladora por disminución usada mediante el método de la presente divulgación podría ser capaz de extravasarse eficazmente de los vasos sanguíneos tumorales, pero mucho menos eficazmente de los vasos sanguíneos estabilizados normales.

### **Reguladores por incremento**

Pueden utilizarse numerosos enfoques para aumentar los niveles de LOX o LOXL y, como tal, para potenciar la formación de vasos sanguíneos.

Por ejemplo, puede administrarse una construcción de ácido nucleico que incluye un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido, posicionado en la dirección 5' de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de LOX o LOXL, tal como el polipéptido establecido en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 8 o 9, en un tejido de mamífero. Las LOX o LOXL expresadas a partir de esta construcción podrían aumentar sustancialmente los niveles de LOX o LOXL dentro de las células del tejido y, como tales, potenciar la angiogénesis.

Los segmentos del polinucleótido que codifican LOX o LOXL pueden ligarse en un vector de expresión disponible comercialmente. Un vector de expresión tal incluye una secuencia promotora para dirigir la transcripción de la secuencia del polinucleótido en la célula de una forma constitutiva o inducible. Un promotor adecuado puede ser, por ejemplo, un promotor Tie-2, que es capaz de dirigir la expresión génica específica de la lisil oxidasa en células endoteliales (véase Schlaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 3058-3063 (1997)). El vector de expresión de la presente divulgación puede incluir además secuencias de polinucleótidos adicionales tales como, por ejemplo, secuencias que codifican para marcadores de selección o polipéptidos indicadores, secuencias que codifican origen de replicación en bacterias, secuencias que permiten la traducción de varias proteínas a partir de un único ARNm, tal como un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), secuencias para la integración genómica de la región

codificante del polipéptido quimérico promotor y/o secuencias generalmente incluidas en un vector de expresión de mamífero, tales como pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Strategene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

5 Se apreciará que tales sistemas de vector comercialmente disponibles pueden modificarse fácilmente a través de técnicas recombinantes usadas habitualmente con el fin de sustituir, duplicar o mutar secuencias de promotor o potenciador existentes y/o introducir cualquier secuencia de polinucleótidos adicional.

10 Un agente capaz de regular por incremento una LOX o LOXL también puede ser cualquier compuesto que sea capaz de aumentar la transcripción y/o la traducción de un ADN o ARNm endógeno que codifica una LOX o LOXL usando, por ejemplo, técnicas de "activación" de genes.

15 Los elementos potenciadores pueden "activarse" adyacentes a las secuencias codificantes de la lisil oxidasa endógena para aumentar así la transcripción a partir de las mismas.

20 Detalles adicionales relativos a la construcción y el uso de construcciones inactivadas y activadas se proporcionan en otro lugar (Fukushige e Ikeda, DNA Res. 3:73-80 (1996); Bedell et al., Genes Dev. 11:1-11 (1997); Bermingham et al., Genes Dev. 10:1751-1762 (1996)).

Se apreciará que la administración directa de un polipéptido que muestra una actividad de LOX o LOXL también puede utilizarse para potenciar la angiogénesis.

25 Así, pueden usarse ensayos de unión por afinidad y/o ensayos de actividad, cuyos principios son bien conocidos en la técnica, para cribar compuestos novedosos (por ejemplo, análogos de sustrato) que puedan regular específicamente la actividad de una lisil oxidasa, y como tales, puedan ser usados con la presente divulgación.

Un ensayo adecuado para el uso con este aspecto de la presente divulgación se ha descrito previamente en un estudio realizado por Bedell-Hogan et al., J Biol Chem. 268:10345-10350 (1993).

30 **Administración**

Estudios previos correlacionaron los niveles de expresión de LOXL2 con las propiedades metastásicas de líneas celulares derivadas de cáncer de mama, indicando que LOXL2 puede desempeñar funciones adicionales en la invasividad tumoral, además su función en la angiogénesis.

35 Así, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis y/o la fibrosis en un tejido de mamífero usando las composiciones descritas en este documento. El método se efectúa administrando al tejido de mamífero una molécula capaz de regular por disminución un nivel tisular y/o una actividad de al menos un tipo de una lisil oxidasa, tal como el ARNph desvelado en este documento.

40 El método de la presente divulgación puede usarse para tratar pacientes humanos que han sido diagnosticados con tumores cancerosos, administrando cualquiera de las moléculas reguladoras por disminución descritas en este documento anteriormente, con el fin de reducir el nivel tisular y/o la actividad de al menos un tipo de una lisil oxidasa.

45 Como se usa en este documento, la expresión "tumor canceroso" se refiere a cualquier tumor maligno dentro de un cuerpo humano, incluyendo, pero no limitándose a, tumores con metástasis. Además, y sin ceñirse a tipo particular alguno de tumor canceroso, la presente divulgación es útil para tratar tumores de cáncer de mama, con o sin metástasis.

50 Como se usa en este documento, la expresión "administrar" se refiere a todos los modos de administración descritos en este documento a continuación con respecto a las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. La administración también se refiere a todos los modos de administración descritos en este documento a continuación con respecto a cualquier agente, incluyendo los polinucleótidos de la presente divulgación, para un efecto terapéutico. La administración puede ser de una cantidad eficaz para que tenga un efecto terapéutico. El efecto terapéutico puede ser para tratar o inhibir una afección o trastorno, tal como tumores cancerosos, primarios o metastásicos, PAP, así como trastornos o afecciones asociadas con fibrosis, y/o angiogénesis. Una cantidad eficaz como se usa en este documento se refiere a la cantidad o dosis de esa composición, tal como un agente, incluyendo los polinucleótidos de la presente divulgación, que se requiere para inducir un efecto deseado. Se entiende que una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, o de un agente, tal como un polinucleótido, es una cantidad no tóxica, pero suficiente, del agente o composición, para proporcionar el efecto deseado, es decir, inhibir, prevenir o revertir el inicio o el curso progresivo de un cáncer, primario o metastásico, PAP, inflamación y/o afecciones o trastornos relacionados con la fibrosis o la angiogénesis.

65 La administración incluye, pero no se limita a, administración local en el tejido tumoral, un órgano en el que se diagnosticó el tumor canceroso y/o tejido relacionados que normalmente forman metástasis (Hortobagyi, Semin.

Oncol. 29:134-144 (2002); Morrow y Gradishar, BMJ 324: 410-414 (2002)). Ejemplos de tejido relacionado incluyen ganglios linfáticos adyacentes a, por ejemplo, tejido mamario y huesos.

La administración también puede efectuarse de una forma sistémica con el fin de tratar el tejido afectado, es decir, el tejido en el que se ha formado el tumor canceroso y en el que las metástasis están presentes o es probable que se formen con la progresión del tumor. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones descritas en este documento, en las que la cantidad es no tóxica, pero suficiente para proporcionar el efecto deseado, es decir, inhibir, prevenir o revertir el inicio o el curso progresivo de una afección aquí descrita, incluyendo la formación o el crecimiento de tumores primarios, metástasis, fibrosis, angiogénesis y PAP.

Dado que cualquier molécula capaz de regular por disminución una actividad de una lisil oxidasa puede ser utilizada por los métodos descritos anteriormente, la presente divulgación también proporciona un método para identificar moléculas capaces de inhibir metástasis y/o fibrosis.

Este método se efectúa mediante el cribado y la identificación de moléculas que muestran reactividad específica con al menos un tipo de lisil oxidasa y el ensayo de un potencial inhibidor de la metástasis y/o fibrosis de estas moléculas.

Pueden cribarse numerosos tipos de moléculas para la reactividad con al menos un tipo de lisil oxidasa, ejemplos incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como oligonucleótidos antisentido, ARN<sub>i</sub>, ADNzimas, ribozimas y oligonucleótidos formadores de hélice triple (TFO) que interactúan con un polinucleótido que expresa una actividad de lisil oxidasa, o moléculas tales como anticuerpos que interactúan con polipéptidos que tienen una actividad de lisil oxidasa. Además, también pueden cribarse péptidos cortos y otras moléculas pequeñas mediante este método y usarse en las composiciones y métodos de tratamiento desvelados en este documento.

El cribado de reactividad cruzada puede efectuarse mediante ensayos de la actividad enzimática de la lisil oxidasa, mediante ensayos de unión, y similares. Ejemplos de ensayos adecuados se proporcionan en Rodríguez et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22:1409-1414 (2002); Wilson y Nock, Curr. Opin. Chem. Biol. 6:81-85 (2002); Uetz, Curr. Opin. Chem. Biol. 6:57-62 (2002); Stoll et al., Front Biosci. 7:c13-32 (2002)).

El ensayo de un fenotipo metastásico de células tumorales transformadas puede realizarse *in vitro* dado que prácticamente todas las etapas del proceso metastásico, incluyendo la unión, degradación y migración de la matriz, pueden modelarse experimentalmente *in vitro* midiendo la invasión de una membrana basal reconstituida (RBM). La invasividad metastásica de la célula tumoral puede modelarse mediante la migración de células tumorales en la membrana basal reconstituida (RBM) en presencia y ausencia de un quimioatrayente, tal como un medio de fibroblastos condicionado (FCM). El ensayo determina las células que se han unido a la RBM, degradado enzimáticamente la RBM y, finalmente, las células que han atravesado el lado del FCM de la membrana.

Dado que los acontecimientos metastásicos *in vitro* se corresponden con las etapas observadas en la diseminación metastásica de células tumorales a través de la membrana basal *in vivo*, la invasividad *in vitro* de las células puede ensayarse mediante los métodos descritos en Albini et al., Cancer Res. 47:3239-3245 (1987). Los ensayos de invasividad y otros métodos para evaluar los efectos metastásicos, se describen en Leyton et al., Cancer Res. 54:3696-3699 (1994). Las preparaciones de membrana basal reconstituida para su uso según los ensayos descritos anteriormente están fácilmente disponibles de numerosos proveedores comerciales. Una membrana de ejemplo tal a este respecto es "MATRIGEL" disponible de Collaborative Biomedical Products de Bedford, MA.

La evaluación *in vitro* del genotipo metastásico de las células tumorales también puede efectuarse determinando el nivel y patrón de expresión de uno o más marcadores asociados a metástasis tales como marcadores de proteasa, que se considera que son una parte integrante de la metástasis tumoral (véase la patente de EE.UU. N.º 6.303.318). Un ejemplo es el ácido araquidónico, cuya liberación en las células puede servir para indicar el potencial metastásico de un tumor (patente de EE.UU. N.º 6.316.416). A este respecto, la determinación de la actividad de la fosfolipasa A-2 (PLA2), y la actividad o la abundancia de factores que afectan a la actividad de PLA2, tal como la proteína uteroglobina (patente de EE.UU. N.º 6.316.416), puede servir como una indicación del potencial metastásico.

La determinación del patrón y nivel de expresión de marcadores asociados a metástasis puede efectuarse por uno de varios métodos conocidos en la técnica.

La presencia o el nivel de proteínas indicativas del potencial metastásico de tumores puede determinarse en células por métodos convencionales bien conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para producir y usar anticuerpos y otros reactivos inmunológicos y para detectar proteínas particulares en muestras usando tales reactivos se describen en Coligan et al. (Eds.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York (1995), que se incorpora por referencia en este documento en partes relativas a la preparación y el uso de reactivos útiles para la determinación de proteínas específicas en muestras. Como otro ejemplo, se describen métodos inmunohistoquímicos para la determinación de proteínas en células en tejidos en Ausubel et al., (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, Capítulo 14, John Wiley & Sons, Inc. (1994), que se incorpora por referencia en este documento en partes relativas a llevar a cabo tales determinaciones. Finalmente, Linnoila et

al., A. J. C. P. 97: 235-243 (1992) y Peri et al., J. Clin. Invest. 92: 2099-2109 (1992), incorporados en este documento como referencia a lo anterior, describen técnicas que pueden usarse.

5 El potencial metastásico también puede determinarse *in vivo* al nivel del ARNm. La presencia y/o nivel de transcritos de ARNm puede determinarse mediante una variedad de métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica. Puede detectarse un ARNm dado en células mediante la hibridación con una sonda específica. Tales sondas pueden ser ADN clonados o fragmentos de los mismos, ARN, normalmente preparados mediante transcripción *in vitro*, o sondas de oligonucleótidos, habitualmente generadas mediante síntesis en fase sólida. Los métodos para la generación y el uso de sondas adecuadas para hibridación específica son bien conocidos y usados en la técnica.

10 Pueden emplearse provechosamente una variedad de controles para mejorar la precisión en los ensayos de detección de ARNm. Por ejemplo, pueden hibridarse muestras con una sonda irrelevante y tratarse con RNasa A antes de la hibridación, para evaluar una falsa hibridación.

15 Con objeto de modular la angiogénesis o de inhibir la metástasis o la fibrosis tumoral, las moléculas usadas por la presente divulgación pueden administrarse al individuo por sí mismas, o en una composición farmacéutica, donde se mezclan con vehículos o excipientes adecuados.

20 Como se usa en este documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en este documento con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración/llegada de un compuesto a un mamífero.

25 Como se usa en este documento, el término "principios activos" se refiere a la preparación responsable del efecto biológico, es decir, moléculas reguladoras por incremento/reguladoras por disminución usadas por la presente divulgación para modular la angiogénesis, y las moléculas reguladoras por disminución usadas por la presente divulgación para inhibir metástasis y fibrosis tumoral.

30 Las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usan de forma intercambiable para referirse a un vehículo, tal como, por ejemplo, un liposoma, un virus, una micela o una proteína, o un diluyente que no provoque una irritación significativa al mamífero y no anule la actividad biológica y las propiedades del principio activo. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

35 El término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

40 Técnicas para la formulación y administración de composiciones pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.*

45 Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración por vía oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

50 Para inyección, los principios activos de la divulgación pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón de disolución salina fisiológica. Para administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que va a atravesarse. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

55 Para administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando el principio activo con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que el principio activo de la divulgación se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir sustancias auxiliares adecuadas si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal del mismo, tal como alginato sódico.

65 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas

de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato magnésico, y opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de la forma convencional.

Las preparaciones descritas en este documento pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas, o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en una forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los principios activos pueden prepararse como suspensiones para inyección apropiadas basadas en aceite o en agua. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, disolución basada en agua estéril y libre de pirógenos, antes de uso.

La preparación de la presente divulgación también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente divulgación incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido.

La composición farmacéutica puede formar una parte de un artículo de fabricación que también incluye un material de envasado para contener la composición farmacéutica y un prospecto que proporciona indicaciones de uso de la composición farmacéutica.

Así, la presente divulgación proporciona métodos y composiciones farmacéuticas útiles para modular la angiogénesis.

Tal actividad de modulación puede usarse para tratar artritis (Koch, *Arthritis Rheum.* 41:951-962 (1998); Paleolog y Fava, *Springer Semin. Immunopathol.* 20:73-94 (1998)), retinopatía diabética (Miller et al., *Diabetes Metab. Rev.* 13:37-50 (1997)), psoriasis, (Detmar et al., *J. Exp. Med.* 180:1141-1146 (1994); Creamer et al., *Br. J. Dermatol.* 136, 859-865 (1997)) o vasculitis (Lie, *Curr. Opin. Rheumatol.* 4:47-55 (1992); Klipple y Riordan, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15:383-398 (1989)).

Además, la presente divulgación también proporciona métodos para tratar una enfermedad caracterizada por vasos sanguíneos frágiles, incluyendo el síndrome de Marfans, Kawasaki, Ehlers-Danlos, cutis laxa y takysu (Lie, *Curr. Opin. Rheumatol.* 4:47-55 (1992); Klipple y Riordan, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15:383-398 (1989); Brahn et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 90:147-151 (1999); Cid et al., *J. Clin. Invest.* 91:977-985 (1993); Hoffman et al., *Arthritis Rheum.* 34:1466-1475 (1991)). Es posible que algunas de estas enfermedades resulten de una actividad reducida o anulada de la lisil oxidasa, que conduce a la síntesis de una matriz extracelular frágil, y consecuentemente, vasos sanguíneos frágiles. Como tal, puede usarse la administración de secuencias que codifican LOX o LOXL o polipéptidos para corregir algunas de las manifestaciones de estas enfermedades.

La presente divulgación también proporciona métodos para tratar enfermedades que se caracterizan por cambios en la pared de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, la reestenosis, que es una complicación común tras la terapia de globo, la displasia fibromuscular (Begelman y Olin, *Curr. Opin. Rheumatol.* 12:41-47 (2000)) y la estenosis aórtica (Palta et al., *Circulation* 101: 2497-2502 (2000)), son todas potencialmente tratables por las composiciones y los

métodos descritos en este documento.

### **Diagnóstico**

5 Además, LOXL2 se expresa más altamente en tumores y líneas celulares metastásicas que en tumores y líneas celulares no metastásicas. Esto sugiere que los niveles de expresión de LOXL2 pueden usarse como herramienta diagnóstica para determinar la malignidad de células cancerosas, así como para determinar e implementar pautas de tratamiento adecuadas. LOXL2 y LOXL3 también se expresan más altamente en PAP, y así pueden usarse los niveles de LOXL2, de LOXL3, o de ambas, como herramienta diagnóstica para determinar PAP e implementar pautas de tratamiento adecuadas. Pueden usarse agentes de detección, tales como un anticuerpo, una molécula pequeña, molécula antisentido, ribozima, ADNzima, oligonucleótidos formadores de hélice triple, ARNic, o ARNph, para evaluar el nivel o la actividad de LOXL2, LOXL3, o ambas, en sujetos.

15 El cáncer de colon es una enfermedad altamente tratable y a menudo curable cuando está localizada en el intestino. Sin embargo, en muchos casos, debido a diagnósticos erróneos, una hiperplasia de colon premaligna progresa a un adenoma de colon, que se desarrolla adicionalmente en formas más malignas de adenocarcinoma de colon de grado bajo y de grado alto. Una vez un individuo se diagnostica con cáncer de colon, la malignidad del tumor necesita ser evaluada con el fin de seleccionar pautas de tratamiento adecuadas. La práctica actual para evaluar la malignidad de un tumor de colon se basa en el sistema de estadificación de tumor-nódulo-metástasis (TNM) desarrollado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC). Según este método, la estadificación se basa en la puntuación de la presencia o ausencia de células cancerosas en el propio tumor, en la submucosa de la pared intestinal, en la capa muscular de la pared intestinal (muscularis propia), y/o en los tejidos subserosos, pericólicos o perirrectales, así como en los ganglios linfáticos regionales y metástasis distantes. Así, la estadificación de tumores de colon implica múltiples biopsias de tejido y complejas evaluaciones patológicas que requieren mucho tiempo y pueden producir un diagnóstico erróneo.

25 La expresión de LOXL2 en células de tejido epitelial y/o conjuntivo en un tejido de colon es indicativa de un cáncer de colon maligno, y, así, proporciona un nuevo método para evaluar la malignidad de tumores de cáncer de colon, desprovisto de las limitaciones anteriores.

30 La expresión de LOXL2 está correlacionada con la formación de tumores de colon benignos, y está aumentada en formas más malignas de tumores de cáncer de colon, sugiriendo así el uso de LOXL2 en la determinación del estadio de los tumores de cáncer de colon.

35 Así, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para evaluar una malignidad de un tumor de colon. El método se efectúa determinando un nivel tisular y/o un nivel de actividad de un polipéptido homólogo al menos el 75 % al polipéptido establecido en SEQ ID NO: 2 o 9, en el tejido del tumor de colon, evaluando así la malignidad del tumor de colon.

40 Como se usa en este documento, la expresión "evaluar una malignidad de un tumor de colon" se refiere a determinar el estadio del tumor de colon, es decir, el progreso del tumor de colon a partir de un tumor de colon benigno hacia un cáncer de colon altamente maligno que invade el tejido circundante.

45 El polipéptido detectado por la presente divulgación puede ser homólogo al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, a SEQ ID NO: 2 o 9, como se determina usando el software BestFit del paquete de análisis de secuencias Wisconsin, utilizando el algoritmo de Smith y Waterman, donde la penalización por la creación de huecos es igual a 8 y la penalización por la extensión de huecos es igual a 2.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido es LOXL2 (SEQ ID NO: 2), un miembro de la familia de la lisil oxidasa, que se han descrito completamente en este documento.

55 Según los métodos descritos en este documento, se obtiene un tejido de tumor de colon usando una biopsia de colon y/o una cirugía de colon usando métodos conocidos en la técnica. Una vez obtenido, se determina el nivel tisular y/o el nivel de actividad del polipéptido de la presente divulgación en el tejido de tumor de colon.

60 Similarmente, para el diagnóstico de PAP, puede obtenerse una muestra de tejido pulmonar mediante una biopsia pulmonar y otros métodos conocidos en la técnica. El polipéptido detectado por la presente divulgación puede tener ser homólogo al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % a SEQ ID NO: 2 o 9, como se determina usando el software BestFit del paquete de análisis de secuencias Wisconsin, utilizando el algoritmo de Smith y Waterman, donde la penalización por la creación de huecos es igual a 8 y la penalización por la extensión de huecos es igual a 2. El polipéptido de la presente divulgación puede ser LOXL2 (SEQ ID NO: 2) o LOXL3 (SEQ ID NO. 9), miembros de la familia de las lisil oxidasas, que se describen completamente en este documento. La expresión del ARNm también puede detectarse y usarse para el diagnóstico. Adicionalmente, también pueden detectarse tanto LOXL2 como LOXL3, bien usando el mismo agente de detección (por ejemplo, un anticuerpo que detecta ambas proteínas), o bien agentes de detección diferentes (por ejemplo, un anticuerpo que es específico para LOXL2 y otro anticuerpo específico para LOXL3; o diferentes sondas Northern).

La determinación del nivel tisular de los polipéptidos descritos en este documento puede realizarse directamente usando métodos inmunológicos.

5 Los métodos de detección inmunológica en el contexto de la presente divulgación se explican completamente, por ejemplo, en Lane (Ed.), *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999), y aquellos familiarizados con la técnica serán capaces de implementar las diversas técnicas resumidas a continuación como parte de la presente invención. Todas las técnicas inmunológicas requieren anticuerpos  
10 inmunológicos adecuados para su uso como parte de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), transferencia Western, análisis inmunohistoquímico.

**Radioinmunoensayo (RIA):** En una versión, este método implica la precipitación del sustrato deseado, por ejemplo, LOXL2, con un anticuerpo específico, y una proteína de unión al anticuerpo radiomarcada (por ejemplo, proteína A  
15 marcada con  $I^{125}$ ) inmovilizada sobre un vehículo precipitable, tal como perlas de agarosa. El número de recuento en el sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de sustrato.

En una versión alternativa del RIA, se emplean un sustrato marcado y una proteína de unión al anticuerpo no  
20 marcada. Se añade una muestra que contiene una cantidad desconocida de sustrato en cantidades variables. La disminución en los recuentos de precipitado del sustrato marcado es proporcional a la cantidad de sustrato en la muestra añadida.

**Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA):** Este método implica la fijación de una muestra (por ejemplo, células fijadas o una disolución proteinácea) que contiene un sustrato de proteína (por ejemplo, LOXL2) a una  
25 superficie, tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Se aplica un anticuerpo específico de sustrato acoplado a una enzima y se deja unir al sustrato. Entonces, la presencia del anticuerpo se detecta y se cuantifica mediante una reacción colorimétrica que emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas empleadas habitualmente en este método incluyen peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Si está bien calibrado y  
30 dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producida. Generalmente se emplea un sustrato estándar para mejorar la precisión cuantitativa.

**Análisis por transferencia Western:** Este método implica la separación de un sustrato (por ejemplo, LOXL2) de  
35 otras proteínas mediante un gel de acrilamida, seguido de transferencia del sustrato a una membrana (por ejemplo, nailon o PVDF). La presencia del sustrato se detecta entonces mediante anticuerpos específicos para el sustrato, que a su vez son detectados por los reactivos de unión al anticuerpo. Los reactivos de unión al anticuerpo pueden ser, por ejemplo, proteína A u otros anticuerpos. Los reactivos de unión al anticuerpo pueden estar radiomarcados o unidos a enzimas, como se describió anteriormente. La detección puede ser mediante una autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de sustrato como la  
40 determinación de su identidad por una posición relativa en la membrana, que es indicativa de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

**Análisis inmunohistoquímico:** Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en tejido fijado mediante  
45 anticuerpos específicos de sustrato. Los anticuerpos específicos de sustrato pueden estar unidos a una enzima o unidos a fluoróforos, y detectarse mediante microscopía y evaluación subjetiva. Si se emplean anticuerpos unidos a una enzima, puede emplearse una reacción colorimétrica.

Dado que los niveles tisulares de un polipéptido pueden inferirse a partir de los niveles del ARNm que codifica tal  
50 polipéptido, el método según este aspecto de la presente divulgación también puede emplear diversos enfoques de detección de polinucleótidos para determinar el nivel tisular del polipéptido de la presente divulgación.

Las moléculas de ARN pueden detectarse usando métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, análisis de RT-PCR, tinción de la hibridación *in situ* de ARN y tinción de RT-PCR  
55 *in situ*.

**Análisis de transferencia Northern:** Este método implica la detección de un ARN particular (por ejemplo, la  
60 molécula de ARN que codifica LOXL2) en una mezcla de ARN. Se desnaturaliza una muestra de ARN mediante el tratamiento con un agente (por ejemplo, formaldehído) que impide los puentes de hidrógeno entre pares de bases, asegurando que todas las moléculas de ARN tengan una conformación lineal no plegada. Entonces, las moléculas de ARN individuales se separan según su tamaño mediante una electroforesis en gel y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o basada en nailon, a la que se adhieren los ARN desnaturalizados. Entonces, la membrana se expone a sondas de ADN marcadas. Las sondas pueden marcarse usando radioisótopos o nucleótidos unidos a enzimas. La detección puede ser usando autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia, como se describió anteriormente. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad  
65 de moléculas de ARN particular como la determinación de su identidad por una posición relativa sobre la membrana, que es indicativa de una distancia de migración en el gel durante la electroforesis.

**Análisis de RT-PCR:** Este método usa la amplificación por PCR de moléculas de ARN relativamente raras. En primer lugar, las moléculas de ARN de un tejido en particular (por ejemplo, un tejido de tumor de colon) se purifican y se convierten en ADN complementario (ADNc) usando una enzima transcriptasa inversa (tal como una MMLV-RT) y cebadores tales como oligo dT, hexámeros aleatorios o cebadores específicos de genes, todos los cuales están disponibles de Invitrogen Life Technologies, Frederick, MD, EE.UU. Entonces, mediante la aplicación de los cebadores específicos de genes y polimerasa Taq de ADN, se realiza una amplificación por PCR en una máquina de PCR. Aquellos expertos en la técnica son capaces de seleccionar la longitud y la secuencia de los cebadores específicos de genes, y las condiciones de PCR (es decir, temperaturas de hibridación, número de ciclos y similares), que son adecuados para detectar moléculas de ARN específicas.

**Tinción de la hibridación *in situ* de ARN:** En este método se unen sondas de ADN o de ARN a las moléculas de ARN presentes en el tejido. Generalmente, se fija una muestra de tejido (por ejemplo, un tejido de colon) para preservar su estructura y para prevenir que el ARN se degrade, y después se secciona mediante microscopía y se coloca sobre un portaobjetos. Alternativamente, pueden seccionarse en primer lugar muestras de tejido congelado y ponerse en un portaobjetos, y después someterse a fijación previa a la hibridación. Las condiciones de hibridación incluyen reactivos tales como formamida y sales (por ejemplo, cloruro sódico y citrato sódico) que permiten la hibridación específica de las sondas de ADN o de ARN con sus moléculas de ARNm diana *in situ*, mientras que evitan la unión no específica de la sonda. Aquellos expertos en la materia son capaces de ajustar las condiciones de hibridación (es decir, temperatura, concentración de sales y formamida, y similares) a las sondas específicas y los tipos de células. Tras la hibridación, se elimina por lavado cualquier sonda no unida y el portaobjetos se somete bien a una emulsión fotográfica que revela las señales generadas usando sondas radiomarcadas, o bien a una reacción colorimétrica que revela las señales generadas usando sondas marcadas unidas a enzimas, como se describió anteriormente.

**Tinción de la RT-PCR *in situ*:** Este método se describe en Nuovo et al., Am. J. Surg. Pathol. 17: 683-690 (1993) y Komminoth et al., Pathol. Res. Pract. 190:1017-1025 (1994). En resumen, la reacción de RT-PCR se realiza sobre secciones de tejido fijadas incorporando nucleótidos marcados a la reacción PCR. La reacción se lleva a cabo usando un aparato de RT-PCR específico *in situ* tal como el sistema de microdissección por captura de láser PixCell I LCM disponible en Arcturus Engineering (Mountainview, CA).

La determinación de un nivel de actividad del polipéptido de la presente divulgación (por ejemplo, LOXL2) en un tejido de tumor de colon puede efectuarse usando sustratos adecuados en una tinción citoquímica y/o ensayos de actividad *in vitro*.

**Tinción citoquímica:** Según este método se aplica un sustrato cromogénico sobre el tejido del tumor de colon que contiene una enzima activa (por ejemplo, LOXL2). La enzima cataliza una reacción en la que el sustrato se descompone para producir un producto cromogénico visible mediante un microscopio óptico o fluorescente.

**Ensayos de actividad *in vitro*:** En estos métodos se mide la actividad de una enzima particular en una mezcla de proteína extraída del tejido de interés (por ejemplo, un tejido tumoral de colon). La actividad puede medirse en un espectrofotómetro, bien usando métodos colorimétricos (véase, por ejemplo, Wande et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997, 94: 12817-12822 (1997)) o bien puede medirse en un gel de acrilamida no desnaturizante (es decir, gel de actividad). Tras la electroforesis, el gel se empapa en una disolución que contiene un sustrato y reactivos colorimétricos. La banda teñida resultante se corresponde con la actividad enzimática del polipéptido de interés (por ejemplo, LOXL2). Si está bien calibrado y dentro de un intervalo de respuesta lineal, la cantidad de enzima presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producida. Generalmente se emplea un patrón de enzima para mejorar la precisión cuantitativa.

Una vez que se ha determinado el nivel tisular y/o el nivel de actividad del polipéptido (o ARNm) de la presente divulgación (por ejemplo, LOXL2) en el tejido de tumor de colon, se evalúa la malignidad del tumor comparando el nivel de expresión y/o la actividad en el tejido de tumor de colon con la de un tejido de colon normal.

Se apreciará que el tejido de colon normal puede obtenerse de una biopsia y/o una cirugía de un tejido de colon obtenido de un individuo sano. Alternativamente, el tejido de colon normal puede obtenerse a partir de un segmento no afectado del colon del mismo individuo. Los métodos para determinar el estado de un tejido de colon normal son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen por ejemplo, una evaluación morfológica de las secciones de tejido.

Una vez determinada la malignidad del cáncer de colon como se ha descrito anteriormente, también puede utilizarse el nivel tisular y/o el nivel de actividad del polipéptido (o ARNm del mismo) de la presente divulgación para estadificar el tumor de colon y para así predecir el pronóstico de un individuo diagnosticado con cáncer de colon.

Tal estadificación puede efectuarse evaluando el nivel tisular y/o el nivel de actividad del polipéptido y correlacionándolos con los resultados obtenidos del tejido del cáncer de colon en diversos estadios (obtenibles a través de la evaluación patológica de tumores de colon). Se apreciará que tal estadificación precisa y rápida

permitirá un pronóstico preciso y rápido de un individuo afectado con cáncer de colon y la administración oportuna de una pauta de tratamiento adecuada.

Objetos y ventajas adicionales, y características novedosas de la presente divulgación serán apreciables por el experto en la técnica. Se aprecia que ciertas características de la divulgación que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, las diversas características de la divulgación que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente divulgación como se describieron anteriormente y como se reivindican en las sección de reivindicaciones, a continuación, encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

Generalmente, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989); Ausubel (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Volúmenes I-III John Wiley and Sons, Baltimore, Mariland (1994); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., *Recombinant DNA*, Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (Eds.), *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías según se establece en las patentes de EE.UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; Cellis (Ed.), *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Volúmenes I-III, (1994); Coligan (Ed.), *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes I-III (1994); Stites et al. (Eds.), *Basic and Clinical Immunology* (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (Eds.), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; Gait (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis*, (1984); Hames y Higgins (Eds.), *Nucleic Acid Hybridization*, (1985); Hames y Higgins (Eds.), *Transcription and Translation*, (1984); Freshney (Ed.), *Animal Cell Culture*, (1986); *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press (1986); y *Methods in Enzymology*, Vol. 1-317, Academic Press; *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., *Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*, CSHL Press (1996).

## EJEMPLO 1

### *El ARNph contra LOXL2 inhibe la invasividad de las células tumorales*

#### **Materiales y métodos**

Los presentes inventores compraron plásmidos de expresión lentivirales que contienen varias secuencias de ADN candidatas que codifican especies de ARNph candidatas dirigidas contra LOXL2, y un ADN que codifica un gen que confiere resistencia al agente selectivo puromicina de Sigma (St. Louis, MI) (**FIG. 1**). Los lentivirus que contienen estos ADNc candidatos se produjeron en la línea celular de empaquetamiento HEK293-T mediante la transfección de los plásmidos en las células junto con el vector de empaquetamiento pCMVdR8.91, y un plásmido que codifica la envoltura de recubrimiento del virus de la estomatitis vesicular pMD2-VSVG (5 µg). Se recogieron lentivirus de replicación recombinante defectuosa del medio condicionado de las células de empaquetamiento y se usaron para infectar células tumorales diana. El ensayo de invasión tumoral se ilustra en el **FIG. 2**. Las células tumorales se siembran entre dos capas de colágeno en una monocapa, que representa la masa tumoral. Las células invaden con el tiempo las capas adyacentes de colágeno. Se cuenta automáticamente el número de células invasoras a diversas profundidades en campos microscópicos usando el software de análisis morfométrico Image-Pro.

#### **Resultados**

Se cribaron los diferentes lentivirus que llevan las diferentes especies de ADN candidatas que codifican los diferentes ARNph para su capacidad de inhibir la expresión de LOXL2. Ninguna de estas especies de ADNc tiene ninguna homología con las secuencias de los otros miembros de la familia de genes de las lisil oxidasas. Se encontró que dos de estas especies de ADNc codifican especies de ARNph que inhiben la expresión de LOXL2 a nivel del ARNm y de la proteína. La secuencia de ADN que codifica el primer ARNph es GAAGGAGACATCCAGAAGAAT (sh.LOXL2.197 o si-197; SEQ ID NO: 20) y la segunda tiene la secuencia CGATTACTCCAACAACATCAT (sh.LOXL2.195, o si-195; SEQ ID NO: 21). De estas dos, se cree que si-195 es un inhibidor ligeramente más potente (**FIG. 3A**).

El fenotipo invasivo/metastásico está asociado en muchos casos con una transición de una morfología epitelial a una mesenquimatosas (EMT). La expresión de las especies de ARNph en las líneas celulares tumorales derivadas de

seres humanos indujo un cambio drástico en la morfología de una morfología mesenquimatosa a una epitelial (**FIG. 4**).

Con el fin de evaluar los efectos de las especies de ARNph sobre la invasividad de las células, se sembraron células tumorales infectadas con lentivirus de control o células tumorales infectadas con el lentivirus que codifica el ARNph de si-195, entre dos capas de colágeno, y se evaluó su capacidad de invadir el colágeno por encima y por debajo de la monocapa de células. Puede observarse que la expresión del ARNph de si-195 inhibió sustancialmente la invasividad de las células en las capas de colágeno por encima y por debajo de la monocapa de células original (**FIG. 5**).

## EJEMPLO 2

### *LOXL2 está expresada en exceso en la proteinosis alveolar primaria*

La proteinosis alveolar primaria (PAP) está caracterizada por una hipersecreción del tensioactivo pulmonar, y es una afección problemática de etiología desconocida, que presenta dificultades tanto para el diagnóstico como para un tratamiento eficaz.

Se evaluó la expresión de LOXL2 y LOXL3 en pulmones de pacientes normales y con PAP. La **FIG. 6** muestra la expresión en exceso de LOXL2 en células endoteliales pulmonares en PAP, mientras que LOXL3 se expresa en el músculo liso.

## EJEMPLO 3

### *El ARNph de LOXL2 promueve la MET en células malignas humanas*

Se indujo una MET por LOXL2 en tres tipos de células malignas humanas, células 10HT1080, MDA-MB-231 o Yu/PAC2. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células en placas de 35 mm. Las células se infectaron con lentivirus que dirigen la expresión del ARNph de LOXL2, ARNph.LoX12.195 o ARNph de control (**FIG. 7**) según el protocolo del vendedor (Sigma). La tinción de las células con faloidina se realizó fijando células en paraformaldehído al 4 %. Entonces, las células se permeabilizaron con saponina al 0,05 % antes de teñirlas con rodamina-faloidina (Molecular Probes, Eugene, OR) (**FIG. 7**). Las células tratadas con ARNph.LoX12.195 parecían estar en estados de transición mesenquimatosa-epitelial (MET).

### Transfecciones con fosfato cálcico

Se realizaron transfecciones con fosfato cálcico para la producción de retrovirus. Generalmente, las placas se recubrieron previamente con gelatina esterilizada al 0,2 % para asegurar una mejor adherencia de las células durante todas las fases del protocolo. Para una placa de 100 mm se sembraron  $\sim 2,5\text{-}3,0 \times 10^6$  células para células 293, 293T y  $3,2\text{-}3,5 \times 10^6$  células para células  $\Phi$ NX-A 18-24 h antes de la transfección. Para placas de 150 mm se sembraron  $\sim 6,0 \times 10^6$  células 293, 293T o  $\Phi$ NX-A.

Las células fueron confluentes al  $\sim 60$  % en el momento de la transfección. Para placas de 100 mm, se mezclaron  $\sim 10$   $\mu$ g de ADN,  $\sim 438$   $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (dependiendo del volumen de ADN), 61  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 2 M (volumen total de la mezcla de H<sub>2</sub>O/ADN/CaCl<sub>2</sub>: 500  $\mu$ l) en un tubo de microcentrífuga. El CaCl<sub>2</sub> no se añadió hasta que los precipitados estuvieron listos para ser preparados. Para placas de 150 mm, se usaron 30  $\mu$ g de ADN,  $\sim 878$   $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (dependiendo del volumen de ADN), 122  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 2 M (volumen total de la mezcla de H<sub>2</sub>O/ADN/CaCl<sub>2</sub>: 1000  $\mu$ l).

### Producción lentiviral

Para la producción lentiviral en células 293 o 293T mediante cotransfección de ADN triple o en la cubierta de VSVg de virus de Moloney, usando placas de 100 mm, se usaron  $\sim 10$   $\mu$ g de tres ADN que consisten en 5  $\mu$ g de vector de transferencia, 3-4  $\mu$ g de vector de la proteína estructural y 1-2  $\mu$ g de vector de la envuelta pCI(VSVg). Para placas de 150 mm,  $\sim 30$   $\mu$ g de tres ADN (16  $\mu$ g de vector lenti-transfer, 12  $\mu$ g de vector estructural  $\Delta 8.2$  y 3  $\mu$ g de vector de la envuelta CI(VSVg)). Si el vector de transferencia no tiene un gen de la GFP, habitualmente se incluía un vector de expresión de la GFP como  $\sim 5$  % del ADN total, para conocer la eficacia relativa de la transfección (en el momento de la recogida de virus).

Se añadieron 500  $\mu$ l de 2 x HBS (Hepes 50 mM, KCl 10 mM, dextrosa 12 mM, NaCl 280 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 1,5 mM) a las mezclas de H<sub>2</sub>O/ADN/CaCl<sub>2</sub> (placas de 100 mm) o 1000  $\mu$ l (para placas de 150 mm) con burbujeo constante de las últimas mezclas en o bien tubos de microcentrífuga (si los precipitados son de 0,5 ml o menos) o tubos de polipropileno de 14 ml (si los precipitados son de 1-3 ml cada uno) o bien en tubos de polipropileno de 15 ml. Entonces se añadieron las mezclas de CaCl<sub>2</sub> al H<sub>2</sub>O/ADN pero no más de cuatro tubos a la vez. Entonces los precipitados se dejaron a temperatura ambiente durante 0-10 min.

Las células estaban en 9 ml de medio (placas de 100 mm) o en 18 ml de medio (placas de 150 mm). El exceso de

medio se eliminó dejando los volúmenes apropiados en cada tamaño de placa. Se añadió cloroquina a cada placa hasta una concentración final de 25  $\mu\text{M}$ .

5 Los precipitados de 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}/\text{ADN}/\text{CaCl}_2/2 \times \text{HBS}$  se añadieron suavemente a las células. El examen microscópico debería revelar partículas negras muy finas.

10 Las placas se colocaron en una estufa de incubación a 37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ . Para asegurar que los precipitados estaban distribuidos uniformemente, las placas se giraron suavemente a mano ~ dos veces durante los primeros 20-30 min de incubación.

15 5-8 h después de la transfección, los medios se cambiaron por 10 ml de GM reciente (DMEM, 1 % de Pen/Estrep, 1 % de glutamina, 10 % de FBS) para las placas 100 mm y 22 ml para las placas de 150 mm. Las células 293 son más sensibles a la cloroquina que las células  $\Phi\text{NX}$ , por lo que el medio se cambió no más de 5-7 h después de la transfección.

20 24 h después de la transfección, el GM se cambió por 6,5-7 ml para recoger los virus (placas de 100 mm) o 16-17 ml (placas de 150 mm). 6 horas antes de recoger las placas se llevaron a una estufa de incubación a 32 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ . Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 RPM durante 5 minutos para eliminar cualquier residuo celular, o se filtraron a través de un filtro de 0,45 micrómetros.

#### Infecciones retrovirales de Moloney y Lenti (protocolo de inoculación por rotación)

25 Para reforzar la infección viral, células adherentes y en suspensión en soportes de placas de cultivo tisular pueden ser infectadas por rotación a 2000-2400 RPM durante 45-60 minutos a 30-32 °C. Las células se infectaron a una alta MOI con virus no diluido virus en placas de 12, 24 o 6 pocillos (usando generalmente no más de 50-100  $\times 10^3$  células por pocillo de una placa de 6 pocillos) en presencia de 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de polibrina. Las células se infectaron con 0,5-1,0 ml de sobrenadante viral por pocillo de una placa de 24 pocillos, 1 ml por pocillo de una de 12 pocillos y 2,0 ml/pocillo de una de 6 pocillos. Los sobrenadantes virales del congelador a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y después se añadieron a las células junto con la polibrina. Para las células en suspensión se resuspendieron directamente un número contado de células en el sobrenadante viral sin diluir. La placa se cerró herméticamente con parafilm en todo su contorno para evitar la evaporación y cambios en el pH del medio durante la inoculación por rotación. Después de la primera inoculación por rotación se retira el parafilm de las placas y los sobrenadantes virales se sustituyen por una alícuota reciente de virus y polibrina (el virus descongelado puede mantenerse a temperatura ambiente durante los primeros 45 minutos de rotación) para una segunda rotación equivalente o incluso una tercera rotación (dependiendo de la tolerancia de las células a la centrifugación). Para la mayoría de las células, las células normalmente se rotaron dos veces (45 min cada rotación). Para las células en suspensión se añadió un volumen igual adicional de sobrenadante viral reciente a cada pocillo para una segunda rotación. El parafilm se retiró de las placas y sin extraer el sobrenadante viral, y se continuó con la incubación a 32 °C en una estufa de incubación de  $\text{CO}_2$  durante hasta un total de 4-6 h desde el momento de la primera inoculación por rotación (si se han realizado tres rotaciones de 45 min cada una, la incubación con la última alícuota de virus se realiza durante otras 2-3 h a 32 °C). Se cambió el medio de crecimiento regular y las células se incubaron a 37 °C durante 2 días antes de examinar las células para la fluorescencia de la GFP. Las selecciones farmacológicas comenzaron 48 h después de la infección. Si las células crecían en exceso antes de alcanzar las 48 h, se dividieron en más pocillos con medio de crecimiento regular.

#### **EJEMPLO 4**

##### ***El ARNph de LOXL2 disminuye el desarrollo tumoral primario***

50 Se infectaron cinco millones de células MDA-MB-231 con ARNph de control que codifica lentivirus o el vector lentiviral que expresa el ARNph dirigido a 195 LOXL2, ARNph.Lox12.195 (si-LOXL2). Las células infectadas se seleccionaron antes de la inyección con puromicina (2 microgramos/ml). Dos días antes de la inyección se determinó la expresión de LOXL2 en células de control frente a infectadas con ARNmc.Lox12.195, y la inhibición fue de aproximadamente el 65 % basada en densitometría de transferencia Western (lectura directa de la fluorescencia de la transferencia). La velocidad de proliferación de las células de control frente a las infectadas por ARNph.Lox12.195 *in vitro* fue similar. Las células infectadas se inyectaron en los panículos adiposos mamarios de ratones hembra balb/c nu/nu. El volumen tumoral se midió 6, 11, 14, 18, 22, 25 y 27 días después de la inyección. (**FIG. 8A**) El desarrollo del tumor disminuyó en los ratones inyectados con MDA-231 si-control en comparación con los ratones inyectados con las células MDA- 231 si-Lox12. (**FIGS. 8A, B**)

#### **EJEMPLO 5**

##### ***Genes en células MCF7 afectados por la expresión en exceso o la inhibición de LOXL2***

65 Se transfectaron células MCF7 con vector de expresión para expresar en exceso LOXL2 (clones 12 y 14), se infectaron con vector lentiviral de control que contenía un ARNph no relacionado (WT), o se infectaron con un

mutante de LOXL2 que era enzimáticamente inactivo debido a una mutación en su motivo LTQ (Y689F). La expresión génica se midió mediante RT-PCR y transferencia Western. La RT-PCR se realizó usando protocolos estándar. Se identificó un aumento en la expresión en varios genes cuando la LOXL2 se expresó en exceso (**FIG. 9A**).

Las células se infectaron con vector lentiviral 195 de ARNph. Las células se seleccionaron con puromicina y la expresión de LOXL2 se monitorizó mediante transferencia Western. Se aisló el ARN y se realizó RT-PCR. Las condiciones de la PCR usando cebadores específicos para LOXL2 fueron de 30 ciclos de 55, 72, 95 °C, de 1 min cada uno (**FIG. 9B**).

## EJEMPLO 6

### *La expresión de LOXL2 es aumentada por la hipoxia*

Las células se incubaron en una cámara de hipoxia a 37 °C al 1,5 % de O<sub>2</sub> durante 24 h. Se incubó un control en condiciones normóxicas (estufa de incubación normal). El ARN se preparó a partir de las células A549 y se amplificó mediante RT-PCR (30 ciclos de 55, 72, 95 °C, de 1 min cada uno). La expresión de LOXL2 está aumentada en condiciones hipóxicas (**FIG. 10A**).

Se evaluaron los niveles de LOXL2 mediante transferencia Western. Las células se estimularon durante los tiempos indicados con la concentración de CoCl<sub>2</sub> indicada (**FIG. 10B**). Se prepararon concentraciones iguales de lisado celular con tampón de lisis que contenía 0,1 % de DOC y un 1 % de NP40 con inhibidores de la proteasa, y tampón Hepes 10 mM, pH-7,2. Los lisados celulares se separaron con un gradiente del 8 %-10 % en gel de SDS/PAGE, se transfirieron y se sondaron con anticuerpos anti-LOXL2. Las membranas se rasparon y se volvieron a sondear con un anticuerpo dirigido contra actina β para verificar carga igual.

## EJEMPLO 7

### *Las células endoteliales derivadas de vena umbilical humana contienen receptor de LOXL2 unido a la superficie celular*

Se ensayaron cuatro líneas celulares diferentes, HUVEC, LE2, HMEC y Balb, para comprobar su unión específica a LOXL2 mediante una medición que usaba LOXL2 yodada. Se yodó LOXL2 y se añadió a cada pocillo a una concentración final de 0,35 µg/ml. La competición se hizo con LOXL2 no marcada (3,5 µg/ml) (**FIG. 11A**).

Las células se recubrieron con gelatina, laminina o fibronectina para probar su capacidad de unión a LOXL2. LOXL2 se yodó y se añadió a cada pocillo a una concentración final de 0,35 µg/ml. La competición se hizo con LOXL2 no marcada (3,5 µg/ml). No se determinó unión específica (**FIG. 11B**), indicando que la unión observada en la **FIG. 11A** no estaba causada por la unión a estos componentes de la ECM.

Las mismas condiciones de unión a las descritas anteriormente en la **FIG.11A** pero en ausencia o con adición de 100 µg/ml de heparina o después de una digestión previa con heparinasa. Ni la ausencia ni la adición de heparina de la unión afecta la unión a LOXL2. (**FIG. 11C**).

## EJEMPLO 8

### *LOXL2 y LOXL3 se expresan en células neuronales*

Se examinaron secciones de 5 µm incorporadas en parafina fijadas en formalina de corteza cerebral normal mediante hibridación *in situ*. (**FIG. 12**)

### Preparación de sondas de ARN marcadas con DIG

Se prepararon sondas de ARN marcadas con digoxigenina (DIG-11-UTP) en tanto orientación sentido como antisentido. Las sondas se sintetizaron mediante una prueba de transcripción *in vitro* usando polimerasa T7 de ARN y el kit de marcado de ARN Dig/Genius (Roche Boehringer-Mannheim). Las sondas se generaron mediante una reacción de PCR a partir del ADNc de LOX, LOXL1, LOXL2 y LOXL3 humanas correspondientes a los nucleótidos (partiendo del primer ATG) 164-560 para LOX, 668-1093 para LOXL1, 403-1102 para LOXL2 y 479-1913 para LOXL3. Los cebadores fueron específicos para cada sonda, y portaban enzimas de restricción para la clonación en el vector pBluescript (KS, SK). Los cebadores fueron:

hLOX: 5' (EcoRI) CGCCGGAATTCGCTCACAGTACCAGCCTCAG (SEQ ID NO: 27)  
 3' (PstI) CCAAACACTGCAGGTAGTAGTTGTAATAAGGGT (SEQ ID NO: 28)  
 hLOXL1: 5' (EcoRI) CGCCGGAATTCGGTTCATCTACCCCTACCAGC (SEQ ID NO: 29)  
 3' (XbaI) CTAGTCTAGAACATAGTTGGGGTCTGGGAC (SEQ ID NO: 30)  
 hLOXL2: LOXL2/pCADN3,1 higo se digirió con EcoRA-NotI y se clonó el fragmento

hLOXL3: LOXL3/pCADN3,1 higo se digirió con Xho-BglII y se clonó el fragmento.

Los fragmentos se clonaron en pBluescript en orientación "KS" o "SK" con el fin de generar sondas "sentido" o "antisentido".

5 La mezcla de reacción para el marcado del problema contuvo: 1 µg de ADN (LOXL2, LOX, LOXL1 o LOXL3 en pBluescript), 10X tampón de reacción (kit de polimerasa T7 de ARN de Boehringer-Mannheim), DTT 100 mM (Sigma), 10X de dNTPs marcados con Dig (Boehringer-Mannheim, N° de Cat. 1175025), inhibidor de la RNAsa (Promega, 15 unidades por reacción), 10X de polimerasa T7 de ARN y agua tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo) para completar un volumen de 20 ul. La reacción fue durante 2 horas a 37 °C.

15 La reacción se detuvo mediante la adición de 0,8 ul de EDTA. La sonda de ARN marcada con Dig se precipitó entonces mediante la adición de 1 µl de 20 mg/ml de glucógeno, 2 µl de LiCl 4 M y 55 µl de etanol frío. La disolución se mezcló bien y se incubó durante una noche a -70 °C. La sonda se sedimentó mediante centrifugación durante 15 minutos a 4 °C a 13000 g. El precipitado se lavó etanol frío al 70 % y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 4 °C a 13000 g. El sedimento se secó y se resuspendió en 100 ul de DDW (agua destilada desionizada) tratada con DEPC. Se separaron cuatro µl de sonda en gel de agarosa TAE al 1 % regulado con bromuro de etidio al 0,005 % para determinar la formación de la sonda de ARN. La concentración final de la sonda para hibridación fue 1 ug/ml.

#### 20 Pretratamiento de portaobjetos

Se desparafinaron secciones de tejido de 5 um incorporadas en parafina fijadas en formalina mediante tres lavados de 5-10 min cada uno con xileno al 100 %. Las secciones se rehidrataron mediante una serie de lavados con etanol al 100 %, 95 %, 70 % y 30 % (5 min de incubación en cada disolución) a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron entonces dos veces con agua tratada con DEPC durante 2 min y luego se trataron con HCl 0,2 M durante 10 min para desnaturalizar las proteínas. Entonces las secciones se lavaron dos veces con PBS y se lavaron dos veces con agua y posteriormente se digirieron con proteinasa-K (20 ug/ml en TE, 10 min a temperatura ambiente). La reacción se detuvo mediante dos lavados con agua tratada con DEPC. Los portaobjetos se lavaron entonces dos veces con PBS durante 2 min.

#### 30 Hibridación

35 La prehibridación se realizó mediante la incubación de portaobjetos durante 2 horas a 45 °C con disolución de hibridación precalentada (a 70 °C) (véase a continuación). La sonda se diluyó en la disolución de hibridación precalentada hasta una concentración final de 1 µg/ml y se desnaturalizó mediante incubación a 80 °C durante 5 min y se enfrió durante 3 min en hielo antes de la adición a los portaobjetos. Los portaobjetos se secaron, y las sondas se añadieron a los portaobjetos. Las secciones se cubrieron con parafilm y se incubaron en una cámara humidificada durante una noche a 45 °C.

#### 40 Lavados después de la hibridación e incubación con anticuerpo anti-DIG

45 Los portaobjetos se lavaron brevemente con 2 x SSPE a temperatura ambiente durante 5 min y luego se incubaron con 0,2 x SSPE a 50-55 °C durante 1 hora. Entonces los portaobjetos se lavaron mediante incubación adicional con 0,2 x SSPE a 50-55 °C durante 1 hora y se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Después de lavar con PBS durante 5 min a temperatura ambiente, los portaobjetos se incubaron con Tampón 2 (véase a continuación) durante 45 min a temperatura ambiente con agitación suave. Los portaobjetos se lavaron con disolución de lavado de BSA durante 45 min a temperatura ambiente con agitación suave.

50 El anticuerpo anti-DIG se diluyó hasta una concentración final de 1:1000-1:1500 en Tampón 2 y se añadió a los portaobjetos (~ 150 ul/portaobjeto). Los portaobjetos se recubrieron con parafilm y se incubaron en una cámara humidificada durante una noche a 4 °C.

55 Entonces, los portaobjetos se lavaron tres veces con disolución de lavado de BSA, durante 5 min cada lavado. Entonces, los portaobjetos se lavaron con Tampón 2 durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave.

#### Detección de anticuerpos anti-DIG unidos

60 Los portaobjetos se incubaron en Tampón 3 (véase a continuación) durante 2 min, a temperatura ambiente sin agitación. Para la detección colorimétrica se diluyeron 3 ul de BCIP y 4,2 ul de NBT se diluyeron en 2 ml de Tampón 3. La disolución se añadió a los portaobjetos y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante el tiempo requerido. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de detención (véase a continuación). Entonces, los portaobjetos se lavaron con DDW y se contratiñeron con hematoxilina de Mayers (1:10 en DDW durante 5-7 s). Finalmente, los portaobjetos se lavaron con DDW y se montaron con Mount Q y se cubrieron con cubreobjetos.

#### 65 Disoluciones

## ES 2 572 955 T3

Todas las disoluciones se prepararon en agua tratada con DEPC (DEPC al 0,1 % en DDW durante 18 horas y después esterilización en autoclave).

5 Disolución de prehibridación: formamida al 50 %, Tris 100 mM (pH 7,6), 150 ug/ml de ARNt, 1 mg/ml de ARN total de levadura, sulfato de dextrano al 10 %, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, reactivo de bloqueo al 1 %)

Disolución de lavado de BSA: BSA al 1 %, Tritón X-100 al 0,3 %, Tris 100 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM.

10 Tampón 1: Tris 100 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM

Tampón 2: reactivo de bloqueo diluido al 2 % en Tampón 1

Tampón 3: Tris 100 mM (pH 9,5), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM

15 Tampón de Detención: Tris 100 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM

"GVA-Mount solution" de Zymed (N.º de Cat. 00-8000) Aunque la presente divulgación se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Por consiguiente, pretende englobar todas aquellas alternativas, modificaciones y variaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Technion Research & Development Foundation Ltd.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES, FIBROSIS, Y PROTEINOSIS ALVEOLAR PULMONAR.

<130> F-20857/EP-SSP

<140> 08763709.6

<141> 2008-07-15

<150> IL 184627

<151> 2007-07-15

<150> PCT/IL2008/000985

<151> 2008-07-15

<160> 30

<170> Versión 3.5 de PatentIn

<210> 1

<211> 2325

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggagagggc	ctctgtgctc	ccacctctgc	agctgcctgg	ctatgctggc	cctcctgtcc	60
ccccctgagcc	tggcacagta	tgacagctgg	ccccattacc	ccgagtactt	ccagcaaccg	120
gctcctgagt	atcaccagcc	ccaggccccc	gccaacgtgg	ccaagattca	gctgogcctg	180
gctgggcaga	agaggaagca	cagcgagggc	cgggtggagg	tgtactatga	tggccagtgg	240
ggcacctgtg	ggatgacga	cttctccatc	caagctgccc	acgtctctctg	ccgggagctg	300
ggctatgtgg	aggccaagtc	ctggactgcc	agctcctcct	acggcaaggg	agaagggccc	360
atctggttag	acaatctcca	ctgtactggc	aaogaggcga	ccottgcagc	atgcacctcc	420
aatggctggg	gcgtcaactga	ctgcaagcac	acggaggatg	tcggtgtggt	gtgcagcgac	480
aaaaggattc	ctgggttcaa	atctgacaat	tcggtgatca	accagataga	gaacctgaat	540
atccaggtgg	aggacattcg	gattcgagcc	atcctctcaa	cctaccgcaa	gcgcacccca	600
gtgatggagg	gctacgtgga	ggtgaaggag	ggcaagacct	ggaagcagat	ctgtgacaag	660
cactggacgg	ccaagaattc	ccgcgtggtc	tcggcatgt	ttggcttccc	tggggagagg	720
acatacaata	ccaaagtgta	caaatgttt	gcctcacgga	ggaagcagcg	ctactggcca	780
ttctccatgg	actgcaccgg	cacagaggcc	cacatctcca	gctgcaagct	gggccccag	840
gtgtcaactg	accccatgaa	gaatgtcacc	tgcgagaatg	ggctacoggc	cgtggtgggt	900
tgtgtgcctg	ggcaggtctt	cagccctgac	ggaccctcaa	gattccggaa	agcgtacaag	960
ccagagcaac	ccctggtgcg	actgagaggc	ggtgcctaca	tcggggaggg	ccgcgtggag	1020
gtgctcaaaa	atggagaatg	ggggaccgtc	tgcgacgaca	agtgggacct	ggtgtcggcc	1080

ES 2 572 955 T3

5 agtgtggtct gcagagagct gggctttggg agtgccaaag aggcagtcaac tggctcccga 1140  
 ctggggcaag ggatcggacc catccacctc aacgagatcc agtgcacagg caatgagaag 1200  
 tccattatag actgcaagtt caatgccgag tctcagggct gcaaccacga ggaggatgct 1260  
 10 ggtgtgagat gcaacacccc tgccatgggc ttgcagaaga agctggcctt gaacggcggc 1320  
 cgcaatccct acgagggccg agtggaggtg ctggtggaga gaaacgggtc ccttgtgtgg 1380  
 gggatggtgt gtggccaaaa ctggggcctc gtggaggcca tgggtggtctg ccgccagctg 1440  
 15 ggcctgggat tcgccagcaa cgccttcag gagacctggt attggcacgg agatgtcaac 1500  
 agcaacaaag tggatcatgag tggagtgaag tgctcgggaa cggagctgtc cctggcgcac 1560  
 tgccgccacg acggggagga cgtggcctgc ccccaggcg gagtgcagta cggggccgga 1620  
 20 gttgctgct cagaaaccgc ccctgacctg gtctcaatg cggagatggt gcagcagacc 1680  
 acctacctgg aggaccggcc catgttcctg ctgcagtgtg ccatggagga gaactgcctc 1740  
 tcggcctcag ccgcgcagac cgaccccacc acgggctacc gccggtcctt ggccttctcc 1800  
 25 tcccagatcc acaacaatgg ccagtcggac ttccggccca agaacggccg ccacgcgtgg 1860  
 atctggcacg actgtcacag gcactaccac agcatggagg tgttcacca ctatgacctg 1920  
 30 ctgaacctca atggcacca ggtggcagag gccacaagg ccagcttctg cttggaggac 1980  
 acagaatgtg aaggagacat ccagaagaat tacgagtgtg ccaactcgg cgatcagggc 2040  
 35 atcaccatgg gctgctggga catgtaccgc catgacatcg actgccagtg ggttgacatc 2100  
 actgacgtgc ccctggaga ctacctgttc caggttgta ttaacccca cttogaggtt 2160  
 gcagaatcgg attactcaa caacatcatg aatgcagga gccgctatga cggccaccgc 2220  
 40 atctggatgt acaactgcca cataggtggt tccttcagcg aagagacgga aaaaagttt 2280  
 gagcaattca ggggctctt aaacaaccag ctgtccccgc agtaa 2325

45 <210> 2  
 <211> 774  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 2

55  
60  
65

ES 2 572 955 T3

5 Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu  
1 5 10 15

10 Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His  
20 25 30

15 Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln  
35 40 45

20 Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys  
50 55 60

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 572 955 T3

5 Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp  
65 70 75 80

Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val  
85 90 95

10 Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser  
100 105 110

15 Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys  
115 120 125

20 Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly  
130 135 140

25 Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp  
145 150 155 160

Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile  
165 170 175

30 Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile Leu  
180 185 190

35 Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu Val  
195 200 205

40 Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr Ala  
210 215 220

45 Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu Arg  
225 230 235 240

Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys Gln  
245 250 255

50 Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile  
260 265 270

55 Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn  
275 280 285

60 Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Gly Cys Val Pro Gly  
290 295 300

Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr Lys  
305 310 315 320

65

ES 2 572 955 T3

5 Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu  
325 330 335

10 Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp  
340 345 350

15 Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly  
355 360 365

20 Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly  
370 375 380

25 Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys  
385 390 395 400

30 Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His  
405 410 415

35 Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln  
420 425 430

40 Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val  
435 440 445

45 Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys  
450 455 460

50 Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu  
465 470 475 480

55 Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His  
485 490 495

60 Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser  
500 505 510

65 Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val  
515 520 525

70 Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser  
530 535 540

75 Glu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr  
545 550 555 560

80 Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu  
565 570 575

ES 2 572 955 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

580 585 590

Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln  
595 600 605

Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp  
610 615 620

Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu  
625 630 635 640

Leu Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe  
645 650 655

Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu  
660 665 670

Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met  
675 680 685

Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro  
690 695 700

Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val  
705 710 715 720

Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr  
725 730 735

Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe  
740 745 750

Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn  
755 760 765

Asn Gln Leu Ser Pro Gln  
770

<210> 3  
<211> 757  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 3

ES 2 572 955 T3

5 Met Met Trp Pro Gln Pro Pro Thr Phe Ser Leu Phe Leu Leu Leu Leu  
1 5 10 15

10 Leu Ser Gln Ala Pro Ser Ser Arg Pro Gln Ser Ser Gly Thr Lys Lys  
20 25 30

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 572 955 T3

5 Leu Arg Leu Val Gly Pro Ala Asp Arg Pro Glu Glu Gly Arg Leu Glu  
                   35                                  40  45  
 10 Val Leu His Gln Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ala  
           50  55                                  60  
 15 Leu Gln Glu Ala Thr Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Phe Glu Ser Ala  
       65                                  70                                  75                                  80  
 20 Leu Thr Trp Ala His Ser Ala Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Gly Pro Ile  
                                   85                                  90                                  95  
 25 Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Leu Gly Thr Glu Lys Thr Leu Asp Gln  
                                   100                                  105                                  110  
 30 Cys Gly Ser Asn Gly Trp Gly Ile Ser Asp Cys Arg His Ser Glu Asp  
                                   115                                  120                                  125  
 35 Val Gly Val Val Cys His Pro Arg Arg Gln His Gly Tyr His Ser Glu  
           130                                  135                                  140  
 40 Lys Val Ser Asn Ala Leu Gly Pro Gln Gly Arg Arg Leu Glu Glu Val  
       145                                  150                                  155                                  160  
 45 Arg Leu Lys Pro Ile Leu Ala Ser Ala Lys Arg His Ser Pro Val Thr  
                                   165                                  170                                  175  
 50 Glu Gly Ala Val Glu Val Arg Tyr Asp Gly His Trp Arg Gln Val Cys  
                                   180                                  185                                  190  
 55 Asp Gln Gly Trp Thr Met Asn Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Leu  
                                   195                                  200                                  205  
 60 Gly Phe Pro Ser Gln Thr Ser Val Asn Ser His Tyr Tyr Arg Lys Val  
           210                                  215                                  220  
 65 Trp Asn Leu Lys Met Lys Asp Pro Lys Ser Arg Leu Asn Ser Leu Thr  
       225                                  230                                  235                                  240  
 70 Lys Lys Asn Ser Phe Trp Ile His Arg Val Asp Cys Phe Gly Thr Glu  
                                   245                                  250                                  255  
 75 Pro His Leu Ala Lys Cys Gln Val Gln Val Ala Pro Gly Arg Gly Lys  
                                   260                                  265                                  270  
 80 Leu Arg Pro Ala Cys Pro Gly Gly Met His Ala Val Val Ser Cys Val  
           275                                  280                                  285

ES 2 572 955 T3

Ala Gly Pro His Phe Arg Arg Gln Lys Pro Lys Pro Thr Arg Lys Glu  
 290 295 300

5 Ser His Ala Glu Glu Leu Lys Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Gln Val  
 305 310 315 320

10 Gly Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Met Asn Arg Gln Trp Gly Thr Val  
 325 330 335

15 Cys Asp His Arg Trp Asn Leu Ile Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Gln  
 340 345 350

20 Leu Gly Phe Gly Ser Ala Arg Glu Ala Leu Phe Gly Ala Gln Leu Gly  
 355 360 365

25 Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Arg Gly Tyr  
 370 375 380

30 Glu Arg Thr Leu Gly Asp Cys Leu Ala Leu Glu Gly Ser Gln Asn Gly  
 385 390 395 400

35 Cys Gln His Ala Asn Asp Ala Ala Val Arg Cys Asn Ile Pro Asp Met  
 405 410 415

40 Gly Phe Gln Asn Lys Val Arg Leu Ala Gly Gly Arg Asn Ser Glu Glu  
 420 425 430

45 Gly Val Val Glu Val Gln Val Glu Val Asn Gly Gly Pro Arg Trp Gly  
 435 440 445

50 Thr Val Cys Ser Asp His Trp Gly Leu Thr Glu Ala Met Val Thr Cys  
 450 455 460

55 Arg Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Asn Phe Ala Leu Lys Asp Thr Trp  
 465 470 475 480

60 Tyr Trp Gln Gly Thr Pro Glu Ala Lys Glu Val Val Met Ser Gly Val  
 485 490 495

65 Arg Cys Ser Gly Thr Glu Met Ala Leu Gln Gln Cys Gln Arg His Gly  
 500 505 510

Pro Val His Cys Ser His Gly Pro Gly Arg Phe Ser Ala Gly Val Ala  
 515 520 525

Cys Met Asn Ser Ala Pro Asp Leu Val Met Asn Ala Gln Leu Val Gln  
 530 535 540



ES 2 572 955 T3

5           atgcgacctg tcagtgtctg gcagtgagc cctgggggc tgetgctgtg cctgctgtgc       60  
            agttcgtgct tggggtctcc gtcccctcc acgggcctg agaagaaggc cgggagccag       120

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 572 955 T3

5           gggcttcggt tccggctggc tggcttcccc aggaagccct acgagggccg cgtggagata       180  
           cagcgagctg gtgaatgggg caccatctgc gatgatgact tcacgctgca ggctgcccac       240  
           atcctctgcc gggagctggg cttcacagag gccacaggct ggaccacacag tgccaaatat       300  
 10           ggccctggaa caggccgcat ctggctggac aacttgagct gcagtgggac cgagcagagt       360  
           gtgactgaat gtgcctcccg gggctggggg aacagtgact gtaogcaoga tgaggatgct       420  
           ggggtcatct gcaaagacca gcgcctccct ggcttctcgg actccaatgt cattgaggta       480  
 15           gagcatcacc tgcaagtgga ggaggtgoga attogaccgg ccgttgggtg gggcagacga       540  
           ccctgcccgg tgacggaggg gctggtggaa gtcaggcttc ctgacggctg gtogcaagtg       600  
           tgcgacaaag gctggagcgc ccacaacagc cacgtggtct gcgggatgct gggcttcccc       660  
 20           agcgaaaaga gggtaaacgc ggccctctac aggctgctag cccaacggca gcaacactcc       720  
           tttggctctg atgggggggc gtgogtgggc acggaggccc acctctccct ctgttcctctg       780  
           gagttctatc gtgccaatga caccgccagg tgccctgggg ggggccctgc agtggtgagc       840  
 25           tgtgtgccag gccctgtcta cgcggcatcc agtggccaga agaagcaaca acagtogaag       900  
           cctcaggggg agggccgtgt ccgtctaaag ggcggcgccc accctggaga gggccgggta       960  
           gaagtctctg agggccagcac atggggcaca gtcctgtgacc gcaagtggga cctgcatgca       1020  
 30           gccagogtgg tgtgtcggga gctgggcttc gggagtgtct gagaagctct gagtggogct       1080  
           cgcatggggc agggcatggg tgctatccac ctgagtgaag ttcgctgtct tggacaggag       1140  
           ctctccctct ggaagtgcc ccacaagaac atcacagctg aggattgttc acatagccag       1200  
 35           gatgccgggg tccggtgcaa cctaccttac actggggcag agaccaggat ccgactcagt       1260  
           gggggcccga gccaacatga ggggagagtc gaggtgcaaa tagggggacc tgggcccctt       1320  
 40           cgctggggcc tcatctgtgg ggatgactgg gggaccctgg aggccatggt ggccctgtagg       1380  
           caactgggtc tgggctacgc caaccacggc ctgcaggaga cctggtactg ggactctggg       1440  
           aatataacag aggtggtgat gagtggagtg cgctgcacag ggactgagct gtcctggat       1500  
 45           cagtgtgcc atcatggcac ccacatcacc tgcaagagga cagggaaccg cttcactgct       1560  
           ggagtcatct gttctgagac tgcatcagat ctgttgctgc actcagcact ggtgcaggag       1620  
           accgcctaca tcgaagaccg gccctgcat atgttgact gtgctcgga agagaactgc       1680  
 50           ctggccagct cagcccgctc agccaactgg ccctatggtc accggcgtct gctccgatto       1740  
           tcctcccaga tccacaacct gggacgagct gacttcaggc ccaaggctgg gcgccaactcc       1800  
           tgggtgtggc acgagtcca tgggcattac cacagcatgg acatcttcac tcaactatgat       1860  
 55           atcctcacc ccaatggcac caaggtggct gagggccaca aagctagttt ctgtctcgaa       1920  
           gacactgagt gtcaggagga tgtctccaag cggtatgagt gtgccaaact tggagagcaa       1980  
 60           ggcatcactg tgggttgctg ggatctctac cggcatgaca ttgactgtca gtggattgac       2040  
           atcacggatg tgaagccagg aaactacatt ctccaggttg tcatcaacct aaactttgaa       2100

65

# ES 2 572 955 T3

5           gtagcagaga gtgactttac caacaatgca atgaaatgta actgcaata tgatggacat       2160  
            agaatctggg tgcacaactg ccacattggt gatgccttca gtgaagaggc caacaggagg       2220  
            tttgaacgct accctggcca gaccagcaac cagattatct aa                       2262

10           <210> 5  
            <211> 1725  
            <212> ADN  
            <213> Homo sapiens

15           <400> 5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 572 955 T3

5 atggctctgg cccgaggcag ccggcagctg ggggccctgg tgtggggcgc ctgcctgtgc 60  
 gtgctggtgc acgggcagca ggogcagccc gggcagggct cggaccccgc ccgctggcgg 120  
 cagctgatcc agtgggagaa caacgggcag gtgtacagct tgctcaactc gggctcagag 180  
 10 tacgtgccgg ccggacctca gcgctccgag agtagctccc ggtgctgct gcccgggcgg 240  
 ccccaggccc agcagcggcg cagccacggg agccccggc gtcggcagge gccgtccctg 300  
 cccctgccgg ggcgcgtagg ctcgacacc gtgocgggcc aggcggcgca ccattcggc 360  
 15 tttggccagg tgcccgaaa ctggcgagag gtggccgtcg gggacagcac gggcatggcc 420  
 ctggcccgca cctccgtctc ccagcaacgg cacgggggct ccgcctctc ggtctcggct 480  
 tcggccttgc ccagcaacta ccgccagcag cctcctacc cgcagcagtt ccctaccgc 540  
 20 caggcgcctt tcgtcagcca gtacgagaac tacgaccccg cgtcggggac ctacgaccag 600  
 ggtttcgtgt actaccggcc cgcggggcgc ggcgtggggc cggggggcgc gccgtggcc 660  
 25 tcggcggggg tcactaccc ctaccagccc cgggcgcgct acgaggagta cggcggcggc 720  
 gaagagctgc ccgagtacc gcctcagggc ttctaccgg ccccggagag gccctacgtg 780  
 ccgcccgcgc cgcgccccc cgcagggcctg gaccgcgct actcgcacag tctgtacagc 840  
 30 gagggcacc ccggttcga gcaggcctac cctgaccccg gtcccagagc ggcgcaggcc 900  
 catggcggag acccacgcct gggctggtac ccgcctacg ccaaccgcgc gcccgaggcg 960  
 35 tacgggcgcgc cgcgcgcgct ggagccgccc tacctgccgg tgcgcagctc cgcacgccc 1020  
 ccgcccgggtg gggagcggaa cggcgcgcag cagggcgcgc tcagcgtagg cagcgtgtac 1080  
 cggcccaacc agaacggccg cggctcctct gacttggctc cagaccccaa ctatgtgcaa 1140  
 40 gcatccactt atgtgcagag agcccactg tactcctgc gctgtgctgc ggaggagaag 1200  
 tgtctggcca gcacagccta tgcccctgag gccaccgact acgatgtgcg ggtgctactg 1260  
 45 cgcttcccc agcgcgtgaa gaaccagggc acagcagact tcctcccaa ccggccacgg 1320  
 cacacctggg agtggcacag ctgccaccag cattaccaca gcatggacga gttcagccac 1380  
 tacgacctac tggatgcagc cacaggcaag aaggtggccg agggccacaa ggcagtttc 1440  
 50 tgcttgagg acagcacctg tgacttcggc aacctcaagc gctatgcatg cacctctcat 1500  
 acccagggcc tgagcccagg ctgctatgac acctacaatg cggacatcga ctgccagtgg 1560  
 atcgacataa ccgacgtgca gcctgggaac tacatcctca aggtgcacgt gaacccaaag 1620  
 55 tatattgttt tggagtotga cttcaccaac aacgtggtga gatgcaacat tcactacaca 1680  
 ggtcgctacg tttctgcaac aaactgcaaa attgtccaat cctga 1725

60 <210> 6  
 <211> 574  
 <212> PRT

65

ES 2 572 955 T3

<213> Homo sapiens

5

<400> 6

10

Met Ala Leu Ala Arg Gly Ser Arg Gln Leu Gly Ala Leu Val Trp Gly  
1 5 10 15

15

Ala Cys Leu Cys Val Leu Val His Gly Gln Gln Ala Gln Pro Gly Gln  
20 25 30

20

Gly Ser Asp Pro Ala Arg Trp Arg Gln Leu Ile Gln Trp Glu Asn Asn  
35 40 45

25

Gly Gln Val Tyr Ser Leu Leu Asn Ser Gly Ser Glu Tyr Val Pro Ala  
50 55 60

30

Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ser Ser Ser Arg Val Leu Leu Ala Gly Ala  
65 70 75 80

35

Pro Gln Ala Gln Gln Arg Arg Ser His Gly Ser Pro Arg Arg Arg Gln  
85 90 95

40

Ala Pro Ser Leu Pro Leu Pro Gly Arg Val Gly Ser Asp Thr Val Arg  
100 105 110

45

Gly Gln Ala Arg His Pro Phe Gly Phe Gly Gln Val Pro Asp Asn Trp  
115 120 125

50

Arg Glu Val Ala Val Gly Asp Ser Thr Gly Met Ala Leu Ala Arg Thr  
130 135 140

55

Ser Val Ser Gln Gln Arg His Gly Gly Ser Ala Ser Ser Val Ser Ala  
145 150 155 160

60

Ser Ala Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Gln Gln Pro Ser Tyr Pro Gln Gln  
165 170 175

65

Phe Pro Tyr Pro Gln Ala Pro Phe Val Ser Gln Tyr Glu Asn Tyr Asp  
180 185 190

Pro Ala Ser Arg Thr Tyr Asp Gln Gly Phe Val Tyr Tyr Arg Pro Ala  
195 200 205

ES 2 572 955 T3

5 Gly Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Val Ala Ser Ala Gly Val  
210 215 220

10 Ile Tyr Pro Tyr Gln Pro Arg Ala Arg Tyr Glu Glu Tyr Gly Gly Gly  
225 230 235 240

15 Glu Glu Leu Pro Glu Tyr Pro Pro Gln Gly Phe Tyr Pro Ala Pro Glu  
245 250 255

20 Arg Pro Tyr Val Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Leu Asp Arg  
260 265 270

25 Arg Tyr Ser His Ser Leu Tyr Ser Glu Gly Thr Pro Gly Phe Glu Gln  
275 280 285

30 Ala Tyr Pro Asp Pro Gly Pro Glu Ala Ala Gln Ala His Gly Gly Asp  
290 295 300

35 Pro Arg Leu Gly Trp Tyr Pro Pro Tyr Ala Asn Pro Pro Pro Glu Ala  
305 310 315 320

40 Tyr Gly Pro Pro Arg Ala Leu Glu Pro Pro Tyr Leu Pro Val Arg Ser  
325 330 335

45 Ser Asp Thr Pro Pro Pro Gly Gly Glu Arg Asn Gly Ala Gln Gln Gly  
340 345 350

50 Arg Leu Ser Val Gly Ser Val Tyr Arg Pro Asn Gln Asn Gly Arg Gly  
355 360 365

55 Leu Pro Asp Leu Val Pro Asp Pro Asn Tyr Val Gln Ala Ser Thr Tyr  
370 375 380

60 Val Gln Arg Ala His Leu Tyr Ser Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Lys  
385 390 395 400

65 Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Pro Glu Ala Thr Asp Tyr Asp Val  
405 410 415

Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ala  
420 425 430

Asp Phe Leu Pro Asn Arg Pro Arg His Thr Trp Glu Trp His Ser Cys  
435 440 445

His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu  
450 455 460

ES 2 572 955 T3

5 Asp Ala Ala Thr Gly Lys Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe  
465 470 475 480

10 Cys Leu Glu Asp Ser Thr Cys Asp Phe Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Ala  
485 490 495

15 Cys Thr Ser His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr  
500 505 510

20 Asn Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Gln Pro  
515 520 525

25 Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val His Val Asn Pro Lys Tyr Ile Val Leu  
530 535 540

30 Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asn Ile His Tyr Thr  
545 550 555 560

Gly Arg Tyr Val Ser Ala Thr Asn Cys Lys Ile Val Gln Ser  
565 570

35 <210> 7  
<211> 1254  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 7

40

45

50

55

60

65

ES 2 572 955 T3

5	atggccttgc cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgccc gctagtgcac	60
	tgcgcccctc ccgcccgcgg ccaacagcag cccccgcggc agccgcgggc ggetccgggc	120
	gcctggcgcc agcagatcca atgggagaac aacgggcagg tgttcagctt gctgagcctg	180
10	ggetcacagt accagcctca ggcgcggcgg gaccgcgggg ccgcccgtccc tggcgcagcc	240
	aacgcctccg ccagcagccc ccgcaactcc atcctgctga tccgcgacaa ccgcaaccgc	300
	gcggcgcgaa cggggacggc cggctcatct ggagtcaccc ctggcccgcc caggcccacc	360
15	gcccgtcaet ggttccaagc tggctactcg acatctagag cccgcgaagc tggcgcctcg	420
	cgcgccggaga accagacagc gccggggagaa gttcctgccc tcagtaacct gccgcccgcc	480
20	agccgcgtgg acggcatggt gggcgacgac ccttacaacc cctacaagta ctctgacgac	540
	aacccttatt acaactacta cgatacttat gaaaggccca gacctggggg caggtaccgg	600
	cccggatacg gcaactgcta cttccagtac ggtctcccag acctggtggc cgaccctac	660
25	tacatccagg cgtccacgta cgtgcagaag atgtccatgt acaacctgag atgcgcggcg	720
	gaggaaaact gtctggccag tacagcatac agggcagatg tcagagatta tgatcacagg	780
	gtgctgctca gatttcccca aagagtgaaa aaccaaggga catcagattt cttaccagc	840
30	cgaccaagat attcctggga atggcacagt tgctcatcaac attaccacag tatggatgag	900
	tttagccact atgacctgct tgatgccaac acccagagga gagtggctga aggccacaaa	960
35	gcaagtttct gtcttgaaga cacatcctgt gactatggct accacaggcg atttgcattg	1020
	actgcacaca cacagggatt gaggcctggc tgttatgata cctatggtgc agacatagac	1080
40	tgccagtgga ttgatattac agatgtaaaa cctggaaact ataccctaaa ggtcagtgta	1140
	aaccccagct acctggttcc tgaatctgac tataccaaca atggtgtgcg ctgtgacatt	1200
	cgtacacag gacatcatgc gtatgcctca ggctgcacaa tttaccgta ttag	1254
45	<210> 8	
	<211> 417	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 8	
55		
60		
65		

ES 2 572 955 T3

5 Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
1 5 10 15

10 Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
20 25 30

15 Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

20 Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
50 55 60

25 Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
65 70 75 80

30 Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
85 90 95

35 Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
100 105 110

40 Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
115 120 125

45 Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
130 135 140

50 Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
145 150 155 160

55 Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
165 170 175

60 Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg

65

ES 2 572 955 T3

5                                   180                                   185                                   190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
                                  195                                   200                                   205

10 Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
                                  210                                   215                                   220

15 Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
225   230                                   235                                   240

20 Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
  245                                   250                                   255

25 Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
  260                                   265                                   270

30 Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
  275                                   280                                   285

35 His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
  290                                   295                                   300

40 Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
305   310                                   315                                   320

45 Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
  325                                   330                                   335

50 Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
  340                                   345                                   350

55 Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
  355                                   360                                   365

60 Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
  370                                   375                                   380

65 Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
385   390                                   395                                   400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
  405                                   410                                   415

Tyr

# ES 2 572 955 T3

5	<210> 9
	<211> 752
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
10	<400> 9
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	

ES 2 572 955 T3

5 Met Arg Pro Val Ser Val Trp Gln Trp Ser Pro Trp Gly Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Cys Leu Leu Cys Ser Ser Cys Leu Gly Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gly  
20 25 30

10 Pro Glu Lys Lys Ala Gly Ser Gln Gly Leu Arg Phe Arg Leu Ala Gly  
35 40 45

15 Phe Pro Arg Lys Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu Ile Gln Arg Ala Gly  
50 55 60

20 Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Asp Phe Thr Leu Gln Ala Ala His  
65 70 75 80

Ile Leu Cys Arg Glu Leu Gly Phe Thr Glu Ala Thr Gly Trp Thr His  
85 90 95

25 Ser Ala Lys Tyr Gly Pro Gly Thr Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asn Leu  
100 105 110

30 Ser Cys Ser Gly Thr Glu Gln Ser Val Thr Glu Cys Ala Ser Arg Gly  
115 120 125

35 Trp Gly Asn Ser Asp Cys Thr His Asp Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys  
130 135 140

Lys Asp Gln Arg Leu Pro Gly Phe Ser Asp Ser Asn Val Ile Glu Val  
145 150 155 160

40 Glu His His Leu Gln Val Glu Glu Val Arg Ile Arg Pro Ala Val Gly  
165 170 175

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

50 Leu Pro Asp Gly Trp Ser Gln Val Cys Asp Lys Gly Trp Ser Ala His  
195 200 205

55 Asn Ser His Val Val Cys Gly Met Leu Gly Phe Pro Ser Glu Lys Arg  
210 215 220

60 Val Asn Ala Ala Phe Tyr Arg Leu Leu Ala Gln Arg Gln Gln His Ser  
225 230 235 240

65

ES 2 572 955 T3

5 Phe Gly Leu His Gly Val Ala Cys Val Gly Thr Glu Ala His Leu Ser  
245 250 255

10 Leu Cys Ser Leu Glu Phe Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Ala Arg Cys Pro  
260 265 270

15 Gly Gly Gly Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly Pro Val Tyr Ala  
275 280 285

20 Ala Ser Ser Gly Gln Lys Lys Gln Gln Gln Ser Lys Pro Gln Gly Glu  
290 295 300

25 Ala Arg Val Arg Leu Lys Gly Gly Ala His Pro Gly Glu Gly Arg Val  
305 310 315 320

30 Glu Val Leu Lys Ala Ser Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Arg Lys Trp  
325 330 335

35 Asp Leu His Ala Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser  
340 345 350

40 Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met Gly Gln Gly Met Gly Ala  
355 360 365

45 Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly Gln Glu Leu Ser Leu Trp  
370 375 380

50 Lys Cys Pro His Lys Asn Ile Thr Ala Glu Asp Cys Ser His Ser Gln  
385 390 395 400

55 Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Arg  
405 410 415

60 Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His Glu Gly Arg Val Glu Val  
420 425 430

65 Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly Asp  
435 440 445

70 Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu  
450 455 460

75 Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser Gly  
465 470 475 480

80 Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Thr Glu  
485 490 495



5  
 <210> 10  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra

15  
 <400> 10  
 cgcaagcttg gatccgggat ggagaggcct ctgtgc 36

20  
 <210> 11  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra

30  
 <400> 11  
 cgctctagag gatccttact gcggggacag ctggttg 37

35  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra

45  
 <400> 12  
 gccatgcgac ctgctcagtgt c 21

50  
 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra

60  
 <400> 13  
 gggcagtggc acctagat 18

65  
 <210> 14  
 <211> 613  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 572 955 T3

5 cctgacctg gtctcaatg cggagatggt gcagcagacc acctacctgg aggaccggcc 60  
 catgttcattg ctgcagtggt ccatggagga gaactgcctc toggcctcag ccgcgcagac 120  
 cgacccccacc acgggctacc gcgggtcctt gcgcttctcc tcccagatcc acaacaatgg 180  
 10 ccagtccgac ttccggccca agaacggccg ccacgcgtgg atctggcacg actgtcacag 240  
 gcactaccac agcatggagg tgttcaccca ctatgacctg ctgaacctca atggcaccaa 300  
 ggtggcagag ggccacaagg ccagcttctg cttggaggac acagaatgtg aaggagacat 360  
 15 ccagaagaat taogagtgtg ccaacttcgg cgatcagggc atcaccatgg gotgctggga 420  
 catgtaccgc catgacatcg actgccagtg ggttgacatc actgacgtgc cccctggaga 480  
 ctacctgttc caggttgta ttaaccccaa cttecgaggtt gcagaatccg attactccaa 540  
 20 caacatcatg aatgcagga gccgctatga cggccaccgc atctggatgt acaactgcc 600  
 cataggtggt tcc 613

25 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra

<400> 15  
 acatgcatgc cctgacctgg tctcaatgc 30

35 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra

<400> 16  
 occaagcttg gaaccaccta tgtggcagtt 30

45 <210> 17  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Secuencia de proteína derivada de la fusión de fragmento de LOXL2 (16412253) a 5' 6XHis tag

55 <400> 17

60

65

ES 2 572 955 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

His His His His His His Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val  
 1 5 10 15

Gln Gln Thr Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys  
 20 25 30

Ala Met Glu Glu Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro  
 35 40 45

Thr Thr Gly Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn  
 50 55 60

Asn Gly Gln Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile  
 65 70 75 80

Trp His Asp Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His  
 85 90 95

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

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys  
 115 120 125

Asn Tyr Glu Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys  
 130 135 140

Trp Asp Met Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr  
 145 150 155 160

Asp Val Pro Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn  
 165 170 175

Phe Glu Val Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg  
 180 185 190

Ser Arg Tyr Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly  
 195 200 205

Gly Ser  
 210

<210> 18

<211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda de transferencia del norte consistente en nucleótidos 1-660 de la LOXL2 cADN

60

65

ES 2 572 955 T3

<400> 18

5 atggagagggc ctctgtgctc ccacctctgc agctgcctgg ctatgctggc cctcctgtcc 60  
cccctgagcc tggcacagta tgacagctgg ccccattacc ccgagtactt ccagcaaccg 120  
gctcctgaggt atcaccagcc ccaggccccc gccaacgtgg ccaagattca gctgogcctg 180  
10 gctgggcaga agaggaagca cagcgagggc cgggtggagg tgtactatga tggccagtgg 240  
ggcaccgtgt gcgatgacga cttctccatc cacgctgccc acgtcgtctg ccgggagctg 300  
ggctatgtgg aggccaagtc ctggactgoc agctcctcct acggcaaggg agaaggggccc 360  
15 atctggttag acaatctcca ctgtactggc aacgagggcg cccttgcagc atgcacctcc 420  
aatggctggg gcgtcactga ctgcaagcac acggaggatg tcggtgtggt gtgcagcgac 480  
aaaaggattc ctgggttcaa atttgacaat tcgttgatca accagataga gaacctgaat 540  
20 atccaggtgg aggacattcg gattcgagcc atcctctcaa cctaccgcaa gcgcacccca 600  
gtgatggagg gctacgtgga ggtgaaggag ggcaagacct ggaagcagat ctgtgacaag 660

25 <210> 19  
<211> 530  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Sonda de transferencia del norte consistente en nucleótidos 1061-1590 de la LOXL3 cADN

<400> 19

35 gagaagctct gagtggcgt cgcattgggc agggcatggg tgctatccac ctgagtgaag 60  
ttogctgctc tggacaggag ctctccctct ggaagtgcc ccacaagaac atcacagctg 120  
aggattgttc acatagccag gatgccgggg tcoggtgcaa cctaccttac actggggcag 180  
40 agaccaggat ccgactcagt gggggccgca gccaacatga ggggcgagtc gaggtgcaaa 240  
tagggggacc tgggccctt cgctggggcc tcattctgtg ggatgactgg gggaccctgg 300  
aggccatggt ggcctgtagg caactgggtc tgggctacgc caaccacggc ctgcaggaga 360  
45 cctggtactg ggactctggg aatataacag aggtggtgat gagtggagtg cgctgcacag 420  
ggactgagct gtccctggat cagtgtgcc atcatggcac ccacatcacc tgcaagagga 480  
cagggaccog cttcactgct ggagtcattt gttctgagac tgcacagat 530

50 <210> 20  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>

60

65

5 <223> LOXL2 shARN secuencia de direccionamiento  
 <400> 20  
 gaaggagaca tccagaagaa t 21

10 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> LOXL2 shARN secuencia de direccionamiento  
 <400> 21  
 cgattactcc aacaacatca t 21

20 <210> 22  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> LOXL2 shARN secuencia  
 <400> 22  
 ccggccagat agagaacctg aatatctoga gatattcagg ttctctatct ggttttg 58

30 <210> 23  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> LOXL2 shARN secuencia  
 <400> 23  
 ccggcctggg tcaaatftg acaatctoga gattgtcaaa ttgaaccoca ggttttg 58

40 <210> 24  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> LOXL2 shARN secuencia  
 <400> 24  
 ccggcgatta ctccaacaac atcatctoga gatgatgttg ttggagtaat cgttttg 58

50 <210> 25  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> LOXL2 shARN secuencia  
 <400> 25

60

65

5 cgggagagg acatacaata ccaaactoga gtttggtaft gatgtcctc tcttttg 58

<210> 26  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> LOXL2 shARN secuencia

15 <400> 26  
 cggggaagga gacatccaga agaactcoga gattctctcg gatgtcctc tcttttg 58

20 <210> 27  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Oligonucleotido de ADN de una sola hebra

<400> 27  
 cgcoggaatt cgctcacagt accagcctca g 31

30 <210> 28  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleotido de ADN de una sola hebra

<400> 28  
 ccaaactgc aggtagtagt tgtaataagg gt 32

40 <210> 29  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleotido de ADN de una sola hebra

50 <400> 29  
 cgcoggaatt cggtaactca cccctaccag c 31

55 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleotido de ADN de una sola hebra

<400> 30  
 ctagtctaga acatagtgg ggtctgggac 30

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente para su uso en inhibir proteinosis alveolar pulmonar (PAP) en un sujeto, en el que el agente modula la expresión o actividad de la proteína LOXL2, en el que el agente comprende un polinucleótido que comprende:

5 una primera secuencia hibridable con un polinucleótido que codifica LOXL2, una segunda secuencia complementaria a la primera secuencia, y una secuencia de conexión que une la primera secuencia con la segunda secuencia, en el que la primera secuencia comprende SEQ ID NO: 21.

10 2. El agente para su uso según la reivindicación 1, en el que la secuencia de conexión forma una estructura de bucle en horquilla.

15 3. El agente para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente es al menos dos veces la longitud de SEQ ID NO. 21.

4. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polinucleótido se proporciona en un vector de expresión.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65