

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 847**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

**C12N 9/06** (2006.01)

**C12N 15/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2003 E 08020753 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2062919**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y métodos útiles para modular la angiogénesis, inhibir la metástasis y la fibrosis tumoral, y evaluar la malignidad de tumores cancerígenos de colon**

30 Prioridad:

**27.11.2002 US 305348**

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

**29.09.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NEUFELD, GERA;  
AKIRI, GAL;  
VADASZ, ZAHAVA y  
GENGRINOVITCH, STELA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 584 847 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).

**Composiciones farmacéuticas y métodos útiles para modular la angiogénesis, inhibir la metástasis y la fibrosis tumoral, y evaluar la malignidad de tumores cancerígenos de colon**

**Descripción**

5 ÁREA Y ANTECEDENTES DEL INVENTO

[0001] Este invento se refiere a un método para evaluar la malignidad de tumores de colon y predecir la prognosis de cáncer de colon.

10 **Angiogénesis**

[0002] En un adulto, la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejidos normales o enfermos se regula por medio de 2 procesos, la vasculogénesis recapitulada (la transformación de arteriolas pre-existentes a arterias musculares pequeñas) y la angiogénesis, el brote de vasos sanguíneos existentes (que ocurre en el embrión y en el adulto).

15 [0003] El proceso de la angiogénesis es regulado por medio de estímulos biomecánicos y bioquímicos. Los factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF - basic fibroblast growth factor) son liberados por las células vasculares, los macrófagos, y células que rodean a los vasos sanguíneos. Estos factores alogénicos activan a proteasas específicas que están involucradas en la degradación de la membrana basal. Como resultado de esta degradación, las células vasculares migran y proliferan conllevando, por lo tanto, a la formación de vasos sanguíneos nuevos. Las células periendotheliales, tales como los pericitos en los capilares, células musculares lisas en vasos más grandes y miocitos cardiacos en el corazón son adquiridos para suministrar funciones de mantenimiento y moratorios para los vasos que se están formando.

20 [0004] El establecimiento y remodelación de vasos sanguíneos son controlados por las señales paracrinas, muchas de las cuales son reguladas por ligandos proteínicos que modulan la actividad de receptores de transmembranas de quinasa y tirosina. Entre estas moléculas se encuentra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor) y sus familias de receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1 y neuropilina-2), angiopietinas 1-4 (Ang-1, Ang-2 etc.) y sus receptores respectivos (Tie-1 y Tie-2), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF - basic fibroblast growth factor), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF - platelet derived growth factor), y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$  - transforming growth factor).

25 [0005] El crecimiento de tumores sólidos es limitado por la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Cuando las células dentro de los tumores sólidos empiezan a producir a factores angiogénicos o cuando los niveles de los inhibidores de angiogénesis se reducen, el balance entre las influencias anti-angiogénicas y angiogénicas es perturbado, iniciando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la capa vascular existente en el tumor. Este evento en la progresión tumoral es conocido como el conmutador angiogénico (Folkman, 1990; Hanahan y Folkman 1996). Se ha demostrado que los inhibidores de la angiogénesis tumoral son capaces de inhibir completamente el crecimiento de tumores en ratones (Boehm et al., 1997; Bergers et al., 1999) y además inhibir la metástasis tumoral, un proceso que se basa en un contacto cercano entre la vasculatura y la células tumorales (Zetter, 1998). También se ha demostrado que la angiogénesis juega un rol importante en el progreso del cáncer a la mamá (Weidner, N. 1998; Degani et al., 1997; Guidi et al., 1997; Balsari et al., 1999).

30 [0006] Aquellos hallazgos han provocado el uso de factores anti-angiogénicos conocidos en la terapia de cáncer a la mamá (Klauber et al., 1997; Harris et al., 1996; Weinstatsaslow et al., 1994) y una búsqueda de nuevos inhibidores de la angiogénesis.

35 [0007] Durante la última década algunos inhibidores nuevos de angiogénesis han sido aislados incluyendo a inhibidores de señalización es VEGF (Neufeld et al., 1999) e inhibidores de procesos que conllevan a la maduración y estabilización de nuevos vasos sanguíneos. Los anticuerpos anti-integrina han sido utilizados como inhibidores de la maduración de vasos sanguíneos (Brooks et al., 1994; Brooks et al., 1998).

40 [0008] Aunque algunos medicamentos anti-angiogénicos ahora están disponibles comercialmente, los mecanismos anti-angiogénicos de la mayoría de estos medicamentos (por ejemplo, la angiostatina y la endostatina) no son claros (O'Reilly et al., 1997; O'Reilly et al., 1996).

45 [0009] Puesto que la angiogénesis puede ser iniciada por muchos factores angiogénicos (posiblemente compensatorios) parece razonable que los actores anti-angiogénicos que se dirigen a procesos posteriores en la respuesta angiogénica tales como la maduración de vasos o una combinación de factores anti-angiogénicos sería lo más efectivo para contrarrestar la formación de vasos.

50 [0010] El factor de plaquetas-4 (PFA - Platelet factor-4) es una proteína anti-angiogénica atrapada normalmente en las plaquetas (Tanaka et al., 1997; Maione et al., 1990; Neufeld et al., 2000). El PF4 inhibe la angiogénesis utilizando mecanismos malamente definidos (Gengrinovitch et al., 1995; Brown, y Parish, 1994; Gupta, y Singh, 1994; Watson

et al., 1994). Se especuló previamente que PF4 inhibe a proteoglicanos de heparán-sulfato de la superficie celular y en esta forma se inhibe la actividad de los factores de crecimiento angiogénicos tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico (Watson et al., 1994).

## 5 **Metástasis y etapas tumorales**

[0011] La transición desde un tumor localizado a un tumor metastásico e invasivo representa un hito en el desarrollo de la enfermedad maligna, puesto que usualmente está asociado con una prognosis significativamente peor. La comprensión del proceso que regula a esta transición es, por lo tanto, algo muy importante.

### 10 **Cáncer a la mamá**

[0012] En el cáncer a la mamá, la transición desde un tumor localizado a un tumor invasivo/metastásico se asocia en muchos casos con la formación de focos fibróticos y desmoplasia, lo cual es la presencia de estroma colagenoso inusualmente denso, dentro del tumor principal (Colpaert et al., 2001; Hasebe et al., 2000). Una correlación similar podría existir en otros tipos de cánceres tales como los cánceres del colon y pancreáticos (Nishimura et al., 1998; Ellenrieder et al., 2000). Estas observaciones representan paradojas aparentes a primera vista, puesto que la característica invasiva ha sido asociada por mucho tiempo con la destrucción de la matriz extracelular por enzimas que degradan a la matriz extracelular tales como las metalo-proteasas (Stamenkovic, 2000; Duffy et al., 2000) y la heparanasa (Vlodavsky y Friedmann, 2001). Sin embargo, es posible que la deposición de un exceso de la matriz extracelular pueda estimular a su vez la expresión de enzimas que degradan a la matriz que contribuirán, bajo ciertas circunstancias, a la invasión tumoral. De hecho, existe alguna evidencia que un incremento en la deposición de la matriz extracelular puede, en efecto, influenciar la producción de enzimas que degradan a la matriz celular (Schuppan et al., 2001; Swada et al., 2001).

[0013] WO 02/11667 muestra una correlación entre el nivel de expresión de la proteína de oxidasa de lisilo LOR-1 (lysyl oxidase protein) y las propiedades metastásicas del cáncer a la mama derivada de líneas celulares, y sugiere que el nivel de expresión de LOR-1 puede ser utilizado como una herramienta diagnóstica para determinar la malignidad de las células cancerígenas.

[0014] Algunos estudios anteriores en la industria han intentado desarrollar agentes para tratar a la metástasis del cáncer a la mama (Sauer et al., 2002) incluyendo un estudio por Kim et al., (2000) que describió a [(N-O-metil-L-triptofanil-L-isoleucinil-D-pipecolinil - L-2-amino-8-oxodecanoilo) de ciclo] de apicidina, un metabolito de hongos que fue identificado como un agente antiprotozoario que es conocido por inhibir parásitos, la histona deacetilasa (HDAC), que puede inhibir un fenotipo invasivo inducido por H-ras de MCF10A, células epiteliales de la mamá humana. Otro agente que es la forma polimérica de fibronectina que ha demostrado reducir el crecimiento tumoral y que posee una actividad anti metastásica cuando se administra sistemáticamente a ratones que tienen tumores (Yi y Ruoslahti, 2001).

### 40 **Cáncer al colon**

[0015] El cáncer a la tráquea gastrointestinal (GI), especialmente el cáncer al colon, es una enfermedad altamente tratable y a menudo curable cuando está ubicado en el intestino. Una cirugía es el tratamiento principal y los resultados de curación son aproximadamente del 50% de los pacientes. Recurrencia después de la cirugía es un problema principal y a menudo es la causa principal de muerte. Casi todos los casos de cáncer colorrectal surgen de pólipos adenomatosos, algunos de los cuales maduran en pólipos grandes, experimentan un crecimiento y desarrollo anormales, y finalmente progresan a cáncer. Esta progresión aparentemente tomaría por lo menos 10 años en la mayoría de pacientes, haciendo que sea una forma fácilmente tratable de cáncer si se diagnostica temprano, cuando el cáncer está localizado.

[0016] Los procedimientos estándar que son usados actualmente para establecer una diagnosis definitiva de un cáncer a la tráquea GI incluyen estudios de bario, endoscopias, biopsias y tomografías por computadora [M. F. Brennan, et al. En: Cancer: Principles and Practice of Oncology (Cáncer: Principios y Práctica de la Oncología), 4ª edición, pp. 849-882, Filadelfia, Pa.: J. B. Lippincott Co. (1993)].

[0017] La prognosis de cáncer de colon está relacionada claramente al nivel de penetración del tumor a través de la pared intestinal y a la presencia o ausencia de interacción de los nodos. Estas 2 características forman la base de todos los sistemas de determinación de etapas desarrollados para esta enfermedad. Las etapas son determinadas usualmente por un patólogo en secciones de tejidos obtenidas por medio de biopsias y/o cirugía y son dirigidas para determinar el grado anatómico de la enfermedad. Determinaciones precisas de las etapas son críticas para predecir los resultados de los pacientes y suministran criterios para diseñar una terapia óptima. Determinaciones imprecisas de etapas podrían resultar en malas decisiones terapéuticas y es un problema clínico importante en el cáncer del colon.

[0018] Por lo tanto, para incrementar la precisión de la terapia y la tasa de supervivencia de los pacientes de cáncer al colon existe una necesidad para desarrollar métodos sensibles y precisos de determinación de etapas del cáncer

del colon.

RESUMEN DEL INVENTO

- 5 **[0019]** Mientras se reduce este invento a la práctica, estos inventores han descubierto una nueva proteína enlazadora de PF4, una proteína de oxidasa de lisilo, LOR-1, que participa en modular la angiogénesis y metástasis del cáncer a la mama y como tal, puede ser utilizada como un objetivo para inhibir la metástasis y reducir la capacidad invasiva del tumor. Además, estos inventores han descubierto que la expresión de LOR-1 está correlacionada con el progreso del cáncer al colon y como tal puede ser utilizada para determinaciones precisas de las etapas de cáncer al colon.
- 10
- [0020]** De acuerdo a un aspecto de este invento, se ha suministrado un método ex-vivo o in-vitro para evaluar la malignidad de un tumor en el colon que comprende de: (a) determinar el nivel en tejidos de un polipéptido que es por lo menos el 95% homólogo con el polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o (b) determinar los niveles de ARNm que codifica a un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, en un tejido tumoral del colon, evaluando, por lo tanto, la malignidad del tumor del colon.
- 15
- [0021]** De acuerdo a otro aspecto de este invento, se suministra un método ex-vivo o in-vitro para predecir una prognosis de un individuo diagnosticado con cáncer al colon que comprende: (a) suministrar un tejido del tumor del colon obtenido del individuo, y; (b1) determinar un nivel en el tejido de un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o (b2) determinar los niveles de ARNm que codifican a un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, en dicho tejido tumoral del colon para evaluar, por lo tanto, la malignidad de dicho tejido tumoral del colon y predecir la prognosis del individuo diagnosticado con cáncer al colon.
- 20
- [0022]** En una sección adicional, dicho tejido de dicho tumor del colon es obtenible utilizando una biopsia del colon y/o una cirugía del colon.
- [0023]** En una sección adicional, el determinar a dicho nivel en el tejido de dicho polipéptido se realiza por medio de un método de detección inmunológica o dicha determinación de dichos niveles de ARNm es ejecutada por medio de un método de detección de ARN.
- 30
- [0024]** En una sección adicional, dicho método de detección inmunológica es seleccionado de un grupo que consiste de un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunoabsorción enlazado a enzimas (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay), un análisis de Western blot, y un análisis inmunohistoquímico.
- 35
- [0025]** En otra sección, dicho método de detección de ARN es seleccionado de un grupo que consiste de un análisis de Northern blot, una coloración de hibridación in situ, un análisis RT-PCR, y una coloración RT-PCR in situ.
- 40
- [0026]** En una sección adicional, la malignidad de dicho tejido tumoral del colon es evaluada al comparar a dicho nivel en dicho tejido tumoral del colon con un nivel de dicho polipéptido en un tejido normal de colon.
- [0027]** En una sección adicional, el método es ejecutado al determinar los niveles de ARNm que codifican a un polipéptido de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
- 45
- [0028]** En una sección adicional, el método es ejecutado al determinar el nivel de tejidos de un polipéptido de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
- [0029]** En una sección adicional, la determinación de dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido es ejecutada utilizando un anticuerpo anti-LOR-1 o uno de sus fragmentos.
- 50
- [0030]** En una sección adicional, dicho anticuerpo anti-LOR-1 es un anticuerpo policlonal generado utilizando un fragmento que tiene a una secuencia de aminoácidos de los 200 aminoácidos de la terminal C de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
- 55
- [0031]** De acuerdo a otro aspecto adicional de este invento, se suministra un método ex vivo o in vitro para determinar la etapa de un tumor del colon que comprende a: (a) determinar un nivel en tejidos de un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o (b) determinar los niveles de ARNm que codifican a un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, en un tejido tumoral del colon, evaluando, por lo tanto, la etapa del tumor del colon.
- 60
- [0032]** En una sección adicional, dicho tejido del tumor del colon es obtenido utilizando una biopsia del colon y/o una cirugía del colon.
- 65

- [0033]** En una sección adicional, el determinar a dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido es efectuado por medio de un método de detección inmunológica o dicha determinación de dichos niveles de ARNm es efectuada por medio de un método de detección de ARN.
- 5 **[0034]** En una sección adicional, dicho método de detección de ARN es seleccionado de un grupo que consiste de un análisis de Northern blot, una coloración de hibridación in situ, un análisis RT-PCR, y una coloración RT-PCR in situ.
- 10 **[0035]** En una sección adicional, el determinar dicho nivel en tejidos de dicho polipéptido se realiza utilizando un anticuerpo policlonal anti-LOR-1 generado utilizando un fragmento que tiene una secuencia de aminoácidos de los 200 aminoácidos de la terminal C de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
- 15 **[0036]** De acuerdo a un aspecto de esta presentación, se suministra un método para modular la angiogénesis en un tejido de mamíferos, donde el método comprende la administración a un tejido de mamíferos de una molécula capaz de modificar a un nivel de tejidos y/o la actividad de por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo para modular, por lo tanto, la angiogénesis en tejidos de mamíferos.
- 20 **[0037]** De acuerdo a otro aspecto de esta presentación, se suministra un método para modular la angiogénesis en un tejido de mamíferos, donde el método comprende administrar al tejido de mamíferos a un compuesto de ácidos nucleicos que es capaz de expresar a un polipéptido que tiene una actividad de oxidasas de lisilo para modular, por lo tanto, la angiogénesis dentro de tejidos de mamíferos.
- 25 **[0038]** De acuerdo a otro aspecto de esta presentación se suministra una composición farmacéutica útil para la modulación de la angiogénesis en un tejido de mamíferos que comprende, como un ingrediente activo, a una molécula capaz de modificar un nivel y/o actividad de por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo del tejido de mamíferos, y, a un portador farmacéuticamente efectivo.
- 30 **[0039]** De acuerdo a otro aspecto de esta presentación, se suministra un método para modular la angiogénesis en un tejido de mamíferos, donde el método comprende administrar al tejido de mamíferos a una molécula capaz de modificar a un nivel de tejidos y/o a la actividad de un polipéptido que es por lo menos un 75% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2 o 9 para modular, por lo tanto, la angiogénesis dentro del tejido de mamíferos. De acuerdo a características adicionales en secciones importantes de la presentación que se describen más adelante, la molécula es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpos capaz de enlazarse con, e inhibir, por lo menos parcialmente, la actividad de por lo menos un polipéptido.
- 35 **[0040]** De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpos es dirigido hacia por lo menos una porción del polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, 3, 6, 8 o 9.
- 40 **[0041]** De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, la molécula es un polinucleótido capaz de regular-reducir la expresión de por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo.
- 45 **[0042]** De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el polinucleótido es por lo menos parcialmente complementario al polinucleótido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1, 4, 5 o 7.
- [0043]** De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, la molécula es un polipéptido que tiene una actividad de oxidasa de lisilo.
- 50 **[0044]** De acuerdo a características adicionales en secciones preferidas descritas de la presentación, el polipéptido es tal como se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, 3, 6, 8 o 9.
- 55 **[0045]** De acuerdo a otro aspecto de esta presentación, se suministra un método para modular la angiogénesis en un tejido de mamíferos, donde el método comprende administrar al tejido de mamíferos a una estructura de ácidos nucleicos que es capaz de expresar a un polipéptido que tiene una actividad de oxidasa de lisilo para modular, por lo tanto, la angiogénesis dentro del tejido de mamíferos.
- 60 **[0046]** De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, el polipéptido tiene por lo menos un 75% de homología en relación al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, 3, 6, 8 o 9.
- 65 **[0047]** De acuerdo a otro aspecto adicional de esta presentación, se suministra un método para identificar moléculas capaces de modular la angiogénesis, donde el método comprende: (a) aislar las moléculas que muestran a una reactividad específica con por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo, y (b) probar a las moléculas con tejidos de mamíferos para determinar su actividad de modulación de angiogénesis.

- [0048] De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, el paso (a) es efectuado para ensayos de enlaces y/o ensayos de la actividad de oxidasas de lisilo.
- 5 [0049] De acuerdo a un aspecto adicional de esta presentación, se suministra un método para determinar la malignidad del tejido cancerígeno, donde el método comprende (a) determinar un nivel de expresión de oxidasas de lisilo y/o la actividad del tejido cancerígeno; y (b) comparar el nivel de la expresión de oxidasas de lisilo en comparación de aquel nivel determinado para el tejido de control para determinar, por lo tanto, la malignidad del tejido cancerígeno.
- 10 [0050] De acuerdo a otro aspecto de esta presentación, se suministra un método para inhibir la metástasis y fibrosis en un tejido de mamíferos, cuyo método comprende la administración al tejido de mamíferos de una molécula capaz de regular-reducir un nivel en tejidos y/o la actividad de por lo menos un tipo de oxidasas de lisilo para, por lo tanto, inhibir la metástasis en el tejido de mamíferos.
- 15 [0051] De acuerdo a otro aspecto de esta presentación, se suministra una composición farmacéutica útil para inhibir la metástasis y fibrosis en tejidos de mamíferos que comprende, como un ingrediente activo, a una molécula capaz de regular-reducir un nivel y/o actividad de por lo menos un tipo de oxidasas de lisilo del tejido de mamíferos y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 [0052] De acuerdo a características adicionales y secciones importantes de la presentación que se describen más adelante, la molécula es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpos capaz de enlazarse con, e inhibir, por lo menos parcialmente, la actividad de, por lo menos un polipéptido.
- 25 [0053] De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpos es dirigido hacia por lo menos una porción del polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, 3, 6, 8 o 9.
- 30 [0054] De acuerdo a otra característica adicional de secciones importantes descritas de la presentación, la molécula es un polinucleótido capaz de regular-reducir la expresión de por lo menos un tipo de oxidasas de lisilo.
- 35 [0055] De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, el polinucleótido es complementario, por lo menos parcialmente, al nucleótido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1, 4, 5 o 7.
- 40 [0056] De acuerdo a otro aspecto adicional de esta presentación, se suministra un método para identificar moléculas capaces de inhibir la metástasis o la fibrosis, cuyo método comprende a: (a) examinar e identificar moléculas que muestran actividades específicas con por lo menos un tipo de oxidasas de lisilo; y (b) probar el potencial inhibitorio de metástasis y de fibrosis de dichas moléculas.
- 45 [0057] De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el paso (a) es efectuado por medio de ensayos de enlace y/o ensayos de la actividad de oxidasas de lisilo.
- 50 [0058] De acuerdo a otro aspecto adicional de esta presentación, se suministra un método para inhibir la metástasis y fibrosis en un tejido de mamíferos, cuyo método comprende la administración al tejido de mamíferos de una molécula capaz de regular-reducir el nivel de tejidos y/o la actividad de un polipéptido que tiene por lo menos un 75% de homología con el polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2 o 9, para inhibir, por lo tanto, la metástasis y fibrosis en un tejido de mamíferos.
- 55 [0059] De acuerdo a otro aspecto adicional de esta presentación, se suministra un método para evaluar la malignidad de un tumor de colon que comprende el determinar a un nivel en tejidos y/o a un nivel de actividad de un polipéptido que es por lo menos un 75% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2 o 9 en un tejido tumoral de colon, evaluando, por lo tanto, la malignidad del tumor de colon.
- 60 [0060] De acuerdo a otro aspecto adicional de esta presentación, se suministra un método para predecir una prognosis de un individuo diagnosticado con cáncer al colon que comprende: (a) obtener a un tejido tumoral del colon del individuo, y; (b) determinar un nivel en tejidos y/o un nivel de actividad de un polipéptido que tiene por lo menos un 75% de homología con el polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2 o 9 en el tejido tumoral del colon para, por lo tanto, evaluar la malignidad del tejido tumoral del colon y predecir la prognosis del individuo diagnosticado con cáncer al colon.
- 65 [0061] De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, el tejido tumoral del colon es obtenido utilizando una biopsia de colon y/o una cirugía de colon.
- [0062] De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el determinar el nivel en tejidos del polipéptido es efectuado por medio de un método inmunológico de detección y/o un método de detección de ARN.

**[0063]** De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el determinar el nivel de actividad del polipéptido es efectuado por medio de un método de detección de actividad enzimática.

5 **[0064]** De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el método inmunológico de detección es seleccionado de un grupo que consiste de un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay), un análisis Western blot, y un análisis inmunohistoquímico.

10 **[0065]** De acuerdo a características adicionales de secciones importantes descritas de la presentación, el método de detección de actividad enzimática es seleccionado de un grupo que consiste de una coloración citoquímica, un ensayo de actividad in vitro, y un gel de actividad.

15 **[0067]** De acuerdo a características adicionales en secciones importantes descritas de la presentación, la malignidad tumoral del colon es evaluada al comparar el nivel en tejidos y/o el nivel de actividades del polipéptido en el tejido tumoral del colon con un nivel de tejidos y/o un nivel de actividades del polipéptido en un tejido de colon normal.

20 **[0068]** Esta presentación aborda exitosamente las fallas de los sistemas conocidos actualmente al suministrar composiciones farmacéuticas y métodos que pueden ser utilizados para tratar al cáncer metastásico, a la formación de fibrosis tumoral y otras enfermedades caracterizadas por una formación excesiva o insuficiente de vasos sanguíneos, así como a suministrar a un método para evaluar la malignidad de cáncer al colon.

25 **[0069]** A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que lo que se entiende comúnmente por una persona con conocimiento normal en la industria a la cual este invento pertenece. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento pueden ser utilizados en la práctica o para pruebas de este invento, métodos y materiales adecuados son descritos más adelante. En caso de que existiese conflicto, la especificación de la patente, incluyendo sus definiciones, tendrán validez. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no tienen la intención de ser limitantes.

30

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS

35 **[0070]** El invento es descrito en este documento, en forma de ejemplo únicamente, con referencia a los esquemas adjuntos. Con referencia específica ahora a los esquemas en detalle, se indica nuevamente que los particulares mostrados sólo están en forma de ejemplo y para propósitos ilustrativos de debate de secciones importantes de este invento, y son presentados para suministrar lo que se cree que es la descripción más útil y más fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales del invento. En este sentido, no se intenta mostrar detalles estructurales del invento en más detalle de lo que sea necesario para entender los fundamentos del invento. La descripción debe ser tomada con los esquemas volviéndose aparente para aquellas personas con conocimiento en la industria de cómo varias formas del invento podrían ser conceptualizadas en la práctica.

40

**[0071]** En los esquemas:

45 La figura 1 ilustra un análisis de SDS-PAGE de extractos de células endoteliales aórticas porcinas (células PAE - Porcine aortic endothelial) que fueron transfectadas con un vector junto (línea 1) o con el vector que contiene al ADNc de LOR-1 (línea 3) y marcado metabólicamente con <sup>35</sup>S-metionina. Extractos de las células transfectadas con el vector (línea 2), del vector que contiene a células transfectadas con ADNc de LOR-1 (línea 4) o que provienen de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC - human umbilical vein endothelial cells) marcadas con <sup>35</sup>S-metionina (línea 5) fueron purificadas en una columna de afinidad PF4. Una banda correspondiente en tamaño a la banda original observada en las HUVEC es evidente (comparar a las líneas 4 y 5); esta banda está ausente en los extractos de las células transfectadas por vectores.

50

55 La figura 2 ilustra a la expresión diferencial de LOR-1 en células derivadas de cáncer a la mamá de potenciales metastásicos diferentes. El potencial metastásico de las células se incrementa de la izquierda a la derecha, y es correlacionado a la expresión incrementada del ARNm de LOR-1. Los resultados corresponden al análisis de northern blot de la expresión del ARNm de LOR-1. Los datos relacionados con el potencial metastásico relativo de las líneas celulares se derivó de la literatura.

60

65 La figura 3 ilustra la expresión de LOR-1 recombinante en células de cáncer a la mamá MCF-7 (línea 1). Las células MCF-7 transfectadas con vectores (línea 2) y 2 clones de MCF-7 que expresan al LOR-1 recombinante (línea 3, clon 12, línea 4, clon 22) fueron cultivadas durante 2 días en un medio libre de sueros. El medio proveniente de un número igual de células fue recaudado, concentrado 30 veces utilizando a Centricon™, y porciones de 10 µl fueron expuestas a electroforesis utilizando un gel de SDS/PAGE. Las proteínas fueron coloradas utilizando nitrocelulosa, y la proteína LOR-1 fue identificada utilizando un anticuerpo dirigido hacia la terminal C de LOR-1. Un anticuerpo acoplado con alcalinofosfatasa secundarias y una coloración NBT-BICP fueron utilizadas para detectar el anticuerpo primario enlazado.

La figura 4 ilustra el tamaño del tumor tal como fue correlacionado con la expresión LOR-1. Las células parentales MCF-7 (par), células MCF-7 transfectadas con vectores individuales pCDNA3 (vec) y 2 LOR-1 recombinantes que expresan a células MCF-7 (clones 12 y 24) fueron depositadas bajo la piel de ratones con deficiencia inmunológica ( $10^7$ /lugar de la inyección) junto con un pellet de liberación lenta de estrógeno. 6 animales fueron utilizados para cada tipo celular implantado. El área de los tumores fue medida cada cierto número reducido de días. Las barras representan la desviación estándar a partir de la media.

Las figuras 5a-b ilustra la inmunocoloración con el anti-factor-8 de tumores generados por las células MCF-7 transfectadas con la expresión individual del vector (figura 5a) o con un vector de expresión que contienen a la ADNc de LOR-1 (figura 5b). La contra - coloración fue realizada con hematoxilina-eosina (azul). La invasión de vasos sanguíneos a la masa tumoral es más abundante en tumores que expresan a LOR-1 (figura 5b) en comparación con los tumores generados por las células de control que no expresan a LOR-1 (figura 5a).

Las figuras 6a-d ilustran secciones del hígado de pacientes con la enfermedad de Wilson (figura 6c-d) y pacientes normales (figuras 6a-b) que fueron examinados con una sonda sensible de LOR-1 (figura 6a, 6c) y sondas antisentido (figuras 6b, 6d).

La figura 7 ilustra los resultados de una hibridación in situ de montaje completo utilizando una sonda de ADNc de LOR-1 y un embrión de pollo de 4 días de edad. Se observó una expresión fuerte de ARNm de LOR-1 en los vasos sanguíneos amnióticos (flecha).

La figura 8 ilustra la alineación secuencial de varias oxididasas de lisilo incluyendo a LOR-1.

Las figuras 9a-b ilustra la expresión de LOR-1 y LOR-2 en células derivadas del cáncer a la mamá humano: el ARN total fue preparado de células MCF-7 confluyentes (MCF-7), células MDA-MB-231 y células MDA-MB-435 (MDA-435) y fue expuesto a un análisis de Northern blots utilizando sondas de ADNc específicas para LOR-1 (figura 9a) y LOR-2 (figura 9b). La señal de hibridación específica de LOR-1 es vista en tumores derivados de células MDA-231 y MDA-435 pero no en tumores derivados de células MCF-7. La señal de hibridación específica de LOR-2 es vista únicamente en tumores derivados de células MDA-435. Las señales de hibridación que no son específicas para LOR-1 y LOR-2 son vistas en todos los ARN de tumores en una banda que corresponde al ARNs de 28S.

Las figuras 9c-f ilustran el patrón de expresión de LOR-1 en mamás humanas normales (figura 9c), en carcinoma de la mamá no invasivo in situ (figura 9d), en carcinoma ductal invasivo de nivel 1 (figura 9e) y en carcinoma ductal invasivo de nivel 3 (figura 9f). Un anticuerpo de conejo purificado en lo que se refiere a afinidad policlonal dirigido en contra de la terminal C de LOR-1 fue utilizado para detectar la expresión de LOR-1. La expresión de alto nivel de la proteína LOR-1 es vista en el epitelio del ducto normal (figura 9c, flecha abierta), magnificación x 100. En carcinomas a la mama no invasivos in situ (figura 9d) las células cancerígenas han llenado el ducto, pero todavía están confinadas a este. Muchas de las células ubicadas en la periferia del tumor han perdido su capacidad de expresar a LOR-1, mientras que, en el centro, las células todavía expresan altos niveles de LOR-1 (figura 9d, flecha vacía); magnificación x 200. En el carcinoma a la mama invasivo de nivel 1 las células tumorigénicas han formado pseudo-ductos (figura 9e, flechas negras) pero no expresan más a LOR-1. Sin embargo, las células encontradas en un carcinoma cercano expresan in situ a LOR-1 (figura 9e, flecha vacía); magnificación x 200. En carcinoma a la mama invasivo de nivel 3, las células tumorigénicas expresan montos grandes de LOR-1 y la morfología está completamente desordenada (figura 9f); magnificación x 200.

La figura 10a ilustra la expresión de LOR-1 recombinante en células MCF-7 transfectadas con el vector de expresión en forma individual (vec) o con un vector de expresión que contienen al clon 12 o 24 de la ADNc de LOR-1 (#12 o #24, respectivamente). Las proteínas de LOR-1 fueron detectadas por medio de Western blots con un anticuerpo dirigido hacia la terminal C de LOR-1 humano.

La figura 10b ilustra el proceso post-interpretación de LOR-1. Las células MCF-7/Tet-LOR1 cultivadas en la presencia de tetraciclina fueron tripnizadas y sembradas en un disco de 24 pozos (5 x 10<sup>4</sup> células/pozo) en un medio libre de sueros en la ausencia de tetraciclina. Las porciones celulares fueron recaudadas en momentos especificados después de la remoción de la tetraciclina y fueron analizadas para detectar la presencia de LOR-1 por medio de Western blots tal como fue descrito en la figura 10a.

La figura 10c ilustra el índice de crecimiento de los tumores derivados de las células MCF-7 que expresan al control o a LOR-1. Las células MCF-7 transfectadas con solamente el vector de expresión (vec) o con un vector de expresión que contienen al clon 12 o 24 de la ADNc de LOR-1 que fueron inyectadas en almohadillas de grasas de mamíferos de ratones desnudos atímicos. Cada tipo celular fue implantado en 8 animales. El área tumoral fue medida en momentos indicados. Las barras de error representan al error estándar de la media. El experimento fue terminado y los ratones fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó un diámetro de alrededor de 1 cm.

La figura 10d ilustra el tamaño relativo del tumor en ratones 25 días después de la inyección de las células MCF-7. Se muestran a ratones que tenían a tumores que se desarrollaron a partir de células transfectadas con solamente el vector de expresión (izquierda) o con el vector de expresión que contenía al clon 24 (centro) o 12 (derecha) de la ADNc de LOR-1.

Las figuras 11a-h ilustran a focos fibróticos y depósitos de colágeno en tumores derivados a partir de las células MCF-7 que expresan al LOR-1 recombinante. La coloración por medio de hematoxilina-eosina demuestra a unos pocos focos necróticos en un tumor derivado a partir de células MCF-7 transfectadas únicamente con el vector de expresión (figura 11a, flecha, magnificación x 20) y focos necróticos numerosos en un tumor derivado a partir de las células MCF-7 transfectadas con el vector de expresión que



contienen al clon 12 del ADNc de LOR-1 (figura 11b, flechas, magnificación x 20). La figura 11c ilustra a la inmuno - coloración de queratina-7 humana de tumores generados por células MCF-7 transfectadas con el vector de expresión que contienen al clon 12. La contra - coloración fue realizada con hematoxilina-eosina (azul). Las flechas indican a los núcleos de las células anfitrionas concentrados en los focos fibróticos. No se puede observar ninguna necrosis; magnificación x 40. Las figuras 11d-f ilustran los depósitos de colágeno en células tumorales tal como se observó por medio de la coloración tricrómica de Masson. Unos pocos depósitos de colágeno fueron observados en los tumores generados a partir de las células MCF-7 transfectadas solamente con vectores de expresión (figura 11d, flechas, magnificación x 200). Se observaron paquetes gruesos de colágeno entre las células tumorales generadas a partir de las células MCF-7 transfectadas con el vector de expresión que contiene al clon 12 (figura 11e, magnificación x 200). El área fibrótica está llena con fibras de colágeno e inter - separada con células derivadas del anfitrión en tumores generados a partir de células MCF-7 transfectadas con un vector de expresión que contienen al clon 24 (figura 11f, magnificación x 200). Las figuras 11g-h ilustran a vasos sanguíneos colorados con Trichrome de Masson en tumores generados a partir de células MCF-7 transfectadas únicamente con el vector de expresión (figura 11g) o el vector de expresión que contienen al clon 12 (figura 11h); magnificación x 400. Las figuras 12a-d ilustran el depósito de colágeno de tipo 3 por la coloración de retículos en tumores generados a partir de las células MCF-7 y de glioma C6 transfectadas únicamente con el vector de expresión (figura 12a,c) o con el clon 12 del vector que expresa individualmente a la ADNc de LOR-1 (figura 12b,d); magnificación x 200.

Las figuras 13a-h ilustran la capacidad invasiva de los tumores derivados a partir de las células MCF-7 que expresan al LOR-1 recombinante. Se muestran secciones histológicas de tumores generados a partir de las células MCF-7 transfectadas con únicamente un vector de expresión (figuras 13a,b) o un vector que expresa a LOR-1 (figuras 13c-h). Las secciones fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal específico para la queratina-7 humana (figuras 13a-d y f-h, coloración morada azul) o con un anticuerpo dirigido hacia el LOR-1 (figura 13e, coloración roja). La contra - coloración fue con hematoxilina (celeste) en todas las secciones. Las flechas negras designan a células tumorales que dieron resultados positivos para la citoqueratina-7 que invaden a la pseudo-cápsula tumoral (figura 13c), infiltrándose entre paquetes musculares adyacentes (figura 13d), o que invaden a la vasculatura (figuras 13f, g) y el espacio peri-neural de los nervios (figura 13h). Las flechas blancas designan a las células tumorales que dieron resultados positivos de LOR-1 que se infiltran en los músculos ubicados cerca del tumor (figura 13g). Los vasos sanguíneos v; los nervios n; las fibras musculares m; magnificación x 100 para las figuras 13a-c, f, h y x 200 para las figuras 13d, por ejemplo. Las figuras 14a-d ilustran la tendencia de expresión de LOR-1 en un colon humano normal (figura 14a), en un tumor del colon que incluye a hiperplasia (figura 14b, flechas tipo diamante) y adenoma (figura 14b, flechas tipo círculo), en un adenocarcinoma del colon de nivel bajo (14c, flechas, coloración café) y en un adenocarcinoma de colon de nivel alto (14d, coloración café). Un anticuerpo de conejo purificado en relación a su afinidad policlonal dirigido en contra de la terminal C de LOR-1 fue utilizado para detectar la expresión de LOR-1 por medio de inmunohistoquímica en secciones de tejidos obtenidos provenientes de varios tumores de cáncer al colon. Se debe tomar en cuenta la coloración ligera de LOR-1 en unas pocas células del colon normal (figura 14a, flechas, magnificación x 10), la coloración moderada de LOR-1 en un tumor de hiperplasia (figura 14b, círculos tipo diamante) y alta coloración de LOR-1 en células de adenoma del colon (figura 14b, flechas tipo círculo, magnificación x 4). También se debe tomar en cuenta la coloración significativa de LOR-1 en adenocarcinoma de nivel bajo (figura 14c, flechas, magnificación x 10) y en el carcinoma de alto nivel (figura 14d, magnificación x 20).

#### DESCRIPCIÓN DE LAS SECCIONES IMPORTANTES

**[0072]** Esta presentación describe composiciones y métodos farmacéuticos que pueden ser utilizados para modular la angiogénesis y para inhibir la capacidad invasiva tumoral y fibrosis tumoral. Específicamente, esta presentación puede ser utilizada para suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis, así como, para tratar trastornos tales como, por ejemplo, la artritis, la retinopatía diabética, la psoriasis y la vasculitis. Además, este invento es un método para determinar la malignidad de tumores de cáncer al colon lo cual puede ser utilizado para determinar las etapas de cáncer al colon. Específicamente, este invento puede ser utilizado para predecir la prognosis de pacientes de cáncer al colon basándose en el nivel en tejidos y/o en el nivel de actividad de LOR-1 en tumores del colon.

**[0073]** Los principios y operación de este invento podrían ser entendidos de mejor forma con referencias a los esquemas y a las descripciones adjuntas.

**[0074]** Antes de explicar por lo menos una sección del invento en detalle, debe entenderse que el invento no está limitado en su aplicación a los detalles de construcción y a la configuración de los componentes establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en los esquemas descritos en la sección de ejemplos. El invento es capaz de otras aplicaciones o de ser practicado o ejecutado en varias otras formas. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología utilizadas en este documento tienen el propósito de describir y no deberían ser vistas como limitantes.

**[0075]** Tal como se describió en la sección de ejemplos más adelante, los inventores han descubierto un constituyente proteínico nuevo del proceso angiogénico.

**[0076]** Esta proteína, que es denominada LOR-1 en este documento (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2) pertenece a la familia enzimática de oxidasas de lisilo que catalizan la formación de enlaces transversales covalentes entre los residuos de lisina en fibrillas de colágeno o elastina adyacentes. La familia de oxidasas de lisilo incluye a 4 genes (Saito et al., 1997; Kim et al., 1995; Reiser et al., 1992; Jang et al., 1999), secuencias proteínicas de los cuales están representadas en las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 3, 6, 8 y 9. Una comparación homológica entre algunos miembros de la familia de oxidasas de lisilos se presenta en la figura 8 que se describe aún más en la sección de ejemplos más adelante.

**[0077]** Cada miembro de la familia de enzimas de oxidasas de lisilo incluye a un dominio altamente conservado de oxidasas de lisilo, actividad del cual depende altamente de la presencia de cobre.

**[0078]** Debe tomarse en cuenta que estudios anteriores en la industria han demostrado que la remoción del cobre de tejidos tumorales conlleva a la inhibición de la angiogénesis (Rabinovitz, 1999; Yoshida et al., 1995). Esto apoya aún más el rol de la familia enzimática de oxidasas de lisilo en la angiogénesis puesto que se presume, que la remoción del cobre conlleva a la inhibición de las oxidasas de lisilo.

**[0079]** Un apoyo adicional para la actividad angiogénica de las oxidasas de lisilo es suministrada por los ensayos de enlaces PF4-LOR-1 aquí presentados. Tal como se mencionó anteriormente en este documento, PF4 es un inhibidor de la angiogénesis. Como tal, la actividad anti-angiogénica mostrada por PF4 podría ser efectuada a través de la inhibición de LOR-1, que, tal como fue demostrado en la sección de ejemplos más adelante, es expresada altamente en las células endoteliales que cubren a los vasos sanguíneos.

**[0080]** Por lo tanto, de acuerdo a un aspecto de esta presentación, se suministra a un método para modular la angiogénesis.

**[0081]** El método es efectuado al administrar al tejido de mamíferos a una molécula capaz de modificar a un nivel en tejidos y/o la actividad de por lo menos un tipo de oxidasas de lisilo para, por lo tanto, modular la angiogénesis en tejidos de mamíferos.

**[0082]** Tal como se utiliza en este documento, la frase "nivel de tejidos" se refiere al nivel de proteínas de oxidasas de lisilo que están presentes en una forma activa en el tejido en un momento dado en el tiempo. Los niveles proteínicos son determinados por factores tales como, las tasas de transcripción y/o interpretación, la rotación de ARN o de proteínas y/o la localización proteínica dentro de la célula. Como tal, cualquier molécula que efectúa cualquiera de estos factores puede modificar el nivel de tejidos de la oxidasa de lisilo.

**[0083]** Tal como se utiliza en este documento, el término "actividad" se refiere a una actividad enzimática de la oxidasa de lisilo. Una molécula que puede modificar a la actividad enzimática podría alterar directamente o indirectamente a la expresividad del sustrato de la enzima o la actividad de su lugar catalítico.

**[0084]** Existen muchos ejemplos de moléculas que pueden modificar específicamente el nivel en los tejidos y/o la actividad de una oxidasa de lisilo. Aquellas moléculas pueden ser categorizadas como "reguladores-reductores" o "reguladores-impulsadores" de la oxidasa de lisilo.  
*Reguladores-reductores*

**[0085]** Un ejemplo de un agente capaz de regular-reducir a una proteína de oxidasa de lisilo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpos capaz de enlazar específicamente a la oxidasa de lisilo o por lo menos a parte de la proteína de oxidasa de lisilo (por ejemplo, una región que cubre al lugar catalítico) y que inhibe su actividad cuando se introduce en tejidos de mamíferos. Como tal, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpos dirigido a la oxidasa de lisilo puede ser utilizado para suprimir o contrarrestar la formación de vasos sanguíneos, y para inhibir la fibrosis y metástasis tumoral.

**[0086]** Muchos ejemplos de inhibidores de anticuerpos son conocidos en la industria, incluyendo a inhibidores de angiogénesis que se dirigen a los factores angiogénicos (Brooks et al., 1994; Brooks et al., 1998).

**[0087]** Preferiblemente, el anticuerpo se enlaza específicamente a por lo menos un epítipo de una oxidasa de lisilo. Tal como se utiliza en este documento, el término "epítopos" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al cual se enlaza el paratopo de un anticuerpo.

**[0088]** Los determinantes de epítopos usualmente consisten de agrupaciones de moléculas superficiales químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga.

**[0089]** El término "anticuerpo" tal como se utiliza en este invento incluye a moléculas intactas, así como a sus fragmentos funcionales, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv que son capaces de enlazarse a macrófagos. Estos fragmentos funcionales de anticuerpos son definidos de la siguiente forma: (1) Fab, el fragmento que contiene a un fragmento monovalente enlazador de antígenos de una molécula de anticuerpos, que puede ser producida por

medio de la digestión de un anticuerpo completo con la papaína enzimática para generar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpos que puede ser obtenida al tratar a todo el anticuerpo con pepsina, seguido por una reducción, para generar a una cadena ligera intacta y a una porción de una cadena pesada; 2 fragmentos Fab' son obtenidos por cada molécula de anticuerpos; (3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que puede ser obtenido al tratar a todo el anticuerpo con la pepsina enzimática sin una reducción subsiguiente; F (ab')<sub>2</sub> es un dímero de 2 fragmentos Fab' que se mantienen juntos por los enlaces de disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento diseñado genéticamente que contiene en la región variable de la cadena ligera y a la región variable de la cadena pesada expresadas como 2 cadenas; y (5) un anticuerpo de una sola cadena ("SCA" - Single chain antibody), una molécula diseñada genéticamente que contienen a la región variable de la cadena ligera y a la región variable de la cadena pesada, enlazadas por un enlazador adecuado de polipéptidos en forma de una sola molécula de cadenas fusionada genéticamente.

**[0090]** Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como sus fragmentos son conocidos en la industria (refiérase por ejemplo a, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Anticuerpos: Un manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988.

**[0091]** Los fragmentos de anticuerpos de acuerdo a este invento pueden ser preparados por medio de una hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por medio de expresiones en el E. Coli o en células de mamíferos (por ejemplo, en cultivos celulares de ovarios de conejillos de indias chinos u otros sistemas de expresión) del ADN que codifica al fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos por medio de la digestión de pepsina o papaína de los anticuerpos completos por medio de métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ser producidos por medio de divisiones enzimáticas de los anticuerpos con pepsina para suministrar a un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede ser dividido aún más utilizando a un agente reductor de tiol, y opcionalmente a un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilos que resultan de la división de los enlaces de disulfuros, para producir a fragmentos monovalentes de 3.5S Fab'. Alternamente, una división enzimática que utiliza a pepsina produce a los fragmentos monovalentes de Fab' y directamente a un fragmento Fc. Estos métodos son descritos, por ejemplo, por Goldenberg, por las patentes de Estados Unidos números 4,036,945 y 4,331,647, y por referencias contenidas en este documento. Refiérase también a Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]. Otros métodos para la división de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras-pesadas, divisiones adicionales de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas también pueden ser utilizadas, siempre y cuando los fragmentos que se enlazan al antígeno sean reconocidos por el anticuerpo intacto.

**[0092]** Los fragmentos de Fv comprenden a una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación podría no ser covalente, tal como es descrito en Inbar et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos de América 69: 2659-62 (1972)]. Alternamente, las cadenas variables pueden ser conectadas por un enlace inter - molecular de, o enlazadas transversalmente mediante químicos tales como el glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos de Fv comprenden a cadenas VH y VL conectadas por medio de un enlazador de péptidos. Estas proteínas enlazadoras de antígenos de una sola cadena (sFv) son preparadas al construir a un gen estructural que comprende a secuencias de ADN que codifican a los dominios de VH y de VL que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural es insertado en un vector de expresión, que es introducido subsiguientemente a una célula anfitriona tal como el E. Coli. Las células anfitrionas recombinantes sintetizan a una sola cadena de polipéptidos con un péptido enlazador que conecta a los 2 dominios V. Métodos para producir a sFvs son descritos, por ejemplo, por Whitlow y Filpula, Methods (Métodos) 2: 97-105 (1991); Bird et al., Science (Ciencia) 242:423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77 (1993); y la patente de Estados Unidos número. 4,946,778.

**[0093]** Otra forma de un fragmento de anticuerpos es un péptido que codifica para una sola región que determina la complementariedad (CDR - complementarity-determining region). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") pueden ser obtenidas al construir a genes que codifican al CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes son preparados, por ejemplo, al usar a la reacción en cadena de polimerasas para sintetizar a la región variable del ARN de células que producen anticuerpos. Refiérase, por ejemplo, a Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

**[0094]** Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de ratones) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab').sub.2 u otras sub-secuencias de anticuerpos enlazadoras de antígenos) que contienen a la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina humana. Anticuerpos humanizados incluyen a inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las cuales los residuos que forman a una región complementaria determinante (CDR - complementarity determining region) del receptor son reemplazados por residuos de un CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, la actividad y capacidad deseadas. En algunas instancias, los residuos del marco referencial de Fv de inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Anticuerpos humanizados también podrían comprender a residuos que no son encontrados en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias del marco referencial. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente a todos o por lo menos a uno, y comúnmente a 2, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana de consenso. El anticuerpo humanizado comprenderá además óptimamente a por lo

menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), comúnmente aquella de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature (Naturaleza)*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature (Naturaleza)*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

5 **[0095]** Métodos para humanizar los anticuerpos no humanos son bien conocidos en la industria. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos a este a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son referidos a menudo como residuos importados, que son tomados comúnmente de un dominio variable importado. La humanización puede ser realizada esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colegas [Jones et al., *Nature (Naturaleza)*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature (Naturaleza)* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science (Ciencia)*, 239: 1534-1536 (1988)], al sustituir a los CDRs o secuencias de CDRs de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Asimismo, aquellos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos número 4,816,567), donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente proveniente de especies no humanas. En la práctica, anticuerpos humanizados son comúnmente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de lugares análogos en anticuerpos de roedores.

**[0096]** Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos utilizando varias técnicas conocidas en la industria, incluyendo a bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos Monoclonales y Terapia contra el Cáncer)*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)]. Asimismo, anticuerpos humanos pueden ser hechos mediante la introducción de lugares de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógena han sido desactivados parcialmente o completamente. A partir de esto, la producción de anticuerpos humanos es observada, la cual se asemeja de cerca a aquella vista en los humanos en todo sentido, incluyendo la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este método es descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en las siguientes publicaciones científicas: Markset al., *Bio/Technology (Bio/Tecnología)* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature (Naturaleza)* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature (Naturaleza)* 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology (Biotecnología Natural)* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology (Biotecnología Natural)* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

**[0097]** Tal como se describe más adelante, varios métodos pueden ser utilizados para reducir o abolir la transcripción o interpretación de una oxidasa de lisilo. Estos incluyen a métodos de oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ADNzimas, ARNip y oligonucleótidos que forman hélices triples.  
*Polinucleótidos antisentido*

**[0098]** La regulación-reducción de una oxidasa del lisilo puede efectuarse utilizando a un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con una transcripción de ARNm que codifica a la proteína de la oxidasa de lisilo.

**[0099]** El diseño de moléculas antisentido que puede ser utilizado para regular-reducir eficientemente a la oxidasa de lisilo debe efectuarse considerando 2 aspectos importantes para el método antisentido. El primer aspecto es la entrega del oligonucleótido al citoplasma de las células apropiadas, mientras que el 2º aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se enlaza específicamente al ARNm designado dentro de las células en una forma que inhibe su interpretación.

**[0100]** Algunas consideraciones deben tomarse en cuenta cuando se diseñan a oligonucleótidos antisentido. Para una inhibición eficiente in vivo de la expresión genética utilizando a oligonucleótidos o a análogos antisentido, los oligonucleótidos o los análogos deben cumplir los 7 requerimientos (i) especificidad suficiente en los enlaces con la secuencia objetivo; (ii) solubilidad en agua, (iii) estabilidad en contra de nucleasas intra- y extracelulares; (iv) capacidad de penetración a través de la membrana celular; y (v) cuando son usados para tratar a un organismo, una baja toxicidad. Algoritmos que sirven para identificar a aquellas secuencias con la afinidad pronosticada más alta para su ARNm objetivo basándose en un ciclo termodinámico que tome en cuenta la energía de las alteraciones estructurales en el ARNm y del oligonucleótido objetivos también están disponibles [refiérase a, por ejemplo, Walton et al. *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9 (1999)].

**[0101]** Aquellos algoritmos han sido utilizados exitosamente para implementar un método antisentido en células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton et al. permitió a los científicos diseñar exitosamente a oligonucleótidos antisentido para las transcripciones beta-globina de conejos (RBG – rabbit beta-globin) y el factor alfa de necrosis tumoral de ratones (TNF alfa - tumor necrosis factor-alpha). El mismo grupo de investigación ha reportado más recientemente que la actividad antisentido de oligonucleótidos seleccionados racionalmente en contra de 3 ARNms objetivo modelo (deshidrogenasa láctica humana A y B y gp130 de rata) en cultivos celulares tal como fue evaluado por medio de una técnica PCR cinética, demostró ser efectiva en casi todos los casos, incluyendo pruebas en contra de 3 objetivos diferentes en 2 tipos celulares con químicas de oligonucleótidos de fosfodiésteres y fosforotioatos.

**[0102]** Adicionalmente, varios métodos para el diseño y eficiencia de pronóstico de oligonucleótidos específicos usando un sistema in vitro también fueron publicados (Matveeva et al., Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) 16: 1374-1375 (1998)).

5 **[0103]** Una molécula antisentido que puede ser utilizada con este invento incluye a un polinucleótido o a un análogo del polinucleótido de por lo menos 10 bases, preferiblemente de entre 10 y 15, más preferiblemente de entre 15 y 20 bases, más preferiblemente de por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 22, por lo menos 25, o lo menos 30 o por lo menos 40 bases que son capaces de hibridarse in vivo, bajo condiciones fisiológicas, con una porción de una hebra de polinucleótidos que codifica a un polipéptido que es por lo menos un  
10 50% homólogo a la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1, 4, 5 o 7 o por lo menos un 75% homólogo a una porción de su terminal N tal como se determine usando el software BestFit del paquete de análisis secuencial de Wisconsin, que utiliza al algoritmo de Smith y Waterman, donde la penalidad por la creación de vacíos es igual a 8 y penalidad por extensión de vacíos es igual a 2.

15 **[0104]** Los oligonucleótidos antisentido utilizados por este invento pueden ser expresados a partir de una estructura de ácidos nucleicos administrada al tejido, en cuyo caso promotores inducibles son utilizados preferiblemente de tal forma que la expresión antisentido pueda ser activada y desactivada, o alternamente aquellos oligonucleótidos pueden ser sintetizados químicamente y administrados directamente al tejido, como parte de, por ejemplo, una composición farmacéutica.

20 **[0105]** La capacidad de sintetizar químicamente a oligonucleótidos y a sus análogos que tienen una secuencia predeterminada seleccionada ofrece los medios para regular-reducir la expresión genética. Podrían considerarse a 4 tipos de estrategias para la modulación de la expresión genética.

25 **[0106]** A nivel de transcripciones, los oligonucleótidos o sus análogos antisentido o sentido que se enlaza al ADN genómico mediante el desplazo de una hebra o mediante la formación de una hélice triple, podrían prevenir la transcripción. A nivel de transcripciones, los oligonucleótidos o sus análogos antisentido que se enlazan a moléculas de ARNm objetivas conllevan a la división enzimática del híbrido mediante una RNasa H intracelular. En este caso, mediante la hibridación al ARNm objetivo, los oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos suministran a un híbrido dúplex reconocido y destruido por la enzima RNasa H. Alternamente, aquella formación de híbridos podría conlleva a una interferencia con cortes y empalmes correctos. Como resultado, en ambos casos, se reduce o se elimina el número de transcripciones intactas del ARNm objetivo que están listas para su interpretación.

30 **[0107]** A nivel de transcripciones, los oligonucleótidos o análogos antisentido que se enlazan a las moléculas objetivas de ARNm evitan, mediante una obstaculización estérica, el enlace de factores esenciales de interpretación (ribosomas), al ARNm objetivo, un fenómeno conocido en la industria como una supresión de hibridación, deshabilitando la interpretación de aquellos ARNMs.

35 **[0108]** Oligonucleótidos que no han sido modificados son comúnmente imprácticos para ser usados como secuencias antisentido puesto que tienen vidas útiles medias cortas in vivo, durante las cuales son degradadas rápidamente por las nucleasas. Además, son difíciles de preparar en cantidades que superan a los miligramos. Adicionalmente, aquellos oligonucleótidos son malos penetrantes de las membranas celulares.

40 **[0109]** Por lo tanto, es aparente que para cumplir con todos los requerimientos que se mencionaron anteriormente, los análogos de oligonucleótidos necesitan ser preparados en una forma adecuada.

45 **[0110]** Por ejemplo, problemas que surgen en conexión con el reconocimiento de ADN de doble hebra (ADNdh) a través de la formación de hélices triples han sido reducidos mediante un enlace químico separador de "conmutación de retorno", por el cual una secuencia de polipurina en una hebra es reconocida, y mediante la "conmutación de retorno", una secuencia de homopurina en la otra hebra puede ser reconocida. Además, la formación de buenas hélices ha sido obtenida mediante el uso de bases artificiales, mejorando, por lo tanto, las condiciones de enlace en relación a la fuerza iónica y al pH.

50 **[0111]** Adicionalmente, para mejorar la vida media, así como la penetración a membranas, se han hecho un número grande de variaciones en las estructuras de los polinucleótidos, sin embargo, esto ha tenido poco éxito.

55 **[0112]** Los oligonucleótidos pueden ser modificados ya sea en la base, en la partícula de azúcar o en la partícula de fosfato. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, el uso de metilfosfonatos, monotiofosfonatos, ditiofosfonatos, fosforamidatos, ésteres de fosfato, fosforotioatos conectados, fosforamidatos conectados, metileno fosfonatos conectados, análogos de nucleótidos de defosfos con conexiones de siloxano, conexiones de carbonato, conexiones de ésteres de carboximetilo, conexiones de carbonato, conexiones de ésteres de carboximetilos, conexiones de acetamidas, conexiones de carbamatos, conexiones de tioéteres, conexiones sulfoxi, conexiones de sulfonos, varios ADNs "plásticos", conexiones anoméricas y derivados de borano [Cook (1991) Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides-future opportunities (Química medicinal de oligonucleótidos antisentido-opportunidades futuras). Anti-Cancer Drug Design (Diseño de Medicamentos Anti-Cáncer) 6: 585].

65

- 5 [0113] La aplicación de patente internacional WO 89/12060 presenta a varios bloques de construcción para sintetizar a análogos de oligonucleótidos, así como análogos de oligonucleótidos formados mediante la unión de aquellos bloques de construcción en una secuencia definida. Los bloques de construcción pueden ser "rígidos" (es decir, que contienen una estructura anular) o "flexibles" (es decir, que no tienen una estructura anular). En ambos casos, los bloques de construcción contienen a un grupo hidroxilo y a un grupo mercapto, a través del cual se dice que los bloques de construcción se unen para formar a los análogos de oligonucleótidos. La partícula enlazadora en los análogos de oligonucleótidos es seleccionada de un grupo que consiste de sulfuro (-S-), sulfóxido (-SO-), y sulfonas (-SO<sub>2</sub>-).
- 10 [0114] La aplicación de patente internacional WO 92/20702 describe un oligonucleótido acíclico que incluye a una estructura de péptidos en la cual cualquier núcleo base o análogo químico seleccionado está atado y sirve como carácter de codificación tal como lo hace en el ADN o en el ARN natural. Estos nuevos compuestos, conocidos como ácidos nucleicos de péptidos (PNAs - peptide nucleic acids), no solamente son más estables en células que sus contrapartes normales, pero también se enlazan con ADN y ARNs normales de 50 a 100 veces más ajustadamente que los ácidos nucleicos naturales lo hacen entre sí. Los oligómeros de PNAs pueden ser sintetizados a partir de 4 monómeros protegidos que contienen timina, citosina, adenina y guanina por medio de la síntesis de péptidos de fase sólida de Merrifield. Para incrementar la solubilidad en agua y para prevenir acumulaciones, un grupo de amidas de lisina es colocado en la región de la terminal C.
- 20 [0115] Los oligonucleótidos de ARN también podrían ser utilizados para inhibiciones antisentido puesto que forman a una dupla estable de ARN-ARN con el objetivo, sugiriendo una inhibición eficiente. Sin embargo, debido a su baja estabilidad, los oligonucleótidos de ARN son expresados comúnmente adentro de las células utilizando a vectores diseñados para ese propósito. Este método es favorable cuando se intenta usar como objetivo a un ARNm que codifica a una proteína abundante y de larga vida.
- 25 [0116] Previo conocimiento en la industria nos enseña una variedad de estrategias de entrega que pueden ser utilizadas para entregar eficientemente a oligonucleótidos a una amplia variedad de tipos de célula [refiérase a, por ejemplo, Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al. Blood (Sangre) ( 91: 852-62 (1998); Rajur et al. Bioconjug Chem 8: 935-40 (1997); Lavigne et al. Biochem Biophys Res Commun (Común) 237: 566-71 (1997) y Aoki et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun (Común) 231: 540-5 (1997)].
- 30 [0117] Las terapias antisentido tienen el potencial de tratar muchas enfermedades que amenazan la vida con varias ventajas sobre los medicamentos tradicionales. Los medicamentos tradicionales intervienen después de que una proteína que causa la enfermedad se forma. Las terapias antisentido, sin embargo, bloquean la transcripción/interpretación del ARNm e intervienen antes de que se formen las proteínas, y puesto que las terapias antisentido usan como objetivo únicamente a un ARNm específico, deberían ser más efectivas con efectos secundarios más reducidos que las terapias actuales de inhibición proteínica.
- 35 [0118] Algunos ensayos clínicos han demostrado la seguridad, factibilidad y la actividad de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido adecuados para el tratamiento del cáncer han sido utilizados exitosamente [Holmund et al., Curr Opin Mol Ther 1: 372-85 (1999)], mientras que el tratamiento de malignidades hematológicas por medio de oligonucleótidos antisentido que usan como objetivo a *genc-myb*, *p53* y *Bcl-2* han participado en ensayos clínicos y han demostrado ser tolerados por los pacientes [Gerwitz Curr Opin Mol Ther 1: 297-306 (1999)].
- 40 [0119] Más recientemente, la supresión mediada por antisentidos de la expresión genética de heparanasa humana ha demostrado, de acuerdo a varios reportes, inhibir la diseminación pleural de células cancerígenas humanas en un modelo de ratón [Uno et al., Cancer (Cáncer) Res 61: 7855-60 (2001)].
- 45 [0120] El primer medicamento antisentido fue aprobado recientemente por la FDA. El medicamento, Fomivirsén, fue desarrollado por Isis, y es indicado para el tratamiento local del citomegalovirus en pacientes con SIDA que no tienen tolerancia o que tienen una contraindicación de otros tratamientos para la retinitis CMV o que no tuvieron la respuesta suficiente a tratamientos previos para la retinitis CMV (Pharmacotherapy News Network - Red de Noticias de Farmacoterapia).
- 50 [0121] Por lo tanto, el consenso actual es que los desarrollos recientes en el campo de la tecnología antisentido que, tal como se acaba de describir, han conllevado a la generación de algoritmos antisentido de diseño altamente preciso y una amplia variedad de sistemas de entrega de oligonucleótidos, permiten a una persona con conocimiento normal en la industria el diseñar e implementar métodos antisentido adecuados para regular-reducir la expresión de secuencias conocidas sin tener que recurrir a experimentaciones indebidas de ensayo y error.
- 55 **Ribozima**
- 60 [0122] Otro agente capaz de regular-reducir una oxidasa de lisilo es una molécula de ribozima capaz de dividir específicamente una transcripción de ARNm que codifica a una oxidasa de lisilo. Las ribozimas son cada vez más utilizadas para la inhibición de secuencias específicas de expresiones genéticas por medio de la división de ARNMs
- 65

que codifican a proteínas de interés [Welch et al., *Curr Opin Biotechnol.* 9: 486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para dividir a cualquier ARN objetivo específico las ha vuelto herramientas valiosas para aplicaciones básicas de investigación y de terapia. En el área terapéutica, las ribozimas han sido utilizadas para usar como objetivos a ARNs virales en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en enfermedades genéticas [Welch et al., *Clin Diagn Virol.* 10: 163-71 (1998)]. Más notablemente, algunos protocolos de terapia genética de ribozimas para pacientes de VIH ya están en ensayos en la fase 1. Más recientemente, las ribozimas han sido utilizadas para investigación animal transgénica, la validación de objetivos genéticos y la dilucidación de senderos. Algunas ribozimas están en varias etapas de ensayos clínicos. ANGIOZIMA fue la primera ribozima sintetizada químicamente que fue estudiada en ensayos clínicos humanos. ANGIOZIMA inhibe específicamente la formación de VEGF-r (receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular - Vascular Endothelial Growth Factor receptor), un componente clave en el sendero de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras compañías han demostrado la importancia de las terapias de anti-angiogénesis en modelos animales. La HEPTAZIMA, una ribozima diseñada para destruir selectivamente al ARN del Virus de la Hepatitis C (HCV - Hepatitis C Virus), demostró ser efectivo para reducir el ARN viral de la hepatitis C en ensayos de cultivos celulares (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - página de inicio de su página web).

### **ADNzima**

[0123] Otro agente capaz de regular-reducir una oxidasa de lisilo es una ADNzima, molécula capaz de dividir específicamente a una transcripción de ARNm o a una secuencia de ADN de la oxidasa de lisilo. Las ADNzimas son polinucleótidos de una sola hebra que son capaces de dividir a secuencias objetivo de una y de 2 hebras (Breaker, R.R. y Joyce, G. *Chemistry and Biology* (Química y Biología) 1995; 2: 655; Santoro, S.W. y Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 1997; 94(3): 4262). Un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima ha sido propuesto. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 deoxirribonucleótidos, flanqueados por 2 dominios de reconocimiento de sustratos que tienen de 7 a 9 deoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima pueden dividir efectivamente a su ARN sustrato en las uniones purina:pirimidina (Santoro, S.W. y Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 1997; 94(3): 4262; para una revisión de las ADNzimas por favor refiérase a Khachigian, LM [*Curr Opin Mol Ther* 4: 119-21 (2002)].

[0124] Ejemplos de la construcción y amplificación de ADNzimas sintéticas y diseñadas que reconocen a lugares de división de objetivos de 1 y 2 hebras se han presentado en la patente de Estados Unidos número 6,326,174 otorgada a Joyce et al. Las ADNzimas de diseño similar dirigidas en contra del receptor de urokinasa humana demostraron recientemente inhibir la expresión del receptor de urokinasa e inhibir exitosamente la metástasis celular de cáncer de colon in vivo (Itoh et al., 2002, Abstract 409, *Ann Meeting Am. Soc. Gen. Ther.* www.asgt.org). En otra aplicación, ADNzimas complementarias a los oncogenes bcr-ab1 fueron exitosas al inhibir la expresión de oncogenes en células de leucemia, y reducir los índices de relapso en trasplantes autólogos de médula ósea en casos de CML y ALL.

### **ARNip**

[0125] Otro mecanismo de regulación-reducción de una oxidasa de lisilo a nivel de transcripciones es el Interferencia de ARN (ARNi), un método que utiliza a moléculas pequeñas de ARNs que interfieren (ARNip) que son homólogas en relación al ARNm objetivo y conllevan a su degradación [Carthew RW. *Gene silencing by double-stranded RNA* (Silenciamiento genético mediante ARN de doble hebra). *Curr Opin Cell (Célula) Biol* 2001 Apr;13(2):244-8].

[0126] La interferencia de ARN es un proceso de 2 pasos. En el primer paso, el cual es denominado paso de iniciación, el ARNs entrante es digerido en ARNs de interferencia pequeña (ARNip) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente la acción de Dicer, un miembro de la familia de RNasas III de ribonucleasa las de ARNs específicas, que procesan (dividen) a ARNs (introducidos directamente o mediante un transgén o un virus) en una forma que depende de ATP. Eventos sucesivos de división degradan al ARN en 19-21 duplas de bp (ARNip), cada una con proyecciones de 3' de 2-nucleótidos [Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development* (Genética y Desarrollo) 12: 225-232 (2002); y Bernstein *Nature* (Naturaleza) 409: 363-366 (2001)].

[0127] En el paso de ejecución, las duplas de ARNip se enlazan a un complejo de nucleasas para formar al complejo silenciador inducido por ARN (RISC - RNA-induced silencing complex). Una reversión dependiente de ATP de la dupla de ARNip es requerida para la activación del RISC. El RISC activo usa como objetivo entonces a la transcripción homóloga al emparejar las bases de interacciones y divide al ARNm en 12 fragmentos de nucleótidos provenientes de la terminal 3' del ARNip [Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development* (Genética y Desarrollo) 12: 225-232 (2002); Hammond et al. (2001) *Nat. Rev. Gen.* 2: 110-119 (2001); y Sharp *Genes* (Genes Penetrantes). *Dev.* 15: 485-90 (2001)]. Aunque el mecanismo de división todavía debe ser elucidado, la investigación indica que cada RISC contiene a un ARNip individual y a una RNasa [Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development* (Genética y Desarrollo) 12: 225-232 (2002)].

[0128] Debido a la potencia admirable de la ARNi, un paso de amplificación dentro del sendero de IARN ha sido sugerido. La aplicación podría ocurrir mediante la copia de ARNdhs de entrada lo cual generaría más ARNips, o

mediante la replicación de los ARNips formados. Alternamente o adicionalmente, la ampliación podría ser efectuada mediante varios eventos de rotación del RISC [Hammond et al. *Nat. Rev. Gen.* 2: 110-119 (2001), Sharp *Genes (Genes Penetrantes)*. *Dev.* 15: 485-90 (2001); Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development (Genética y Desarrollo)* 12: 225-232 (2002)]. Para mayor información acerca de IARN refiérase las siguientes revisiones Tuschl *Chem Biochem.* 2: 239-245 (2001); Cullen *Nat. Immunol.* 3: 597-599 (2002); y Brantl *Biochem. Biophys. Act.* 1575: 15-25 (2002).

**[0129]** La síntesis de las moléculas de IARN adecuadas para ser usadas con este invento pueden ser efectuadas de la siguiente forma. Primero, la secuencia de ARNm de oxidasa de lisilo es examinada corriente abajo del codón de inicio AUG para detectar secuencias de dinucleótidos AA. La incidencia de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes a 3' es registrada como lugares objetivos potenciales del ARNip. Preferiblemente, los lugares objetivos del ARNip son seleccionados del marco referencial de lectura abierta, puesto que las regiones no interpretadas (UTRs - untranslated regions) son más ricas en los lugares enlazadores de proteínas regulatorias. Las proteínas enlazadoras de UTRs y/o los complejos de inicio de interpretación podrían interferir con enlaces de complejos de endonucleasas de ARNips [Tuschl *Chem Biochem.* 2: 239-245, 2001]. Será apreciado, que los ARNips dirigidos a regiones no interpretadas también podrían ser efectivos, tal como se demostró para GAPDH donde el ARNip dirigido al 5' UTR medió a alrededor de un 90% de reducción en el ARNm de GADH y abolió completamente el nivel proteínico ([www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html](http://www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)).

**[0130]** Segundo, los lugares objetivos potenciales son comparados con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, humanos, ratones, ratas, etcétera) utilizando cualquier software de alineación secuencial, tal como el software BLAST disponible en el servidor de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Lugares objetivos putativos que muestran una homología significativa con otras secuencias codificadoras son filtradas y extraídas.

**[0131]** Las secuencias objetivo que califican son seleccionadas como plantilla para la síntesis del ARNip. Secuencias importantes son aquellas que incluyen a contenidos bajos de G/C puesto que éstas han demostrado ser más efectivas para mediar el silenciamiento genético en comparación de aquellas con un contenido de G/C superior al 55%. Algunos lugares objetivos son seleccionados preferiblemente dentro de la longitud del gen objetivo para su evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNips seleccionados, un control negativo es utilizado preferiblemente en conjunto. Un ARNip de control negativo incluye preferiblemente a la misma composición de nucleótidos que los ARNips, pero no tiene una homología significativa con el genoma. Por lo tanto, una secuencia mezclada de nucleótidos del ARNip es utilizada preferiblemente, siempre y cuando no presente a ninguna homología significativa con otro gen.

**[0132]** Las moléculas de ARNip de este invento son transcritas preferiblemente a partir de vectores de expresión que pueden facilitar una expresión estable de las transcripciones de ARNips una vez que son introducidos a la célula anfitriona. Estos vectores son diseñados para expresar a ARNs horquillados cortos (ARNhcs), que son procesados in vivo en moléculas de ARNips capaces de ejecutar silenciamientos genéticos específicos [Brummelkamp, T.R., et al., (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells (Un sistema para la expresión estable de ARNs de interferencia pequeña en células de mamíferos). *Science (Ciencia)* 296: 550-53; Paddison, P.J., et al. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells (ARNs horquillados cortos (ARNhcs) inducen silenciamientos específicos de secuencias en células de mamíferos). *Genes Dev.* 16:948-58; Paul et al. (2002) *Nature (Naturaleza)* Biotech. 20: 505-08; Yu, J.Y., et al. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells (Interferencia de ARN por medio de la expresión de ARNs de interferencia pequeña). *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 99: 6047-52].

**[0133]** Un ejemplo de un vector adecuado de expresión es el pSUPER<sup>™</sup>, que incluye al promotor genético H1-ARN de la polimerasa III con un inicio de transcripción bien definido y una señal de terminación que consiste de 5 timidinas seguidas (T5) [Brummelkamp, T.R. et al. (2002), *Science (Ciencia)* 296: 550-53]. Más importantemente, la división de la transcripción en el lugar de terminación es un lugar que sigue a la 2ª uridina, generando, por lo tanto, a una transcripción que se asemeja a los extremos de ARNips sintéticos, que también contienen a proyecciones de nucleótidos. El ARNip es clonado para que incluya a la secuencia de interés, es decir, a la oxidasa de lisilo distanciada por un separador corto del complemento en reversa de la misma secuencia. La transcripción resultante se dobla de vuelta en ella misma para formar una estructura de tallo bucle, que regula al IARN de la oxidasa de lisilo.

**[0134]** Otro vector de expresión de ARNip adecuado codifica al ARNip sentido y antisentido bajo la regulación de promotores polIII independientes [Miyagishi y Taira (2002) *Nature (Naturaleza)* Biotech. 20: 497-500]. El ARNip, generado por este vector también incluye a una señal de terminación de 5 timidinas (T5).

**[0135]** Puesto que los métodos para la introducción de ARNips sintéticos a células por medio de lipofección puede resultar en eficiencias bajas de transfección en algunos tipos celulares y/o la persistencia a corto plazo de efectos silenciadores, se han desarrollado métodos mediados por vectores.

**[0136]** Por lo tanto, las moléculas de ARNip utilizadas por este invento son entregadas preferiblemente a la célula utilizando retrovirus. La entrega de ARNips utilizando retrovirus suministran varias ventajas sobre otros métodos, tales como la lipofección, puesto que la entrega retroviral es más eficiente, uniforme y selecciona inmediatamente



para células estables de "eliminación" [Devroe, E. y Silver, P.A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA (ARNips entregados por medio de retrovirus). BMC Biotechnol. 2: 15].

5 **[0137]** Publicaciones científicas recientes han validado la eficacia de aquellas moléculas cortas de ARN de doble hebra para inhibir la expresión del ARNm objetivo y, por lo tanto, han demostrado claramente el potencial terapéutico de aquellas moléculas. Por ejemplo, el IARN ha sido utilizado para demostrar inhibir la expresión de la hepatitis C (McCaffrey, A. P., et al., 2002, Gene expression: RNA interference in adult mice (Expresión genética: interferencia del ARN en ratones adultos). Nature (Naturaleza) 418, 38-39), VIH-1 (Jacque, J-M., et al. 2002, Modulation of HIV-1 replication by RNA interference (Modulación de la replicación de VIH-1 por medio de Interferencia de ARN). Nature (Naturaleza) 418, 435-438), Células de cáncer cervical (Jiang, M., y Milner, J. 2002, Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference (Silenciamiento selectivo de la expresión genética viral en células de carcinoma cervical humano con resultados positivos de HPV tratadas con ARNips, un cebador de interferencia del ARN). Oncogene (Oncogén) 21, 6041-8) y células leucémicas [Wilda, M., et al., 2002, Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) (Eliminación de células leucémicas con un gen de la fusión BCR/ABL mediante interferencia de ARN (iARN). Oncogene (Oncogén) 21, 5716-24].

**Oligonucleótido que forma hélices triples (TFO - Triple helix forming oligonucleotide)**

20 **[0138]** Un método adicional de regulación de la expresión de una oxidasa de lisilo en células es por medio de oligonucleótidos que forman a tripletes (TFOs - triplex forming oligonucleotides). Estudios recientes han demostrado que los TFOs pueden ser diseñados de tal forma que reconozcan y se enlacen a regiones de polipurina/polipirimidina en ADN helicoidal de doble hebra en una forma específica para secuencias. Estas reglas de reconocimiento son señaladas por Maher III, L. J., et al., Science (Ciencia) (1989), 245: 725-730; Moser, H. E., et al., Science (Ciencia) (1987), 238: 645-630; Beal, P. A., et al, Science (Ciencia) (1992), 251: 1360-1363; Cooney, M., et al., Science (Ciencia) (1988), 241: 456-459; y Hogan, M. E., et al., publicación EP 375408. La modificación de los oligonucleótidos, tal como la introducción de intercaladores y sustituciones estructurales, y la optimización de condiciones del enlace (concentración de pH y de cationes) han apoyado a superar obstáculos inherentes para la actividad de TFOs tales como repulsión e inestabilidad de carga, y se ha demostrado recientemente que los oligonucleótidos sintéticos pueden ser usados como objetivos para secuencias específicas [para ver una revisión reciente refiérase a Seidman y Glazer, J. Clin. Invest. (2003), 112: 487-94].

**[0139]** En general, el oligonucleótido que forma a tripletes tiene la correspondencia secuencial:

35	oligo	3'--A	G	G	T
	dupla	5'--A	G	C	T
	dupla	3'--T	C	G	A

40 **[0140]** Sin embargo, se ha demostrado que los tripletes A-AT y G-GC tienen la estabilidad helicoidal triple más alta (Reither y Jeltsch, BMC Biochem, 2002, Sept12, Epub). Los mismos autores han demostrado que los TFOs diseñados de acuerdo a la regla A-AT y G-GC no forman tripletes no específicos, indicando que la formación de tripletes es de hecho específica en relación a las secuencias.

45 **[0141]** Por lo tanto para cualquier secuencia dada en la región regulatoria de oxidasas de lisilo puede diseñarse una secuencia que forma a tripletes. Los oligonucleótidos que forman a tripletes son preferiblemente de por lo menos 15, más preferiblemente de 25, y todavía más preferiblemente de 30 o más nucleótidos de largo, hasta 50 o 100 bp.

50 **[0142]** La transfección de las células (por ejemplo, por medio de liposomas catiónicos) con TFOs, y la formación de la estructura helicoidal triple con el ADN objetivo induce cambios estéticos y funcionales, bloqueando la iniciación y el alargamiento de transcripciones, permitiendo la introducción de los cambios secuenciales deseados en el ADN endógeno y resultando en la regulación-reducción específica de la expresión genética. Ejemplos de aquella supresión de expresión genética en las células tratadas con TFOs incluye a la eliminación de supFG1 apisomal y de genes HPRT endógenos en células de mamíferos (Vasquez et al., Nucl Acids (Ácidos) Res. 1999; 27: 1176-81, y Puri, et al, J Biol Chem, 2001; 276: 28991-98), y la regulación-reducción específica de secuencias y objetivos de la expresión del factor de transcripción Ets2, importante en la etiología del cáncer a la próstata (Carbone, et al, Nucl Acid Res. 2003; 31: 833-43), y el gen ICAM-1 pro - inflamatorio (Besch et al, J Biol Chem, 2002; 277: 32473-79). Adicionalmente, Vuyisich y Beal han demostrado recientemente que los TFOs de secuencias específicas pueden enlazarse a ARNs de doble hebra, inhibiendo la actividad de las enzimas que dependen de ARNs de doble hebra tales como las quinasas que dependen de ARN (Vuyisich y Beal, Nuc. Acids (Ácidos) Res 2000; 28: 2369-74).

60 **[0143]** Adicionalmente, los TFOs diseñados de acuerdo a los principios que se acaban de mencionar pueden inducir a mutagénesis dirigidas capaces de ejecutar reparaciones de ADN, suministrando, por lo tanto, a regulaciones-reducciones y regulaciones-incrementos de la expresión de genes endógenos (Seidman y Glazer, J Clin Invest 2003; 112: 487-94). Descripción detallada del diseño, de la síntesis y de la administración de TFOs efectivos puede encontrarse en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos 2003 017068 y 2003 0096980 otorgada a Froehler et

al, y 2002 0128218 y 2002 0123476 otorgada a Emanuele et al, y la patente de Estados Unidos. No. 5,721,138 otorgada a Lawn.

**[0144]** Los reguladores-reductores descritos anteriormente en este documento serían particularmente útiles para inhibir la angiogénesis en el tejido tumoral. Se ha demostrado que PF4, una proteína enlazadora de la oxidasa de lisilo que inhibe a la angiogénesis en el tejido tumoral se acumula específicamente en vasos sanguíneos formado recientemente de tumores (vasos angiogénicos) pero no en vasos sanguíneos establecidos (Hansell, P., et al., 1995, Selective binding of platelet factor 4 to regions of active angiogenesis in vivo (Enlaces selectivos del factor de plaquetas 4 a regiones de angiogénesis activas in vivo). Amer. J. Physiol-Heart. Circ. Phy. 38, H829-H836; Reiser, K., et al., 1992, Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin (Enlaces transversales enzimáticos y no enzimáticos de colágeno y de elastina). FASEB J. 6, 2439-2449).

**[0145]** Vasos sanguíneos alogénicos formado recientemente son más permeables para las proteínas que los vasos sanguíneos establecidos puesto que el mayor inductor de angiogénesis en muchas enfermedades angiogénicas es el VEGF, un factor de crecimiento que también funciona como un factor potente de permeabilización de vasos sanguíneos (VPF - vessel permeabilizing factor) [Neufeld et al., 1999, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - , Vascular endothelial growth factor) y sus receptores). FASEB J. 13(1): 9-22].

Vasos sanguíneos asociados con tumores están, por lo tanto, en un estado permanente de hiper - permeabilidad debido a la expresión sobre des-regulada del VEGF (Shweiki et al., 1995; Rak et al., 1995) y como tal, una molécula reguladora-reductora utilizada por el método de este invento sería capaz de extravasarse eficientemente desde vasos sanguíneos tumorales, pero mucho menos eficientemente desde vasos sanguíneos estabilizados normales.

#### **Reguladores-impulsadores**

**[0146]** Varios métodos pueden ser utilizados para incrementar los niveles de oxidasa de lisilo y como tales para mejorar la formación de los vasos sanguíneos.

**[0147]** Por ejemplo, una estructura de ácido nucleico que incluye a un promotor específico constitutivo o inducible o de tejidos posicionado corriente arriba de un polinucleótido que codifica a un polipéptido que tiene una actividad de oxidasas de lisilo, tal como él polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, 3, 6, 8 o 9 puede ser administrado en un tejido de mamíferos. La oxidasa del lisilo expresada a partir de esta estructura incrementaría sustancialmente los niveles de oxidasa de lisilo dentro de las células del tejido y como tal mejoraría la angiogénesis.

**[0148]** Los segmentos de polinucleótidos que codifican a la oxidasa de lisilo pueden estar ligadas a un vector de expresión disponible comercialmente. Un vector de expresión como esos incluye a una secuencia promotora para dirigir la transcripción de la secuencia de poli nucleótidos en la célula en una forma constitutiva o inducible. Un promotor adecuado puede ser, por ejemplo, un promotor de Tie-2 que es capaz de dirigir a la expresión genética específica de la oxidasa de lisilo en células endoteliales (refiérase a Schlaeger, T.M., Bartunkova, S., Lawitts, J.A., Teichmann, G., Risau, W., Deutsch, U., y Sato, T.N. (1997). Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice (Expresión genética específica uniforme de células endoteliales vasculares en ratones transgénicos embrionarios y adultos). Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 94, 3058-3063). El vector de expresión de este invento puede incluir además a secuencias adicionales de polinucleótidos tales como por ejemplo, secuencias que codifican a marcadores de selección o a polipéptidos de portadores, secuencias que codifican al origen de replicación en bacterias, secuencias que permiten la interpretación de algunas proteínas a partir de un sólo ARNm tal como un lugar interno de entrada de ribosomas (IRES - internal ribosome entry site), secuencias para la integración genómica de la región que codifica al polipéptido promotor quimérico y/o secuencias incluidas generalmente en el vector de expresión de mamíferos tales como pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que son disponibles de Invitrogen, pCI que es disponible de Promega, pBK-RSV y pBKCMV que es disponible de Strategene, pTRES que es disponible de Clontech, y sus derivados.

**[0149]** Será apreciado que aquellos sistemas de vectores disponibles comercialmente pueden ser modificados fácilmente por medio de técnicas recombinantes usadas comúnmente para reemplazar, duplicar o mutar a secuencias promotoras o mejoradoras existentes y/o introducir a cualquier secuencia adicional de polinucleótidos.

**[0150]** Un agente capaz de regular a una oxidasa de lisilo también podría ser cualquier compuesto que sea capaz de incrementar la transcripción y/o la interpretación de un ADN o un ARNm endógeno que codifica a una oxidasa de lisilo utilizando, por ejemplo, a técnicas genéticas de "desactivación".

**[0151]** Elementos mejoradores pueden ser "colocados" en forma adyacente a secuencias codificadoras endógenas de oxidasas de lisilo para, incrementar, por lo tanto, a la transcripción desde ahí.

**[0152]** Detalles adicionales en relación a la construcción y al uso de estructuras de desactivación y de inserción son suministradas en otros documentos [Fukushige S. y Ikeda, J.E. Trapping of mammalian promoters by Cre-lox site-

specific recombination (Atrapando a promotores mamíferos mediante la combinación específica del lugar Cre-lox. DNA (ADN) Res 3 (1996) 73-80; Bedell, M.A., et al. Mouse models of human disease (Modelos de ratones de enfermedades humanas). Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice (Parte I: Técnicas y recursos para análisis genético en ratones). Genes and Development (Genes y Desarrollo) 11 (1997) 1-11; Bermingham, J.J., et al. Tst-I/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration (Tst-I/Oct-6/SCIP regula a un paso único en la mielinización periférica y es requerida para una respiración normal). Genes Dev 10 (1996) 1751-62].

**[0153]** Será apreciado que la administración directa de un polipéptido que muestra una actividad de oxidasa de lisilo también puede ser utilizada para mejorar la angiogénesis.

**[0154]** Por lo tanto, ensayos de enlaces de afinidad y/o ensayos de actividad, principios de los cuales son bien conocidos en la industria, pueden ser utilizados para examinar y detectar compuestos nuevos (por ejemplo, análogos de sustratos) que pueden regular específicamente a la actividad de una oxidasa de lisilo y como tales, pueden ser utilizados con este invento.

**[0155]** Un ensayo adecuado para su uso con este aspecto ha sido descrito previamente en un estudio realizado por Bedell-Hogan et al., 1993.

**[0156]** Tal como se mostró claramente en la sección de ejemplos a continuación, este estudio también correlaciona a los niveles de expresión de LOR-1 con las propiedades metastásica de las líneas celulares derivadas de cáncer a la mamá, indicando que LOR-1 podría jugar roles adicionales en la capacidad invasiva tumoral en la adición a su rol en la angiogénesis.

**[0157]** Por lo tanto, esta presentación también suministra un método para inhibir la metástasis y/o la fibrosis en el tejido de mamíferos. El método es efectuado al administrar a mamíferos una molécula capaz de regular y reducir a un nivel de tejidos y/o la actividad de por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo.

**[0158]** El método de esta presentación puede ser utilizado para tratar a pacientes humanos que han sido diagnosticados con cáncer, al administrar cualquiera de las moléculas reguladoras-reductoras descritas en secciones anteriores de este documento, para reducir el nivel de tejidos y/la actividad de por lo menos un tipo de una oxidasa de lisilo.

**[0159]** Tal como se utiliza en este documento, la frase "tumor cancerígeno" se refiere a cualquier tumor maligno dentro del cuerpo humano incluyendo, pero sin limitarse a, tumores con metástasis. Adicionalmente, y sin atarse a ningún tipo particular cancerígeno, este invento es útil para tumores de cáncer a la mamá, con o sin metástasis.

**[0160]** Tal como se utiliza en este documento, la frase "administrar" se refiere a todas las modalidades de administración descritas en secciones posteriores de este documento en relación a las composiciones farmacéuticas de este invento.

**[0161]** Esto incluye, pero no se limitan a, la administración local en el tejido tumoral, un órgano donde el tumor cancerígeno fue diagnosticado y/o tejidos relacionados que comúnmente forman metástasis [Hortobagyi, 2002, Semin Oncol 29 (3 Suppl 11): 134-44; Morrow y Gradishar, 2002, 324: 410-4]. Ejemplos de tejidos relacionados incluyen a nódulos linfáticos adyacentes, por ejemplo, el tejido de la mama y los huesos.

**[0162]** La administración puede ser efectuada en una forma sistémica para tratar al tejido afectado, es decir, el tejido en el cual se formó el tumor cancerígeno y donde la metástasis está presente o es posible que sea formada como una progresión tumoral.

**[0163]** Puesto que cualquier partícula capaz de regular-reducir una actividad de oxidasa de lisilo puede ser utilizada por los métodos descritos anteriormente en este documento, este invento suministra un método para identificar moléculas capaces de inhibir la metástasis y/o la fibrosis.

**[0164]** Este método es efectuado al examinar e identificar moléculas que muestran una actividad específica con por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo y probar el potencial inhibitorio de metástasis y/o fibrosis de estas moléculas.

**[0165]** Muchos tipos de moléculas pueden ser examinados para detectar la actividad de por lo menos un tipo de oxidasa de lisilo. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como los oligonucleótidos antisentido, el ARNip, las ADNzimas, las ribozimas y oligonucleótidos que forman hélices triples (TFOs – triple helix forming oligonucleotides) que interactúan con polinucleótidos que expresan a una actividad de oxidasa de lisilo, moléculas tales como anticuerpos que interactúan con polipéptidos y que expresan una actividad de oxidasa de lisilo. Adicionalmente, péptidos cortos y otras moléculas pequeñas pueden ser examinadas por este método de este invento.

**[0166]** La examinación de una reactividad transversal puede efectuarse mediante ensayos de actividad enzimática de oxidasa de lisilo, por medio de ensayos de fase y similares. Ejemplos de ensayos adecuados son suministrados por Rodríguez et al., 2002, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1409-14; Wilson y Nock, 2002, *Curr Opin Chem Biol* 6: 81-5; Uetz, 2002, *Curr Opin Chem Biol* 6: 57-62; Stoll et al., 2002, *Front (frente) Biosci* 2002 7: c13-32).

**[0167]** Las pruebas de fenotipos metastásicos de células tumorales transformadas pueden realizarse in vitro puesto que casi todos los pasos del proceso metastásico, incluyendo la adherencia, la degradación matricial y la migración, pueden ser modeladas experimentalmente in vitro al medir la invasión de una membrana basal reconstituida (RBM - reconstituted basement membrane). La capacidad invasiva metastásica de la célula tumoral puede ser modelada por medio de la migración de células tumorales a la membrana basal reconstituida (RBM - reconstituted basement membrane) en la presencia y en la ausencia de quimio-atrayentes, tales como el medio acondicionado de fibroblastos (FCM - fibroblast conditioned medium). El ensayo determina las células que se han adherido a la RBM, que han degradado enzimáticamente a la RBM y, finalmente, las células que han penetrado al lado del FCM de la membrana.

**[0168]** Puesto que los eventos de metástasis in vitro corresponden a pasos observados en la propagación metastásica de células tumorales a través de la membrana basal in vivo, la capacidad invasiva in vitro de las células puede ser evaluada en ensayos por los métodos descritos en Albini et al., 1987 *Cancer Research (Investigación del Cáncer)* 47: 3239-3245. Ensayos de la capacidad invasiva y otros métodos para evaluar a los efectos metastásicos, son descritos en Leyton et al., 1994 *Cancer Research (Investigación del Cáncer)* 54: 3696-3699. Preparaciones de la membrana basal reconstituida para su uso de acuerdo a los ensayos mencionados en secciones posteriores de este documento son encontradas fácilmente de muchos proveedores comerciales. Un ejemplo adecuado de una membrana en este sentido es "MATRIGEL" disponible de Collaborative Biomedical Products de Bedford, MA.

**[0169]** La evaluación in vitro de fenotipos metastásicos celulares tumorales también puede efectuarse al determinar el nivel y el patrón de la expresión de uno o más marcadores asociados metastásicos tales como los marcadores de proteasas, los cuales se considera que son una parte integral de la metástasis tumoral (refiérase a la patente de Estados Unidos número: 6,303,318). Un ejemplo es el ácido araquidónico, liberación del cual puede servir en las células para indicar un potencial metastásico de un tumor (patente de Estados Unidos número 6,316,416). En este sentido, determinar la actividad de la fosfolipasa A-2 (PLA2), y la actividad o abundancia de factores que afectan a la actividad de PLA2, tales como la proteína uteroglobina (patente de Estados Unidos número 6,316,416) puede servir como una indicación de una metástasis potencial.

**[0170]** Determinar el patrón y el nivel de expresión de los marcadores asociados con la metástasis puede ser efectuado por uno de algunos métodos conocidos en la industria.

**[0171]** La presencia o el nivel de proteínas indicadoras del potencial metastásico tumoral puede determinarse en las células por medio de métodos convencionales bien conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria. Por ejemplo, las técnicas para elaborar y usar reactivos de anticuerpos y otros reactivos inmunológicos y para detectar proteínas específicas en muestras utilizando a aquellos reactivos se define en protocolos actuales de inmunología, Coligan et al., Eds., John Wiley & Sons, Nueva York (1995). En forma de otro ejemplo, los métodos inmunohistoquímicos para determinar las proteínas en las células en tejidos son descritos en el volumen 2, capítulo 14 de *current protocols in molecular biology (protocolos actuales de biología molecular)*, Ausubel et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc. (1994). Finalmente, Linnoila et al., *A.J.C.P.* 97(2): 235-243 (1992) y Peri et al., *J. Clin. Invest.* 92: 2099-2109 (1992), incorporadas este documento tal como se mencionó anteriormente, describen técnicas que podrían necesitarse, parcialmente, en este aspecto del invento.

**[0172]** El potencial metastásico también puede ser determinado in vivo a nivel de ARNm. La presencia y/o el nivel de transcripciones de ARNm puede determinarse por medio de una variedad de métodos conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria. Un ARNm específico podría ser detectado en células por medio de la hibridación de una sonda específica. Aquellas sondas podrían ser clonadas de ADNs o sus fragmentos, ARNs elaborados comúnmente por medio de transcripciones in vitro, o sondas de oligonucleótidos, usualmente generadas por medio de la síntesis de fases sólidas. Los métodos para generar y utilizar sondas adecuadas para hibridaciones específicas son conocidas y utilizadas normalmente.

**[0173]** Una variedad de controles podría ser implementada útilmente para mejorar la precisión de los ensayos de detección de ARNm. Por ejemplo, muestras podrían ser hibridadas a una sonda irrelevante y tratadas con ARNs A antes de su hibridación, para evaluar e hibridaciones falsas.

**[0174]** Para modular la angiogénesis o inhibir la metástasis o la fibrosis tumoral, las moléculas utilizadas por esta presentación pueden ser administradas al individuo en sí, o una composición farmacéutica donde se mezcla con portadores o excipientes adecuados.

**[0175]** Tal como se utiliza en este documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más ingredientes activos aquí descritos con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es el facilitar la

administración/orientación de un compuesto.

5 **[0176]** Tal como se utiliza en este documento, el término “ingredientes activos”, se refiere a la preparación a cargo del efecto biológico, es decir, las moléculas reguladoras-impulsadora/reguladoras-reductoras utilizadas por este invento para modular la angiogénesis y las moléculas reguladoras-reductoras utilizadas por esta presentación para inhibir la metástasis y fibrosis tumoral.

10 **[0177]** En secciones posteriores de este documento, las frases “portador fisiológicamente aceptable” y “portador farmacéuticamente aceptable” son intercambiablemente usadas para referirse a un portador, tal como, por ejemplo, un liposoma, un virus, una micela, una proteína, o un diluyente que no causan una irritación significativa al mamífero y que no contrarrestan a la actividad biológica y propiedades del ingrediente activo. Un adyuvante está incluido bajo estas frases.

15 **[0178]** En este documento, el término “excipientes” se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, no limitantes de excipientes, incluyen al carbonato de calcio, el fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidones, derivados de celulosa, gelatinas, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

20 **[0179]** Las técnicas para la formulación y administración de composiciones podrían encontrarse en la edición más reciente de "Remington's Pharmaceutical Sciences" ("Ciencias Farmacéuticas de Remington") Mack Publishing Co., Easton, PA,

25 **[0180]** Rutas adecuadas de administración podrían, por ejemplo, incluir a entregas orales, rectales, transmucosa, transnasales, intestinales o parenterales, incluyendo a inyecciones intramusculares, subcutáneas intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

30 **[0181]** Para inyecciones, los ingredientes activos de la presentación podrían ser formulados en soluciones acuosas, preferiblemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer, o a amortiguadores de sales fisiológicas. Para la administración transmucosa, penetrantes apropiados para la barrera que debe ser permeada son utilizados en la formulación. Aquellos penetrantes son generalmente conocidos en la industria.

35 **[0182]** Para la administración oral, sus compuestos pueden ser formulados fácilmente al combinar al ingrediente activo con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la industria. Aquellos portadores permiten al ingrediente activo del invento ser formulado en forma de tabletas, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, sustancias espesas, suspensiones y similares, para la ingestión oral de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para su uso oral pueden ser hechas utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando a la mezcla resultante, y procesando a la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados, si fuese deseado, para obtener núcleos de tabletas o grageas. Excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo a la lactosa, la sacarosa, el manitol o el sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, el almidón de maíz, el almidón de trigo, el almidón de arroz, el almidón de papa, la gelatina, el tragacanto en forma de goma, la celulosa de metilo, la hidroxipropilmetilcelulosa, la carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como la polivinilpirrolidona (PVP). Si fuese deseado, podrían agregarse agentes desintegradores, tales como la pirrolidona de polivinilo enlazada transversalmente, la agarosa, el ácido algínico o una de sus sales tales como el alginato de sodio.

50 **[0183]** Núcleos de grageas son suministrados con coberturas adecuadas. Para este propósito, soluciones azucaradas concentradas podrían ser utilizadas las cuales podrían contener opcionalmente a arábica, talco, y pirrolidona de polivinilo, gel de carbopol, glicol de polietileno, dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos adecuados o ésteres de solventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a las tabletas o a los recubrimientos de grageas para identificar o para caracterizar a combinaciones diferentes de dosis de compuestos activos.

55 **[0184]** Las composiciones farmacéuticas, que pueden ser utilizadas oralmente, incluyen a cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas suaves selladas hechas de gelatina y un plastificador, tal como glicerol y sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión podrían contener a ingredientes activos en una mezcla con rellenos tales como la lactosa, enlazadores tales como almidones, lubricantes tales como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas suaves, los ingredientes activos podrían disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o glicoles de polietileno líquidos. Adicionalmente, se podrían agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para administraciones orales deberían ser en dosis adecuadas para la ruta escogida de administración.

60 **[0185]** Para una administración bucal, las composiciones podrían tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas en una forma convencional.

- 5 **[0186]** Las preparaciones aquí descritas podrían ser formuladas para su administración parenteral, por ejemplo, por medio de bolos intravenosos o infusiones continuas. Las formulaciones para inyecciones podrían ser presentadas en formas de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosis múltiples con, opcionalmente, un conservante agregado. Las composiciones podrían ser suspensiones, soluciones o emulsiones en portadores de aceites o acuosos, y podrían contener agentes de fórmulas tales como agentes suspensores, estabilizadores y/o dispersores.
- 10 **[0187]** Las composiciones farmacéuticas para su administración parenteral incluyen a soluciones acuosas de la preparación activa en una forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de ingredientes activos podrían ser preparadas como suspensiones apropiadas para inyecciones que se basan en aceites o agua. Los solventes o portadores hidrofílicos adecuados incluyen a aceites grasos tales como el aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como el oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Suspensiones de inyecciones acuosas podrían contener a sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como la celulosa de carboximetilo de sodio, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión también podría contener a estabilizadores o agentes adecuados que incrementen la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.
- 15 **[0188]** Alternamente, el ingrediente activo podría estar en la forma de polvo para su constitución antes de su uso con un portador adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos que se basa en la solución.
- 20 **[0189]** La preparación de esta presentación también podría ser formulada en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, por ejemplo, bases convencionales de supositorios tales como la manteca de cacao u otros glicéridos.
- 25 **[0190]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de esta presentación incluyen a composiciones donde los ingredientes activos están contenidos en un monto efectivo para lograr el propósito deseado.
- 30 **[0191]** La composición farmacéutica podría formar parte de un artículo de fabricación que también incluye a un paquete material para contener a la composición farmacéutica y un folleto que suministra instrucciones para el uso de la composición farmacéutica.
- 35 **[0192]** Por lo tanto, esta presentación suministra un método y composiciones farmacéuticas útiles para modular la angiogénesis.
- 40 **[0193]** Aquella actividad de modulación puede ser utilizada para tratar a la artritis (Koch, 1998; Paleolog y Fava, 1998), a la retinopatía diabética (Miller et al., 1997), la psoriasis (Detmar et al., 1994; Creamer et al., 1997) y la vasculitis (Lie, 1992; Klipple y Riordan, 1989).
- 45 **[0194]** Adicionalmente, esta presentación también puede ser utilizada para tratar enfermedades caracterizadas por vasos sanguíneos frágiles, incluyendo el síndrome de Marfans, Kawasaki, Ehlers-Danlos, cutis-laxa, y takysu (Lie, 1992; Klipple y Riordan, 1989; Brahn et al., 1999; Cid et al., 1993; Hoffman et al., 1991).
- 50 **[0195]** Es posible que algunas de estas enfermedades resulten de una actividad de oxidasa de lisilo reducida o abolida que conlleva a la síntesis de una matriz extracelular frágil, y consecuentemente, generen a vasos sanguíneos frágiles.
- 55 **[0196]** Como tal, la administración de secuencias o polipéptidos que codifican a oxidasas de lisilo pueden ser utilizadas para corregir algunas de las manifestaciones de estas enfermedades.
- 60 **[0197]** Esta presentación puede ser utilizada para tratar a enfermedades que son caracterizadas por cambios de las paredes de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, la restenosis que es una complicación común después de la angioplastia, la displasia de fibra muscular (Begelman y Olin, 2000) y la estenosis aórtica (Palta et al., 2000) son todas potencialmente tratables por el método de esta presentación.
- 65 **[0198]** Adicionalmente, tal como se ilustró en la sesión de ejemplos más adelante, el LOR-1 es expresado más altamente en tumores y líneas celulares metastásicas que en tumores y líneas celulares que no son metastásicas (figuras 3, 9 y 13). Esto sugiere que los niveles de expresión de LOR-1 también pueden ser utilizados como una herramienta de diagnóstico para determinar la malignidad de las células cancerígenas, así como, para determinar e implementar regímenes adecuados de tratamiento.
- [0199]** El cáncer al colon es altamente tratable y a menudo es una enfermedad curable cuando está ubicado en el intestino. Sin embargo, en muchos casos, debido al diagnóstico erróneo, una hiperplasia pre-maligna del colon progresa a un adenoma del colon que se desarrolla aún más en formas malignas de adenocarcinoma del colon de bajo y alto nivel. Una vez que el individuo es diagnosticado con cáncer del colon la malignidad del tumor necesita ser evaluada para seleccionar regímenes adecuados de tratamiento. La práctica actual para evaluar la malignidad

- del tumor del colon se basa en el sistema de determinación de etapas de la metástasis del nódulo tumoral (TNM - tumor-node-metastases) desarrollado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC - Comité Conjunto Americano del Cáncer). De acuerdo a este método la evaluación de la etapa se basa en un puntaje para detectar la presencia o ausencia de células cancerígenas en el tumor en sí, en la sub - mucosa de la pared intestinal, en la capa muscular de la pared intestinal (muscularis propria), y/o en la subserosa, en tejidos pericólicos o perirectales, así como en los nodos linfáticos regionales y metástasis distantes. Por lo tanto, la evaluación de las etapas de los tumores del colon involucra varias biopsias de tejidos y evaluaciones patológicas complejas que consumen tiempo y pueden resultar en diagnósis erróneas.
- 5
- 10 **[0200]** Mientras que se plasma este invento a la práctica, estos inventores han descubierto que la expresión de LOR-1 en células de tejidos epiteliales y/o conectivos en un tejido del colon es un indicador de un cáncer maligno del colon suministrando, por lo tanto, un nuevo método para evaluar una malignidad de los tumores de cáncer al colon desprovisto de las limitaciones que se acaban de mencionar.
- 15 **[0201]** Tal como se describe en el ejemplo 3 de la sección de ejemplos más adelante, la expresión de LOR-1 es correlacionada con la formulación de los tumores benignos del colon (figura 14b) y se incrementa en formas más malignas de tumores de cáncer al colon (figuras 14c y 14d) sugiriendo, por lo tanto, el uso de LOR-1 para determinar la etapa de los tumores de cáncer al colon.
- 20 **[0202]** Por lo tanto, de acuerdo a otro aspecto de este invento se suministra un método para evaluar la malignidad de un tumor de colon. El método es efectuado al determinar un nivel en tejidos y/o un nivel de actividad de un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2 en el tejido tumoral de colon, evaluando, por lo tanto, la malignidad del tumor del colon.
- 25 **[0203]** Tal como es utilizado en este documento, la frase "evaluar una malignidad de un tumor del colon" se refiere a determinar la etapa del tumor del colon, es decir, el progreso del tumor del colon a partir de un tumor de colon benigno a un cáncer de colon altamente maligno que invade a los tejidos adyacentes.
- 30 **[0204]** El polipéptido detectado por esta presentación es por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% homólogo a la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO 2 o 9, tal como es determinado utilizando el software BestFit del paquete de análisis secuencial de Wisconsin, utilizando el algoritmo de Smith y Waterman, donde la penalidad por creación de vacíos es igual a 8 y penalidad por extensión de vacíos es igual a 2.
- 35 **[0205]** Preferiblemente, el polipéptido de este invento es LOR-1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2), un miembro de la familia de oxidasas de lisilo el cual es descrito completamente en secciones anteriores de este documento.
- 40 **[0206]** De acuerdo al método de este invento, un tejido tumoral de colon es obtenido utilizando una biopsia de colon y/o una cirugía de colon utilizando métodos conocidos en la industria. Una vez obtenido, el nivel de tejidos y/o el nivel de actividad del polipéptido de este invento se determina en el tejido tumoral de colon.
- 45 **[0207]** La determinación del nivel de tejidos del polipéptido de este invento podría lograrse directamente utilizando a métodos inmunológicos.
- 50 **[0208]** Estos métodos de detección inmunológica utilizados en el contexto de este invento son explicados completamente en, por ejemplo, "Using Antibodies: A Laboratory Manual" ("Utilizando Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio") (Ed Harlow, David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)) y aquellas personas con conocimiento en la industria serán capaces de implementar las varias técnicas resumidas en partes posteriores de este documento como parte de este invento. Todas las técnicas inmunológicas requieren anticuerpos específicos para por lo menos un epítipo del polipéptido de este invento. Los métodos de detección inmunológica adecuados para el uso como parte de este invento incluyen, pero no se limitan a, radio-inmunoensayos (RIA), ensayos de inmunoabsorbencia enlazada a enzimas (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay), western blots, análisis inmunohistoquímicos.
- 55 **[0209] Radio-inmuno ensayos (RIA):** en una versión, este método involucra la precipitación del sustrato deseado, por ejemplo, LOR-1, con un anticuerpo específico y la proteína que se enlaza al anticuerpo marcado radiológicamente (por ejemplo, proteína A marcada con I125) inmovilizadas en un portador que puede precipitarse tal como micropartículas de agarosa. El número de recuentos en el pellet precipitado es proporcional al monto del sustrato.
- 60 **[0210]** En una versión alterna de RIA, un sustrato marcado y una proteína enlazadora de anticuerpos que no fueron marcados son utilizados. Una muestra que contiene a un monto desconocido del sustrato es agregada en montos variados. La reducción en los recuentos de precipitaciones provenientes del sustrato marcado es proporcional al monto del sustrato en la muestra agregada.
- 65

**[0211] Ensayo de inmunoabsorbencia enlazada a enzimas (ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay):**

Este método involucra la fijación de una muestra (por ejemplo, células fijadas o una solución proteínica) que contienen a un sustrato proteínico (por ejemplo, LOR-1) a una superficie tal como un pozo de una placa de micro-titulación. Un anticuerpo específico del sustrato acoplado a una enzima es acoplado y se le permite enlazarse al sustrato. La presencia del anticuerpo es detectada entonces y cuantificada por medio de una reacción colorimétrica utilizando a la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas que son utilizadas comúnmente en este método incluyen a la peroxidasa de rábano y a la fosfatasa alcalina. Si se encuentra bien calibrado y dentro del rango lineal de respuesta, el monto del sustrato presente en la muestra será proporcional al monto del color producido. Un estándar del sustrato es generalmente utilizado para mejorar la precisión cuantitativa.

**[0212] Análisis de western blots:** Este método involucra la separación de un sustrato (por ejemplo, la proteína LOR-1) a partir de otras proteínas por medio de un gel de acrilamida seguido por una transferencia del sustrato a una membrana (por ejemplo, nylon o PVDF). La presencia del sustrato es detectada entonces por anticuerpos específicos al sustrato, que son, a su vez, detectados por reactivos enlazadores de anticuerpos. Los reactivos enlazadores de anticuerpos podrían ser, por ejemplo, la proteína A, u otros anticuerpos. Los reactivos enlazadores de anticuerpos podrían ser marcados radiológicamente o enlazados a enzimas tal como es descrito en secciones anteriores de este documento. La detección podría ser por medio de una auto-radiografía, una reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite la cuantificación de un monto de un sustrato y la determinación de su identidad por medio de una posición relativa en la membrana que es indicadora de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

**[0213] Análisis inmunohistoquímico:** Este método involucra la detección de un sustrato in situ en un tejido fijo por medio de anticuerpos específicos del sustrato. Los anticuerpos específicos del sustrato podrían ser enlazados con enzimas o enlazados a fluoróforos. La detección es determinada por medio de microscopio y evaluaciones subjetivas. Si se utilizan anticuerpos enlazados a enzimas, una reacción colorimétrica podría ser requerida.

**[0214]** Puesto que los niveles de tejido de un polipéptido pueden ser inferidos a partir de los niveles de ARNm que codifican a dicho polipéptido, el método de acuerdo a este aspecto de este invento también puede utilizar varios métodos de detección de oligonucleótidos para determinar el nivel de tejidos del polipéptido de este invento.

**[0215]** Las moléculas de ARN también pueden ser detectadas utilizando métodos conocidos en la industria incluyendo, por ejemplo, el análisis de Northern blot, análisis de RT-PCR, coloración de hibridación in situ de ARN y coloración in situ de RT-PCR.

**[0216] Análisis de Northern blot:** Este método involucra la detección de un ARN específico (por ejemplo, la molécula ARN que codifica a LOR-1) en una mezcla de ARNs. Una muestra de ARN es desnaturalizada por medio de un tratamiento con un agente (por ejemplo, formaldehído) que previene los enlaces de hidrógeno entre las parejas base, asegurando que todas las moléculas de ARN tengan una conformación lineal y desplegada. Las moléculas individuales de ARN son separadas entonces de acuerdo al tamaño por medio de electroforesis de gel y son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o a una membrana que se basa en nylon a la cual se adhieren las ARNs desnaturalizadas. La membrana es expuesta entonces a sondas marcadas de ADN. Las sondas podrían ser marcadas utilizando nucleótidos enlazados por radio-isótopos o enzimas. La detección podría usar a auto-radiografía, reacciones colorimétricas o quimioluminiscencia tal como se describe en secciones anteriores de este documento. Este método permite la cuantificación de un monto de moléculas particulares de ARN y la determinación de su identidad por medio de una posición relativa en la membrana que es indicadora de una distancia de migración en el gel durante la electroforesis.

**[0217] Análisis RT-PCR:** Este método utiliza amplificaciones PCR de moléculas de ARNs relativamente raras. Primero, las moléculas de ARN de un tejido específico (por ejemplo, un tejido tumoral de colon) son purificadas y convertidas a ADN complementario (ADNc) utilizando una enzima transcriptasa en reversa (tal como una MMLV-RT) y cebadores tales como el oligo dT, hexámeros aleatorios o cebadores genéticos específicos, todos los cuales están disponibles de Invitrogen Life Technologies, Frederick, MD, Estados Unidos de América. Entonces al aplicar a los cebadores genéticos específicos y a la polimerasa de ADN de Taq, una reacción de amplificación PCR es ejecutada en una máquina PCR. Aquellas personas con conocimiento en la industria son capaces de seleccionar la longitud y la secuencia de los cebadores genéticos específicos y las condiciones PCR (es decir, las temperaturas de recosido, el número de ciclos y similares) las cuales son adecuadas para detectar moléculas específicas de ARN.

**[0218] Coloración de hibridación in situ de ARN:** En este método sondas de ADN o de ARN son adheridas a las moléculas de ARN que están presentes en el tejido. Generalmente, una muestra de tejidos (por ejemplo, un tejido de colon) es fijada para preservar su estructura y prevenir que el ARN sea degradado y luego es seccionado para el microscopio y colocado en una diapositiva. Alternamente, las muestras congeladas de tejidos pueden ser seccionadas primero y puestas en una diapositiva y luego sujetas a una fijación antes de la hibridación. Las condiciones de hibridación incluyen a reactivos tales como formamida y sales (por ejemplo, cloruro de sodio y citrato de sodio) que permiten la hibridación específica de las sondas de ADN o de ARN con sus moléculas objetivo de ARNm in situ mientras que se evita enlaces no específicos de las sondas. Aquellas personas con conocimiento en la industria son capaces de ajustar las condiciones de hibridación (es decir, la temperatura, la concentración de las



sales y de la formamida y similares) a sondas y tipos celulares específicos. Después de la hibridación, cualquier sonda no enlazada es lavada y cada diapositiva de sujeta a una emulsión fotográfica que revela las señales generadas utilizando sondas radio-marcadas o a una reacción colorimétrica que revela las señales generadas utilizando sondas marcadas enlazadas a enzimas tal como fue descrito en secciones anteriores de este documento.

**[0219] Coloración RT-PCR in situ:** Este método es descrito en Nuovo GJ, et al. (Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA (Localización intracelular de la reacción en cadena de polimerasa (PCR - polymerase chain reaction)-ADNc amplificado de la hepatitis C). Am J Surg Pathol. 1993, 17: 683-90) y Komminoth P, et al. [Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR (Evaluación de métodos para la detección del virus de la hepatitis C en biopsias de archivo de hígado. Comparación de histología, inmunohistoquímica, hibridación in situ, reacción en cadena de polimerasas de transcriptasas en reversa (RT-PCR - reverse transcriptase polymerase chain reaction) y RT-PCR in situ). Pathol Res Pract. 1994, 190: 1017-25]. Brevemente, la reacción RT-PCR es realizada en secciones de tejidos fijados al incorporar a nucleótidos marcados en la reacción PCR. Las reacciones son ejecutadas utilizando aparatos RT-PCR in situ tales como el sistema PixCell I LCM de micro disección de capturas disponible de Arcturus Engineering (Mountainview, CA).

**[0220]** La determinación de un nivel de actividad del polipéptido de este invento (por ejemplo, LOR-1) en un tejido tumoral de colon puede realizarse utilizando sustratos adecuados en una coloración citoquímica y/o ensayos de actividad in vitro.

**[0221] Coloración citoquímica:** De acuerdo a este método, un sustrato cromogénico es aplicado al tejido tumoral de colon que contiene a una enzima activa (por ejemplo, LOR-1). La enzima cataliza a una reacción en la cual el sustrato es descompuesto para producir a un producto cromogénico visible por medio de luz o por medio de un microscopio fluorescente.

**[0222] Ensayos de actividades in vitro:** En estos métodos la actividad de una enzima específica es medida en una mezcla proteínica extraída del tejido de interés (por ejemplo, un tejido tumoral de colon). La actividad puede ser medida en un pozo espectrómetro utilizando métodos poliméricos (refiérase a, por ejemplo, Wande Li, et al. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells (Localización y actividad de la oxidasa de lisilo dentro de los núcleos de células fibrogénicas). Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América. 1997, 94: 12817-12822) o puede ser medida en un gel de acrilamida no desnaturalizado (es decir, un gel de actividad). Después de la electroforesis el gel es empapado en una solución que contiene un sustrato y reactivos colorimétricos. La banda manchada resultante corresponde a la actividad enzimática del polipéptido de interés (por ejemplo, LOR-1). Si está bien calibrado y dentro del rango lineal de respuesta, el monto de enzimas presentes en la muestra es proporcional al monto de color producido. Un estándar enzimático es utilizado generalmente para mejorar la precisión cuantitativa.

**[0223]** Una vez que el nivel de tejidos y/o el nivel de actividad del polipéptido (o ARNm) de este invento (por ejemplo, LOR-1) es determinado en el tejido tumoral de colon, la malignidad del tumor es evaluada al comparar el nivel de expresión y/o la actividad en el tejido tumoral de colon con aquel de un tejido normal de colon.

**[0224]** Se apreciará que el tejido normal de colon podría ser obtenido de una biopsia y/o una cirugía de un tejido de colon obtenido de un individuo saludable. Alternamente, el tejido normal de colon puede ser obtenido de un segmento no afectado del colon del mismo individuo. Los métodos de determinación del estado de un tejido normal de colon son conocidos para una persona con conocimiento en la industria e incluyen, por ejemplo, a una evaluación morfológica de las secciones del tejido.

**[0225]** Una vez que la malignidad del cáncer de colon es determinada tal como se describió anteriormente, el nivel de tejidos y/o el nivel de actividad del polipéptido (o su ARNm) de acuerdo a este invento también puede ser utilizado para determinar la etapa del tumor de colon y predecir, por lo tanto, la prognosis de un individuo diagnosticado con cáncer al colon.

**[0226]** Aquella determinación de etapas puede ser efectuada al evaluar al nivel de tejidos y/o al nivel de actividad del polipéptido y correlacionarlo con los resultados obtenidos que provienen del tejido cancerígeno del colon en varias etapas (obtenible a partir de la evaluación patológica de tumores del colon). Será una ventaja que aquella determinación precisa y rápida de la etapa permitirá una prognosis precisa y rápida para un individuo que padece de cáncer al colon y una administración a tiempo de un régimen adecuado de tratamiento.

**[0227]** Objetivos, ventajas y características nuevas adicionales de este invento se volverán aparentes para una persona con conocimiento normal en la industria después de examinar a los siguientes ejemplos, que no tiene la intención de ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las varias secciones y aspectos de este invento tal como se eligen en secciones posteriores de este documento y tal como se declara en la sección de reivindicaciones más adelante tienen su soporte experimental en los siguientes ejemplos.

**EJEMPLOS**

**[0228]** Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran el invento en una forma no limitante.

**[0229]** Generalmente, la nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en este invento incluyen a técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes de ADN. Aquellas técnicas son explicadas completamente en la literatura. Refiérase a, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" "Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio". Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" ("Protocolos Actuales en Biología Molecular") volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" ("Protocolos Actuales en Biología Molecular"), John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" ("Una Guía Práctica de Clonación Molecular"), John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA" ("ADN recombinante"), Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (Eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series" ("Análisis Genómico: Una Serie de Manuales de Laboratorio"), Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal como se establecen en las patentes de Estados Unidos números 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" ("Biología Celular: Un Manual de Laboratorio"), volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" ("Protocolos Actuales de Inmunología") volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (Eds), "Basic and Clinical Immunology" ("Inmunología Básica y Clínica") (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (Eds), "Selected Methods in Cellular Immunology" ("Métodos Seleccionados en Inmunología Celular"), W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmuno ensayos disponibles son descritos extensamente en la literatura de patentes y científica, refiérase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 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; "Oligonucleotide Synthesis" ("Síntesis de Oligonucleótidos") Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" ("Hibridación de Ácidos Nucleicos") Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" ("Transcripción e Interpretación") Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" ("Cultivo Celular Animal") Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" ("Células y Enzimas Inmovilizadas") IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" ("Una Guía Práctica de Clonación Molecular") Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" ("Métodos de Enzimología") Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications" ("Protocolos PCR: Una Guía para Métodos y Aplicaciones"), Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" ("Estrategias para la Purificación y Caracterización Proteínica - Un Manual de Curso de Laboratorio") CSHL Press (1996).

**[0230]** Otras referencias generales son suministradas a lo largo de este documento. Los procedimientos aquí descritos son considerados bien conocidos en la industria y son suministrados para la conveniencia del lector.

**EJEMPLO 1****EL ROL DE LOR1 EN LA ANGIOGÉNESIS**

**[0231]** Se realizó un estudio con el objetivo de sustanciar y caracterizar aún más el rol de LOR-1 en la angiogénesis.

**Materiales y métodos**

**[0232]** El factor 4 de plaquetas (PF4 - platelet factor-4) recombinantes humanas (acceso del GenBank (Banco Genético) número M20901) que fue producido en bacterias y fue re-plegado subsiguientemente fue suministrado por el Dr. Maione de Repligen Corp. (Boston, Estados Unidos de América). Las plaquetas de liberación lenta de estrógeno fueron obtenidas de Innovative Research of America, Sarasota, FL, Estados Unidos de América.

**[0233]** La construcción del vector de expresión de LOR-1, su transfección a células MCF-7, y su expresión: El ADNc de LOR-1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1) fue clonada a un vector de expresión pCDNA3.1-hygro (Invitrogen Inc., USA) bajo el control de un promotor CMV. Los clones de células que expresan a LOR-1 fueron seleccionados utilizando higromicina y fueron expuestos a ensayos para detectar la expresión de LOR-1 utilizando el antisuero policlonal descrito más adelante.

**[0234]** Construcción de columnas de afinidad del factor 4 de plaquetas y la purificación de LOR-1 en aquellas columnas: PF4 fue acoplado a sefarosa utilizando una modificación del método de Miron y Wilchek (Wilchek and Miron, 1982) tal como se describió previamente para el factor de crecimiento endotelial vascular (Soker et al., 1998). El medio acondicionado libre de sueros fue recolectado a partir de células MCF-7 marcadas con 35S-metionina que tenía una sobreexpresión de LOR-1. El medio acondicionado fue pasado a través de la columna 2 veces. La columna fue lavada con una sustancia salina amortiguada de fosfato (300 mM de NaCl, pH-7.2) y eluida con PBS (que contenía 2M de NaCl).

**[0235]** Experimentos con ratones desnudos: Células modificadas o parentales MCF-7 ( $10^7$  células por animal)

fueron implantadas bajo la piel de ratones desnudos. Un pellet de estrógeno de liberación lenta fue implantado con 1 cm de separación tal como se describió anteriormente (Zhang et al., 1995). Los tumores fueron medidos periódicamente, después de lo cual, tumores de por lo menos 1 cm de tamaño fueron removidos y analizados inmuno-histológicamente utilizando un anticuerpo comercial dirigido en contra de un antígeno similar al factor 8 que sirvió como un marcador específico para células endoteliales.

**[0236] Hibridación in situ:** Fragmentos que abarcan a los nucleótidos 922-1564 de LOR-1, a los nucleótidos 976-1391 de LOL, a los nucleótidos 400-950 de LO y a los nucleótidos 1061-1590 de LOR-2 (tal como son numerados a partir del codón ATG de estas secuencias) fueron sub-clonados cada uno independientemente en los vectores Bluescript SK y KS (Stratagene). Un botiquín de marcación de ARNc de DIG de Boehringer-Mannheim fue utilizado para transcribir a sondas de ARNc marcadas con digoxigenina sentido (s) y antisentido (as) provenientes del promotor T7 de las estructuras Bluescript. La emigración y la subsiguiente detección de las sondas hibridadas fueron ejecutadas esencialmente tal como se describió anteriormente (Cohen et al., 2001).

**[0237] Antisuero policlonal anti-LOR-1:** El antisuero fue generado al inyectar a un péptido recombinante que contenía a los 200 aminoácidos de la terminal C de LOR-1 (aminoácidos 540-744 de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2) en conejos hembra. El suero fue recolectado 10 días después de cada inyección y una fracción de inmunoglobulina fue purificada utilizando una columna de afinidades de sefarosa de la proteína A (Farmacia).

### Resultados

**[0238] Purificación LOR-1:** Una columna de afinidad de PF4 fue utilizada para detectar proteínas celulares endoteliales que interactúan específicamente con PF4.

**[0239]** 2 proteínas enlazadoras de PF4 fueron detectadas en un medio acondicionado de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC - human umbilical vein endothelial cells), mientras que las proteínas enlazadoras de PF4 no fueron detectadas en estratos detergentes de las células endoteliales.

**[0240]** 2 l del medio condicionado habilitaron una purificación parcial de una de aquellas proteínas enlazadoras que se eluyeron de la columna a concentraciones salinas relativamente altas (0.4-0.5 M de NaCl).

**[0241]** Purificaciones adicionales de esta proteína fueron realizadas utilizando cromatografía se líquidos de alta presión de fase en reversa y cromatografías SDS/PAGE. La proteína enlazadora de PF4 no se enlazo a la heparina ni fue un proteoglicano de heparán-sulfato puesto que la digestión de la heparinasa no pudo cambiar su movilidad en los experimentos de SDS/PAGE.

**[0242]** Una secuenciación parcial y una comparación en base de datos reveló que la proteína enlazadora de PF4 de este invento (LOR-1) pertenece a una familia de proteínas que contienen a dominios similares a los de la oxidasa de lisilo (Kim et al., 1995; Kim et al., 1999). Las oxidasas de lisilo son enzimas que dependen del cobre que participa en la síntesis de la matriz extracelular al catalizar la formación de enlaces covalentes entre las lisinas de fibras adyacentes de colágeno o elastina.

**[0243]** La secuencia de aminoácidos de longitud completa de LOR-1 (tal como se dedujo a partir de la secuencia aislada del ADNc) mostró un alto nivel de identidad con WS9-14, una proteína sobre-expresada en fibroblastos senescentes, en varios tipos de células madre (pero no en las células que no son adherente) y de fibroblastos, el cual se correlacionó con niveles de expresión del pro-colágeno I- $\alpha$ 1, así como su inducción mediante TGF- $\beta$  e inhibición mediante ésteres de forbol y el ácido retinoico (Saito et al., 1997).

**[0244] El rol de LOR-1 en el desarrollo tumoral:** El LOR-1 recombinante, expresado en las células PAE, se enlazo específicamente con la columna de afinidad PF4 (figura 1). Puesto que LOR-1 es un miembro de la familia LO, se desarrolló la hipótesis de que este participa en la formación de ECM durante la angiogénesis. Además, también se tenía la hipótesis de que PF4 suprime o inhibe la actividad pro-angiogénica de LOR-1, inhibiendo, por lo tanto, a su vez, las etapas posteriores de la formación de vasos sanguíneos y como resultado limitaría el crecimiento tumoral.

**[0245] Expresión de LOR-1:** Una hibridación in situ demostró que LOR-1 es expresada en una amplia variedad de tipos de tejidos y células incluyendo a los fibroblastos, a los adipocitos, a las células nerviosas, a las células endoteliales y a una variedad de células epiteliales. Algunos tipos celulares, tales como los hepatocitos de hígado, no expresaron a LOR-1; de los 4 miembros de la familia LO examinados (todos excepto LoxC) LOR-1 fue el único expresado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

**[0246] LOR-1 y el cáncer:** Tal como se muestra en la figura 2, se demostró una correlación directa entre los niveles de expresión de LOR-1 y las propiedades metastásicas de las líneas celulares derivadas del cáncer a la mama.

**[0247]** Puesto que las células epiteliales que alinean a los ductos lácteos del tejido mamario normal (a partir del cual surgen la mayoría de tumores a la mama) expresan montos grandes de LOR-1, es posible que las líneas menos

metastásicas pierdan la expresión de LOR-1 en vez de ganarla.

[0248] Para sustanciar su rol en la metástasis, el ADNc de LOR-1 fue expresado en cáncer a la mama no metastásico derivado de las líneas celulares MCF-7 que normalmente no expresan a LOR-1. La expresión de LOR-1 fue examinada utilizando anticuerpos policlonales de conejo generados tal como se describió anteriormente (figura 3).

[0249] Una línea celular de control fue transfectada con un vector de expresión vacío, y una línea celular de MCF-7 que expresa a LOR-1 fue implantada bajo la piel de ratones con deficiencia inmunológica junto con un pellet de liberación lenta de estrógeno tal como fue descrito anteriormente. El estrógeno fue agregado puesto que el desarrollo de tumores a partir de esta línea celular no metastásica depende del estrógeno (Mcleskey et al., 1993).

[0250] El índice de desarrollo tumoral en los ratones fue monitoreado continuamente (figura 4); se extirparon tumores de 1 cm de tamaño y estos fueron sujetos a análisis histológicos tal como se describió anteriormente. Interesantemente, la tasa de desarrollo tumoral vario entre las 2 líneas celulares, con algunos tumores que mostraban un crecimiento más lento en la MCF-7 que expresaban a LOR-1 y la otra que mostró un crecimiento más lento en las células de control.

[0251] Para superar los problemas de niveles de expresión, el ADNc de LOR-1 fue colocado bajo el control de un promotor inducido por la tetraciclina (el sistema TET-off – de destetado). Una estructura así permitirá determinar conclusivamente si la tasa reducida de crecimiento tumoral observada en células que expresan a LOR-1 en efecto es causada por LOR-1.

[0252] Los tumores que expresan montos grandes de LOR-1 fueron seccionados y colorados con un anticuerpo dirigido en contra del antígeno similar al factor 8, un marcador específico de células endoteliales. El tejido tumoral de control mostró marcaciones predominantemente en la cápsula alrededor del tumor mientras que los tumores que expresaban a LOR-1 tuvieron una coloración en las regiones internas del tejido tumoral (figura 5a y 5b respectivamente).

[0253] **El rol de LOR-1 en la enfermedad de Wilson y en otras enfermedades crónicas del hígado:** Tejido de hígado normal y enfermo fueron examinados con sondas LOR-1 sentido (figura 6a y 6v) y antisentido (figuras 6b y 6d). Los tejidos normales del hígado expresaron muy pocos niveles de LOR-1 (figura 6b). Sin embargo, los tejidos fibróticos de hígado tales como aquellos observados en los tejidos de la enfermedad de Wilson expresan niveles muy bajos de LOR-1 (figura 6d).

[0254] **Expresión de LOR-1 en embriones de pollos:** La figura 7 ilustra la expresión de LOR-1 del ARNm de LOR-1 en los vasos sanguíneos de un embrión de pollo en desarrollo. La hibridación de montaje completo in situ de embriones de pollo de 4 días de edad revelaron la expresión del ARNm de LOR-1 en los vasos sanguíneos ubicados en el amnios (flecha).

[0255] **La familia de oxidasas de lisilo:** Una comparación homológica entre 5 miembros de la familia de oxidasas de lisilo que incluye a las sub - familias LO y LOL y a las sub - familias LOR-1 y LOR-2 revelaron una fuerte homología en la porción de la terminal C que incluye al motivo conservado de oxidasa de lisilo. LOR-1 y LOR-2 se caracterizan por alargamientos largos en la terminal N los cuales no se encuentran en LO y LOL.

## **EJEMPLO 2**

### **CÉLULAS CANCERÍGENAS MAMARIAS MCF-7 EXPRESAN A LA PROTEÍNA 1 RECOMBINANTE RELACIONADA CON OXIDASAS DE LISILO (LOR-1) FORMAN TUMORES INVASIVOS QUE SE CARACTERIZAN POR FIBROSIS GRANDES**

[0256] Un estudio fue realizado para sustanciar y definir las características en más detalle del rol de LOR-1 para inhibir la metástasis y la fibrosis tumoral.

#### **Materiales y Métodos**

[0257] Pelletes de estrógeno (17 $\beta$ -estradiol, 0.72 mg/pellet, liberación de 60 días) provenientes de Innovative Research of America, FL, estados unidos de América. El botiquín de coloración Trichrome de Masson fue comprado de Bio-Optica (Milano, Italia), la transcriptasa en reversa, G418 fue comprada de GIBCO BRL (Reino Unido), la Higromicina B, el hidrocloreuro de tetraciclina, el botiquín de coloración de retículos verde rápido y rojo sirio (rojo directo 80) provinieron de Sigma (Estados Unidos de América), las enzimas de restricción, la ligasa T4 provinieron de New England Biolabs (Estados Unidos de América). El vector de expresión bacteriana pQE-30 y la columna de afinidad de níquel provinieron de Qiagen (Alemania), el 32p-dATP fue comprado de NEN (Estados Unidos de América). La anticitoqueratina-7 monoclonal (CAM 5.2) acoplada a FITC fue adquirida de Becton Dickinson (Estados Unidos de América), y la anti-vimentina monoclonal de ratón (clon V9) fue comprada de DAKO (Dinamarca). Los fosfatos alcalinos anti - FITC conjugados fueron comprados de ROCHE (Estados Unidos de América), los

amortiguadores de recuperación de antígenos de bloque CAS, de citrato y de EDTA provinieron de Zymed (Estados Unidos de América).

5 **[0258] Cultivo celular:** Células MCF-7 de cáncer a la mama fueron suministradas gentilmente por el Dr. Hadasa Degani (Weizmann Institute, Israel). La línea celular del cáncer a la mama MDA-MB-435 fueron suministradas gentilmente por el Dr. Israel Vlodavsky (Technion, Israel). Las células MDA-MB-231 fueron suministradas gentilmente por el Dr. Michael Klagsbrun (Harvard University, Estados Unidos de América). Estas líneas celulares fueron cultivadas rutinariamente en un medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con gentamicina, anfotericina, glutamina y un 10% de suero fetal de ternero (FCS - Fetal Calf Serum). Células endoteliales derivadas de venas umbilicales humanas fueron aisladas y cultivadas tal como se describió anteriormente (Neufeld y Gospodarowics, 1988). Medios de cultivos de tejidos, sueros y suplementos de cultivos celulares provinieron de Beth-Haemek Biological Industries, Israel, o de Gibco-BRL. Las células de destetado MCF-7 (Clontech, USA) que contenían al trans-activador de tetraciclina (tTa) fueron cultivadas en un medio de DMEM que contenía un 10% de suero fetal de ternero aprobado para el sistema Tet (Clontech), en la presencia de 100 µg/mililitros de G418, 150 µg/mililitros de Higromicina B y 1 µg/mililitro de tetraciclina.

20 **[0259] Clonación de la ADNc de LOR1 y LOR2:** El ARN total (4 µg) de células HUVEC (para LOR1) o células de melanoma (para LOR2) fueron transcritas en forma reversa utilizando a la transcriptasa en reversa MMLV (GIBCO BRL) tal como fue descrito anteriormente (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las ADNcs de LOR-2 fueron amplificadas utilizando al sistema de PCR Expand Long High Fidelity (ROCHE) y a las siguientes parejas de cebadores de amplificación: para LOR-1 las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS 10 y 11 y para LOR-2 las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 12 y 13. La ADNc de 2.3 kb de LOR-1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1) y el: 2.26KB de LOR-2 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4) fueron subclonadas al vector pGEMT Easy (Promega) por medio de un clonaje T-A.

25 **[0260] Generación de anticuerpos policlonales en contra del LOR1 humano:** Un fragmento de ADNc que contenía a los nucleótidos 1641-2253 de LOR1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 14) fue amplificado utilizando el botiquín de PCR Expand High Fidelity y una pareja de cebadores de amplificación (IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 15 y 16). El producto del PCR fue sub-clonado al vector pGEM-T Easy (Promega) mediante un clonaje T-A.

30 **[0261]** Un fragmento de ADNc de LOR1 de 613 bp (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 14) fue digerido con las enzimas y ligandos de restricción Sph-I y Hind III al vector de expresión bacteriana pQE-30, que agregó una secuencia en el marco referencial que codifica a una marcación de 6 histidina (6xHis) al extremo 5' de la inserción. El plásmido resultante fue utilizado para producir a un péptido recombinante de 23 kDa marcado con 6xHis (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 17). El péptido fue purificado de los extractos celulares bacterianos utilizando una cromatografía de afinidad de níquel, y se purificó aún más utilizando a SDS-PAGE. El gel fue electro-marcado en nitrocelulosa y la banda que contenía al péptido fue cortada de la marcación, se solubilizó en DMSO, y se utilizó para inmunizar conejos. El antisuero fue purificado en lo que se refiere a su afinidad en sefarsa proteínica seguido por una purificación de afinidad en una columna a la cual el péptido recombinante fue acoplado utilizando un método descrito previamente (Wilchek y Miron, 1982). El anticuerpo fue eluido a partir de la columna utilizando 0.1 M de glicina a un pH 3.

35 **[0262] Transfecciones:** Para expresar constitutivamente a LOR-1, la ADNc de longitud completa de LOR-1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1), fue digerida y expulsada por el vector pGEM-T easy (Promega) con Hind III y XbaI (que fueron incorporadas a los cebadores utilizados para la clonación de la ADNc de LOR1) y ligada al vector de expresión de mamíferos pcDNA3.1 Hygro (Invitrogen, EE.UU.) para generar al vector de expresión pcDNA-LOR1. Un plásmido pcDNA3.1 Hygro o pcDNA-LOR1 vacío (10-20 µg) fue transfectado establemente a células MCF-7 utilizando electroporación con un pulsador genético BioRad (960 µF, 0.28 V). Se seleccionaron a transfectantes estables utilizando a 300 µg/mililitro de Higromicina B. Los clones que expresaban a LOR1 recombinante fueron obtenidos en 2 transfecciones consecutivas estables y fueron examinadas para detectar su expresión de LOR1 utilizando nuestros anticuerpos policlonales anti-LOR-1. El medio acondicionado fue recaudado después de 48 horas de células transfectadas y la expresión de LOR-1 fue monitoreada utilizando un análisis de western blots (figura 10A).

45 **[0263]** Para expresar por inducción a LOR-1, una ADNc de LOR1 de longitud completa (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1) fue clonada al vector pTET-Splice (Clontech), lo que permitió una expresión por inducción bajo el control de tetraciclina (sistema de destetado). El ADN de plásmidos de pTET-Splice fue digerido con Hind III y SpeI y ligado al fragmento de ADNc hLOR1 de 2.3 kb que fue recuperado del plásmido pcDNA-LOR1 utilizando a Hind III y XbaI. El plásmido resultante, que fue designado como pTET-LOR1, fue co-transfectado a las células de destetado MCF-7 junto con pTK-Hygro a una tasa de 20:1 respectivamente. Las células que expresaban a LOR-1 fueron seleccionadas en un medio que contenía 100 µg/mililitro de G418, 150 µg/mililitro de higromicina B y 1 µg/mililitro de tetraciclina. Transfectantes estables fueron examinados para detectar expresiones por inducción de LOR1 usando un análisis de western blots 48 horas después de la remoción de la tetraciclina del medio de crecimiento. El clon que tenía los niveles más altos de inducción en la ausencia de tetraciclina y los niveles de expresión basal más baja en la presencia de tetraciclina fue seleccionado y designado como MCF-7/Tet-LOR1.

**[0264]** Las células de glioma C6 fueron transfectadas y examinadas para detectar la expresión de LOR1 tal como se describió anteriormente.

**[0265] Análisis de Northern blots:** El ARN total fue extraído de las células cultivadas utilizando Tri-Reagent (MRC, Cincinnati) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN total (15 µg) fue cargado en un gel con un 1.2 por ciento de agarosa y se ejecutó un análisis de Northern blots tal como se describió anteriormente (Cohen et al., 2001). Fragmentos de ADNc marcados con <sup>32</sup>P de LOR-1 y LOR-2; nucleótidos 1-660 de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 18 y los 1061-1590 de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 19 (respectivamente) fueron utilizados como sondas.

**[0266] Análisis de coloración proteínica:** Un medio acondicionado libre de sueros (40 µl) fue separado en un gel con un 8% de SDS-PAGE y las proteínas fueron electro-marcadas en un filtro de nitrocelulosa utilizando una electro-marcación semi-seca. El filtro fue bloqueado durante una hora a la temperatura del cuarto en un amortiguador de TBST que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH = 7.0), 0.15 M de NaCl, y 0.3 por ciento de Tween-20 suplementado con un 10% de leche de baja grasa. El filtro fue incubado durante la noche a 4 °C con anticuerpos purificados policlonales de conejo anti-LOR1 en TBST (1:2500). La coloración fue lavada subsiguientemente 3 veces en TBST y se incubó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa con IgG anti - conejo de cabra durante una hora a la temperatura del cuarto. Un anticuerpo de enlace fue visualizado utilizando al sistema de detección ECL (Biological Industries, Israel).

**[0267] Experimentos en ratones desnudos:** Pelletes de liberación lenta que contenían a 17β-estradiol (0.72 miligramos/pellet, liberación de 60 días, Innovative Research) fueron pre-implantados subcutáneamente en ratones desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad (CD1). Las células MCF-7 (10<sup>7</sup> células/ratón) fueron inyectadas en las almohadillas de grasa de mamíferos. El tamaño de los tumores fue medido con un calibrador una o 2 veces por semana, y el volumen tumoral fue determinado utilizando la siguiente fórmula: volumen igual ancho<sup>2</sup> x longitud x 0.52 (O'Reilly et al., 1999). Los ratones fueron sacrificados 4 semanas después de la inyección de las células MCF-7. En otros experimentos, los tumores fueron extirpados cuando alcanzaron un diámetro de 0.8 centímetros. El tumor principal, el hígado y los pulmones fueron removidos, pesados, fijados en un 10% de formalina amortiguada y adheridos en parafina.

**[0268]** El desarrollo de tumores a partir de células C6 de glioma que expresan a LOR-1 recombinante también fue estudiado. Las células (2x 10<sup>5</sup> células/animal) transfectadas con un vector de expresión de control o con un vector de expresión que contiene a ADNc de LOR1 fueron inyectadas subcutáneamente en la extremidad posterior. Los ratones fueron sacrificados 3 semanas después de la inyección de las células. Los tumores principales fueron removidos, fijados en un 10% de formalina amortiguada, y adheridos en parafina para su análisis.

**[0269] Histología e inmunohistoquímica:** Los tejidos adheridos en parafina y fijados con formalina fueron cortados en series de secciones de 5 µm cada una y fueron utilizados para detectar su inmunohistoquímica. A las secciones se les quitó la parafina al calentarse a 60 °C durante una hora, se lavaron 2 veces con xileno durante 5 minutos y se rehidrataron mediante lavados consecutivos en un 100%, en un 95% y en un 70% de etanol seguido por un lavado en agua. La actividad endógena de la peroxidasa fue inhibida mediante una incubación de 15 minutos con un 3% de peróxido de hidrógeno en metanol, seguido por lavados con agua y PBS. Las secciones fueron recuperadas en lo que se refiere a los antígenos al calentarse 2 veces durante 10 minutos en un horno de microondas a 90 °C en un amortiguador de citrato a un pH-6.2 (para anticuerpos de citoqueratina y de vimentina) o en un 1 mM de un amortiguador de EDTA (para los anticuerpos de LOR1); el bloqueo fue realizado utilizando al bloque de CAS (Zymed). Después del bloqueo, las secciones fueron incubadas durante 1.5 horas a la temperatura del cuarto con los siguientes anticuerpos, todos diluidos con una solución reactiva diluyente de anticuerpos (Zymed): anticuerpos anti-LOR1 purificados en lo que se refiere a su afinidad (1:30-1:50), anticuerpos-FITC de citoqueratina-7 anti humanas monoclonales conjugados (1:50) o con anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de vimentina (1:50). Las secciones fueron lavadas de 2 a 3 veces con TBST, y una detección secundaria fue aplicada utilizando una conjugación de fosfatos y alcalina anti FITC (Roche) con una dilución de 1:200 (para el anti citoqueratina) o utilizando el sistema de detección DAKO Envision (anti conejo o anti ratón - HRP). Las secciones fueron desarrolladas en una solución de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, DAKO), contra-manchada por medio de hematoxilina, y fotografiada bajo microscopio. En experimentos de control, los anticuerpos primarios fueron omitidos. Las coloraciones con Trichrome de Masson y las coloraciones del retículo fueron hechas de acuerdo al protocolo del fabricante. En lo que se refiere a las secciones manchadas de rojo con Sirius, fueron incubadas durante 5 minutos con un 0.03 por ciento (masa/volumen) de una solución verde rápida, se enjuagaron 2 veces con un 1% de ácido acético, se incubaron durante 15 minutos en un 0.1 por ciento de la solución roja de Sirius, se enjuagaron tal como se menciona anteriormente, se deshidrataron y se examinaron bajo un microscopio de luz de polarización.

### **Resultados experimentales**

**[0270]** LOR-1 es expresado en tipos celulares derivados del cáncer a la mama que son altamente metastásicas, pero no en células MCF-7 que no son metastásicas: La desmoplasia y la formación de focos fibróticos en tumores de cáncer a la mama es son asociadas con la transición desde un tumor relativamente benigno localizado a un tumor invasivo/metastásico (Colpaert et al., 2001; Hasebe et al., 2000). Oxidasas de lisilo contribuyen a la deposición de

colágeno mediante monómeros de colágeno de enlaces transversales covalentes (Smith-Mungo y Kagan, 1998). Para descubrir si la expresión de oxidasas de lisilo es asociada con el fenotipo invasivo/metastásico, varios tipos celulares derivados del cáncer a la mama humana han sido examinados para detectar la expresión de oxidasas de lisilo. El análisis de Northern blots reveló que el gen del LOR-1 es expresado en células MDA-MB-231 y MDA-MB-435 independientes de hormonas que son altamente malignas (Price et al., 1990) pero no en células MCF-7 no metastásicas que dependen de hormonas (figura 9a). LOR-2, por otro lado, fue expresada únicamente en las células MDA-MB-435 pero no en las células MDA-MB-231 o MCF-7 (figura 9b).

**[0271] Las células de carcinoma a la mama de nivel uno que son altamente malignas no expresan a LOR-1 mientras que el carcinoma de células altamente malignas de nivel 3 expresan a LOR-1:** La expresión de LOR-1 fue combinada a los ductos de leche en mamas normales (figura 9c) y en carcinoma ductal in situ (figura 9d). Sin embargo, en carcinoma a la mama ductal bien diferenciado de nivel uno, donde las células tumorales migran desde los ductos para formar pseudo ductos, las células no expresan a LOR-1 (figura 9e, flechas negras). Por otro lado, las células de tumores de carcinomas a la mama ductales de nivel 3, un tumor altamente maligno que se caracteriza por desmoplasia, expresa altos niveles de LOR-1 (figura 9f).

**[0272] Tumores generados en ratones a partir de células transfectadas con MCF-7 de LOR-1 tienen una tasa más lenta de crecimiento:** Para determinar si es que la expresión de LOR-1 contribuye al progreso de tumores a la mama y al fenotipo invasivo/metastásico, células MCF-7 no invasivas fueron transfectadas con un plásmido de expresión que contiene a ADNc de LOR-1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1). Algunos clones transfectantes fueron aislados y seleccionados debido a su expresión de LOR-1. El medio acondicionado de 2 clones que expresan a LOR-1 (clon 12 y 24) y un clon transfectado con sólo un vector de expresión (vec) fueron expuestos a ensayos con anticuerpos de LOR-1 dirigidos en contra de la porción de la terminal C de LOR-1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 17). Un análisis de Western blots reveló niveles más altos de expresión de LOR-1 en células del clon 12 en comparación a células del clon 24, y ninguna expresión en células transfectadas con solamente el vector de expresión (figura 10a).

**[0273]** Adicionalmente, ambas células que expresaban a LOR-1 mostraron bandas extra de proteínas de alrededor de 70 kDa (figuras 10a, b) sugiriendo que el LOR-1 podría sufrir procesos proteolíticos similares a los de otros miembros de la familia de las oxidasas de lisilo (Borel et al., 2001; Panchenko et al., 1996). Para verificar que las formas de baja masa molecular son producidas como un resultado de un proceso post-interpretación, la ADNc de LOR-1 ácido expresada en células MCF-7 bajo el control de un promotor inducible de esta ciclina (Shockett y Schatz, 1996). Puede observarse que una vez que la inhibición de la tetraciclina ha sido removida, las células empiezan a producir LOR-1 de longitud completa que a su vez es convertida en una forma más corta que contiene a la terminal C de 70 kDa (figura 10b). Todavía no está claro si todas estas formas son enzimáticamente activas.

**[0274]** Para sustanciar su rol en el crecimiento tumoral y de metástasis, células productoras de LOR-1 y células transfectadas solamente con el vector de expresión fueron pre-implantadas cutáneamente en ratones desnudos (descrito anteriormente). Interesantemente, la tasa de crecimiento de tumores que contenían a células que expresaban a LOR-1 fue retrasada en comparación con la tasa de los tumores desarrollados a partir de células parentales o células transfectadas únicamente con el vector de expresión (figura 10c, d).

**[0275]** Para determinar si la tasa reducida de crecimiento tumoral fue un resultado de una proliferación más lenta, también se comparó la tasa de proliferación de MCF-7s transfectadas con un vector vacío con aquel de células del clon 12 y del clon 24; no se detectaron diferencias significativas en sus tasas de proliferación.

**[0276]** Tumores que se desarrollan a partir de células MCF-7 que producen a LOR-1 contienen muchos focos fibróticos que son ricos en depósitos de colágeno: la coloración de hematoxilina-eosina de secciones tumorales revelaron necrosis importantes en tumores generados a partir de células MCF-7 que expresan a LOR-1 (figura 11b) y únicamente unas pocas áreas necróticas en tumores generados de células parentales o de MCF-7 transfectadas únicamente con el vector de expresión (figura 11a).

**[0277]** Tumores que expresan a LOR-1 también mostraron grandes áreas fibróticas compuestas principalmente de células derivadas tales como fibroblastos de ratones en vez de células MCF-7. Estas células son fácilmente distinguibles de las células anfitrionas puesto que ellas no reaccionan con un anticuerpo en contra de la queratina humana 7 (figura 11c).

**[0278]** Puesto que el LOR-1 demostró oxidar los residuos de lisina en el colágeno-I (Vadasz et al., 2002), se anticipó que se podrían inducir a enlaces transversales y a la deposición del colágeno. Sin embargo, esta actividad depende probablemente de la existencia de colágeno puesto que las células MCF-7 que expresan a LOR-1 que han crecido en el cultivo no producen más colágeno que las células MCF-7 parentales. Para entender de mejor forma la interacción de LOR-1 en el progreso tumoral, tumores derivados de células MCF-7 que expresan a LOR-1 fueron coloradas con Trichrome de Mason, un agente que reacciona principalmente con el colágeno-I y produce un color azul cielo (Pinder et al., 1994). (1) Tumores que se desarrollaron de células parentales o MCF-7 transfectadas con solamente el vector de expresión contenían montos limitados de colágeno que estaba esparcido entre las células tumorales (figura 11d, flechas). En contraste, tumores que se desarrollaron de células MCF-7 que expresaban a

LOR-1 del clon 12 y del clon 24 contenían depósitos más densos de colágeno entre las células tumorales (figura 11e). Además, las áreas fibróticas y necróticas de estos tumores parecieron ahogarse completamente con fibras de colágeno (figura 11f). Adicionalmente, mientras que los vasos sanguíneos dentro de los tumores que se desarrollaron de células MCF-7 transfectadas con vectores permanecieron casi sin estar manchadas (figura 11g, flechas), los vasos sanguíneos en tumores derivados de células MCF-7 que expresaban a LOR-1 fueron recubiertas por una capa gruesa de colágeno (11h, flechas).

**[0279]** Estos experimentos indican que LOR-1 afecta a la producción y a los depósitos de colágeno-I en tumores cancerígenos a la mama derivados de MCF-7. Para sustanciar la interacción de LOR-1 en relación a la deposición de colágeno, las células de glioma C6 también fueron inyectadas subcutáneamente a ratones. Mientras que los tumores generados por las células de C6-glioma no contenían montos grandes de colágeno, los tumores generados de células de C6-glioma que expresan a LOR-1 tuvieron mucho colágeno. Estos resultados indican un efecto más general para LOR-1 en lo que se refiere a depósitos de colágeno-I en tumores. Adicionalmente, la coloración de retículos de colágeno-III revelaron que los tumores generados de células de C6-glioma o de MCF-7 que expresan a LOR-1 tuvieron concentraciones más gruesas y más altas de fibras de colágeno-III (figura 12b, 12d) en comparación con los tumores generados de células transfectadas únicamente con el vector de expresión (figuras 12a, c).

**[0280] La expresión de LOR-1 en células MCF-7 transforma a las células en células evasivas in vivo:** Se reportó que indicaban que la aparición de focos fibróticos en tumores del cáncer a la mama tienen una correlación con el alto nivel de capacidad invasiva (Hasebe et al., 2000). Para sustanciar la interacción de LOR-1 en la capacidad invasiva tumoral, se utilizó coloración de queratina-7 humana. Los tumores generados a partir de células MCF-7 transfectadas por el vector de expresión únicamente fueron rodeadas por cápsulas gruesas con bordes afilados. No se observó ninguna marcación de queratina-7 humana dentro de la cápsula (figura 13a) o entre los vasos sanguíneos, los nervios y los músculos ubicados adyacentemente a las cápsulas (figura 13b, flechas). En contraste, en los tumores generados por células MCF-7 que expresan a LOR-1, se observaron células que tuvieron respuestas positivas de queratina-7 humana dentro de la cápsula (figura 13c). Además, en muchas áreas, las células tumorales migraron en masa a través de la cápsula e invadieron a los músculos (figura 13d), a los nervios (figura 13e) y a los vasos sanguíneos (figura 13f). Las células invasivas fueron identificadas como las células MCF-7 que expresan a LOR-1 utilizando un anticuerpo anti-LOR-1 (figura 13g). Estas observaciones suministran una fuerte evidencia de que la producción de LOR-1 por las células tumorales cancerígenas a la mama contribuyen a la transición desde tumores localizados no invasivos a tumores invasivos. Además, concentraciones de células tumorales también fueron detectadas dentro de los vasos linfáticos adyacentes a los tumores indicando que las células MCF-7 que expresan a LOR-1 son metastásicas (Luna, 1968).

### **EJEMPLO 3**

#### **LA EXPRESIÓN DE LOR-1 SE CORRELACIONA CON LA MALIGNIDAD DE TUMORES DEL COLÓN**

**[0281]** Para estudiar la correlación entre la expresión de LOR-1 y la malignidad de tumores del Colón, varias secciones de tumores del colon fueron expuestas a coloración inmunohistoquímica usando un anticuerpo dirigido en contra de LOR-1.

#### **Resultados experimentales**

**[0282] LOR-1 es expresado moderadamente en tumores benignos del colon:** Tejidos normales del colon y tumores benignos del colon incluyendo a tejidos de hiperplasia y de adenoma fueron expuestos a inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo dirigido en contra de la terminal C de LOR-1 humano. Tal como se muestra en las figuras 14a-b, mientras que el bajo nivel de expresión de LOR-1 fue observada en algunas células del tejido normal del colon (figura 14a), un nivel moderado de expresión fue detectado en el tejido de hiperplasia y un nivel sustancial de expresión fue detectado en células que conforman al tejido de adenoma de los tumores benignos del colon (figura 14b). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la expresión de LOR-1 se correlaciona con la formación de tumores benignos del colon.

**[0283] Tumores del colon altamente malignos expresan altos niveles de LOR-1:** Para sustanciar aún más la correlación entre LOR-1 y el progreso de tumores del colon, tejidos de adenocarcinoma del colon de alto y de bajo nivel fueron sujetos a inmunohistoquímica de LOR-1. Tal como se mostró en las figuras 14c-d, un alto nivel de expresión de LOR-1 fue detectado en tejidos de adenocarcinoma de alto y bajo nivel. Sin embargo, mientras que en el adenocarcinoma de bajo nivel la expresión de LOR-1 fue confinada principalmente a las estructuras de carcinoma, (figura 14c, flechas), en los adenocarcinomas del colon de alto nivel que eran más malignos, altos niveles de expresión de LOR-1 fueron detectados a través del tejido tumoral desorganizado. Estos resultados demostraron que un alto nivel de expresión de LOR-1 se correlaciona con tumores del colon más malignos.

**[0284]** Todos estos resultados juntos demuestran que la expresión de LOR-1 se correlaciona con el progreso del cáncer al colon y sugieren el uso de LOR-1 para determinar la etapa de los tumores de cáncer al colon.

**[0285]** Se aprecia que ciertas características del invento, que son, por cuestiones de claridad, descritas en el



contexto de secciones separadas, también podrían ser suministradas en combinación en una sola sección. En contraste, varias características del invento, que son, por cuestión de brevedad, descritas en el contexto de una sola sección, también podrían ser suministradas por separado o en cualquier sub - combinación adecuada.

5 **[0286]** Aunque el invento ha sido descrito en conjunto con sus secciones específicas, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán aparentes para aquellas personas con conocimiento en la industria. La identificación de cualquier referencia en esta aplicación no deberá considerarse como una admisión de que aquella referencia estuvo disponible antes en la industria que este invento.

10 REFERENCIAS CITADAS

(Referencias adicionales son citadas en el texto)

15 **[0287]**

- 15 1. Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent (¿Cuál es la evidencia que los tumores dependen de la angiogenesis?). *J. Nat. Cancer (Cáncer) Inst.* 82,4-7.
- 20 2. Hanahan, D. y Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis (Patrones y mecanismos emergentes del cambio angiogénico durante la tumorigénesis). *Cell (Célula)* 86, 353-364.
- 25 3. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., y O'Reilly, M. S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance (La terapia anti-angiogénica de cáncer experimental no induce una resistencia adquirida a medicamentos). *Nature (Naturaleza)* 390, 404-407.
- 30 4. Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J., y Hanahan, D. (1999) Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice (Efectos de inhibidores de angiogénesis en la carcinogénesis de varias etapas en ratones). *Science (Ciencia)* 284, 808-812.
- 35 5. Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis (Angiogénesis y metástasis tumoral). *Annu. Rev. Med.* 49:407-424,407-424.
- 40 6. Weidner, N. (1998) Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: The evidence continues to grow (Vascularidad tumoral como un factor de pronóstico en pacientes con cáncer: La evidencia continúa creciendo). *J. Pathol.* 184, 119-122.
- 45 7. Degani, H., Gusic, V., Weinstein, D., Fields, S., y Strano, S. (1997) Mapping pathophysiological features of breast tumors by MRI at high spatial resolution (Características de la elaboración de mapas fisiopatológicos de tumores a la mamá mediante la toma de imágenes de resonancia magnética con una alta resolución espacial). *Nature (Naturaleza) Med.* 3, 780-782.
- 50 8. Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Fischer, L., Tognazzi, K., Harris, J. R., Dvorak, H. F., y Brown, L. F. (1997) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast (La expresión y la angiogénesis del factor de permeabilidad vascular (factor de crecimiento endotelial vascular) en pacientes con carcinoma ductal in situ de la mamá). *Cancer (Cáncer)* 80, 1945-1953.
- 55 9. Balsari, A., Maier, J. A. M., Colnaghi, M. I., y Menard, S. (1999) Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma (Correlación entre la vascularidad tumoral, la producción del factor de crecimiento endotelial vascular por células tumorales, los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial vascular, y la actividad angiogénica sérica en pacientes con carcinoma a la mamá). *Lab. Invest.* 79, 897-902.
- 60 10. Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., y D'Amato, R. J. (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol (Inhibición de angiogénesis y cáncer a la mamá en ratones mediante inhibidores de micro túbulos 2-metoxiestradiol y taxol). *Cancer (Cáncer) Res.* 57, 81-86.
- 65 11. Harris, A. L., Zhang, H. T., Moghaddam, A., Fox, S., Scott, P., Pattison, A., Gatter, K., Stratford, I., y Bicknell, R. (1996) Breast cancer angiogenesis - New approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting (Angiogénesis de cáncer a la mamá - Nuevos métodos terapéuticos por medio de la antiangiogénesis, medicamentos activados hipóxicos, y orientación vascular). *Breast Cancer (Cáncer a la Mama) Res. Treat (Tratar).* 38, 97-108.
12. Weinstatsaslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., Vanhoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D., y Steeg, P. S. (1994) Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis (Transfección de ADN complementario de trombospodina 1 en una línea celular de carcinoma a la mamá humana reduce el crecimiento tumoral principal, el potencial metastásico y la angiogénesis). *Cancer (Cáncer) Res.* 54, 6504-6511.
13. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., y Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores). *FASEB J.*

13,9-22.

14. Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T. H., Klier, G., y Cheresch, D. A. (1994) Integrin alpha(v)beta(3) antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels (Los antagonistas de la integrina alfa(v)beta(3) promueven la regresión tumoral al inducir la apoptosis de los vasos sanguíneos angiogénicos). *Cell (Célula)* 79,1157-1164.
- 5 15. Brooks, P. C., Silletti, S., Von Schalscha, T. L., Friedlander, M., y Cheresch, D. A. (1998) Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity (Interrupción de la angiogénesis por PEX, un fragmento de metalloproteinasas no catalíticas con actividades de enlaces de la integrina). *Cell (Célula)* 92, 391-400.
- 10 16. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., y Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth (Endostatina: Un inhibidor endógeno de la angiogénesis en el crecimiento tumoral). *Cell (Célula)* 88,277-285.
- 15 17. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C., y Folkman, J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice (La angiostatina induce y sostiene la desactivación de tumores primarios humanos en ratones). *Nature (Naturaleza) Med.* 2, 689-692.
18. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D. W., y Fine, H. A. (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth (Transducción mediada por vectores virales de una ADNc del factor 4 de plaquetas modificadas inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral). *Nature (Naturaleza) Med.* 3,437-442.
- 20 19. Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., y Sharpe, R. J. (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides (La inhibición de la angiogénesis mediante el factor 4 de plaquetas humanas recombinantes y péptido relacionados). *Science (Ciencia)* 247, 77-79.
- 25 20. Neufeld, G., Akiri, G., y Vadasz, Z. (2000) in Platelet Factor 4 (PF4) (en el factor 4 de plaquetas (PF4)). *The Cytokine Reference: A compendium of cytokines and other mediators of host defence (La referencia de citoquinas: Un compendio de citoquinas y otros mediadores de la defensa del anfitrión)* (Oppenheim, J. J. y Feldmann, M. eds) Academic Press.
- 30 21. Gengrinovitch, S., Greenberg, S. M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T. E., Levi, B., y Neufeld, G. (1995) Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF-121 and VEGF-165 using several concurrent mechanisms (El factor 4 de plaquetas inhibe la actividad mitogénica de VEGF-121 y de VEGF-165 usando algunos mecanismos concurrentes). *J. Biol. Chem.* 270, 15059-15065.
- 35 22. Brown, K. J. y Parish, C. R. (1994) Histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4 mask heparan sulfate proteoglycans recognized by acidic and basic fibroblast growth factor (La glicoproteína rica en histidina y el factor 4 de plaquetas protegen a los proteoglicanos de sulfato de heparán mediante el factor de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos). *Biochemistry (Bioquímica)* 33, 13918-13927.
- 40 23. Gupta, S. K. y Singh, J. P. (1994) Inhibition of endothelial cell. Proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression (Inhibición de células endoteliales. La proliferación por medio del factor 4 de plaquetas involucra una acción única en la progresión de la fase S). *J. Cell (Célula) Biol.* 127, 1121-1127.
- 45 24. Watson, J. B., Getzler, S. B., y Mosher, D. F. (1994) Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor (El factor 4 de plaquetas modula a la actividad mitogénica del factor de crecimiento de fibroblastos básicos). *J. Clin. Invest.* 94, 261-268.
- 50 25. Maione, T. E., Gray, G. S., Hunt, A. J., y Sharpe, R. J. (1991) Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity (La inhibición del crecimiento tumoral en ratones mediante un análogo del factor 4 de plaquetas que no tiene afinidad con la heparina y que retiene una potente actividad angiostática). *Cancer (Cáncer) Res.* 51, 2077-2083.
- 55 26. Sharpe, R. J., Byers, H. R., Scott, C. F., Bauer, S. I., y Maione, T. E. (1990) Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4 (Inhibición del crecimiento de melanoma de ratones y del carcinoma de colon humano mediante el factor 4 de plaquetas humanas recombinantes). *J. Natl. Cancer (Cáncer) Inst.* 82, 848-853.
- 60 27. Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., y Goldstein, S. (1997) Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence (Regulación de un gen nuevo que codifica a una proteína relacionada con la oxidasa de lisilo en adherencia y senectud celular). *J. Biol. Chem.* 272, 8157-8160.
- 65 28. Kim, Y., Boyd, C. D., y Csiszar, K. (1995) A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase (Un nuevo gen con una similitud secuencial y estructural en relación al gen que codifica a la oxidasa del lisilo humana). *J. Biol. Chem.* 270, 7176-7182.
29. Kim, Y. H., Peyrol, S., So, C. K., Boyd, C. D., y Csiszar, K. (1999) La co-expression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis (Co-expresión del gen similar a la oxidasa de lisilo (LOXL) y del gen que codifica a procolágeno tipo III en fibrosis inducida del hígado). *J. Cell Biochem.* 72, 181-188.
30. Rabinovitz, M. (1999) Angiogenesis and its inhibition: the copper connection (La angiogénesis y su inhibición: La conexión del cobre). *J. Natl. Cancer Inst.* 91,1689-1690.
31. Jang, W., Hua, A., Spilson, S. V., Miller, W., Roe, B. A., y Meisler, M. H. (1999) Comparative sequence of human and mouse BAC clones from the mnd2 region of chromosome 2p13 (Secuencia comparativa de

- clones BAC de humanos y de ratones de la region mnd2 del cromosoma 2p13). *Genome (Genoma) Res.* 9, 53-61.
32. Yoshida, D., Ikeda, Y., y Nakazawa, S. (1995) Copper chelation inhibits tumor angiogenesis in the experimental 9L gliosarcoma model (La quelación de cobre inhibe la angiogénesis tumoral en el modelo experimental del gliosarcoma 9L). *Neurosurgery (neurocirugía)* 37, 287-292.
- 5 33. Borgstroem, P., Discipio, R., y Maione, T. E. (1998) Recombinant platelet factor 4, an angiogenic marker for human breast carcinoma (El factor 4 de plaquetas recombinantes, un marcador angiogénico para el carcinoma a la mama humana). *Anticancer (Anti - cáncer) Res.* 18,4035-4041.
- 10 34. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A., y Keshet, E. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis (Inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular mediante hipoxia y mediante la deficiencia de glucosa en esferoides multicelulares: Implicaciones para la angiogénesis tumoral). *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 92, 768-772.
- 15 35. Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T., y Kerbel, R. S. (1995) Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis (Los oncogenes mutantes ras regulan-incrementan la expresión de VEGF/VPF: implicaciones para la inducción y la inhibición de la angiogénesis tumoral). *Cancer (Cáncer) Res.* 55, 4575-4580.
- 20 36. Koch, A. E. (1998) Angiogenesis - Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum (Angiogénesis - implicaciones para la artritis reumatoide. Artritis Reumatoide).* 41, 951-962.
37. Paleolog, E. M. y Fava, R. A. (1998) Angiogenesis in rheumatoid arthritis: implications for future therapeutic strategies (Angiogénesis en la artritis reumatoide: Implicaciones para futuras estrategias terapéuticas). *Springer Semin. Immunopathol.* 20, 73-94.
- 25 38. Miller, J. W., Adamis, A. P., y Aiello, L. P. (1997) Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy (Factor de crecimiento endotelial vascular en la devascularización ocular y la retinopatía diabética proliferativa). *Diabetes (Diabetes) Metab. Rev.* 13, 37-50.
39. Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yee, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., y Dvorak, H. F. (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis (Expresión excesiva del factor de permeabilidad vascular/factor de crecimiento endotelial vascular y sus receptores en la psoriasis (. *J. Exp. Med.* 180,1141-1146.
- 30 40. Creamer, D., Allen, M. H., Sousa, A., Poston, R., y Barker, J. N. W. N. (1997) Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis (Localización de la proliferación endotelial y de la expansión microvascular en la psoriasis de placas activas). *Br. J. Dermatol.* 136, 859-865.
41. Lie, J. T. (1992) Vasculitis simulators and vasculitis look-alikes (Simuladores de vasculitis y elementos parecidos a la vasculitis). *Curr. Opin. Rheumatol.* 4,47-55.
- 35 42. Klipple, G. L. y Riordan, K. K. (1989) Rare inflammatory y hereditary connective tissue diseases (Enfermedades raras, inflamatorias y hereditarias de tejidos colectivos). *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15, 383-398.
43. Brahn, E., Lehman, T. J. A., Peacock, D. J., Tang, C., y Banquerigo, M. L. (1999) Suppression of coronary vasculitis in a murine model of Kawasaki disease using an angiogenesis inhibitor (Supresión de la vasculitis coronaria en un modelo de ratones de la enfermedad de Kawasaki usando un inhibidor de angiogénesis). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 90, 147-151.
- 40 44. Cid, M. C., Grant, D. S., Hoffman, G. S., Auerbach, R., Fauci, A. S., y Kleinman, H. K. (1993) Identification of Haptoglobin as an Angiogenic Factor in Sera from Patients with Systemic Vasculitis (Identificación de la haptoglobina como un factor angiogénico en el suero de pacientes con vasculitis sistémica). *J. Clin. Invest.* 91,977-985.
- 45 45. Hoffman, G. S., Filie, J. D., Schumacher, H. R., Jr., Ortiz-Bravo, E., Tsokos, M. G., Marini, J. C., Kerr, G. S., Ling, Q. H., y Trentham, D. E. (1991) Intractable vasculitis, resorptive osteolysis, and immunity to type I collagen in type VIII Ehlers-Danlos syndrome (Vasculitis intratable, osdteolisis de resorción e inmunidad para el colágeno de tipo I en el síndrome Ehlers-Danlos de tipo VIII). *Arthritis (Artritis) Rheum.* 34, 1466-1475.
- 50 46. Bauters, C. y Isner, J. M. (1997) The biology of restenosis (La biología de la restenosis). *Prog. Cardiovasc. Dis.* 40, 107-116.
47. Begelman, S. M. y Olin, J. W. (2000) Fibromuscular dysplasia (Displasia fibromuscular). *Curr. Opin. Rheumatol.* 12, 41-47.
- 55 48. Palta, S., Pai, A. M., Gill, K. S., y Pai, R. G. (2000) New insights into the progression of aortic stenosis : implications for secondary prevention (Nuevas revelaciones de la progresión de la estenosis aórtica para una prevención secundaria). *Circulación* 101,2497-2502.
49. Wilchek, M. Miron, T., 1982. Immobilization of enzymes and affinity ligands onto agarose via stable and uncharged carbamate linkages (Inmovilización de enzimas y ligandos de afinidad en la agarosa por medio de enlaces estables de carbamato sin carga). *Biochem. Int.* 4, 629-635.
- 60 50. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M., 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor (La neuropilina-1 es expresada por células tumorales y endoteliales como un receptor específico de isoformas para el factor de crecimiento endotelial vascular). *Cell (Célula)* 92, 735-745.
- 65 51. Zhang, H. T., Craft, P., Scott, P. A. E., Ziche, M., Weich, H. A., Harris, A. L., Bicknell, R., 1995. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor

- into MCF-7 human breast carcinoma cells (Impulso del crecimiento tumoral y de la densidad vascular mediante el factor de crecimiento celular endotelial vascular para células de carcinoma a la mamá humana MCF-7). *J. Nat. Cancer (Cáncer) Inst.* 87,213-219.
52. Cohen, T., Gluzman-Poltorak, Z., Brodsky, A., Meytal, V., Sabo, E., Misselevich, I., Hassoun, M., Boss, J. H., Resnick, M., Shneyvas, D., Eldar, S., Neufeld, G., 2001. Neuroendocrine Cells along the Digestive Tract Express Neuropilin-2 (Células neuroendocrinas a lo largo de la tráquea digestiva expresan a la Neuropilina-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284,395-403.
53. Mcleskey, S. W., Kurebayashi, J., Honig, S. F., Zwiebel, J., Lippman, M. E., Dickson, R. B., Kern, F. G., 1993. Fibroblast Growth Factor-4 Transfection of MCF-7 Cells Produces Cell Lines That Are Tumorigenic and Metastatic in Ovariectomized or Tamoxifen-Treated Athymic Nude Mice (La transfección del factor de crecimiento de fibroblastos 4 de células MCF-7 produce líneas celulares que son tumorales y metastásicas en ratones desnudos atímicos ovariectomizados y tratados con Tamoxifeno). *Cancer (Cáncer) Res.* 53, 2168-2177.
54. Nakamura et al. *Cancer (Cáncer) Res* 60(3), 760-5, 2000.
55. Szczylik et al (1991) Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides (Inhibición selectiva de la proliferación de células de leucemia mediante oligodeoxinucleótidos antisentido BCR-ABL). *Science (Ciencia)* 253:562.
56. Calabretta et al. (1991) Normal and leukemic hematopoietic cell manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging (Las células hematopoyéticas normales y leucémicas manifiestan una sensibilidad diferencial en relación a los efectos inhibitorios de los oligodeoxinucleótidos antisentido c-myc: un estudio in vitro relevante a la depuración de la médula ósea). *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:2351.
57. Heikhila et al. (1987) A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G(0) to G(1) (Un oligodeoxinucleótido antisentido c-myc inhibe la entrada a la fase S pero no progresa de G(0) a G(1)). *Nature (Naturaleza)*, 328:445.
58. Burch y Mahan (1991) Oligodeoxynucleotides antisense to the interleukin I receptor m RNA block the effects of interleukin I in cultured murine and human fibroblasts and in mice (Los oligodeoxinucleótidos causan un efecto antisentido para el ARNm del receptor de interleucina I que bloquea los efectos de la interleucina I en fibroblastos cultivados de ratones y humanos y ratones). *J. Clin. Invest.* 88:1190.
59. Welch P.J., Barber J.R., y Wong-Staal F. (1998) Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels (La expresión de ribozimas en sistemas de transferencia genética para modular los niveles de ARN objetivos). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):486-496.
60. Bedell-Hogan,D., Trackman,P., Abrams,W., Rosenbloom,J., y Kagan,H. (1993) Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase (Oxidación, vinculación transversal e insolubilización de la tropoelastina mediante oxidasas de lisilo purificadas). *J. Biol. Chem.* 268, 10345-10350).
61. Colpaert, C., Vermeulen, P., Van Marck, E., y Dirix, L. (2001) The presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early metastasis in lymph node-negative breast cancer patients (La presencia de un foco fibrótico es un pronosticador independiente de una metástasis temprana en pacientes de cáncer a la mamá que muestran una respuesta negativa de nodos linfáticos). *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 1557 Hasebe, T., Mukai, K., Tsuda, H., y Ochiai, A. (2000) New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: Clinicopathological significance of fibrotic focus (Nuevo parámetro histológico de pronóstico del carcinoma ductal invasivo de la mamá: Significancia clínico-patológica del foco fibrótico). *Pathology International (Patología Internacional)* 50, 263-272
62. Nishimura, R., Hasebe, T., Tsubono, Y., Ono, M., Sugitoh, M., Arai, T., y Mukai, K. (1998) The fibrotic focus in advanced colorectal carcinoma: a hitherto unrecognized histological predictor for liver metastasis (El foco fibrótico en el carcinoma colorrectal avanzado: Un pronosticador histológico que no ha sido reconocido hasta ahora para la metástasis del hígado). *Virchows Arch.* 433, 517-522
63. Ellenrieder, V., Alber, B., Lacher, U., Hendler, S.F., Menke, A., Boeck, W., Wagner, M., Wilda, M., Friess, H., Buchler, M., Adler, G., y Gress, T.M. (2000) Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression (La participación de MT-MMPs y de MMP-2 en el progreso del cáncer pancreático). *Int. J. Cancer (Cáncer)* 85, 14-20.
64. Stamenkovic, I. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis (Metaloproteinasas matriciales en la invasión y metástasis tumoral). *Semin. Cancer (Cáncer) Biol.* 10, 415-433.
65. Duffy, MJ., Maguire, T.M., Hill, A., McDermott, E., y O'Higgins, N. (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis (Metaloproteinasas: Su papel en la carcinogénesis, invasión y metástasis de la mama). *Breast Cancer (Cáncer a la mama) Res.* 2, 252-257.
66. Vlodavsky, I. y Friedmann, Y. (2001) Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis (Propiedades moleculares e interacción de la heparanasa en la metástasis y angiogénesis cancerígena). *J. Clin. Invest* 108, 341-347.
67. Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R., y Hahn, E.G. (2001) Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis (La matriz como un modulador de filogénesis hepática). *Semin. Liver (Hígado) Dis.* 21, 351-372.
68. Sawada, S., Murakami, K., Murata, J., Tsukada, K., y Saiki, I. (2001) Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung (La acumulación de una matriz extracelular en el hígado induce un alto potencial metastásico de carcinoma hepatocelular para el

pulmón). *Int. J. Oncol.* 19, 65-70.

69. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S.E., y Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* (Interferencia potente y específica por el ARN de doble hebra en el *Caenorhabditis elegans*). *Nature (Naturaleza)* 391, 806-811.

70. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., y Bartel, D. P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals (ARNi: El ARN de doble hebra dirige la división que depende del ATP del ARNm en intervalos de 21 a 23 nucleótidos). *Cell (Célula)* 101, 25-33.

71. Elbashir, S. M., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs (La interferencia de ARN es regulada por ARNs de 21 y 22 nucleótidos). *Genes Dev.* 15, 188-200.

72. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. y Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells (Una nucleasa dirigida por ARN regula el silenciamiento genético posterior a la interpretación en células de *Drosophila*). *Nature (Naturaleza)* 404, 293-296.

73. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. y Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference (La participación de una ribonucleasa bidentada en el paso de iniciación de la interferencia de ARN). *Nature (Naturaleza)* 409, 363-366.

74. Nykanen, A., Haley, B. y Zamore, P. D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway (Requerimientos del ATP y de la estructura de ARN de interferencia pequeña en el sendero de interferencia de ARN). *Cell (Célula)* 107, 309-321

75. Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A. y Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference (Silenciamiento genético regulado por ADN de doble hebra en células cultivadas de *Drosophila*: Un modelo de cultivo de tejidos para el análisis de la interferencia del ARN). *Gene (Gen)* 252, 95-105.

76. Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y. y Saigo, K. (2000) Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target (Ensayo sensible de la interferencia de ARN en células cultivadas de *Drosophila* y de hámster chino usando el gen de la luciferasa de la luciérnaga como un objetivo). *FEBS Lett.* 479, 79-82.

77. Hohjoh, H. (2002) RNA interference (RNA(i)) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells (Inducción de la interferencia de ARN (ARN(i)) con varios tipos de duplas de oligonucleótidos sintéticos en células humanas cultivadas). *FEBS Lett.* 521, 195-9.

78. Leirdal, M., y Sioud, M. (2002) Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes (Silenciamiento genético en células de mamíferos mediante duplas elaboradas de ARNs pequeños). *Biochem Biophys Res Commun* 295, 744-8.

79. Yang, D., Buchholz, F., Huang, Z., Goga, A., Chen, C.Y., Brodsky, F.M., y Bishop, J.M. (2002) Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells (Duplas de ARNs cortos producidas mediante hidrólisis con la ribonucleasa III de *Escherichia coli* regulan la interferencia efectiva de ARN en células de mamíferos). *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99,9942-7.

80. Pinder, S.E., Ellis, I.O., Galea, M., O'Rourke, S., Blamey, R.W., y Elston, C.W. (1994) Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with longterm follow-up (Factores patológicos de pronóstico en el cáncer a la mamá. III. Invasión vascular: relación con la recurrencia y la supervivencia en un estudio grande con seguimiento a largo plazo). *Histopathology (Histopatología)* 24, 41-47.

81. Luna, L.G. (1968) *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology* (Manual de métodos de coloración histológica del Instituto de patología de las Fuerzas Armadas), McGraw-Hill, Nueva York.

#### LISTAS DE SECUENCIAS

##### [0288]

<110> Neufeld, Gera  
Akiri, Gal  
Vadasz, Zahava  
Gengrinovitch, Stela

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS FARMACÉUTICOS ÚTILES PARA LA MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS, LA INHIBICIÓN DE LA METÁSTASIS Y LA FIBROSIS TUMORAL, Y LA EVALUACIÓN DE LA MALIGNIDAD DE TUMORES CANCERÍGENOS DEL COLÓN.

<130> 26376

<160> 19

<170> Versión de PatentIn 3.2

ES 2 584 847 T3

<210> 1  
<211> 2325  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5

<400> 1

10

atggagaggc ctctgtgctc ccacctctgc agctgecttg ctatgctggc cctcctgtcc 60

ccccagacc tggcaccagta tgacagctgg cccattacc ccaggtactt ccagcaaccg 120

gctcctgagt atcaccagcc ccaggccccc gccaaegtgg ccaagattca gctgcgctg 180

15

gctgggcaga agaggaagca cagcgagggc cgggtggagg tgtactatga tggccagtgg 240

ggcaaccgtg gcgatgacga cttctccatc caogetgccc acgtcgtctg ccgggagctg 300

20

ggctatgtgg aggccaagtc ctggaactgcc agctcctcct acggcaaggg agaagggccc 360

atctggttag acaatctcca ctgtaactggc aacgaggcga ccttgccagc atgcacctcc 420

aatggctggg gcgtcactga ctgcaagcac acggaggatg tcggtgtggt gtgcagcgac 480

25

aaaaggattc ctgggttcaa atttgacaat tcgttgatca accagataga gaaectgaat 540

atccagggtg aggacattcg gattcgagcc atcctctcaa cctaccgcaa gcgcacccca 600

30

gtgatggagg gctacgtgga ggtgaaggag ggcaagacct ggaagcagat ctgtgacaag 660

cactggaccg ccaagaattc ccgcgtggtc tgcggcatgt ctggctcccc tggggagagg 720

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 584 847 T3

acatacaata ccaaagtgt aaaaatgttt gcctcaegga ggaagcagcg ctactggcca 780  
 5 tctccatgg actgcaccg cacagaggcc cacatctcca gctgcaagct gggeccccag 840  
 gtgtcaetgg accccatgaa gaatgtcacc tgcgagaatg ggctaccggc cgtggtgagt 900  
 10 tgtgtcctg ggcaggtcct cagccctgac ggaccctcaa gattccggaa agcgtacaag 960  
 ccagagcaac cccctggtcg actgagagcc ggtgcctaca tcggggaggg ccgcgtggag 1020  
 gtgctcaaaa atggagaatg ggggaccgtc tgcgacgaca agtgggacct ggtgtcggcc 1080  
 15 agtgtggtct gcagagagct gggctttggg agtgccaag aggcagtca c tggctcccga 1140  
 ctggggcaag ggatcggacc catccacctc aacgagatcc agtgcacagg caatgagaag 1200  
 20 tccattatag actgcaagtt caatgccag tctcaggct gcaaccacga ggaggatgct 1260  
 ggtgtgagat gcaacacccc tgccatgggc ttgcagaaga agctgcgect gaacggcggc 1320  
 cgcaatccct acgagggccg agtggaggtg ctggtggaga gaaacgggtc ccttgtgtgg 1380  
 25 gggatggtgt gtggcaaaa ctggggcacc gtggaggcca tgggtgctg ccgccagctg 1440  
 ggccctggat tcgccagcaa cgccttcacg gagacctggt attggcacgg agatgtcaac 1500  
 30 agcaacaag tggcatgag tggagtgaag tgetcggaa cggagctgc cctggccac 1560  
 tgcccccacg acggggagga cgtggcctgc ccccagggcg gagtgcagta cggggccgga 1620  
 gttgcctgct cagaaacccg cctgacctg gtctcaatg cggagatggt gcagcagacc 1680  
 35 acctacctgg aggaccggcc catgttcacg ctgcagtgtg ccattggagga gaactgecte 1740  
 teggcctcag ccgcgcagac cgaacccacc acgggctacc gccggctcct gcgcttctc 1800  
 40 tcccagatcc acaacaatgg ccagtcagac ttccggccca agaacggccg ccacgcgtgg 1860  
 atctggaacg actgtcacag gcactaccac agcatggagg tgttcaecca ctatgaectg 1920  
 45 ctgaacctca atggcaccaa ggtggcagag ggccacaagg ccagcttctg cttggaggac 1980  
 acagaatgtg aaggagacat ccagaagaat tacgagtgtg ccaacttcgg egatcagggc 2040  
 atcaccatgg gctgctggga catgtaccgc catgacatcg actgcccagt ggttgacatc 2100  
 50 actgacgtgc cccctggaga ctacctgttc caggttgta ttaaccccaa cttcgaggtt 2160  
 gcagaatccg attactcaa caacatcatg aatgcagga gccgctatga cggccaccgc 2220  
 55 atctggatgt acaactgcca cataggtggt tccttcagcg aagagacgga aaaaaagttt 2280  
 gagcacttca gcgggctcct aaacaaccag ctgtccccgc agtaa 2325

60

65

ES 2 584 847 T3

5 <210> 2  
 <211> 774  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

45 Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys



	115	120	125
5	Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly		
	130	135	140
10	Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp		
	145	150	155 160
15	Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile		
	165	170	175
20	Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile Leu		
	180	185	190
25	Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu Val		
	195	200	205
30	Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr Ala		
	210	215	220
35	Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu Arg		
	225	230	235 240
40	Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys Gln		
	245	250	255
45	Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile		
	260	265	270
50	Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn		
	275	280	285
55	Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly		
	290	295	300





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

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

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

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

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

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

35 Asn Gln Leu Ser Pro Gln  
770

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

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

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

50 Leu Arg Leu Val Gly Pro Ala Asp Arg Pro Glu Glu Gly Arg Leu Glu  
35 40 45

55

60

65

5 Val Leu His Gln Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ala  
50 55 60

10 Leu Gln Glu Ala Thr Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Phe Glu Ser Ala  
65 70 75 80

15 Leu Thr Trp Ala His Ser Ala Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Gly Pro Ile  
85 90 95

20 Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Leu Gly Thr Glu Lys Thr Leu Asp Gln  
100 105 110

25 Cys Gly Ser Asn Gly Trp Gly Ile Ser Asp Cys Arg His Ser Glu Asp  
115 120 125

30 Val Gly Val Val Cys His Pro Arg Arg Gln His Gly Tyr His Ser Glu  
130 135 140

35 Lys Val Ser Asn Ala Leu Gly Pro Gln Gly Arg Arg Leu Glu Glu Val  
145 150 155 160

40 Arg Leu Lys Pro Ile Leu Ala Ser Ala Lys Arg His Ser Pro Val Thr  
165 170 175

45 Glu Gly Ala Val Glu Val Arg Tyr Asp Gly His Trp Arg Gln Val Cys  
180 185 190

50 Asp Gln Gly Trp Thr Met Asn Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Leu  
195 200 205

55 Gly Phe Pro Ser Gln Thr Ser Val Asn Ser His Tyr Tyr Arg Lys Val  
210 215 220

Trp Asn Leu Lys Met Lys Asp Pro Lys Ser Arg Leu Asn Ser Leu Thr  
 225                    230                    235                    240

5

Lys Lys Asn Ser Phe Trp Ile His Arg Val Asp Cys Phe Gly Thr Glu  
                                  245                    250                    255

10

Pro His Leu Ala Lys Cys Gln Val Gln Val Ala Pro Gly Arg Gly Lys  
                                  260                    265                    270

15

Leu Arg Pro Ala Cys Pro Gly Gly Met His Ala Val Val Ser Cys Val  
                                  275                    280                    285

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

65

Gly Phe Gln Asn Lys Val Arg Leu Ala Gly Gly Arg Asn Ser Glu Glu  
 420 425 430  
 5  
 Gly Val Val Glu Val Gln Val Glu Val Asn Gly Gly Pro Arg Trp Gly  
 435 440 445  
 10  
 Thr Val Cys Ser Asp His Trp Gly Leu Thr Glu Ala Met Val Thr Cys  
 450 455 460  
 15  
 Arg Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Asn Phe Ala Leu Lys Asp Thr Trp  
 465 470 475 480  
 20  
 Tyr Trp Gln Gly Thr Pro Glu Ala Lys Glu Val Val Met Ser Gly Val  
 485 490 495  
 25  
 Arg Cys Ser Gly Thr Glu Met Ala Leu Gln Gln Cys Gln Arg His Gly  
 500 505 510  
 30  
 Pro Val His Cys Ser His Gly Pro Gly Arg Phe Ser Ala Gly Val Ala  
 515 520 525  
 35  
 Cys Met Asn Ser Ala Pro Asp Leu Val Met Asn Ala Gln Leu Val Gln  
 530 535 540  
 40  
 Glu Thr Ala Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Met Leu Tyr Cys Ala  
 545 550 555 560  
 45  
 His Glu Glu Asn Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asp His Met Asp Trp Pro  
 565 570 575  
 50  
 Tyr Gly Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asn Leu  
 580 585 590  
 55  
 60  
 65

ES 2 584 847 T3

Gly Arg Ala Asp Phe Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Ile Trp  
595 600 605

5

His Gln Cys His Arg His Asn His Ser Ile Glu Val Phe Thr His Tyr  
610 615 620

10

Asp Leu Leu Thr Leu Asn Gly Ser Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala  
625 630 635 640

15

Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Asn Cys Pro Ser Gly Val Gln Arg Arg  
645 650 655

20

Tyr Ala Cys Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Val Ala Val Gly Cys Trp  
660 665 670

25

Asp Thr Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp  
675 680 685

30

Val Gly Pro Gly Asp Tyr Ile Phe Gln Val Val Val Asn Pro Thr Asn  
690 695 700

35

Asp Val Ala Glu Ser Asp Phe Ser Asn Asn Met Ile Arg Cys Arg Cys  
705 710 715 720

40

Lys Tyr Asp Gly Gln Arg Val Trp Leu His Asn Cys His Thr Gly Asp  
725 730 735

45

Ser Tyr Arg Ala Asn Ala Glu Leu Ser Leu Glu Gln Glu Gln Arg Leu  
740 745 750

Arg Asn Asn Leu Ile  
755

<210> 4  
<211> 2262  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 4

55

60

65



ES 2 584 847 T3

atgcgacctg teagtgctg gcagtgagc ccctggggc tgetgctgtg cctgctgtgc 60  
 5 agttcgtgct tggggtctcc gtcccctcc acgggccctg agaagaaggc cgggagccag 120  
 gggcttcggg tccgctggc tggctcccc aggaagccct acgagggccg cgtggagata 180  
 10 cagcgagctg gtgaatggg caccatctgc gatgatgact tcacgctgca ggcgcccac 240  
 atcctctgcc gggagctgg cttcacagag gccacaggt ggaccacag tgccaaatat 300  
 ggcctggaa caggccgat ctggtggac aacttgagct gcagtggaac cgagcagagt 360  
 15 gtgactgaat gtgctcccg gggctgggg aacagtgact gtacgacga tgaggatgct 420  
 ggggtcatct gcaagacca ggcctcccct ggcttctcg actccaatgt cattgaggta 480  
 20 ggcctcacc tgcaagtga ggagtgoga attcgaccg ccgttgggtg gggcagcga 540  
 cccctgccg tgacggagg gctggtgaa gtcaggctc ctgacggtg gtcgcaagt 600  
 tggacaaag gctggagcgc ccacaacgc cactgtgtct ggggatgct gggctcccc 660  
 25 agcgaaga gggtaacgc ggccttctac aggtgctag cccaacgca gcaacactcc 720  
 tttggtctgc atgggtggc gtgctgggc acggaggccc acctctccc ctgttcccg 780  
 30 gagttctatc gtccaatga caccgccag tgcctgggg ggggccctgc agtggtgagc 840  
 tgtgtgccag gccctgtcta cgcgcatcc agtgccaga agaagcaaca acagtcaag 900  
 35 cctcagggg aggccctgt cctctaaag ggcggcccc acctggaga gggccggta 960  
 gaagtcctga aggccagcac atggggcaca gtctgtgacc gcaagtggga cctgcatgca 1020  
 gccagcgtg tgtgtcggg gctgggctc gggagtctc gagaagctct ggttggcct 1080  
 40 cgcaggggc agggcatgg tgctatccac ctgagtgaag ttcgctgctc tggacaggag 1140  
 ctctcccct ggaagtgcc ccacaagaac atcacagctg aggattgttc acatagccag 1200  
 45 gatccgggg tccggtgcaa cctacctac actggggcag agaccaggat ccgaetcagt 1260  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 584 847 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35

```

gggggccgca gccaacatga ggggcgagtc gaggtgcaaa tagggggacc tgggccctt 1320
cgctggggcc tcactgtggt ggatgactgg gggaccctgg aggccatggt ggctgtagg 1380
caactgggtc tgggctacgc caaccacggc ctgcaggaga cctggtactg ggaactctgg 1440
aatataacag aggtggtgat gagtggagtg cgctgcacag ggaactgagct gtccttggat 1500
cagtggtccc atcatggcac ccacatcacc tgcaagagga cagggaaccg cttcactgct 1560
ggagtcactc gttctgagac tgcacagat ctgttgctgc actcagcact ggtgcaggag 1620
accgectaca tcgaagaccg gcccttgcac atgttgact gtgctcgga agagaactgc 1680
ctggccagct cagcccgctc agccaactgg cctatggtc accggcgtct gctccgatc 1740
tcctcccaga tcacaacct gggcagagct gacttcagtc ccaaggctgg gcgccactcc 1800
tgggtgtggc acgagtcca tgggeattac cacagcatgg acatcttacc tcaactatgat 1860
atcctcacc ccaatggcac caaggtggtt gagggccaca aagctagttt ctgtctcgaa 1920
gacactgagt gtcaggagga tgtctccaag cggtatgagt gtccaactt tggagagcaa 1980
ggcatcactg tgggttctg ggatctctac cggcatgaca ttgactgtca gtgattgac 2040
atcaggatg tgaagccagg aaactacatt ctccaggtt tcatcaacc aaactttgaa 2100
gtagcagaga gtgactttac caacaatgca atgaaatga actgcaata tgatggacat 2160
agaactctgg tgcacaactg ccacattggt gatgccttca gtgaagagge caacaggagg 2220
tttgaacgct accctggcca gaccagcaac cagattatct aa 2262
  
```

40  
 45

```

<210> 5
<211> 1725
<212> ADN
<213> homo sapiens
<400> 5
  
```

50  
 55  
 60  
 65

```

atggctctgg cccgaggcag ccggcagctg gggccctgg tgtggggcgc ctgcctgtgc 60
gtgctgggtc acgggcagca ggcgcagccc gggcaggget cggaccctgc ccgctggcgg 120
cagctgatcc agtgggagaa caacgggcag gtgtacagct tgetcaacte gggctcagag 180
  
```

ES 2 584 847 T3

tacgtgccg cggaaectc gcctccgag agtagctccc gggctctgct gcccggcgcg 240  
 ccccaggccc agcagcggcg cagccaeggg agccccggc gtccgcagge gccgtccctg 300  
 5 cccctgccg ggcgcgtggg ctgggaacc gtccgcggcc aggcgcggca cccattcggc 360  
 ttggccagg tcccagaca ctggccgag gtggccgtcg gggacagcac gggcatggcc 420  
 10 ctggcccga cctccgtctc ccagcaacgg cacgggggct ccgcctcctc ggtctcggct 480  
 teggccttcg ccagcaccta ccgccagcag ccctcctacc cgcagcagtt cccctacccg 540  
 caggcgcctc tctcagcca gtacgagaac tacgaccccg cgtccgggac ctacgaccag 600  
 15 ggtttcgtg actaccggcc cgcggggcgg ggcgtgggcg cggggggcgg ggcctgggcc 660  
 tcggcggggg teactaccc ctaccagccc cgggcgcgct acgaggagta cggcggcggc 720  
 20 gaagagctgc ccgagtacc gcctcagggc ttctaccgg ccccagagag gccctacgtg 780  
 ccgccgcgcg cgcgccccc cgcggcctg gaccgcgct actccacag tctgtacgc 840  
 25 gagggcacc cggcctcga gcaggctac cctgacccc gtcccaggge ggcgcaggcc 900  
 catggcggag acccacgctt gggctggta ccgccctac ccaaccgcc gcccgaggcg 960  
 tacgggcgcg cgcgcgcgct ggagccgcc taectgccg tgcgcagctc cgcacgccc 1020  
 30 ccgccggtg gggagcggaa cggcgcgag caggccgcc tcagcgtagg cagcgtgtac 1080  
 cggcccaacc agaacggccg cggctcctt gacttggctc cagaccacca ctatgtgcaa 1140  
 35 gcateccctt atgtgcagag agcccacctg tactccctgc gctgtctgc ggaggagaag 1200  
 tgtctggcca gcacagccta tgcccctgag gccaccgact acgatgtgcg ggtgctactg 1260  
 cgttccccc agcgcgtgaa gaaccaggc acagcagact tctccacca ccggccacgg 1320  
 40 cacacctgg agtggcacag ctgccaccag cattaccaca gcatggcga gttcagccac 1380  
 tacgacctac tggatgcag cacaggcaag aaggtggccg agggccaaa gccagttc 1440  
 45 tgcttgagg acagacctg tgacttcggc aacctcaagc gctatgcatg cccctctcat 1500  
 acccagggcc tgagcccagg ctgctatgac acctacaatg cggacataga ctgccagtg 1560  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 584 847 T3

atcgacataa cggacgtgca gcttggaac tacatctca agtgacagt gaacccaag 1620  
 tatattgttt tggagtctga cttcaaccaac aacgtggtga gatgcaacat tcactacaca 1680  
 5 ggtcgctacg tttctgcaac aaactgcaaa attgtccaat cctga 1725

<210> 6  
 <211> 574  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

15 Met Ala Leu Ala Arg Gly Ser Arg Gln Leu Gly Ala Leu Val Trp Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Cys Leu Cys Val Leu Val His Gly Gln Gln Ala Gln Pro Gly Gln  
 20 20 25 30  
 Gly Ser Asp Pro Ala Arg Trp Arg Gln Leu Ile Gln Trp Glu Asn Asn  
 25 35 40 45  
 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  
 55  
 60  
 65

Arg Glu Val Ala Val Gly Asp Ser Thr Gly Met Ala Leu Ala Arg Thr  
 130 135 140  
 Ser Val Ser Gln Gln Arg His Gly Gly Ser Ala Ser Ser Val Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Ser Ala Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Gln Gln Pro Ser Tyr Pro Gln Gln  
 165 170 175  
 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  
 Gly Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Val Ala Ser Ala Gly Val  
 210 215 220  
 Ile Tyr Pro Tyr Gln Pro Arg Ala Arg Tyr Glu Glu Tyr Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Leu Pro Glu Tyr Pro Pro Gln Gly Phe Tyr Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Arg Pro Tyr Val Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Leu Asp Arg  
 260 265 270  
 Arg Tyr Ser His Ser Leu Tyr Ser Glu Gly Thr Pro Gly Phe Glu Gln  
 275 280 285  
 Ala Tyr Pro Asp Pro Gly Pro Glu Ala Ala Gln Ala His Gly Gly Asp  
 290 295 300  
 Pro Arg Leu Gly Trp Tyr Pro Pro Tyr Ala Asn Pro Pro Pro Glu Ala

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



ES 2 584 847 T3

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

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

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

15 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

20 <210> 7  
 <211> 1254  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 7

atgagcttcc cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgccc gctagtccac 60  
 tgcgcccctc ccgcgcgcgg ccaccagcag cccccgcgcg agccgcgggc ggctccgggc 120  
 gcttggegcc agcagatcca atgggagaac aacgggcagg tgttcagctt gctgagcctg 180  
 ggctcacagt accagcctca gcgcgcgcgg gaccgcggcg ccgcggtccc tgggtcagcc 240  
 aacgectccg cccagcagcc ccgcactccg atcctgctga tccgcgacaa ccgcaccgcc 300  
 gcggcgcgaa cgcggcggc cggctcatct ggagtaccg ctggccgcc caggeccacc 360  
 gcccgctact ggttccaagc tggctactcg acatctagag cccgcgaagc tgggcgctcg 420  
 cgcgcggaga accagacagc gccgggagaa gttcctgcgc tcagtaacct gcggccgcc 480  
 agccgcgtgg acggcatggt gggcgacgac cttacaacc cttacaagta ctctgacgac 540  
 aacccttatt acaactacta cgatacttat gaaaggccca gacctggggg caggtaccgg 600

50

55

60

65

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





<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu His His Leu Gln Val Glu Glu Val Arg Ile Arg Pro Ala Val Gly  
 165 170 175  
 5  
 Trp Gly Arg Arg Pro Leu Pro Val Thr Glu Gly Leu Val Glu Val Arg  
 180 185 190  
 10  
 Leu Pro Asp Gly Trp Ser Gln Val Cys Asp Lys Gly Trp Ser Ala His  
 195 200 205  
 15  
 Asn Ser His Val Val Cys Gly Met Leu Gly Phe Pro Ser Glu Lys Arg  
 210 215 220  
 20  
 Val Asn Ala Ala Phe Tyr Arg Leu Leu Ala Gln Arg Gln Gln His Ser  
 225 230 235 240  
 25  
 Phe Gly Leu His Gly Val Ala Cys Val Gly Thr Glu Ala His Leu Ser  
 245 250 255  
 30  
 Leu Cys Ser Leu Glu Phe Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Ala Arg Cys Pro  
 260 265 270  
 35  
 Gly Gly Gly Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly Pro Val Tyr Ala  
 275 280 285  
 40  
 Ala Ser Ser Gly Gln Lys Lys Gln Gln Gln Ser Lys Pro Gln Gly Glu  
 290 295 300  
 45  
 Ala Arg Val Arg Leu Lys Gly Gly Ala His Pro Gly Glu Gly Arg Val  
 305 310 315 320  
 50  
 Glu Val Leu Lys Ala Ser Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Arg Lys Trp  
 325 330 335  
 55  
 60  
 65

Asp Leu His Ala Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser  
 340 345 350  
 5  
 Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met Gly Gln Gly Met Gly Ala  
 355 360 365  
 10  
 Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly Gln Glu Leu Ser Leu Trp  
 370 375 380  
 15  
 Lys Cys Pro His Lys Asn Ile Thr Ala Glu Asp Cys Ser His Ser Gln  
 385 390 395 400  
 20  
 Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Arg  
 405 410 415  
 25  
 Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His Glu Gly Arg Val Glu Val  
 420 425 430  
 30  
 Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly Asp  
 435 440 445  
 35  
 Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu  
 450 455 460  
 40  
 Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser Gly  
 465 470 475 480  
 45  
 Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Thr Glu  
 485 490 495  
 50  
 Leu Ser Leu Asp Gln Cys Ala His His Gly Thr His Ile Thr Cys Lys  
 500 505 510  
 55  
 Arg Thr Gly Thr Arg Phe Thr Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Thr Ala  
 515 520 525  
 60  
 65

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

Ser Asp Leu Leu Leu His Ser Ala Leu Val Gln Glu Thr Ala Tyr Ile  
 530 535 540

Glu Asp Arg Pro Leu His Met Leu Tyr Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys  
 545 550 555 560

Leu Ala Ser Ser Ala Arg Ser Ala Asn Trp Pro Tyr Gly His Arg Arg  
 565 570 575

Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Leu Gly Arg Ala Asp Phe  
 580 585 590

Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Val Trp His Glu Cys His Gly  
 595 600 605

His Tyr His Ser Met Asp Ile Phe Thr His Tyr Asp Ile Leu Thr Pro  
 610 615 620

Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu  
 625 630 635 640

Asp Thr Glu Cys Gln Glu Asp Val Ser Lys Arg Tyr Glu Cys Ala Asn  
 645 650 655

Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Val Gly Cys Trp Asp Leu Tyr Arg His  
 660 665 670

Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn  
 675 680 685

Tyr Ile Leu Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser  
 690 695 700



ES 2 584 847 T3

```

cctgacctg gtcctcaatg cggagatggt gcagcagacc acctacctgg aggaccggcc 60
5  catgttcattg ctgcagtggt ccatggagga gaactgcctc tcggcctcag ccgcgcagac 120
cgacccccacc acgggetacc gccggetect ggcctctcc tccagatcc acaacaatgg 180
10 ccagtcctgac ttccggccca agaaccggcg ccaecgctgg atctggcaeg actgtcacag 240
geactaccac agcatggagg tgttcaccca ctatgacctg ctgaacctca atggcaccaa 300
ggtaggcagag ggccacaagg ccagcttctg cttggaggac acagaatgtg aaggagacat 360
15 ccagaagaat taagagtgtg ccaacttcgg cgatcagggc atcaccatgg gctgctggga 420
catgtaccgc catgacatcg actgccagtg ggtagacatc actgacgtgc cccctggaga 480
20 ctacctgttc caggttgta ttaaccccaa cttagaggtt gcagaatccg attactccaa 540
caacatcatg aatgcagga gccgctatga cggccaccgc atctggatgt acaactgcca 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
35 acatgcatgc cctgacctgg tcctcaatgc 30
<210> 16
<211> 30
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido de ADN de una sola hebra
45 <400> 16
cccaagcttg gaaccaccta tgtggcagtt 30
<210> 17
<211> 210
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia proteínica derivada de la fusión del fragmento de LOR-1 (1641-2253) para una marcación 6XHis
55 de 5'
<400> 17
60
65

```

ES 2 584 847 T3

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

- 60 <210> 18
- <211> 660
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 65 <223> La sonda de Northern blots consistió de los nucleótidos 1-660 de la ADNc de LOR-1
- <400> 18



atggagagge ctctgtgctc ccacctctgc agctgcctgg ctatgctggc cctcctgtcc 60  
 5 cccctgagcc tggcacagta tgacagctgg cccattacc ccgagtactt ccagcaaccg 120  
 gctcctgagt atcaccagcc ccaggccccc gccaacgtgg ccaagattca gctgcgcctg 180  
 10 gctgggcaga agaggaagca cagcgagggc cgggtggagg tgtactatga tggccagtgg 240  
 ggcaaccgtg gcgatgacga cttctccate caeagtccc acgtgcttg ccgggagctg 300  
 ggctatgtgg agccaagtc ctggactgcc agctcctct acggcaaggg agaaggccc 360  
 15 atctggtag acaatctcca ctgtactggc aacgaggcga cccttgacg atgcacctcc 420  
 aatggctggg gcgtcaciga ctgcaagcac acggagatg tccgtgtgtg gtgcagcgc 480  
 20 aaaaggattc ctgggttcaa atttgacaat tegtgtatca accagataga gaacctgaat 540  
 atccaggtgg aggacattcg gattcgagcc atcctctcaa cctaccgcaa gcgcacccca 600  
 gtgatgggg gctacgtgga ggtgaaggag ggcaagacct ggaagcagat ctgtgacaag 660  
 25 <210> 19  
 <211> 530  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> la sonda de Northern blots consistió de los nucleótidos 1061-1590 de la ADNc de LOR-2  
 <400> 19  
 gagaagctct gagtggcctc cgcattgggc agggcatggg tgctatccac ctgagtgaag 60  
 35 ttgctgctc tggacaggag ctctccctct ggaagtccc ccacaagaac atcacagctg 120  
 aggattgttc acatagccag gatgccgggg tccggtgcaa cctaccttac actggggcag 180  
 40 agaccaggat ccgactcagt gggggccgca gccaacatga ggggcgagtc gaggtgcaaa 240  
 tagggggacc tgggccctt cgtcggggc tcatctgtgg ggatgactgg gggacctgg 300  
 aggccatggt ggctgtagg caactgggtc tgggtacgc caaccacgc ctgcaggaga 360  
 45 cctggtactg ggaactctgg aatataacag agtggtgat gagtggagtg cgtgcacag 420  
 ggactgagct gtcctggat cagtgtccc atcatggcac ccacateacc tgcaagagga 480  
 50 cagggaccgg cttcactget ggagtcctct gttctgagc tgcacagat 530  
 55  
 60  
 65

**Reivindicaciones**

1. Un método excesivo ex vivo o in vitro para la evaluación de la malignidad de un tumor del colon que comprende:
  - (a) determinar un nivel de tejidos de un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o
  - (b) determinar los niveles de ARNm que codifican a un polipéptido que sean por lo menos un 95% homólogos al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, en un tejido del tumor del colon, evaluando, por lo tanto, la malignidad del tumor de colon.
2. Un método ex vivo o in vitro para predecir una prognosis de un individuo diagnosticado con cáncer al colon que comprende:
  - (a) suministrar un tejido de tumor de colon obtenido del individuo, y;
  - (b1) determinar un nivel de tejidos de un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o
  - (b2) determinar los niveles de ARNm que codifica a un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, en dicho tejido tumoral del colon para, de esa forma, evaluar la malignidad de dicho tejido tumoral de colon y predecir la prognosis del individuo diagnosticado con cáncer al colon.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicho tejido de dicho tumor del colon es obtenido usando una biopsia del colon y/o una cirugía de colon.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la determinación de dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido se efectúa por medio un método de detección inmunológica o dicha determinación de dichos niveles de ARNm se efectúa por medio de un método de detección de ARN.
5. El método de la reivindicación 4, donde dicho método de detección inmunológica es seleccionado de un grupo que consiste de un radio-inmuno ensayo (RIA), un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay), un análisis de Western blots, y un análisis inmunohistoquímico.
6. El método de la reivindicación 4, donde dicho método de detección de ARN es seleccionado de un grupo que consiste de un análisis de Northern blots, una coloración de hibridación in situ, un análisis RT-PCR, y una coloración RT-PCR in situ.
7. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la malignidad de dicho tejido tumoral del colon es evaluada al comparar a dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido en dicho tejido tumoral de colon con un nivel de tejidos de dicho polipéptido en un tejido normal de colon.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7, donde el método es ejecutado al determinar los niveles del ARNm que codifica al polipéptido de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7, donde el método es ejecutado al determinar un nivel de tejidos de un polipéptido de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7, donde la determinación de dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido es ejecutada utilizando un anticuerpo anti-LOR-1 o uno de sus fragmentos.
11. El método de la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo anti-LOR-1 es un anticuerpo policlonal generado utilizando a un fragmento que tiene una secuencia de aminoácidos de los 200 aminoácidos de la terminal C de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.
12. Un método ex vivo o in vitro para determinar la etapa de un tumor de colon que comprende:
  - (a) determinar un nivel de tejidos de un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o
  - (b) determinar los niveles de ARNm que codifican a un polipéptido que es por lo menos un 95% homólogo al polipéptido establecido en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, en un tejido tumoral de colon, evaluando, por lo tanto, la etapa del tumor del colon.
13. El método de la reivindicación 12, donde dicho tejido de dicho tumor de colon es obtenido utilizando a una biopsia de colon y/o a una cirugía de colon.

14. El método de la reivindicación 12, donde la determinación de dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido es efectuada mediante un método de detección inmunológica o dicha determinación de dichos niveles de ARNm es efectuada mediante un método de detección de ARN.

5

15. El método de la reivindicación 14, donde dicho método de detección de ARN es seleccionado de un grupo que consiste de un análisis de Northern blots, una coloración de hibridación in situ, un análisis RT-PCR, y una coloración de RT-PCR in situ.

10

16. El método de la reivindicación 12, donde la determinación de dicho nivel de tejidos de dicho polipéptido es ejecutada utilizando un anticuerpo policlonal anti-LOR-1 generado usando a un fragmento que tiene una secuencia de aminoácidos de los 200 aminoácidos de la terminal C de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

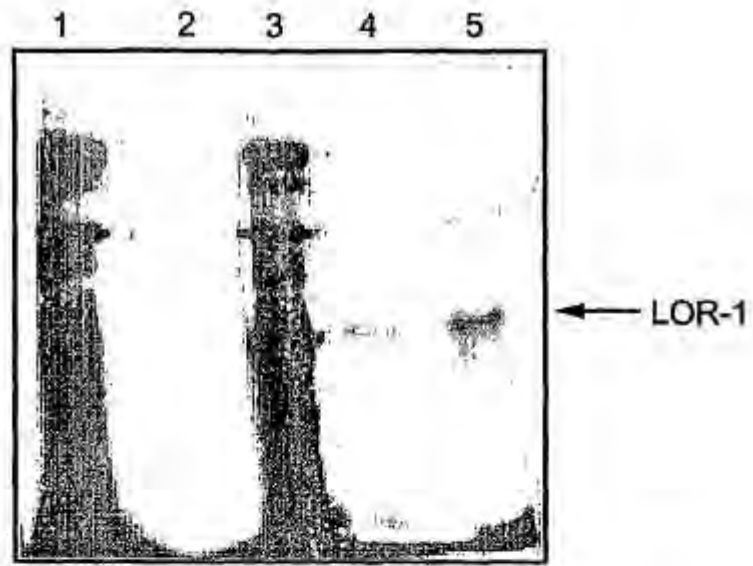


Fig. 1

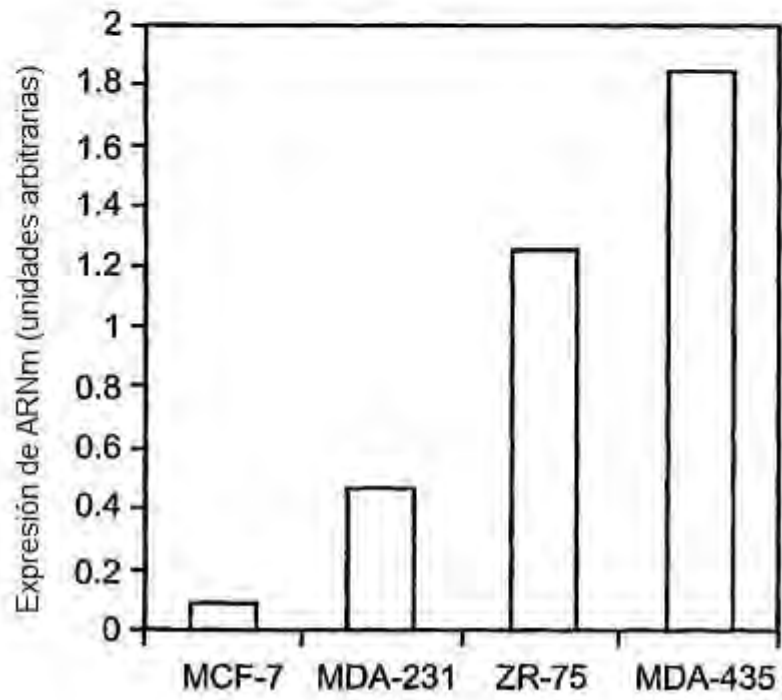


Fig. 2

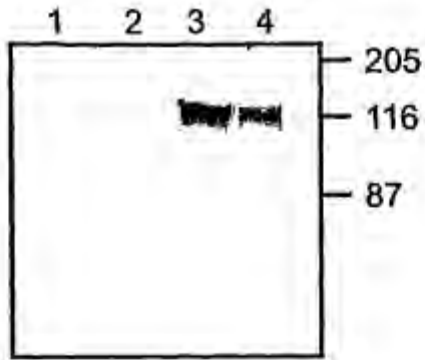


Fig. 3

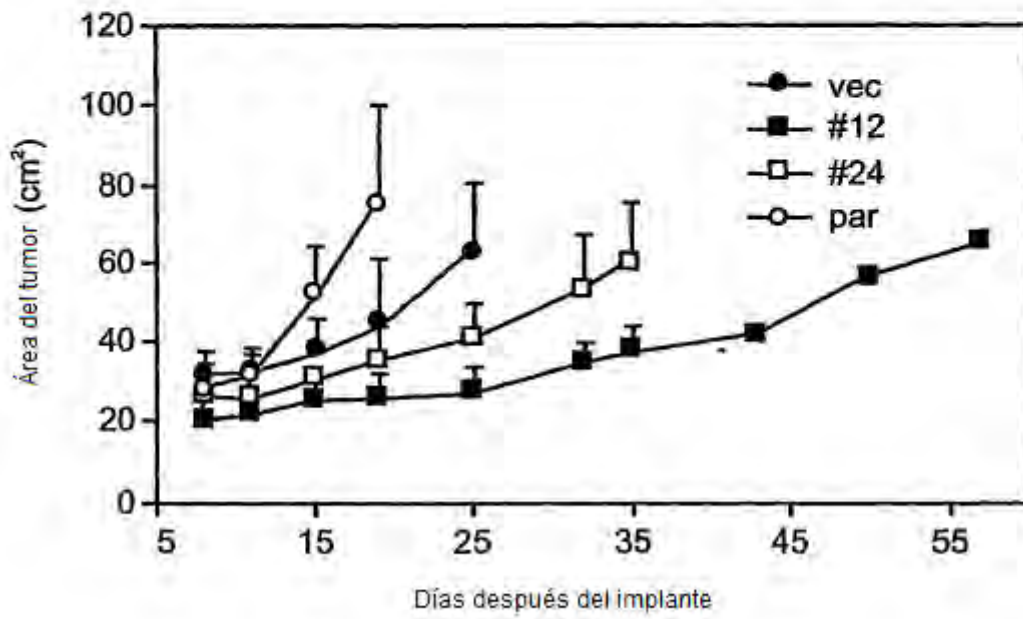


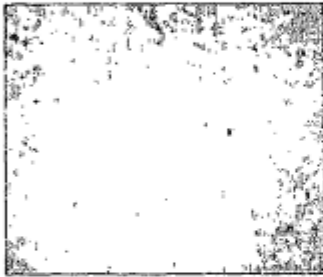
Fig. 4



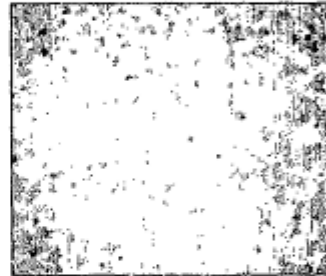
**Fig. 5a**



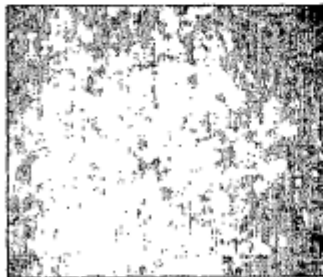
**Fig. 5b**



**Fig. 6a**



**Fig. 6b**



**Fig. 6c**



**Fig. 6d**

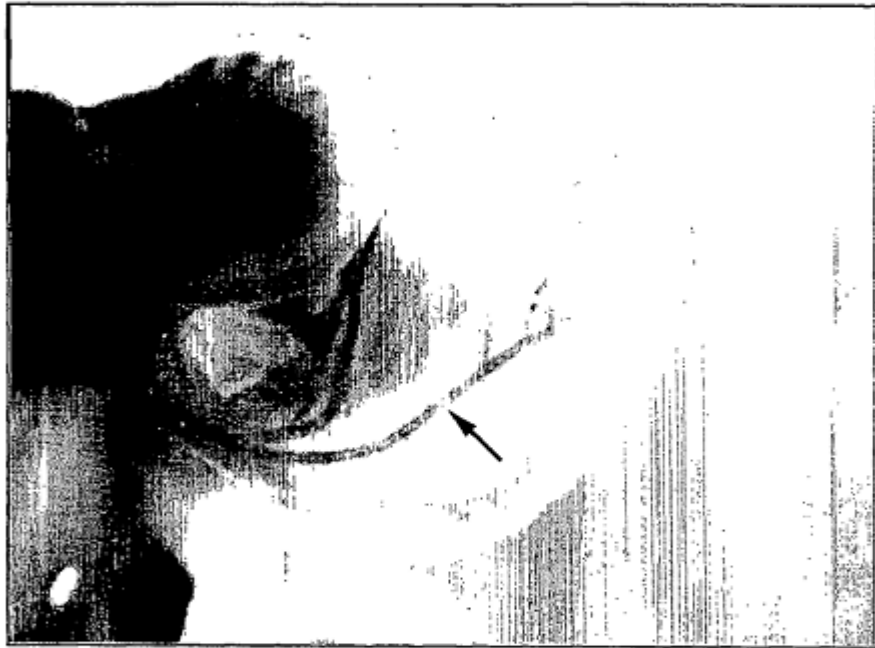


Fig. 7









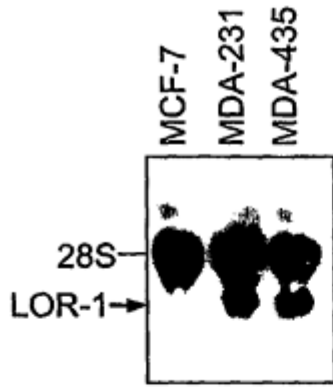


Fig. 9a

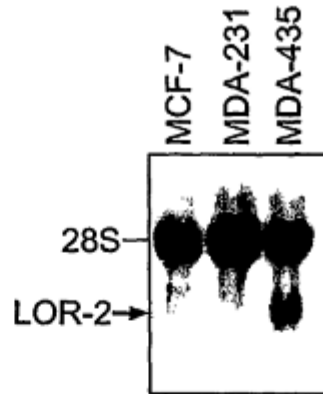


Fig. 9b

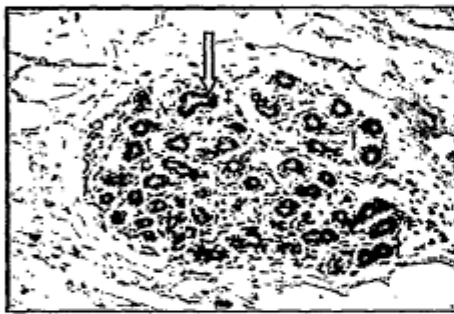


Fig. 9c



Fig. 9d

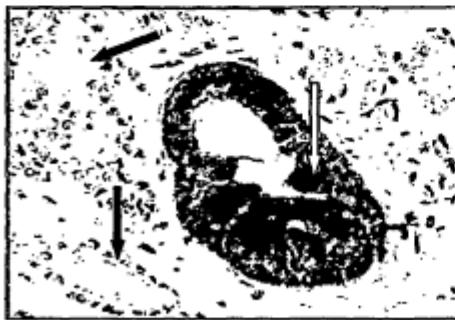


Fig. 9e

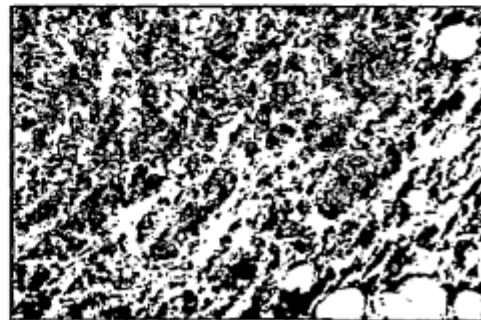


Fig. 9f

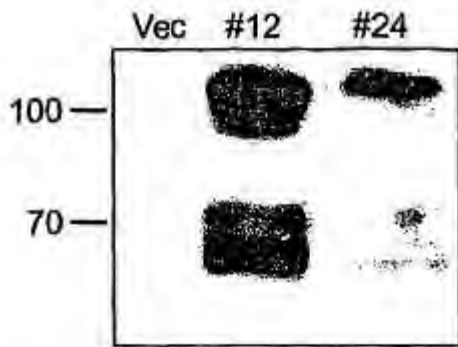


Fig. 10a

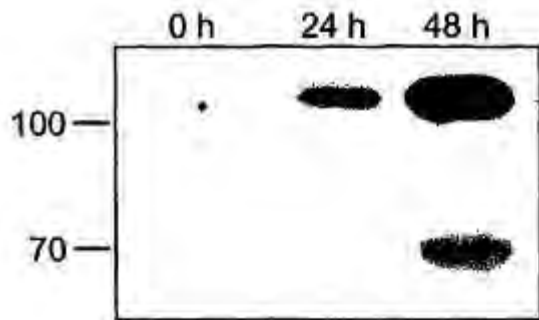


Fig. 10b

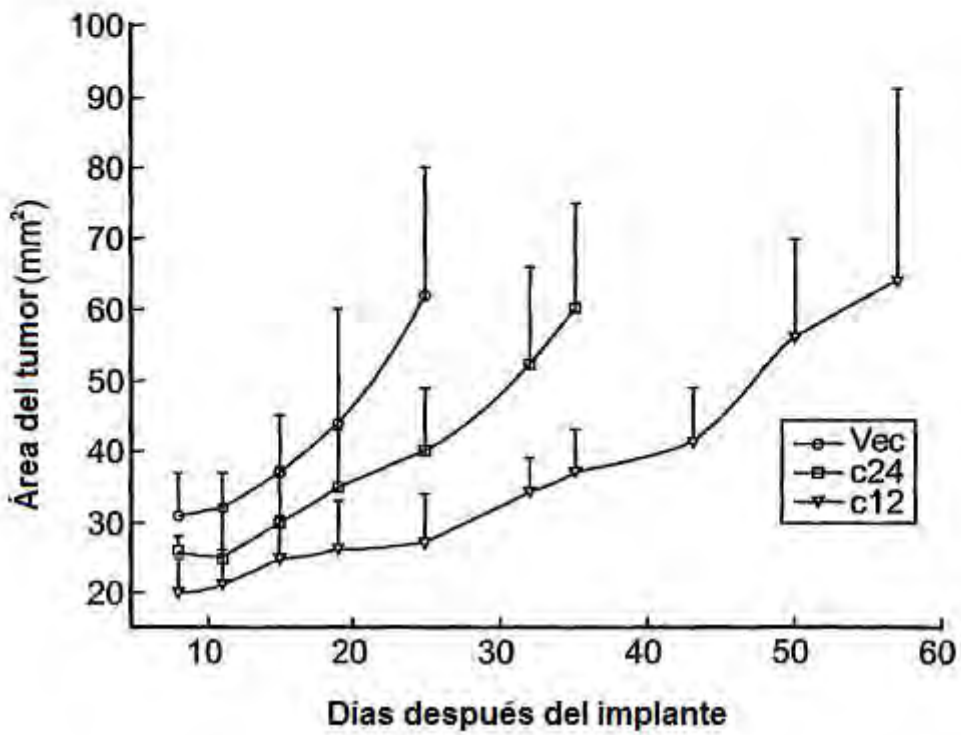


Fig. 10c

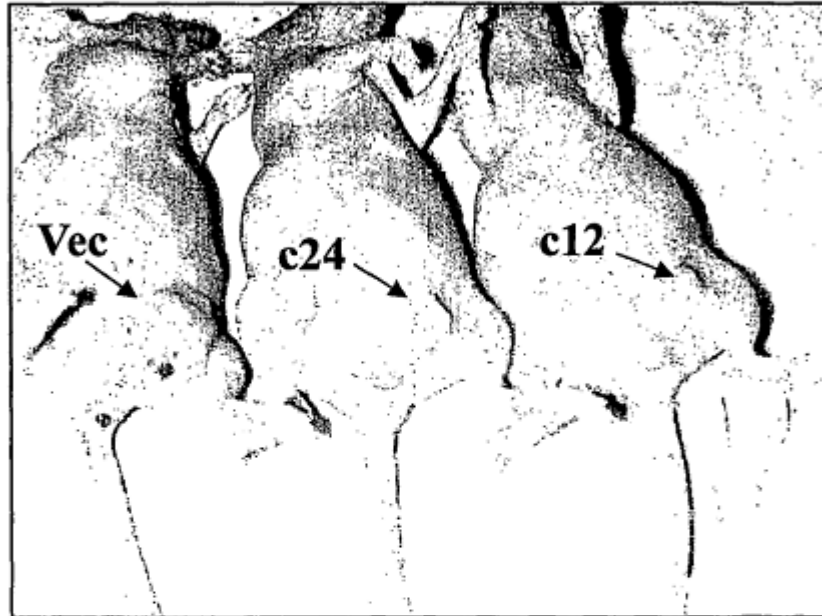


Fig. 10d

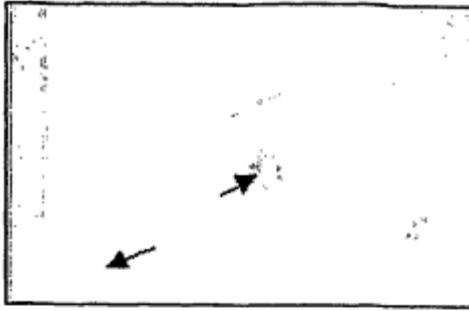


Fig. 11a

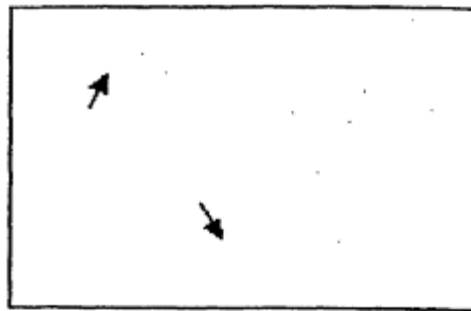


Fig. 11b

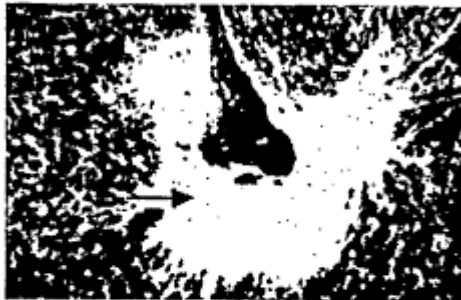


Fig. 11c

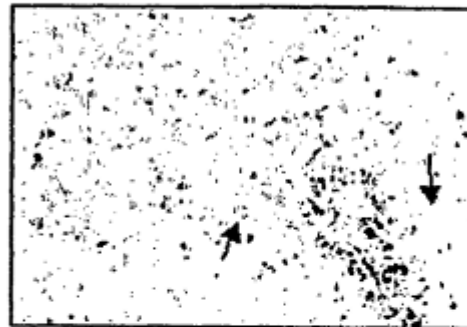


Fig. 11d

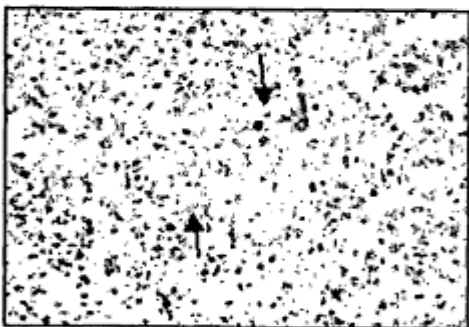


Fig. 11e



Fig. 11f



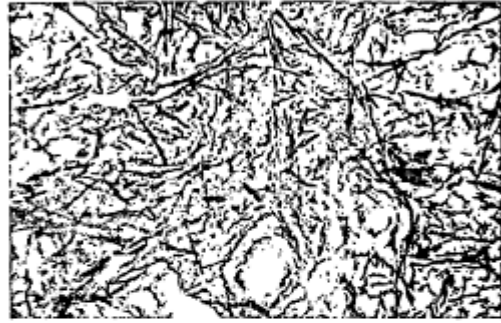
Fig. 11g



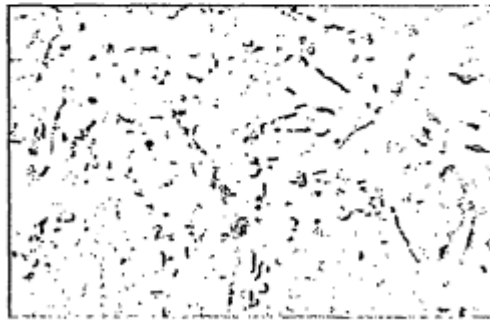
Fig. 11h



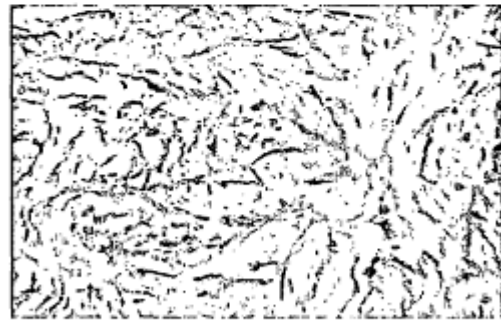
**Fig. 12a**



**Fig. 12b**



**Fig. 12c**



**Fig. 12d**



Fig. 13a

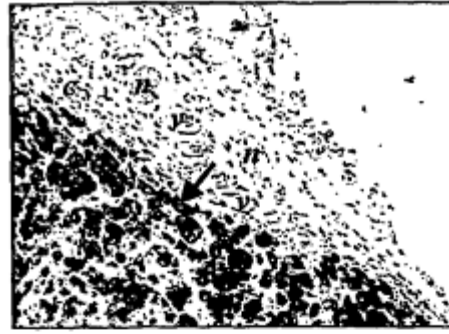


Fig. 13b



Fig. 13c

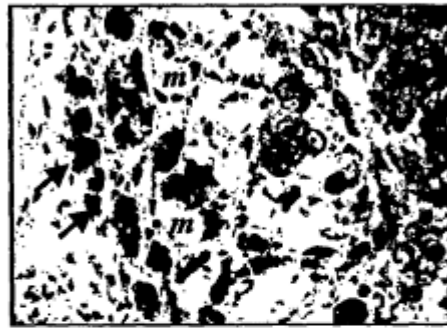


Fig. 13d

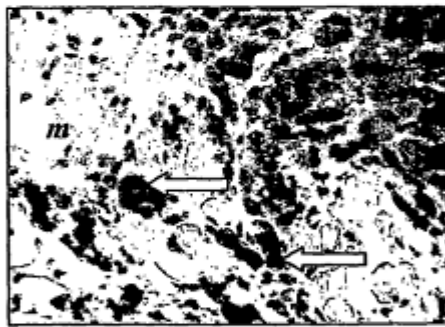


Fig. 13e



Fig. 13f

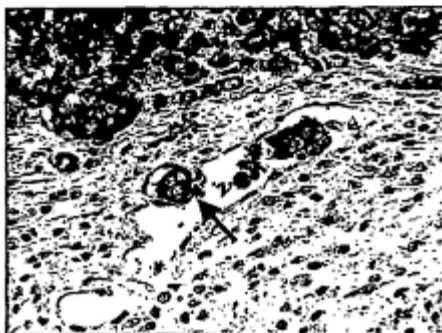


Fig. 13g

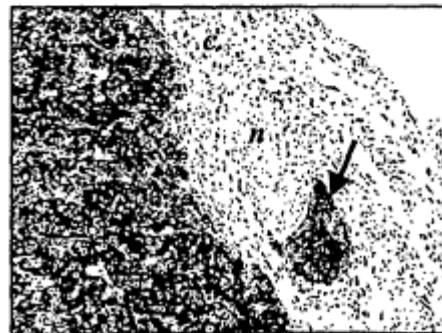
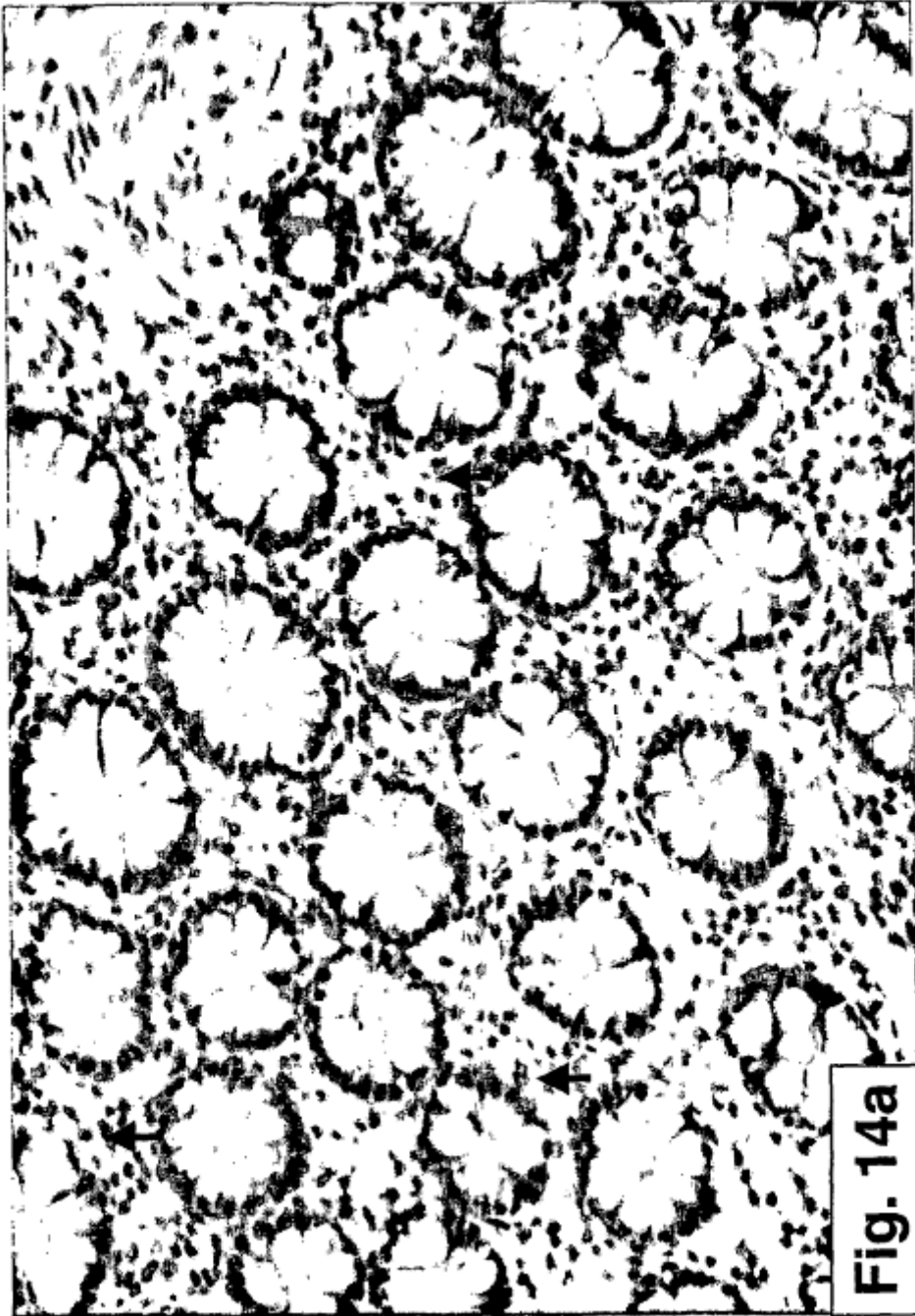


Fig. 13h

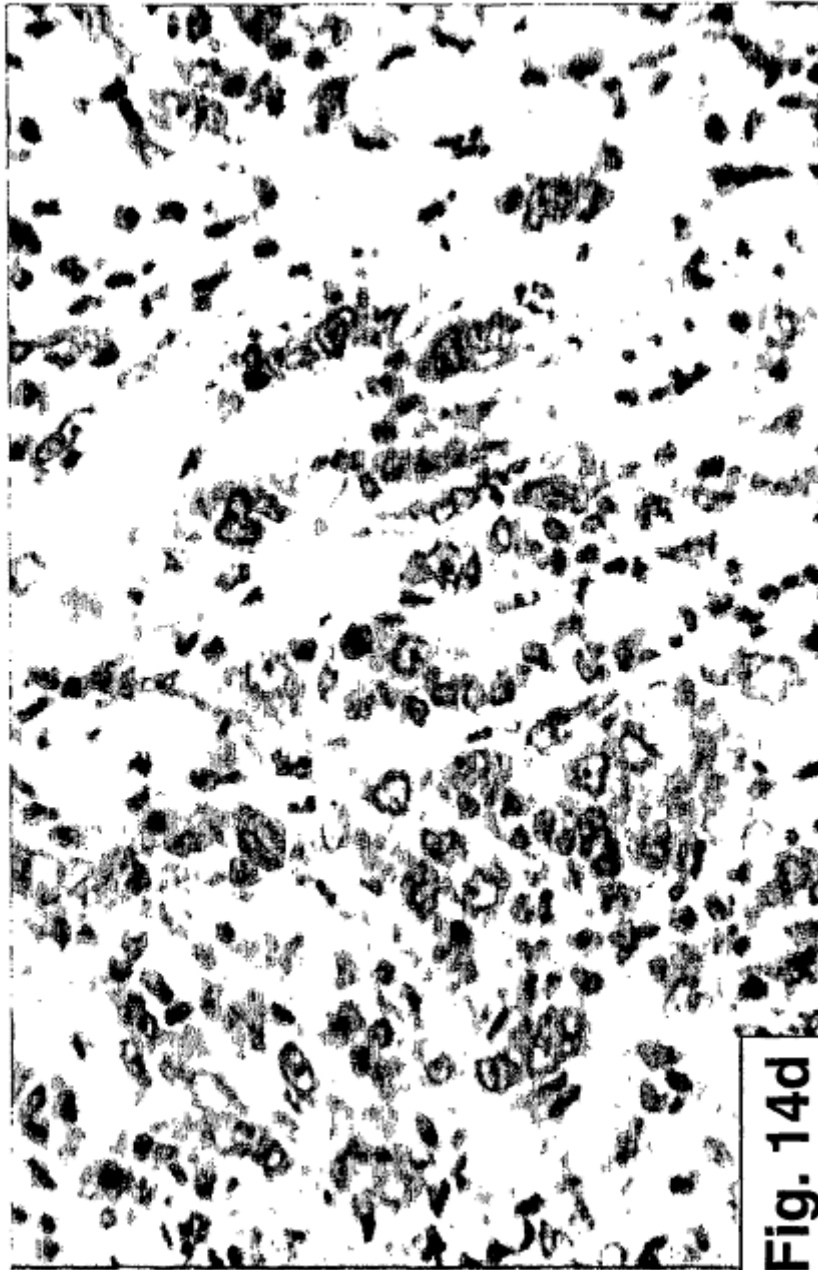








**Fig. 14c**



**Fig. 14d**