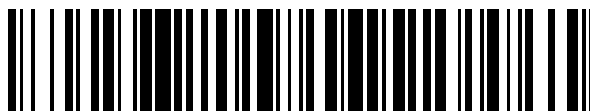


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 430**

51 Int. Cl.:

A61K 31/535 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2008 E 08718670 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2146736**

54 Título: **SRPIN340 como modulador de empalme de VEGF y agentes anti-angiogenicos**

30 Prioridad:

09.03.2007 GB 0704678

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

14.10.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF BRISTOL (100.0%)
RESEARCH & ENTERPRISE DEVELOPMENT-3RD
FLOOR, SENATE HOUSE, TYNDALL AVENUE
BRISTOL, BS8 1TH, GB**

72 Inventor/es:

**BATES, DAVID;
HARPER, STEVEN, JAMES y
NOWAK, DAWID, GRZEGORZ**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

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

ES 2 586 430 T3

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

DESCRIPCIÓN

SRPIN340 como modulador de empalme de VEGF y agentes anti-angiogénicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a tratamientos anti-angiogénicos y a composiciones para uso en los mismos.

5 Antecedentes de la invención

La angiogénesis es un proceso patológico subyacente significativo en muchas, si no en todas, las enfermedades principales en humanos y otros mamíferos del mundo occidental. Además del cáncer, por ejemplo es una característica prominente de enfermedad vascular (desarrollo de placa ateromatosa que requiere proliferación de los vasa vasorum), diabetes, artritis reumatoide, retinopatía proliferativa. La predominancia de angiogénesis dentro de las patologías clínicas y el papel relativamente limitado en la fisiología normal (en comparación con la división celular) respalda la propuesta de que la terapia anti-angiogénica puede ser una modalidad de tratamiento efectiva y, en términos generales, bien tolerada, particularmente pero no exclusivamente en pacientes con enfermedades que amenazan la vida.

El pre-ARNm de VEGF es empalmado diferencialmente de 8 exones para formar ARNm que codifican al menos para seis proteínas (38) que han sido ampliamente estudiadas y aceptadas como vasodilatadores pro-angiogénicos de pro-permeabilidad. La forma más estudiada tiene 165 aminoácidos en la estructura final y se denomina VEGF₁₆₅. En 2002, una isoforma alternativa, VEGF_{165b}, fue identificada (2 y WO-A-03/012105), generada mediante selección de sitio aceptor de empalme diferencial en el 3'UTR de exón 8 del gen VEGF (véase figura 1A de los dibujos adjuntos), dando lugar de esta manera a dos sub-exones, denominados exón 8a (llamado previamente exón 8) y exón 8b (llamado previamente exón 9), manteniéndose con la nomenclatura para el exón 6 (24). El empalme distal en el sitio aceptor de empalme para exón 8b da lugar a un marco de lectura abierto de 18 bases. Los campos de lectura abiertos de exones 8a y 8b codifican ambos para 6 aminoácidos; el exón 8a para Cys-Asp-Lys-Pro-Arg-Arg y el exón 8b para Ser-Leu-Thr-Arg-Lys-Asp. Este empalme alternativo predijo una familia alterna de isoformas de VEGF (complementarias a las isoformas existentes) expresadas como proteínas múltiples en tejidos y células humanas, de los cuales se han identificado ahora VEGF_{121b}, VEGF_{165b}, VEGF_{145b} y VEGF_{189b} (42). La familia ha sido denominada VEGF_{xxx}b en la cual xxx es el número de aminoácido (véase la figura 1B de los dibujos adjuntos). Este terminal C alterno permite que VEGF_{165b} inhiba la proliferación endotelial, migración, vasodilatación inducidas por VEGF₁₆₅ (2), y angiogénesis in vivo y crecimiento tumoral (54). Se mostró que estos efectos eran específicos para VEGF, puesto que VEGF_{165b} no afecta el crecimiento o la proliferación celulares endoteliales inducidos por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Además, a diferencia de todas las otras isoformas de VEGF, VEGF_{165b} se disminuye de manera regulada en cánceres investigados hasta ahora, que incluyen melanoma maligno (44) y carcinoma de células renales (2), de próstata (54) y de colon (52). Además, la expresión de variante de empalme de VEGF se modifica en fenotipos microvasculares angiogénicos de enfermedad ocular proliferativa y pre-eclampsia (3, 42). Los dominios de enlazamiento de receptor todavía están presentes en VEGF_{165b}, y por lo tanto este actúa como un inhibidor competitivo de VEGF₁₆₅; se enlaza al receptor pero no estimula la fosforilación completa de tirosina del VEGFR activado por VEGF₁₆₅ (4, 54). Por lo tanto, esta isoforma parece ser un agente anti-angiogénico endógeno formado mediante empalme diferencial.

La nomenclatura descrita antes de las variantes de empalme alternativo del exón 8 de terminal C del gen VEGF, el cual identifica como exón 8a la porción de exón 8 adyacente al sitio de empalme proximal y que codifica la secuencia de aminoácidos CDKPRR (SEQ. ID. No. 1) y como exón 8b la porción de exón 8 adyacente al sitio de empalme distal y que codifica la secuencia de aminoácidos SLTRKD (SEQ. ID. No. 2), será usada en la presente en lugar de la antigua nomenclatura usada, por ejemplo, en el documento WO-A-03/012105 (véase la figura 4a del documento WO-A-03/012105), la cual identificó el exón que codificaba SEQ. ID. No. 1 como exón 8 y el exón que codificaba SEQ. ID. No. 2 como "exón 9".

El empalme alternativo es un mecanismo de expresión génica diferencial que permite la inclusión o sustitución de exones específicos y la producción de proteínas distintas estructuralmente y funcionalmente de una secuencia de codificación sencilla (27, 48). Se acepta ampliamente que el empalme alternativo de VEGF que da lugar a la familia pro-angiogénica convencional es fundamental para la regulación de su biodisponibilidad; la inclusión y exclusión de exones 6 y 7, que contienen los dominios que enlazan a heparina, afectan la generación de proteínas capaces de difundirse (24). Además, la expresión génica de VEGF se regula de modo transcripcional mediante una diversidad de factores que incluyen hipoxia (47), factores de crecimiento y citosinas (18) (29) (40) (1), hormonas (49, 8), oncogenes y genes supresores de tumor (45, 37). A pesar de la importancia de las isoformas de VEGF pro- y anti-angiogénicas en la regulación del 'interruptor' angiogénico en una amplia variedad de estados patológicos, y en contraste con la bien descrita regulación de transcripción de VEGF de ARNm, casi no se conoce nada acerca de las rutas moleculares y celulares que regulan el empalme alternativo de VEGF en general y el empalme terminal de C, en particular. De los más de 18 000 documentos publicados sobre VEGF, solamente tres han investigado la regulación del empalme, más precisamente (30, 9, 12).

El empalme de ARNm ocurre durante la transcripción (36) mediada por proteínas de empalme que forman el espliceosoma (5). El corte y empalme es regulado, sin embargo, mediante factores regulatorios de corte y empalme (SRFs). Estos incluyen las proteínas de residuo de serina/arginina (SR) (por ejemplo 9G8, SF2/ASF, Srp40, Srp55, etc) que regulan el enlazamiento a promotores de empalme de exón (ESEs) en el ARNm (5).

5 Los mecanismos generales de corte y empalme pueden regularse genéticamente: las secuencias de bases en la transcripción influyen las afinidades de factor de empalme (33), y los promotores también pueden influir el empalme alternativo por medio del reclutamiento selectivo de factores de empalme al dominio de terminal C de polimerasa ARN 1 (23). También es claro ahora que las rutas de transducción de señales pueden influir el empalme alternativo en respuesta a señales ambientales (13, 26). Una mutación de secuencia en tumores puede teóricamente dar lugar a empalme modificado. Sin embargo, puesto que se ha demostrado previamente empalme de VEGF₁₆₅ a VEGF_{165b} luego de diferenciación de células epiteliales glomerulares (11), es improbable que este empalme sea dependiente de mutación.

15 Pre-ARNm tiene secuencias intrónicas y exónicas que se enlazan a promotores de empalme y silenciadores de SRF (22). El empalme de exón depende del balance de actividades de proteínas SR, incluyendo SF2/ASF, Srp40, Srp55, y 9G8. Además, se ha mostrado previamente que factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento 1 (IGF-1), similar a insulina, factor β de crecimiento de transformación (TGF- β) y factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF) incrementan la expresión total de VEGF, pero su efecto en la selección del sitio de empalme del exón terminal era desconocido previamente (16, 18, 31, 34).

20 Los inventores han investigado el papel potencial de los factores de empalme de SR, cinasas y factores de crecimiento en el empalme de exón terminal de VEGF.

25 Los inventores describen en la presente su sorprendente hallazgo a partir de este trabajo de que los agentes que causan que se favorezca la selección del sitio de empalme distal (DSS por distal splice site) en exón 8 de VEGF (véanse las figuras 1 y 4a del documento WO-A-03/012105 y la figura 1 de los dibujos adjuntos) pueden desempeñar un papel importante en la regulación de corte y empalme alternativos a favor de las isoformas anti-angiogénicas de VEGF_{xxx}b, un efecto que parece ser general a toda las isoformas de VEGF estudiadas hasta ahora, a partir de lo cual los inventores han establecido que los promotores de VEGF-exón-8-DSS y/o inhibidores de VEGF-exón-8-PSS (sitio de empalme proximal) y sus activadores in vivo, reguladores del aumento y potenciadores, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para control de su actividad primaria o de los efectos de los mismos, y sistemas de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes anteriores in vivo, tendrán actividades terapéuticas valiosas en terapias anti-angiogénicas.

35 Los inventores también describen en la presente su sorprendente hallazgo a partir de este trabajo de que los agentes que causan que se favorezca la selección de PSS en el exón 8 de VEGF (véanse figuras 1 y 4a del documento WO-A-03/012105 y la figura 1 de los dibujos adjuntos) pueden desempeñar un papel importante en la regulación de empalme alternativo a favor de las isoformas pro-angiogénicas de VEGF_{xxx}a, un efecto que parece ser general a todas las isoformas de VEGF estudiadas hasta ahora, a partir de lo cual los inventores han establecido que los promotores de VEGF-exón-8-PSS y/o los inhibidores de VEGF-exón-8-DSS y sus activadores in vivo, reguladores de aumento y potenciadores, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para el control de su actividad primaria por los efectos de los mismos, y los sistemas de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes precedentes in vivo, tendrán actividades terapéuticas valiosas en terapias pro-angiogénicas.

Descripción de la invención

45 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis anormalmente incrementada o una sobreproducción anormal de isoformas pro-angiogénicas de VEGF en un sujeto mamífero; en cuyo caso, el promotor de VEGF-exón-8-DSS o el inhibidor de VEGF-exón-8-PSS es SRPIN 340; o análogos funcionalmente activos y fragmentos funcionalmente activos del agente precedente; y en cuyo caso la enfermedad o trastorno se seleccionan de neoplasia maligna, metástasis tumoral, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía proliferativa.

50 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona una composición para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis anormalmente incrementada o sobreproducción anormal de isoformas de VEGF pro-angiogénicas en un sujeto mamífero, en cuyo caso la composición comprende una cantidad efectiva de un promotor de VEGF-exón-8-DSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS tal como se define en el primer aspecto, en asociación o mezcla con un soporte, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptables; en cuyo caso la enfermedad o el trastorno se seleccionan de neoplasia maligna, metástasis tumoral, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, y retinopatía proliferativa.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona el uso de un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS tal como se define en el primer aspecto, para la fabricación de un medicamento para terapia anti-angiogénica en un sujeto mamífero; en cuyo caso la enfermedad o el desorden se seleccionan de neoplasia maligna, metástasis tumoral, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía proliferativa.

Introducción

En la presente se describe un método de tratamiento pro- o anti-angiogénico de un sujeto mamífero, de manera particular pero no exclusiva de un sujeto humano, y el método comprende control específico de sitio de empalme alternativo durante el procesamiento de pre-ARNm de VEGF transcrito desde el exón terminal C del gen VEGF usando agentes de control para el empalme, en cuyo caso uno o más agentes de control que favorecen el empalme de sitio de empalme terminal (PSS) en dicho procesamiento se usa en el tratamiento pro-angiogénico y uno o más agentes de control que favorecen el empalme del sitio de empalme distal (DSS) en dicho procesamiento se utiliza en el tratamiento anti-angiogénico.

El empalme de PSS favorece la inclusión en el dominio terminal C del VEGF expresado de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. No. 1 codificada por exón 8a del gen VEGF, lo cual conduce a expresión de isoformas generalmente pro-angiogénicas de VEGF.

El empalme de DSS favorece la inclusión en el dominio terminal C del VEGF expresado de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. No. 2 codificada por exón 8b del gen VEGF, lo cual conduce a expresión de isoformas generalmente anti-angiogénicas de VEGF.

El agente de control que favorece el empalme de PSS puede usarse, si se desea, en asociación con uno o más agentes de control para el empalme que suprime o inhibe el empalme de DSS.

El agente de control que favorece el empalme de DSS puede usarse, si se desea, en asociación con uno o más agentes de control para el empalme que suprime o inhibe el empalme de PSS.

Si se desea, los agentes de control pueden ajustarse durante el período de tratamiento para cambiar entre tratamiento pro- y anti-angiogénico. El cambio puede proceder ya sea desde pro- a anti- o desde anti- a pro-, y puede realizarse una vez o de modo repetido hacia atrás y hacia delante, según se desee durante el tratamiento.

El control del tratamiento pro- y/o anti-angiogénico, incluyendo el control de cambio entre los dos, puede efectuarse de manera conveniente promedio de co- agentes o agentes secundarios presentes que actúan sobre porciones de los agentes de control o se someten a procesos de control relacionados o compiten con los agentes de control y de esta manera controlan sus actividades y/o la selectividad de sitio de corte y empalme. De modo alternativo o adicional, el control del tratamiento pro- y/o anti-angiogénico puede efectuarse seleccionando el agente de control para el proceso. El agente de control puede incorporar al menos un dominio que puede activarse y desactivarse para un control adicional. Véase la discusión bajo el título "Agentes" más adelante para mayor información.

El tratamiento pro-angiogénico favorece en particular la producción de una o más de las formas de VEGF: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃ y VEGF₁₈₉, particularmente VEGF₁₆₅. El tratamiento anti-angiogénico favorece en particular la producción de una o más isoformas de VEGF: VEGF_{121b}, VEGF_{145b}, VEGF_{165b}, VEGF_{183b} y VEGF_{189b}, particularmente VEGF_{165b}.

El tratamiento puede realizarse administrando a un sujeto que necesite tratamiento anti-angiogénico una cantidad efectiva de uno o más agentes, por cualquier ruta convencional de administración, seleccionados de potenciadores de VEGF-exón-8-DSS e inhibidores de VEGF-exón-8-PSS, sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores in vivo, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tengan una funcionalidad secundaria, útil para controlar su actividad primaria o los efectos de la misma, y un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes precedentes in vivo, o cualquier combinación de los mismos. La ruta de administración puede, por ejemplo, seleccionarse de administración oral, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP) e intra-arterial, en una cavidad tal como, por ejemplo, el espacio pleural o la vejiga, y administración en el ojo o en el fluido cerebrospinal (CSF).

En la presente también se describe un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o un inhibidor de un activador, regulador de aumento o potenciador individuo del mismo, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria por los efectos de la misma, o un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes anteriores in vivo, o cualquier combinación de los mismos, para usar en un método de tratamiento anti-angiogénico de un sujeto mamífero, de modo particular pero no exclusivo un sujeto humano.

En la presente también se describe una composición, por ejemplo un medicamento, para usar en un método de tratamiento anti-angiogénico de un sujeto mamífero, de modo particular pero no exclusivo un sujeto humano, y la

composición comprende una cantidad efectiva de un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS, o un activador, regulador de aumento o potenciador in vivo del mismo, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria por los efectos de la misma, o un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los anteriores agentes in vivo, o cualquier combinación de los mismos, en asociación o mezcla con un soporte, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptables.

En la presente también se describe el uso de un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS, o un activador, regulador de aumento o potenciador in vivo del mismo, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria por los efectos de la misma, o un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes in vivo anteriores, o cualquier combinación de los mismos, para usar en la fabricación de un medicamento para terapia anti-angiogénica en un sujeto mamífero, de modo particular pero no exclusivo un sujeto humano.

Tales agentes incluyen, por ejemplo, inhibidores específicos de factor de crecimiento de transformación (TGF)- β 1, IGF- β R1, SRPK1 y/o SRPK2 (por ejemplo, SRPIN 340, un inhibidor específico de cinasas SRPK1 y SRPK2), antígeno-1 intercelular de células T (TIA-1), cinasas MAP capaces de activar MKK3/MKK6 (por ejemplo, p38 MAPK), cinasas de familia tipo Cdc20 (Clk): Clk1/sty, Clk2, Clk3 y Clk4, el factor de empalme SR SRp55, sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores in vivo, análogos funcionalmente activos y fragmentos funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria por los efectos de la misma, sistemas de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes in vivo anteriores, agentes de bloqueo de transcripción/traducción que se enlazan al PSS de exón 8a del pre-ARNm y/o en la región del pre-ARNm a la cual se enlazan la proteína regulatoria de empalme para inhibir el empalme proximal (por ejemplo, morfolinós u otros agentes de bloqueo sintéticos, conjugados de péptido, proteínas de enlazamiento de ARN, agentes poli- y oligonucleótidos de bloqueo de interferencia de ARN (iARN) (por ejemplo ARNs, microARN (RNAi), RNAsi), ácido nucleico de péptido (PNA), inhibidores de cinasa C de proteína (PKC) (por ejemplo, maleimida de bisindolilo (BIM) y otros inhibidores de PKC mecánicamente análogos, particularmente inhibidores que se enlazan en el dominio catalítico de PKC), o cualquier combinación de los mismos. Todos estos materiales, incluyendo los sistemas de vector de expresión, se denominan en la presente "agentes". Para mayores detalles véase la sección más adelante con el encabezado "Agentes".

El tratamiento anti-angiogénico incluye preferiblemente el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis anormal o sobreproducción anormal de isoformas de VEGF pro-angiogénicas (VEGF_{xxx}). Tales enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedad vascular (por ejemplo vasoconstricción y trastornos caracterizados por vasoconstricción, y enfermedad cardiovascular), neoplasia maligna y benigna (por ejemplo cánceres dependientes de angiogénesis, por ejemplo cánceres tumorales), metástasis tumoral, trastornos inflamatorios, diabetes, retinopatía diabética y otras complicaciones de diabetes (por ejemplo, neovascularización diabética), tracoma, hiperplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, hemangioma, rechazo inmune de tejido de córnea implantado, angiogénesis de córnea asociada con lesión o infección ocular, síndrome de Osler-Webber, angiogénesis de miocardio, granulación de herida, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma, escleroderma de psoriasis telangiectasia, granuloma piogénico, colaterales coronarios, angiogénesis de extremidad isquémica, rubeosis, obesidad, artritis (por ejemplo artritis reumatoide), hematopoyesis, vasculogénesis, gingivitis, aterosclerosis, endometriosis, hiperplasia neoíntima, psoriasis, hirsutismo y retinopatía proliferativa. El tratamiento anti-angiogénico descrito en la presente también puede incluir tratamientos no terapéuticos realizados en sujetos sanos, por ejemplo para inhibir el desarrollo vascular para propósitos cosméticos.

En la presente también se describe un tratamiento que puede realizarse administrando a un sujeto que necesite tratamiento pro-angiogénico una cantidad efectiva de uno o más agentes seleccionados de potenciadores de VEGF-exón-8-PSS e inhibidores de VEGF-exón-8-DSS, sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores in vivo, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para el control de su actividad primaria por los efectos de la misma, y un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes in vivo anteriores, o cualquier combinación de los mismos.

Por consiguiente, en la presente se describe un potenciador de VEGF-exón-8-PSS o un inhibidor de VEGF-exón-8-DSS, o un activador, regulador de aumento o potenciador in vivo de los mismos, una forma modificada de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para control de su actividad primaria por los efectos de la misma, o un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes in vivo anteriores, o cualquier combinación de los mismos, para usar en un método de tratamiento pro-angiogénico de un sujeto mamífero, de modo particular pero no exclusivo un sujeto humano.

En la presente también se describe una composición, por ejemplo un medicamento, para usar en un método de tratamiento pro-angiogénico de un sujeto mamífero, particularmente pero no exclusivamente un sujeto humano, y la composición comprende una cantidad efectiva de un potenciador de VEGF-exón-8-PSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-DSS, o un activador, regulador de aumento o potenciador in vivo, una forma modificada de cualquiera de los

anteriores que tiene una funcionalidad secundaria útil para control de su actividad primaria o los efectos de la misma, o un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los anteriores agentes in vivo, o cualquier combinación de los mismos, en asociación o mezcla con un soporte, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptables.

En la presente también se describe el uso de un potenciador de VEGF-exón-8-PSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-DSS, o un activador, regulador de aumento o potenciador in vivo de los mismos, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria por los efectos de la misma, o un sistema de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes in vivo anteriores, o cualquier combinación de los mismos, para usar en la fabricación de un medicamento para terapia pro-angiogénica en un sujeto mamífero, de modo particular pero no exclusivo un sujeto humano.

Tales agentes, como los mencionados, incluyen por ejemplo factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), IGF-R, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , factor de empalme alternativo/factor de empalme 2 (ASF/SF2), Srp40, sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores in vivo, análogos funcionalmente activos y fragmento funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores, formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria o los efectos de la misma, sistemas de vector de expresión para expresar cualquiera de los agentes in vivo anteriores, agentes de bloqueo de transcripción/traducción que se enlazan al DSS de exón 8a del pre-ARNm y/o en la región del pre-ARNm a la cual se enlaza la proteína reguladora de empalme, para inhibir el empalme distal (por ejemplo, morfolinós u otros agentes de bloqueo sintéticos, conjugados de péptido, proteínas de enlace de ARN, agentes de bloqueo poli- y oligonucleótidos de interferencia de ARN (RNAi) (por ejemplo ARNs, microARN (RNAmi), RNAsi), ácido nucleico de péptido (PNA), o cualquier combinación de los mismos. Inhibidores específicos de los agentes que conducen preferencialmente DSS, tales como TG003 y SB203580, también pueden servir como agentes, como los mencionados en conexión con el quinto, sexto y séptimo aspectos de la presente invención. Todos estos materiales, que incluyen los sistemas de vector de expresión, se denominan en la presente "agentes". Para mayores detalles véase la sección más adelante con el encabezado "Agentes".

El tratamiento pro-angiogénico incluye preferiblemente el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o trastorno asociados con angiogénesis reducida anormalmente o sobreproducción anormal de isoformas de VEGF pro-angiogénicas (VEGF_{xxx}). Tales enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, pre-eclampsia, infarto de miocardio, lesión vascular, enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular periférica, isquemia (incluyendo isquemia de órgano sólido), ataques isquémicos, angina, lesión cerebrovascular (por ejemplo apoplejía, lesión en la cabeza). El tratamiento pro-angiogénico también puede servir para ayudar a la revascularización, por ejemplo en una herida que va curando después de lesión, incluyendo lesión metabólica (por ejemplo diabetes) y lesión por presión periférica (por ejemplo úlceras de decúbito) o cirugía, por ejemplo después de trasplante de tejido o de implante protésico, o en métodos de cultivo de tejido (por ejemplo cultivo de láminas de piel para usar en cirugía o construcción de prótesis de tejido soportada en andamio para implante). El tratamiento pro-angiogénico también puede servir terapéuticamente o no terapéuticamente para soportar aspectos de reproducción mamífera, por ejemplo humana o de animal de granja, por ejemplo ovulación, fertilidad, implantes, función de endometrio y de ovarios y lactancia. En un ejemplo de uso no terapéutico de la presente invención para soportar aspectos de reproducción de mamífero, se mencionan control de ovulación, fertilidad y lactancia en conexión con la actividad pecuaria y la agricultura. El tratamiento pro-angiogénico también puede usarse de modo no terapéutico en humanos, por ejemplo para mejorar la resistencia o el desempeño atlético en el atletismo y los deportes, por ejemplo, o para promover la vascularización con propósitos cosméticos.

En la presente también se describe un método para facilitar el diagnóstico y pronóstico en un sujeto mamífero, de modo particular pero no exclusivo un sujeto humano, de una condición o trastorno asociados con angiogénesis, y el método comprende obtener una muestra de tejido o de fluido corporal del paciente y ensayar la muestra para determinar la presencia y, o la presencia o ausencia potencialmente relativas, en la muestra de agentes de control que favorecen el empalme de PSS durante el procesamiento de preARNm de VEGF transcrito desde el exón 8 de terminal C del gen VEGF y agentes de control que favorecen el empalme de DSS durante el procesamiento de pre-ARNm de VEGF transcrito desde el exón 8 de terminal C del gen VEGF. Dicha determinación de los agentes de control en la muestra puede ser cualitativa o cuantitativa.

Los agentes de control detectados en la muestra pueden ser cualquiera de los agentes definidos y descritos como potenciadores o inhibidores de VEGF-exón-8-DSS o como potenciadores o inhibidores de VEGF-exón-8-PSS, incluyendo sus activadores, reguladores de aumento o potenciadores in vivo, o formas modificadas de cualquiera de los anteriores que tienen una funcionalidad secundaria útil para controlar su actividad primaria o los efectos de la misma. La presencia o ausencia potencial relativa de los agentes de control en la muestra puede detectarse, por ejemplo, mediante análisis de mutaciones del gen el sujeto lo cual puede influir la extensión de la expresión de los agentes que existen naturalmente en el sujeto, a diferencia de la expresión de formas mutadas (menos activas o inactivas) de los agentes.

La muestra del tejido o fluido corporal puede seleccionarse, por ejemplo, de pelo, piel, tejido de biopsia obtenido de manera invasiva, tejido de biopsia obtenido de manera no invasiva, heces, leche, sangre, suero sanguíneo, saliva,

fluidos cerebrospinal, moco (por ejemplo muestra de frotis de una membrana mucosa tal como la pared de la boca, la lengua o la cérvix), esputo, orina o lágrimas.

5 El ensayo de la muestra puede llevarse a cabo utilizando cualquier sistema adecuado de ensayo, específico para el agente que se está detectando. Sistemas adecuados de ensayo incluyen inmuno-ensayos, por ejemplo inmuno-ensayos de sándwich o inmuno-ensayos de competencia, por ejemplo ELISA, y pueden mencionarse particularmente Inmuno-ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales para el agente diana que va detectarse. Los inmuno-ensayos usarán normalmente una etiqueta detectable, seleccionada de radioisótopos, enzimas, fluorocromos, etiquetas quimioluminiscentes y etiquetas detectables mediante conductividad eléctrica. De modo alternativo, o adicional, el agente que se está detectando puede ensayarse usando reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR), incluyendo RT-PCR cuantitativa (cRT-PCR), y/o Inmunoprecipitación Western, tal como se ilustra con mayor detalle en los experimentos específicos descritos más adelante.

Después del método de diagnóstico o de pronóstico, si se desea pueden usarse los datos para evaluar las tendencias pro- y anti-angiogénicas relativas de la bioquímica del paciente, a partir de las cuales puede evaluarse la probabilidad de desarrollo, recaída, progreso o propagación de la condición o del trastorno.

15 Por ejemplo, el método puede usarse para facilitar el diagnóstico o el pronóstico de cualquiera de las condiciones previamente mencionadas. Puede mencionarse particularmente a este respecto el diagnóstico o el pronóstico en relación al embarazo, curación de heridas, pre-eclampsia, cánceres (por ejemplo, cánceres tumorales), propagación metastática de cánceres, falla en la ovulación, lactancia, pérdida visual y destrucción de articulaciones.

20 Al método puede seguirle un programa de tratamiento diseñado con base en el diagnóstico o el pronóstico para tratar la condición del paciente. Durante dicho programa de tratamiento, el método puede repetirse como se desee para monitorear el progreso del tratamiento y/o permitir que se actualicen el diagnóstico o pronóstico. El programa de tratamiento puede comprender, por ejemplo, la administración al sujeto de agentes anti-angiogénicos convencionales.

25 En el método descrito, el diagnóstico o el pronóstico que van a facilitarse pueden tomar en cuenta, por ejemplo, un tratamiento actual o posible futuro del sujeto con un fármaco anti-angiogénico, particularmente un bloqueador de VEGF. Si el método apunta a la muestra para establecer la presencia o ausencia, o presencia o ausencia potenciales, de uno o más agentes de existencia natural más específicos, seleccionados de (a) agentes de control que favorecen el empalme de PSS durante el procesamiento de pre-ARNm de VEGF transcrito desde el exón 8 de terminal C del gen VEGF y (b) agentes de control que favorecen el empalme de DSS durante el procesamiento de pre-ARNm de VEGF transcrito desde el exón 8 del terminal C del gen VEGF, y el resultado del método es que se muestra que el sujeto tiene un alto nivel de agentes de tipo (a), un alto nivel de agentes de tipo (b), un relativamente alto nivel de uno o más agentes de tipo (a) sobre el tipo (b), un relativamente alto nivel de uno o más agentes del tipo (b) sobre el tipo (a), o el potencial de tenerlo, luego puede predecirse la efectividad de un tratamiento actual o futuro posible del sujeto con un fármaco anti-angiogénico, particularmente un bloqueador de VEGF.

35 Por ejemplo, los potenciadores de VEGF-exón-8-DSS o los inhibidores de VEGF-exón-8-PSS que existen naturalmente, si predominan en un sujeto o tejido sobre los potenciadores de VEGF-exón-8-PSS los inhibidores de VEGF-exón-8-DSS que existen naturalmente, conducirán a una predisposición del sujeto hacia la expresión de VEGF_{xxx}b (angiogénico). Tales objetos serán luego relativamente resistentes hacia el tratamiento de condiciones asociadas con angiogénesis usando bloqueadores de VEGF anti-angiogénico. Tales bloqueadores de VEGF incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF humanizados (por ejemplo bevacizumab (Avastin®)), utilizados para tratar determinados cánceres tales como el cáncer de mama, carcinoma de colon y carcinoma rectal.

40 Los promotores de VEGF-exón-8-PSS o inhibidores de VEGF-exón-8-DSS que existen naturalmente, si predominan en un sujeto o tejido sobre los potenciadores de VEGF-exón-8-DSS o los inhibidores de VEGF-exón-8-PSS que existen naturalmente, conducirán a una predisposición del sujeto hacia la expresión de VEGF_{xxx} (angiogénico). Tales objetos serán entonces relativamente susceptibles a tratamiento de condiciones asociadas con angiogénesis utilizando bloqueadores de VEGF anti-angiogénico. Tales bloqueadores de VEGF incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF humanizados (por ejemplo, bevacizumab (Avastin®)), usados para tratar determinados cánceres tales como cáncer de mama, carcinoma de colon y carcinoma rectal.

50 Se espera que los sujetos que portan genes para uno o más potenciadores de VEGF-exón-8-DSS o inhibidores de VEGF-exón-8-PSS que existen naturalmente, por ejemplo seleccionados de IGF-β1, TGF-β R1, SRPIN 340, TIA-1, p38 MAPK, Clk1/sty, Clk2, Clk3, Clk4, SRp55 y sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores que existen naturalmente, en los cuales tienen lugar la expresión de la proteína normal, lo cual conduce a la tendencia de favorecer la expresión de VEGF_{xxx}b, sean, por lo tanto, relativamente resistentes al tratamiento para cánceres y otras enfermedades y condiciones asociadas con angiogénesis utilizando bloqueadores de VEGF, tales como, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF humanizados. Una predicción tal puede reforzarse si las investigaciones de mutaciones genéticas en el sujeto indican una capacidad disminuida de expresar uno o más potenciadores de VEGF-exón-8-PSS o inhibidores de VEGF-exón-8-DSS que existen naturalmente.

Por otra parte, se espera que los sujetos que portan genes mutados para uno o más potenciadores de VEGF-exón-8-DSS o inhibidores de VEGF-exón-8-PSS que existen naturalmente, por ejemplo seleccionados de TGF- β 1, TGF- β R1, SRPIN 340, TIA-1, p38 MAPK, Clk1/sty, Clk2, Clk3, Clk4, SRp55 y sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores que existen naturalmente, en los cuales tiene lugar la expresión de una forma de variante menos activa o inactiva de la proteína, lo cual conduce a la tendencia de favorecer la expresión de VEGF_{xxx}, sean por lo tanto relativamente susceptibles al tratamiento para cánceres y otras enfermedades y condiciones asociadas con angiogénesis utilizando bloqueadores de VEGF, tales como anticuerpos anti-VEGF humanizados, por ejemplo. Tal predicción puede reforzarse si las investigaciones génicas en los sujetos indican una capacidad normal para expresar uno o más potenciadores de VEGF-exón-8-PSS o inhibidores de VEGF-exón-8-DSS que existen naturalmente.

El ensayo para posibles mutaciones de genes que codifican uno o más agentes específicos que existen naturalmente seleccionados de (a) agentes de control que favorecen el empalme de PSS durante el procesamiento de pre-ARNm de VEGF transcrito del exón 8 de terminal C del gen VEGF y (b) agentes de control que favorecen el empalme de DSS durante el procesamiento de pre-ARNm de VEGF transcrito del exón 8 de terminal C del gen VEGF, puede llevarse a cabo usando métodos convencionales de genotipificación tales como RT-PCR, hibridación de ADN in situ o similares. La genotipificación se lleva a cabo de modo adecuado sobre la biopsia extirpada o muestra tumoral tomada del paciente o sobre otra muestra de tejido o de fluido corporal del paciente. Los métodos descritos en la presente podrían usarse para facilitar el pronóstico de un cáncer en un paciente, por ejemplo seleccionado de cáncer de mama, carcinoma de colon y carcinoma rectal, tomando en consideración un tratamiento actual o futuro posible del sujeto con un bloqueador de VEGF tal como, por ejemplo, bevacizumab, investigando la presencia o ausencia de mutaciones genéticas del sujeto en relación con uno o más potenciadores de VEGF-exón-8-DSS o inhibidores de VEGF-exón-8-PSS que existen naturalmente, por ejemplo seleccionados de IGF- β 1, IGF- β R1, SRPIN 340, TIA-1, p38 MAPK, Clk1/sty, Clk2, Clk3, Clk4, SRp55 y sus activadores, reguladores de aumento y potenciadores que existen naturalmente, preferiblemente TIA-1, para determinar la susceptibilidad o resistencia probables del sujeto a dicho tratamiento a partir de la presencia o ausencia de mutaciones genéticas del sujeto en relación con dichos uno o más potenciadores de VEGF-exón-8-DSS o inhibidores de VEGF-exón-8-PSS que existen naturalmente. Un método de este tipo tiene por lo tanto el potencial de impedir el desperdicio de recursos de servicios de salud e impedir un tratamiento no efectivo de pacientes que no son capaces de responder de manera completa o en absoluto a dichos tratamientos.

La presente divulgación también proporciona una razón lógica para el desarrollo de agentes y métodos de diagnóstico en relación con la susceptibilidad de una lesión o condición potencial a una estrategia terapéutica pro- o anti-angiogénica. Se ha observado que el cambio de anti- a pro-angiogénico es heterogéneo en pacientes con la misma condición clínica, por ejemplo retinopatía diabética (42) y carcinoma de colon (52). Un análisis detallado del balance de expresión de isoformas VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b puede predecir, por lo tanto, la susceptibilidad de la lesión o condición del paciente individual al tratamiento, o aún tratamiento particular, o permitir diseñar de manera específica, a la medida, un tratamiento para un paciente individual, lo que incrementa la efectividad terapéutica reduce efectos colaterales o el resultado particular de efectos colaterales o terapias para ese paciente (considerando las intolerancias particulares, alergias o contraindicaciones en relación con ese paciente).

Los detalles, ejemplos y preferencia suministrados antes en relación con cualquier, uno o más, aspectos particulares enunciados de la presente invención, y descritos y ejemplificados más adelante en relación con cualquiera, uno o más, de los aspectos particulares enunciados de la presente invención, aplican a todos los aspectos de la presente invención.

Para evitar dudas, por medio de la presente se declara que los agentes de control descritos en la presente favorecen/suprimen, según se desee, PSS o DSS en el procesamiento de preARNm de VEGF, transcrito del exón 8 de terminal C del gen VEGF. A partir de esto, es implícito que los términos "potenciadores de VEGF-exón-8-PSS", "potenciadores de VEGF-exón-8-DSS", "inhibidores de VEGF-exón-8-PSS" e "inhibidores de VEGF-exón-8-DSS" utilizados en la presente se refieren a agentes que actúan directamente sobre el procesamiento (modificación post-transcripcional) del pre-ARNm de VEGF, transcrito desde el exón 8 del terminal C del gen VEGF, en el núcleo antes de que el ARNm maduro, cortado y empalmado de manera alternativa, se ha exportado al citoplasma. Como se conoce bien, tal modificación post-transcripcional en el núcleo incluye típicamente la remoción de intrones transcritos y reconexión de los exones de acuerdo con el o los mecanismos de control en operación para el empalme alternativo. Se cree que tal o tales mecanismos de control incluyen acción directa sobre las proteínas regulatorias de empalme nuclear y el material de ARNm que se somete al procesamiento en el núcleo.

De esto sigue que los agentes de control que actúan solamente sobre el ARNm maduro afuera del núcleo no se consideran "agentes de control para el empalme", "potenciadores de VEGF-exón-8-PSS", "potenciadores de VEGF-exón-8-DSS", "inhibidores de VEGF-exón-8-PSS" e "inhibidores de VEGF-exón-8-DSS" tal como esos términos se usan en conexión con la presente invención.

Agentes

- 5 Análogos funcionalmente activos y fragmentos funcionalmente activos de agentes que son factores de empalme pueden incluir, por ejemplo, el dominio de enlazamiento de proteína o el dominio de enlazamiento de ARN o ambos dominios. Tales análogos fragmentos pueden conjugarse, si se desea, a una o más, otras, moléculas activas, por ejemplo un regulador de aumento o de disminución de empalme o una molécula que dirige el empalme de una manera o la otra entre DSS y PSS. Tales moléculas pueden incluir, por ejemplo, otros factores de empalme o moléculas que degradan ARN.
- 10 Análogos funcionalmente activos y fragmento funcionalmente activos de los agentes que son factores de empalme pueden incluir además, por ejemplo, el dominio diana de fosforilación por el cual la proteína puede activarse o desactivarse. Esto puede permitir un grado adicional de control del agente en operación de la presente invención. El dominio diana de fosforilación puede bloquearse, por ejemplo, de modo permanente o reversible, mediante una contraparte de enlazamiento específica para el dominio, para prevenir activación de manera temporal o permanente, o puede estar presente un compuesto secundario que contiene el dominio diana de fosforilación, por ejemplo en exceso, para competir con el agente primario para fosforilación y por lo tanto restringir efectivamente la activación del agente primario.
- 15 Los análogos funcionalmente activos y los fragmentos funcionalmente activos de los agentes que son cinasas pueden incluir, por ejemplo, el dominio regulatorio de cinasa o el dominio activo o ambos dominios. Tales análogos o fragmentos pueden conjugarse con una o más, otras, moléculas activas, si se desea; por ejemplo, un regulador de aumento o disminución de empalme o una molécula que dirige el empalme de una manera o de otra entre DSS y PSS. Tales moléculas pueden incluir, por ejemplo, otros factores de empalme o moléculas que degradan ARN.
- 20 Los coagentes o agentes secundarios para habilitar la funcionalidad deseada o la combinación de funcionalidades de los agentes usados en la presente invención pueden estar presentes según se requiera conjuntamente con los agentes primarios, tal como será bien entendido por aquellos versados en la materia.
- 25 Los agentes de bloqueo de transcripción/traducción que se enlazan a DSS o PSS de exón 8a del pre-ARNm y/o en la región del pre-ARNm a la cual se enlaza una proteínas regulatorias de empalme, para inhibir respectivamente empalme distal o proximal, incluyen, por ejemplo, morfolidos u otros agentes de bloqueo sintéticos, conjugados de péptido, proteínas que enlazan ARN, agentes de bloqueo de poli- y oligonucleótidos de interferencia de ARN (RNAi) (por ejemplo ARNs, microARN (miARN), ARNs), ácido nucleico de péptido (PNA).
- 30 Un morfolido adecuado para bloquear PSS de exón 8a será un morfolido fosforodiamidato oligo de 22 a 27 bases que tiene una secuencia base complementaria a una secuencia de bases que abarca el extremo 5' de exón 8a. La secuencia de bases del morfolido puede ser, por ejemplo: 3'-CAAAAGGTAAAGGGAGTCTACACTG-5' (SEQ. ID. NO. 3) o tener suficiente homología con tal secuencia para hibridar al gen VEGF en el PSS de exón 8a, por ejemplo al menos aproximadamente 85%, por ejemplo al menos aproximadamente 90%, de homología con la secuencia. Un morfolido adecuado para bloquear el DSS de exón 8a será un oligo morfolido de fosforodiamidato de 22 a 27 bases que tiene una secuencia de bases complementaria a una secuencia de bases que abarca el extremo 3' de exón 8a.
- 35 La secuencia de bases de tal morfolido puede ser, por ejemplo, 3'-CAAAGCCCTTGGTCTAGAGAGTGG-5' (SEQ. ID. NO. 4) o tener suficiente homología con tal secuencia para hibridar al gen VEGF en el DSS de exón 8a, por ejemplo al menos aproximadamente 85%, por ejemplo al menos aproximadamente 90%, de homología con la secuencia.
- 40 El término "morfolido" utilizado en la presente tiene por objeto referirse generalmente a la clase de análogos de bloqueo sintéticos de nucleótidos que proporcionan bloqueo estérico por hibridación a porciones de la secuencia de pre-ARNm pero son sistemas no replicantes. Mientras que el sistema oligo morfolido fosforodiamidato proporciona un ejemplo bien conocido de una clase de tales agentes de bloqueo, la expresión "morfolido" no debe entenderse como limitada a esta clase y se extiende a agentes de bloqueo análogos no replicantes en los cuales un esqueleto molecular sintético proporciona un fundamento para una secuencia de base que puede hibridar al pre-ARNm de VEGF en el DSS o PSS para causar la regulación del mecanismo alternativo de emplease.
- 45 Un agente adecuado de bloqueo de nucleótido que puede hibridar al pre-ARNm de VEGF en el DSS o PSS para causar la regulación del mecanismo alternativo de empalme de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, ARNs.
- 50 La ilustración en la figura 10C de los dibujos adjuntos, y la leyenda para esa figura y su discusión más adelante, resumen la ruta de control por la cual puede lograrse y controlarse la selección de empalme de DSS o empalme de PSS. Los inhibidores de los agentes de control, que incluyen, por ejemplo, SRPIN340, SB203580 y TG003 tal como se han mostrado, pueden usarse para control adicional de la activación y dirección de empalme durante el procesamiento del pre-ARNm de VEGF. Clk/Sty favorece el empalme distal e inhibe el empalme proximal. Ha sido identificada una ruta TGF- β 1 que conduce a IGF- β R1 que conduce a p38MAPK que conduce a Clk/Sty que conduce a empalme distal a través de SRp55. Ha sido identificada una ruta IGF-1 que conduce a IGF-R que conduce a SRPK1 que conduce a empalme proximal a través de ASF/SF2. SRPIN340 inhibe SPRK1. TG003 inhibe Clk/Sty. SB203580 específicamente inhibe p38MAPK. Tal como se muestra en la figura 6 y en las discusiones acompañantes más adelante, la expresión de VEGF_{xxx}b inducida por TGF- β 1 no fue afectada por la inhibición de
- 55

fosforilación de cinasa p42/44 MAP mediante PD98059, y TG003, un inhibidor de la familia Clk de cinasas implicado en control de empalme mediante factores de empalme fosforilantes, inhibió la expresión de VEGF_{xxx}b inducida por TGF-β1. Éstos resultados indican que IGF-β1 estimula la síntesis de isoformas de VEGF_{xxx}b a través de cinasas p38 MAPK y Clk.

5 Los agentes no vectoriales que incluyen fragmentos y análogos funcionales de los mismos pueden obtenerse adecuadamente por transfección de una célula hospedera adecuada para introducir en su genoma ADN exógeno y promotores adecuados y opcionalmente otras secuencias de control, cultivar las células en un medio de crecimiento adecuado y cosechar la proteína expresada de una manera convencional. Ejemplos de un método de este tipo se proporcionan más adelante. Las secuencias de nucleótido y de aminoácidos de los agentes no vectoriales
10 generalmente son conocidas y la organización y funcionalidad de los diversos dominios de la molécula están suficientemente bien establecidas de manera que la selección de agentes no es pesada siguiendo las enseñanzas hechas en la presente. El ensayo de moléculas expresadas cosechadas para actividad se conduce simplemente de la manera mostrada en los siguientes ejemplos.

15 Los agentes vectoriales se preparan como virus recombinantes que contienen ADN exógeno y promotores adecuados en su genoma y opcionalmente otras secuencias de control, que inician nuevamente a partir de las secuencias publicadas de nucleótido y de aminoácidos de manera generalmente conocida. Mayores detalles se proporcionan más adelante en la sección con el encabezado "Terapia génica".

Composiciones y administración

20 El agente activo de acuerdo con la presente invención puede administrarse en forma de una composición que comprende el agente activo y cualquier componente adecuado adicional. La composición puede ser, por ejemplo, una composición farmacéutica (medicamento, adecuada para administración parenteral (por ejemplo inyección, implante o infusión). De manera alternativa, la composición puede ser, por ejemplo, un producto alimenticio, un suplemento alimenticio, una bebida o un suplemento de bebida.

25 El término "composición farmacéutica" o "medicamento" en el contexto de esta invención significa una composición que comprende un agente activo y que comprende adicionalmente uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. La composición puede contener además ingredientes seleccionados, por ejemplo, de diluyentes, adyuvantes, excipientes, vehículos, agentes conservantes, materiales de carga, agentes desintegrantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes lubricantes y agentes dispersantes,
30 dependiendo de la naturaleza del modo de administración y las formas posológicas. Por ejemplo, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, grageas, polvos, elixires, jarabes, preparaciones líquidas que incluyen suspensiones, espráis, inhalantes, tabletas, pastillas, emulsiones, soluciones, píldoras, gránulos, cápsulas y supositorios, así como también preparaciones líquidas para inyecciones, incluyendo preparaciones de liposoma. Las técnicas y formulaciones pueden encontrarse generalmente en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., Easton, PA, la edición más reciente.

35 Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Como ejemplo pueden mencionarse son lesiones acuosas o de agua-propilenglicol para inyección parenteral. Las preparaciones líquidas también pueden formularse en solución, en solución acuosa de polietilenglicol.

40 También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse, brevemente antes de usar, en preparaciones en forma líquida, ya sea para administración oral o parenteral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones particulares en forma sólida se proporcionan de la manera más conveniente en una forma posológica unitaria y como tal se utilizan para proporcionar una unidad posológica líquida individual. Como alternativa, puede proporcionarse suficiente sólido de modo que después de la conversión a forma líquida puedan obtenerse múltiples dosis líquidas individuales midiendo volúmenes
45 predeterminados de la preparación en forma líquida con una jeringa, una cucharita u otro contenedor o aparato volumétrico. Las preparaciones en forma sólida destinadas a convertirse en forma líquida pueden obtener, además del material activo, saborizantes, colorantes, estabilizantes, reguladores de pH, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares. El líquido utilizado para preparar la preparación en forma líquida puede ser agua, agua isotónica, etanol, glicerina, propilenglicol y similares así como también mezclas
50 de los mismos. Naturalmente, el líquido utilizado se elegirá con respecto a la ruta de administración, por ejemplo, preparaciones líquidas que contienen grandes cantidades de etanol no son adecuadas para uso parenteral.

Los términos "producto alimenticio", "suplemento alimenticio", "bebida" y "suplemento de bebida" usados en la presente tienen los significados normales para aquellos términos y no se restringen a preparaciones farmacéuticas. Otras formas de composición también se incluyen dentro de la presente invención. Éstas pueden incluir, por
55 ejemplo, compuesto puro o sustancialmente puro como tal, un precursor de producto alimenticio tal como un polvo rehidratar un precursor de bebida tal como un polvo dispersable en agua, leche u otro líquido.

La posología puede variar dependiendo de los requisitos del paciente, la severidad de la condición que se está tratando y el compuesto que se está empleando. La determinación de la dosis apropiada para una situación particular se encuentra dentro de la habilidad en la técnica. Generalmente, el tratamiento se inicia con las dosis más pequeñas que son menos que la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se incrementa por pequeños incrementos hasta que se logra el efecto óptimo bajo las circunstancias. Para conveniencia, la dosis diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día, si se desea.

Terapia génica

Los métodos descritos en la presente pueden practicarse alternativamente usando terapia génica. Las técnicas de terapia génica son conocidas en términos generales en la técnica, y los métodos descritos en la presente pueden ponerse en práctica de manera adecuada de estas maneras generalmente conocidas. La siguiente discusión proporciona más explicación de guía.

Las terapias génicas se clasifican ampliamente en dos categorías, es decir terapias in vivo e in vitro. La terapia génica in vivo comprende introducir un gen terapéutico directamente al cuerpo y la terapia génica in vitro comprende cultivar una célula diana in vitro, introducir la célula genéticamente modificada al cuerpo.

Las tecnologías de transferencia génica se dividen ampliamente en un método de transferencia a base de vector viral utilizando virus como soporte, un método de entrega no viral utilizando fosfolípido sintético o polímero catiónico sintético, y un método físico tal como electroporación o introducir un gen aplicando estimulación eléctrica temporalmente a una membrana celular.

Entre las tecnologías de transferencia génica, el método de transferencia a base de vector viral se considera preferible para la terapia génica porque la transferencia de un factor genético puede hacerse eficientemente con un vector con la pérdida de una porción de, o toda, la capacidad replicativa, la cual hace que un gen sustituya un gen terapéutico. Ejemplos de virus utilizado como el portador de virus o vector incluyen vectores de virus de ARN (vectores de retrovirus, vector de lentivirus, etc.), y vectores de virus de ADN (vectores de adenovirus vectors, vectores de virus adeno-asociados, etc.). Además, sus ejemplos incluyen vectores virales de herpes simplex, vectores virales alfa, etc. Entre ellos, los vectores de retrovirus y adenovirus se estudian de manera particularmente activa.

Las características de retrovirus que actúan para integrarse al genoma de las células hospederas consisten en que es inocuo al cuerpo humano pero puede inhibir la función de células normales después de integración. También infecta diversas células, prolifera rápidamente, puede recibir alrededor de 1-7 kb de genes ajenos y es capaz de producir virus deficiente de replicación. Sin embargo, tiene desventajas en cuanto que consisten en que es difícil de infectar células después de mitosis, es difícil transferir un gen in vivo, y el tejido celular somático se necesita para proliferar siempre in vitro. Además, puesto que puede integrarse a un proto-oncogén, tiene el riesgo de mutación y puede causar necrosis celular.

Mientras tanto, el adenovirus tiene diversas ventajas para usar como un vector de clonación; tiene tamaño moderado, puede replicarse dentro de un núcleo celular y clínicamente no es tóxico. También es estable incluso cuando se inserta con un gen ajeno y no causa el reacomodamiento o la pérdida de genes, puede transformar eucariotas y se expresa establemente a un alto nivel incluso cuando se integra al cromosoma de las células hospederas. Las buenas células hospederas para adenovirus son células que causan hematosi humana, linfoma y mieloma. Sin embargo, es difícil que estas células proliferen porque son ADNs lineales. También, no es fácil recuperar virus infectado y tienen baja tasa de infección de virus. También, la expresión de un gen transferido es la más alta después de 1-2 semanas y en algunas células la expresión se mantiene solamente por alrededor de 3-4 semanas. Adicionalmente, éstas tienen el problema de alta inmuno-antigenicidad.

El virus adeno-asociado (AAV) puede superar los problemas ya descritos y al mismo tiempo tener muchas ventajas para usarse como un agente génico terapéutico y, por lo tanto, se considera preferible recientemente. El AAV, que es un provirus monocatenario, requiere un virus asistente para replicación, y el genoma de AAV es de un tamaño de 4,680 bp y puede insertarse en cualquier sitio del cromosoma 19 de las células infectadas. Un transgén se inserta a ADN de plásmido enlazado con 145 bp de cada uno de dos secuencias invertidas terminales de repetición (ITR) y una secuencia de señal. Este gen es transfectado con otro ADN de plásmido que expresa genes rep y cap de AAV, y se adiciona adenovirus como un virus asistente. AAV tiene ventajas en que el rango de sus células hospederas que van a transferirse con un gen es amplio, los efectos inmunes laterales debido a administración repetida son pequeños y el tiempo de expresión génica es largo. Además, es estable incluso cuando el genoma de AAV se integra al cromosoma de una célula hospedera y no causan la modificación o re-acomodación de expresión génica en células hospederas. Puesto que el vector de AAV que contiene un gen CFTR fue aprobado por NIH para el tratamiento de fibrosis quística en 1994, ha sido usado para el tratamiento clínico de diversas enfermedades. Un vector de AAV que contiene un gen factor IX, el cual es un factor de coagulación de sangre, se usa para el tratamiento de hemofilia B; y el desarrollo de un agente terapéutico para hemofilia A con el vector de AAV se está llevando a cabo actualmente. También, los vectores de AAV que contienen diversos tipos de genes anticancerosos fueron certificados para usarse como vacunas tumorales.

La terapia génica, que es un método para tratar enfermedades mediante transferencia y expresión de genes, se utiliza para ajustar un gen determinado, a diferencia de la terapia con fármacos. El propósito último de la terapia génica es obtener efectos terapéuticos modificando genéticamente un gen vivo. La terapia génica tiene diversas ventajas, tales como la transferencia exacta de un factor genético a un sitio de enfermedad, la descomposición completa del factor genético in vivo, la ausencia de toxicidad y de inmuno-antigenicidad, y la expresión estable a largo plazo del factor genético y, por lo tanto, se destaca en conexión con la presente invención como una ruta potencialmente adecuada de tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

Las modalidades de la presente invención se describirán ahora, sólo a manera de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La figura 1 muestra (A) un mapa de exones del gen VEGF humano, y (B) los patrones de empalme de exones que conducen a diferentes isoformas de VEGF;

La figura 2 muestra el efecto de IGF-1 en la expresión de proteínas de VEGF_{xxx}b y de VEGF_{xxx} en (A) células del epitelio pigmentario retinal (RPE) y (B) células del epitelio glomerular visceral renal (podocitos), y los detalles se dan en la leyenda y en las discusiones más adelante;

La figura 3 muestra el efecto de IGF-1 en la expresión de (A) VEGF₁₆₅b y (B) VEGF₁₆₅ en células de RPE, y los detalles se dan en la leyenda y en las discusiones más adelante;

La figura 4 muestra el efecto de TGF-β1 en la expresión de VEGF_{xxx}b y VEGF_{total} en podocitos, mediante (A) un ensayo ELISA de lisado de célula de podocito para las proteínas respectivas y (B) Inmunoprecipitación Western no reductor del listado, y los detalles se dan en la leyenda y las discusiones más adelante;

La figura 5 muestra el efecto de p38-MAPK en la selección de sitio de empalme distal en el exón terminal de VEGF en podocitos, mediante un ensayo ELISA de lisado de las células de podocito para VEGF_{xxx}b después de tratamiento con el inhibidor SB203580 (A) de p38-MAPK sin y (B) con regulación de aumento de la isoformas de VEGF_{xxx}b utilizando TGF-β1; y (C) reduciendo la Inmunoprecipitación Western de los lisados, y los detalles se dan en la leyenda y las discusiones más adelante;

La figura 6 muestra la regulación de la selección de sitio de empalme distal mediante p38-MAPK y p42/p44-MAPK y clk-1/4 en podocitos, por (A) RT-PCR, (B) Inmunoprecipitación Western y (C) un ensayo ELISA, y los detalles se dan en la leyenda y en las discusiones más adelante;

La figura 7 muestra la distribución de las secuencias de consenso del potenciador de empalme de exón (ESE) en el extremo C del gen VEGF, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 8 muestra el efecto de sobreexpresión de determinados factores de empalme en la producción de las isoformas de VEGF en células de RPE, mediante (A) Inmunoprecipitación Western de los lisados de célula, y mediante ensayo ELISA de los lisados de célula (sobrenadantes) que miden para cada factor de empalme (B) el cambio en las isoformas de VEGF totales producidas, (C) el cambio en las isoformas b producidas, y (D) la proporción de VEGF total a VEGF_{xxx}b en comparación con el control, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 9 muestra (A) la Inmunoprecipitación Western de la figura 8A y opcionalmente el control de pcADN3, y (B) la proporción de VEGF₁₆₅ a VEGF₁₆₅b en comparación con el control, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 10 muestra (A) la producción de VEGF_{xxx}b en comparación con el control en podocitos, mediante ELISA, siguiendo ciertos tratamientos mostrados en la figura, (B) la producción de VEGF_{xxx}b en comparación con el control en podocitos, mediante ELISA, siguiendo ciertos tratamientos de IGF a concentraciones variables mostradas en la figura, y tratamiento siguiente con 100nM IGF y Serpin 340, y (C) un esquema que muestran los efectos de activación e inhibición aparentes que conducen a los patrones observados de selección de empalme, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 11 muestra los resultados del análisis de RT-PCR de los niveles de SRPK1 y VEGF165b en podocitos que experimentan diferenciación, y los detalles se dan en la leyenda de las discusiones más adelante;

La figura 12 muestra los resultados del análisis de RT-PCR del alcance de empalme proximal en podocitos después de tratamiento con IGF, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 13 muestra los resultados del análisis ELISA del alcance de empalme proximal en podocitos después de tratamiento con IGF, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 14 muestra el efecto de transfección de SRp55 de podocitos, y ARNic (siRNA) que tiene como objetivo SRp55, en la regulación de la selección del sitio de empalme de VEGF en el exón 8, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

5 La figura 15 muestra el efecto de transfección de TIA-1 de células de carcinoma de colon en VEGF_{165b} ARNm, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

La figura 16 muestra las porciones de exónes 8a y 8b que son diana de morfolidos de PSS y DSS, los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

10 La figura 17 muestra el efecto del tratamiento con morfolino con diana en DSS de células de riñón embrional humano (HEK) en la expresión de VEGF_{165b}, (a) el diagrama de secuencia muestra la localización de la acción de morfolino, (b) los resultados de la acción de morfolino estudiados usando RT-PCR, y (c) la cuantificación de los resultados de (b) en términos de la proporción de VEGF_{165b} a VEGF₁₆₅, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante;

15 La figura 18 muestra el efecto de tratamiento con morfolino con diana en PSS de células de HEK en la expresión de VEGF_{165b}, (a) el diagrama de secuencia que muestra la localización de la acción de morfolino estudiada usando RT-PCR, y (c) la cuantificación de los resultados de (b) en términos de la proporción de VEGF_{165b} a VEGF₁₆₅, y los detalles se dan en la leyenda y en la discusión más adelante; y

La figura 19 muestra fotomicrografías de un estudio del desarrollo de isoformas de VEGF_{xxx}b en una variedad de tejidos de embriones humanos.

Ejemplos y descripción detallada de los dibujos

20 En la siguiente discusión, los ejemplos no están numerados. Los materiales y métodos generales se describen primero, después de lo cual se discuten y se explican los resultados mostrados en las figuras.

Las leyendas incluidas en las figuras forman parte de la siguiente discusión y se van a tomar como referencia en la lectura de la discusión. Su contenido se incorpora a la presente.

Introducción

25 A pesar del hecho de que 12 variantes de empalme de VEGF han sido identificados hasta ahora (figura 1), con biodisponibilidad y actividad variables, muy pocos estudios han considerado los mecanismos de empalme de VEGF con ARNm.

Este es el primer trabajo para examinar el efecto de factores conocidos de empalme y otros agentes en empalme de VEGF en terminal C', un proceso que puede influir profundamente el fenotipo angiogénico de un tejido.

30 Materiales

Las investigaciones utilizaron células de epitelio pigmentario retinal (células de RPE) humano y podocitos inmortalizados condicionalmente de proliferación (PCIP), ya que estas células se conocen para producir de manera constitutiva isoformas tanto de VEGF_{xxx} como de VEGF_{xxx}b (11).

35 La respuesta de estas células a factores conocidos de empalme (SRp40, ASF/SF2, SRp55 & 9G8) y otros estímulos ambientales (IGF-1, TGF-β1 & PDGF) fue ensayada para investigar la hipótesis de que estos agentes y estímulos podían afectar la expresión relativa (diferencial) de las familias de isoformas VEGF_{xxx} y VEGF_{xxx}b.

Las investigaciones a las cuales se refiere la figura 15 utilizaron células de carcinoma de colon humano 10C y LS174t. Estas células normalmente expresan niveles relativamente bajos de isoforma de VEGF_{165b}.

Las investigaciones a las cuales se refieren las figuras 16 a 18 utilizaron células de HEK.

40 Las investigaciones a las cuales se refiere la figura 19 utilizaron los siguientes tejidos a partir de embriones humanos de 14 semanas (8 semanas y 16 semanas en el caso de la piel), tal como se muestra en la figura (leyendo de arriba a abajo, si ando con la fotografía de la esquina superior izquierda y leyendo de izquierda a derecha a lo largo de cada línea): médula espinal, corno ventral, ganglios de la raíz dorsal, vena yugular, arteria carótida, cerebro (posterior), nódulo linfático, endotelio linfático, piel, hueso (periostio y osteoblastos indicados por flechas), esófago, 45 tráquea, plexo coroideo, ojo y epitelio pigmentario retinal.

Métodos

Cultivo celular de epitelio pigmentario retinal (RPE)

Preparación

- Se obtuvieron ojos de donante humano entre 10-30 horas después de la muerte del banco de ojos de Bristol (Bristol Eye Bank), Bristol, Reino Unido. Las láminas de RPE-coroideo diseccionadas de los glóbulos oculares fueron fragmentadas en una pequeña cantidad de modificación de Dulbecco de medio de Eagle: mezcla de Ham F12 (DMEM:F12) (1:1) + suplemento GlutaMAX® (Gibco) y células de RPE fueron aisladas mediante digestión con colagenasa de 0.3 mg/ml (Gibco) durante 15 min a 37°C. Las células de RPE se cultivaron inicialmente durante 5 días en la presencia de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) al 2,5% v/v para impedir la proliferación de fibroblastos y hasta que se establecieron los cultivos celulares. Después que se mantuvo el cultivo celular de primer paso en DMEM:F12 (1:1), suplementado con FBS al 10% v/v y solución de antibiótico/antimicótico (Sigma). Las células pasadas una vez eran homogéneas y contenían solamente RPE tal como se caracterizó mediante inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina (Sigma). Los cultivos de RPE fueron sub-cultivados rutinariamente mediante tripsinización (tripsina/EDTA, Sigma). Las células de RPE en el paso 3-4 se colocaron sobre placas de Petri de 12,5 cm² (Nunc) y se dejó que alcanzaran 70-80% de confluencia.

Ensayos

- Para determinar los efectos de agonistas se cultivaron células de RPE en medio recién reemplazado en ausencia de FBS durante 24 horas antes de la estimulación de agonista. Se prepararon IGF-1 (Sigma) y TNF- α (Sigma) en medio libre de suero y se adicionaron en volumen de 2 ml a diversas concentraciones, tal como se indica en la discusión más adelante. No se notaron cambios de morfología celular al visualizar las células después de estimulación. 24 horas más tarde se recogieron medios acondicionados en todos los tratamientos experimentales, se centrifugaron para retirar desechos y se colocaron inmediatamente a -80 °C hasta que se realizó el ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA). Las células de RPE se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo y lisado en regulador de pH Laemmli para Inmunoprecipitación Western.

Cultivo celular de podocito

Preparación

- Podocitos inmortalizados condicionalmente de proliferación (PCIPs) fueron derivados de líneas celulares transformadas condicionalmente a partir de podocitos humanos normales con mutante sensible a la temperatura de antígeno T de SV-40 (virus de simio 40) inmortalizado. A la temperatura permitida de 33°C el antígeno T de SV-40 es activo y permite que las células proliferen rápidamente (46). PCIPs fueron cultivados en matraces T75 (Greiner) en medio de cultivo celular RPMI-1640® (Sigma) con FBS (suero bovino fetal) al 10%, ITS (Insulina Transferrina Selenio) (Sigma) al 1%, PSS (solución de penicilina estreptomycin) al 0,5% (Sigma) y cultivados hasta 95% de confluencia. Luego las células se partieron en placas de seis pocillos (1x10⁴ de células por pocillo) y cultivados hasta 95% de confluencia.

Ensayos

- Los inventores investigaron efectos dependientes del tiempo y de la dosis del factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1), factor de crecimiento de transformación β 1 (TGF- β 1) y factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF) en la producción de isoformas de VEGF de PCIPs cultivados. Veinticuatro horas antes del tratamiento se reemplazó el medio cultivado con medio RPMI-1654 (Sigma) libre de suero que contenía ITS (Sigma) al 1% y PSS (Sigma) al 0,5%. A continuación, el medio fue reemplazado con medio RPMI-1654 (Sigma) fresco libre de suero que contenía ITS (Sigma) al 1%, PSS (Sigma) al 0,5% y concentraciones crecientes de IGF-1 (Sigma), o IGF- β 1 (Sigma) o 40ng/mL de PDGF (Sigma). Los medios acondicionados se recogieron 24 o 48 horas después de la estimulación (IGF-1, TGF- β) y 48 horas (PDGF).

Evaluación de producción de proteína siguiente a transfección de factores candidatos de empalme

- Se cultivaron células de RPE en placas de seis pocillos, cada una sembrada con 3 x 10⁵ células y transfectadas a continuación usando los vectores de expresión pcADN3-SRp40, pcADN3-ASF/SF2, pcADN3-SRp55, pcADN3-9G8 o el vector de expresión vacío, pcADN3, usando Lipofectamina (Invitrogen). Siguiendo a la incubación a 37 °C durante 48 horas, se recogió el medio condicionado y se lisaron las células en un regulador de pH que contenía: Tris de 20mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1.5% p/v, NaCl de 150mM, glicerina al 10% p/v y cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma). Se midieron las formas de VEGF en el lisado celular o los medios acondicionados utilizando ELISA y producción de proteína evaluada por medio de Inmunoprecipitación Western, tal como se describe más adelante.

- Mediciones de VEGF en medios acondicionados

Se midieron las concentraciones de VEGF totales en el medio acondicionado de RPE puro utilizando ELISA estándar de VEGF DuoSet (R&D) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Se determinó VEGF_{xxx}b con un ELISA sándwich similar, utilizando un anticuerpo anti-humano de ratón biotinilado monoclonal incrementado frente a los nueve aminoácidos terminales de VEGF₁₆₅b (R&D Systems Cat No. MVRL56/1) y una curva estándar para este

ensayo construida con VEGF_{165b} (R&D) recombinante humano. Este anticuerpo MVRL56/1 es un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón purificado de afinidad, comercialmente disponible, que ha sido caracterizado previamente (42, 54). Éste enlaza VEGF_{165b} recombinante, y muestra expresión de VEGF_{165b}, VEGF_{189b}, VEGF_{121b} VEGF_{183b} y VEGF_{145b} colectivamente denominados VEGF_{xxx}b, pero no VEGF₁₆₅. La Inmunoprecipitación Western ha mostrado previamente que todas las proteínas reconocidas por este anticuerpo también se reconocen por anticuerpos comerciales incrementados en comparación con VEGF₁₆₅, los que demuestra de manera concluyente que este anticuerpo es específico para VEGF_{xxx}b (54).

Debido a los niveles relativamente bajos de VEGF_{xxx}b encontrado libre en el sobrenadante de células de RPE, para ELISA de VEGF_{xxx}b se precipitó proteína total en el medio condicionado con ácido tricloroacético (TCA). Para este propósito se adicionaron 250 µl de TCA al 24%, enfriado con hielo, y 6.25 µl de deoxicolato de sodio al 2% a 700 µl de medio acondicionado y se dejaron sobre hielo durante 15 minutos. Después de centrifugar a 5000xg durante 10 minutos, se recogieron pastillas y se re suspende en un en regulador de pH de lisis, el cual contenía: Tris de 20mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1.5% p/v, NaCl de 150mM, glicerina al 10% p/v y cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma). El pH en las muestras comprimidas se ajustó a 7,4 con Tris de 1,5M (pH 8,8). El contenido de proteína total en el comprimido se midió de manera convencional utilizando reactivo de ácido bicinconínico (BCA) (Sigma).

Inmunoprecipitación Western

Se disolvieron muestras de proteína en regulador de pH Laemmli, se hirvieron durante 3-4 min y se centrifugaron por 2 minutos a 20,000 g para retirar materiales insolubles. Se separaron 15 µg de proteína por carril mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio poliacrilamida (SDS/PAGE) (12%) y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm. Las membranas bloqueadas fueron sombreadas por toda una noche (4 °C) con anticuerpos contra panVEGF (R&D; MAB 293, 1:500), VEGF_{xxx}b (clon interno clone 56/1; 1:250) y β-tubulina (Sigma; 1:2000). A continuación se incubaron las membranas con anticuerpo conjugado de peroxidasa secundaria de rábano (HRP), y fueron visualizadas bandas inmunoreactivas utilizando un reactivo (Pierce) de quimioluminiscencia aumentada (ECL). Las bandas inmunoreactivas que correspondían a panVEGF y VEGF_{xxx}b en cada tratamiento fueron cuantificadas mediante análisis de ImageJ y normalizadas para aquellas de β-tubulina.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevarán a cabo sobre datos crudos utilizando la prueba de Friedman (prueba posterior de Dunnet) y un valor p de menos de 0,5 fue considerado estadísticamente significativo. Los valores se expresan como medios ± SE (error estándar). Para todos los datos n representa el número de poblaciones de células de RPE que se derivan de diferentes donantes.

Resultados

Empalme de cambio de IGF-1 y TNF-α de isoformas de VEGF anti-angiogénico a pro-angiogénico

Se ha mostrado previamente que factores de crecimiento tales como IGF-1, TNF-α y TGFβ incrementan la expresión de VEGF total, pero su efecto en la selección de sitio de empalme de exón terminal no es conocido (16, 18, 31, 34). En ambos tipos de célula de epitelio ensayados, células de RPE y podocitos, el tratamiento con IGF-1 reguló significativamente el aumento de la expresión de VEGF total, pero esta regulación de aumento fue restringida a las isoformas de VEGF_{xxx} pro-angiogénico (figura 2). En las células de RPE IGF-1 dio lugar a un incremento dependiente de dosis en el VEGF_{total} de 217±112 pg/mg de proteína total a 1656±448 pg/mg de proteína a IGF-1 de 100nM (N=6, p<0.05 ANOVA, p<0.01 prueba para tendencia lineal, figura 2A). Este incremento se debió a una regulación de aumento de VEGF_{xxx} de 138±117pg/mg de proteína a 1592pg/mg de proteína, y una regulación de disminución de VEGF_{xxx}b desde 78±12pg/mg de proteína a 64±14pg/mg de proteína. Por lo tanto, IGF indujo un cambio en la expresión de modo que las células que originalmente estaban produciendo 80±32% de su VEGF a VEGF_{xxx}b, después del tratamiento con IGF-1 produjeron solamente 5±20% de su VEGF como VEGF_{xxx}b.

Un efecto similar fue visto en otro tipo de célula epitelial, podocitos. Estas células mostraron un decrecimiento en niveles de VEGF_{165b} con un incremento significativo en los niveles de VEGF total en comparación con el control (figura 2B). Para determinar si IGF-1 modificó la regulación de las isoformas de VEGF₁₆₅ y VEGF_{165b} de sus respectivas familias, se utilizó inmunoprecipitación Western. La figura 3A muestra que 100nM IGF regularon la disminución de VEGF_{165b} en células de RPE (figura 3A), mientras que daba lugar a un incremento en el VEGF total relativo al control de carga (β-actina, figura 3B). Para determinar si el cambio de isoformas pudo inducirse por otras citocinas, se incubaron células de RPE en 50ng/ml de TNF-α, y se recogió la proteína. TNFα indujo una regulación de aumento de isoformas de VEGF_{xxx} (de 182±83pg/mg de proteína a 825±366pg/mg de proteína (p<0.05, un incremento medio de 4.5±2.0 veces (n=3). En contraste, 50ng/ml de TNF-α, reguló significativamente la disminución de isoformas de VEGF_{xxx}b (p<0.05) desde 99±26pg/mg a 42±13pg/mg de proteína, una reducción de 46±3%.

TGF-β cambia empalme a isoformas de VEGF anti-angiogénico

Se ha mostrado que TGF- β 1 está involucrado en la regulación de empalme de otros genes (por ejemplo Tenascina (56), procolágeno tipo II (50). Por lo tanto, los inventores investigaron si TGF- β 1 afectó el empalme del ARNm de VEGF.

En contraste con IGF-1 y TNF- α , la incubación con TGF- β 1 a 0.5nM y 1nM durante 48h incrementó significativamente el nivel de proteína def VEGF_{xxx}b (2.9 $\pm$ 1.4 veces y 7.2 $\pm$ 4.7 veces respectivamente, p<0.05 p<0.001 prueba de Dunnet) y expresión de proteína de VEGF total (2.25 $\pm$ 0.65 y 4.63 $\pm$ 0.61 veces respectivamente, p<0.001 prueba de Dunnet, figura 4). Por lo tanto, los niveles de expresión de VEGF_{xxx} cayeron en 70 $\pm$ 7% a 1nM de IGF- β . Para determinar si las isoformas modificadas por alteradas por TGF eran las isoformas VEGF165b y VEGF156, se llevó a cabo la Inmunoprecipitación Western en el lisado celular. La figura 4B muestra en condiciones ligeramente reductoras que las isoformas tanto de VEGF165b como de VEGF121b fueron reguladas en su aumento en 0,5 y 1nM de TGF- β 1. Este blot también muestra alguna evidencia para regulación de aumento de VEGF121b.

Mecanismos intra-celulares a través de los cuales se regula el empalme de VEGF165b mediante citocinas.

Se ha mostrado previamente que TGF- β 1 activa la ruta de p38-MAPK (21), la cual también ha estado involucrada en mecanismos de regulación de empalme (por ejemplo 51, 32). Para determinar si esta ruta estaba involucrada en la regulación de empalme mediada por TGF- β , se incubaron podocitos con el inhibidor SB203580 de p38-MAPK. El tratamiento con SB203580 reguló significativamente la disminución de la expresión de VEGF165b desde 850 $\pm$ 50pg/mg de proteína a 450 $\pm$ 80pg/mg (figura 5A), pero no incrementó la expresión de isoformas de VEGF_{xxx} que estaban por debajo del límite de detección en este experimento, en las células no tratadas o tratadas de SB203820. Además, IGF- β no incrementó la expresión de las isoformas de VEGF_{xxx}b o de las isoformas VEGF_{xxx} en presencia de células tratadas con SB203820 (figura 5B). La Inmunoprecipitación Western demostró que la isoforma principal regulada en su aumento por TGF- β 1 era VEGF165b y esta fue inhibida por SB203820 (figura 5C).

Para confirmar que los cambios vistos por TGF- β 1 estaban al nivel de ARNm, y el efecto de los inhibidores actuó al nivel de ARNm, se llevó a cabo reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) utilizando cebadores que detectan tanto las isoformas de empalme proximal (VEGF_{xxx}, banda 135bp) y como las isoformas de empalme distal (VEGF_{xxx}b, 74bp by). La amplificación de ARNm desde podocitos confirmó que el tratamiento con TGF- β 1 (1nM) dio lugar a un incremento en la densidad relativa de la banda más baja VEGF_{xxx}b (figura 6A). Este incremento en intensidad fue inhibido por SB203820, pero no por el inhibidor PD98059 de p42/p44MAPK. De manera interesante, otro inhibidor de cinasa, TG003, que inhibe la cinasa clk1/sty similar a cdc42, también inhibió la intensidad de la banda de VEGF_{xxx}b incrementada mediada por TGF- β 1. Estos hallazgos fueron confirmados por Inmunoprecipitación Western (figura 6B) y ELISA (figura 6C).

La transfección de células de RPE con factores conocidos de empalme muestra que los factores de empalme, tales como ASF/SF2, 9G8, y en particular SRp55, regulan el empalme alternativo de terminal C' del gen VEGF.

Se ha mostrado que Clk/Sty da lugar a fosforilación de los tres factores conocidos de empalme factor de empalme alternativo/factor de empalme 2 (ASF/SF2), SRp55 y SRp40. La distribución de secuencia de consenso ESE conocidas para estos factores de empalme en el terminal C del gen VEGF, se generan a partir de ESEFinder tal como se muestran en la figura 7. Hay un fuerte agrupamiento de los sitios de enlace de SRp55 justamente distal a los sitios de empalme distal y un agrupamiento fuerte de sitios ASF/SF2 y SRp40 adyacentes al sitio de empalme proximal. Para determinar si estos factores de empalme pueden regular la selección de sitio de empalme de exón terminal de VEGF los inventores transfectaron células de epitelio pigmentario retinal (RPE) con ADNcs de factor de empalme en el vector de pcADN3, y se recogieron la proteína total y el medio acondicionado y se analizaron mediante Inmunoprecipitación Western (mediante densitometría, figura 8A) y ELISA (figuras 8B, 8C, 8D) respectivamente. ASF/SF2 no incrementó significativamente la cantidad de VEGF165b en el lisado celular, pero incrementó la cantidad de VEGF_{total} (media $\pm$ SEM, n=3 41.4 $\pm$ 6.9%, p<0.05, figura 8A). La proteína de SR 9G8 incrementó significativamente tanto niveles de VEGF_{xxx}b (78.6 $\pm$ 4.7%, p<0.01) como los de VEGF_{total} (13.7 $\pm$ 2.9%, p<0.05) en el lisado celular (figura 8A). SRp55 incrementó la cantidad de VEGF_{xxx}b (104.51 $\pm$ 18.0%, p<0.01) pero no incrementó VEGF_{total} (por ejemplo figura 8A). SRp40 no modificó la cantidad de proteínas de VEGF_{total} o de VEGF_{xxx}b (figura 8A). Para determinar si los niveles de VEGF secretado fueron modificados de manera similar, también se ensayó el sobrenadante celular mediante ELISA. En comparación con las células de RPE no tratadas, ASF/SF2, SRp55 y SRp40 parecían disminuir la cantidad de proteína de VEGF_{total} detectada en el medio mediante 12.8 $\pm$ 4.8%, 70.9 $\pm$ 3.6%, y 34.1 $\pm$ 4.6%, respectivamente (figura 8B). 9G8 no afectó el nivel de VEGF_{total} (figura 8B). En contraste, la sobreexpresión de SRp55 sí incrementó significativamente la concentración de VEGF_{xxx}b en los medios. Para determinar el efecto de estos cambios en los niveles de expresión relativa total, se calculó la concentración de VEGF_{xxx}b a VEGF_{total} en los medios (figura 8D). Puede verse que SRp55 da lugar a un cambio significativo en empalme hacia las isoformas de VEGF anti-angiogénico. Estos resultados indican que los factores de empalme, tales como ASF/SF2, 9G8, y en particular SRp55, regulan el empalme alternativo de terminal C' del gen VEGF (figuras 9 y 10).

El balance de las familias de VEGF_{xxx} (angiogénico) y VEGF_{xxx}b (anti-angiogénico), derivadas del mismo gen, parecen de esta manera desempeñar un papel importante en el control de angiogénesis en la salud y un desbalance puede destacar angiogénesis patológica (figura 10C). Entender las propiedades, expresión y control de la familia de

VEGF_{xxx}b puede tener, por lo tanto, implicaciones terapéuticas de amplio alcance en enfermedades tan diversas como cáncer, enfermedad vascular, artritis, diabetes, enfermedad renal y psoriasis.

Han sido aprobadas terapias que inhiben angiogénesis después de los principales experimentos clínicos de la fase III en cáncer y AMD (19, 25). Experimentos recientes de fase II y III muestran la eficacia que activa de las terapias anti-VEGF en carcinoma colorectal (25, 35), y de células renales (55) y en degeneración macular relacionada con la edad (14).

El trabajo de los inventores, descrito en la presente, sobre el empalme alternativo del gen VEGF que da lugar tanto a isoformas anti-angiogénica as como también pro-angiogénica as indica que controlar y entender el balance de cada familia de isoformas puede ser esencial para definir la opción terapéutica y dosificación óptimas. Los inventores han encontrado factores de empalme (particularmente SRp55) y factores de crecimiento (especialmente IGF-β) que podrían seleccionarse preferencialmente para el empalme de terminal C'.

Los factores de empalme se regulan mediante moléculas de señalización específica, ya sea directamente (quinasas de proteína de SR tales como clk1, o SRPKs), o indirectamente (MAPKs y PKC). SRPKs fosforilan SF2/ASF, lo cual favorece el empalme proximal (figura 10C). RT-PCR semicuantitativa para SRPK1 muestra que SRPK, implicada en progreso tumoral (20) es regulada en su disminución durante la diferenciación de podocitos, y que esta regulación de disminución simula la alteración en empalme de VEGF165 a VEGF165b (figura 11).

El tratamiento de podocitos con IGF incrementa PSS tal como se evidencia mediante RT-PCR y ELISA. Este incremento se inhibe por el inhibidor de PKC BIM y el inhibidor de quinasa de proteína SR SERPIN340 (figuras 12 y 13).

SRp55 regula la selección de empalme de VEGF en exón 8. Los pocitos transfectados por SRp55 muestran un muy ligero incremento en la expresión de VEGF165b en comparación con una expresión de SRp55 altamente incrementada. shRNA (por short hairpin interfering RNA o ARN de interferencia de horquilla corta) que toma como diana SRp55 reguló la disminución de la expresión tanto de SRp55 como de VEGF165b (figura 14A, inmuno-blot es la porción izquierda de la figura; cuantificación de la interferencia de shRNA es la porción derecha de la figura). Fue generado ARN mediante transcripción in vitro de tres constructos que terminan con la secuencia enlazante de ARN MS2 que contiene tres secuencias de reconocimiento para la proteína de enlace de maltosa (MBP). El constructo X contenía 88 nucleótidos alrededor del marco de lectura abierto del exón 8b. El constructo Y contenía una supresión de 35 bp corriente abajo del codón de detención. El constructo Z contenía solamente la secuencia MS2. Estos ARNs fueron incubados con extracto nuclear a partir de células HEK293 (control positivo) y MS2 y fueron corridos en una columna de maltosa. La maltosa se enlaza a la proteína MS2-MBP. Las fracciones enlazadas y no enlazadas se recogieron y se sometieron a inmuno-blot para SRp55. Una banda de 55kDa fue vista en la fracción enlazada al ARN de constructo X, y en una corrida de extracto nuclear como control positivo, pero no en los otros constructos, lo que demuestra que SRp55 se enlaza a la región 35bp corriente abajo del codón de detención en el exón 8b. La fracción no enlazada contenía SRp55 en todas las muestras (figura 14B, porción superior es un diagrama que muestra las disposiciones de las regiones de codificación del exón 8 en los tres constructos; la porción inferior muestra los inmuno-blots de las fracciones enlazadas (superiores) y no enlazadas (inferiores)).

Las células de carcinoma de colon (10C y LS174t) que normalmente expresan menos (10C) o poco VEGF165b fueron transfectadas con vector vacío o ADNc TIA. TIA-1 es una proteína que enlaza ARN previamente mostrada {datos no publicados} que va hacer mutada en 10C células. ARN fue extraído y sometido a PCR utilizando cebadores delanteros en el exón 7 y cebadores contrarios en el 3'UTR del ARNm de VEGF (figura 15; la banda inferior es un resultado de la selección de sitio de empalme distal (DSS) (que conduce a VEGF_{165b}) y la banda superior es el resultado de selección de sitio de empalme proximal (PSS) que conduce a VEGF165). Esto indica que la activación de TIA-1 puede ser una estrategia terapéutica anti-angiogénica potencial.

El tratamiento con morfolino (MO) de las células de HEK muestra que la proporción de VEGF_{165b} expresado VEGF₁₆₅ puede controlarse de manera dependiente de la dosis para reducir (figura 17) o incrementar (figura 18) la proporción dependiendo de si morfolino tiene como diana al DSS (figura 17) o al PSS (figura 18). En cada figura, la porción superior (A) muestra el diagrama de secuencia que muestra la localización de morfolino (véase la figura 16 para detalles de secuencia), la porción central (B) muestra las bandas de RT-PCR que muestran el efecto de incrementar la concentración de morfolino, y la porción inferior (C) muestra la cuantificación de la proporción de VEGF165b: VEGF165 mediante densitometría.

Los estudios de inmuno-histoquímica han sido realizados sobre tejidos de embriones humanos para mostrar que en embriones humanos la expresión de isoformas de VEGF_{xxx}b está ampliamente difundida (figura 19). Se ve que VEGF165b en las fotomicrografías está altamente expresado en la médula espinal, particularmente en el corno ventral y los ganglios de raíz dorsal. Se expresa en las células del endotelio, por ejemplo en la vena yugular y la arteria carótida en vías de desarrollo, en el cerebro, aunque no se expresan uniformemente, y en el tejido linfóide. De manera interesante, su expresión aumenta de manera regulada en la piel entre 8 y 16 semanas de desarrollo. Se expresa en osteoblastos y periosteo de hueso en vías de desarrollo, pero no en condroblastos en esta etapa. Se expresa ampliamente y de manera fuerte en células de epitelio, por ejemplo en el esófago y la tráquea, así como

también en áreas específicas de CNS tales como el plexo coroideo y el ojo en vías de desarrollo. La distribución amplia de la expresión de VEGF165b apoyar los principios subyacentes de la presente invención, más precisamente que la selección de sitio de empalme puede ofrecer beneficios clínicos sustanciales en el tratamiento pro- y anti-angiogénico de tejidos en una amplia variedad de sitios en el cuerpo, y se espera que los sistemas de control habilitados mediante la presente invención sean funcionales en un amplio rango de tejidos.

Aplicabilidad industrial

La presente divulgación proporciona agentes y dianas para la manipulación del control de empalme conjuntamente con actividad promotora no modificada a fin de promover selección de sitio de empalme distal (exón 8b - angiogénico), antes que proximal (exón 8a -angiogénico) en la expresión del gen VEGF en mamíferos, particularmente humanos.

Este hallazgo novedoso e impredecible hace posible una terapia que, en el ejemplo del cáncer, estimularía al tumor a desconectar su propio suministro nutricional. Realmente, cuanto más hipóxico se vuelve el tumor, más efectivo puede ser este interruptor terapéutico en vista de los efectos conocidos de la hipoxia en la regulación transcripcional de expresión génica de VEGF (47).

En particular, el tratamiento con IGF y TNF- α modificó la expresión para favorecer PSS (VEGF_{xxx}) mientras que TGF- β 1 favoreció DSS, incrementando los niveles de VEGF_{xxx}b. Este DSS inducido por TGF- β 1 fue evitado por inhibición de p38MAPK, y por inhibición de cinasa de factor de empalme clk/sty, pero no por inhibición de ERK1/2. Se ha mostrado que Clk/sty fosforila los factores de empalme de proteína de SR tales como ASF/SF2, SRp40 y Srp55. Para determinar si los factores de empalme de SR podían alterar aplicando VEGF, fueron sobre-expresados en células de epitelio y se evaluó la producción de isoforma diferencial. ASF/SF2, y Srp40 favorecieron ambos PSS, mientras que SRp55 reguló el aumento de isoformas de VEGF_{xxx}b en relación con VEGF_{xxx} (DSS) de una manera que fue inhibido por siRNA diana de SRp55. El inhibidor BIM de PKC, así como también TIA-1, también favoreció VEGF165b. Estos resultados identifican la regulación de empalme por factores de crecimiento y de empalme con un evento clave en la determinación de la expresión relativa pro- angiogénica versus anti-angiogénica de isoformas de VEGF y sugieren que la cinasas p38MAPK-clk/st pueden ser responsables de la selección de sitio de empalme distal inducida por TGF- β 1.

Estos hallazgos permiten además un método para facilitar diagnóstico y/o pronóstico de condiciones que tiene un aspecto relacionado con angiogénesis y permiten que se diseñe la medida el tratamiento subsiguiente de aquellas condiciones de la bioquímica subyacente de la condición en el sujeto.

La presente divulgación también proporciona una razón para el desarrollo de agentes y métodos de diagnóstico en relación con la susceptibilidad de una lesión o condición potencial a una estrategia terapéutica pro-angiogénica o anti-angiogénica, ya que los inventores han mostrado que el cambio de anti- a pro-angiogénico es heterogéneo en pacientes con la misma condición clínica, por ejemplo retinopatía diabética y carcinoma de colon. El análisis detallado del balance de la expresión de isoforma de VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b puede predecir susceptibilidad de una lesión o condición a tratamiento, o aún tratamiento particular, o permitir hacer a la medida un tratamiento para el paciente individual, lo cual incrementa la efectividad terapéutica y reduce los efectos colaterales.

Listado de secuencias

<110> Universidad de Bristol

<120> Tratamientos pro- y anti-angiogénicos

<130> P108076PC00

<140> PCT/GB

<141> 2008-03-10

<150> GB0704678.2

<151> 2007-03-09

<160> 4

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220>
 <400>
 CDKPRR
 5 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <400>
 SLTRKD
 <210> 3
 <211> 25
 <212> Sintético, morfolino
 15 <213> Artificial
 <220>
 <400>
 GTCACATCTGAGGGAAATGGAAAAC
 <210> 4
 20 <211> 24
 <212> Sintético, morfolino
 <213> Artificial
 <220>
 <400>
 25 GGTGAGAGATCTGGTTCCCGAAAC
 LISTADO DE SECUENCIAS
 <110> Universidad de Bristol Bates, David Harper, Steven J Nowak, Dawid G
 <120> Tratamientos pro- y anti-angiogénicos
 <130> P108076PC00
 30 <140> PCT/GB2008/000824
 <141> 2008-03-10
 <150> GB0704678.2
 <151> 2007-03-09
 <160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Asp Lys Pro Arg Arg
1 5

<210> 2

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Leu Thr Arg Lys Asp
1 5

<210> 3

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sintético, morfolino

20 <220>

<221> modified_base

<222> (1)..(25)

<223> Estas bases son bases de morfolino y no bases de ADN o ARN convencionales

<400> 3

25 gtcacatctg agggaaatgg aaaac 25

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Sintético, morfolino

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(24)

<223> Estas bases son bases de morfolino y no bases de ADN o ARN convencionales

<400> 4

5 ggtgagagat ctggttcccg aaac 24

Referencias

1. Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Kawakita T, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, y Fujishima H. TGF-beta1, IL-1beta, y Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. *Exp Eye Res* 80: 555-560, 2005.
- 10 2. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, y Harper SJ. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123-4131., 2002.
3. Bates DO, Macmillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, Hunter AJ, Soothill PW, Read M, Donaldson LF, y Harper SJ. The endogenous antiangiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)*, 2006.
- 15 4. Bevan HS, Harper SJ, y Bates DO. VEGF165b, the anti-angiogenic isoform of VEGF, differentially stimulates VEGFR2, MAPK and Akt fosforylation in endothelial cells. submitted, 2006.
5. Caceres JF y Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18: 186-193., 2002.
- 20 6. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med* 6: 1102-1103, 2000.
7. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, y Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 7: 425-429., 2001.
8. Charnock-Jones DS, Macpherson AM, Archer DF, Leslie S, Makkink WK, Sharkey AM, y Smith SK. The effect of progestins on vascular endothelial growth factor, oestrogen receptor and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell density in human endometrium. *Hum Reprod* 15 Suppl 3: 85-95, 2000.
- 25 9. Cohen CD, Doran PP, Blattner SM, Merkle M, Wang GQ, Schmid H, Mathieson PW, Saleem MA, Henger A, Rastaldi MP, y Kretzler M. Sam68-Like Mammalian Protein 2, Identified by Digital Differential Display as Expressed by Podocytes, Is Induced in Proteinuria and Involved in Splice Site Selection of Vascular Endothelial Growth Factor. *J Am Soc Nephrol*, 2005.
- 30 10. Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, y Kornblihtt AR. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 4: 251-258., 1999.
- 35 11. Cui TG, Foster RR, Saleem M, Mathieson PW, Gillatt DA, Bates DO, y Harper SJ. Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) ARNm and protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F767-773, 2004.
12. Dowhan DH, Hong EP, Auboeuf D, Dennis AP, Wilson MM, Berget SM, y O'Malley BW. Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol Cell* 17: 429-439, 2005.
- 40 13. Endo H, Matsuda C, y Kagawa Y. Exclusion of an alternatively spliced exon in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA requires de novo protein synthesis. *J Biol Chem* 269: 12488-12493., 1994.
14. Eyetech. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 110: 979-986., 2003.
15. Ferrara N y Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25., 1997.

16. Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, y Siemeister G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 15: 669-676., 1997.
17. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43: 175-203, 1985.
18. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr., y Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 137: 2262-2268., 1996.
19. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, y Guyer DR. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351: 2805-2816, 2004.
20. Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, y Miller LJ. Targeting the ARN splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 66: 3819-3827, 2006.
21. Herrera B, Fernyez M, Roncero C, Ventura JJ, Porras A, Valladares A, Benito M, y Fabregat I. Activation of p38MAPK by TGF-beta in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. *Febs Lett* 499: 225-229, 2001.
22. Hertel KJ, Lynch KW, y Maniatis T. Common themes in the function of transcription y splicing enhancers. *Curr Opin Cell Biol* 9: 350-357., 1997.
23. Hirose Y, Tacke R, y Manley JL. Fosforylated ARN polymerase II stimulates pre-ARNm splicing. *Genes Dev* 13: 1234-1239., 1999.
24. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, y Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of ARN. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814, 1991.
25. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, y Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342, 2004.
26. Idriss H, Kumar A, Casas-Finet JR, Guo H, Damuni Z, y Wilson SH. Regulation of in vitro nucleic acid strand annealing activity of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein A1 by reversible fosforylation. *Biochemistry* 33: 11382-11390., 1994.
27. Kalnina Z, Zayakin P, Silina K, y Line A. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 342-357, 2005.
28. Koenigsberger C, Chicca JJ, 2nd, Amoureux MC, Edelman GM, y Jones FS. Differential regulation by multiple promoters of the gene encoding the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2291-2296., 2000.
29. Kotsuji-Maruyama T, Imakado S, Kawachi Y, y Otsuka F. PDGF-BB induces MAP kinase fosforylation and VEGF expression in neurofibroma-derived cultured cells from patients with neurofibromatosis 1. *J Dermatol* 29: 713-717, 2002.
30. Li H, Yonekura H, Kim CH, Sakurai S, Yamamoto Y, Takiya T, Futo S, Watanabe T, y Yamamoto H. Possible participation of pICln in the regulation of angiogenesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor ARNms. *Endothelium* 11: 293-300, 2004.
31. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, y Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270: 308-312., 1995.
32. Lin JC, Hsu M, y Tarn WY. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2235-2240, 2007.
33. Lynch KW y Maniatis T. Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev* 10: 2089-2101., 1996.
34. Matsumoto K, Ohi H, y Kanmatsuse K. Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* 77: 212-218., 1997.
35. McCarthy M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 361: 1959., 2003.

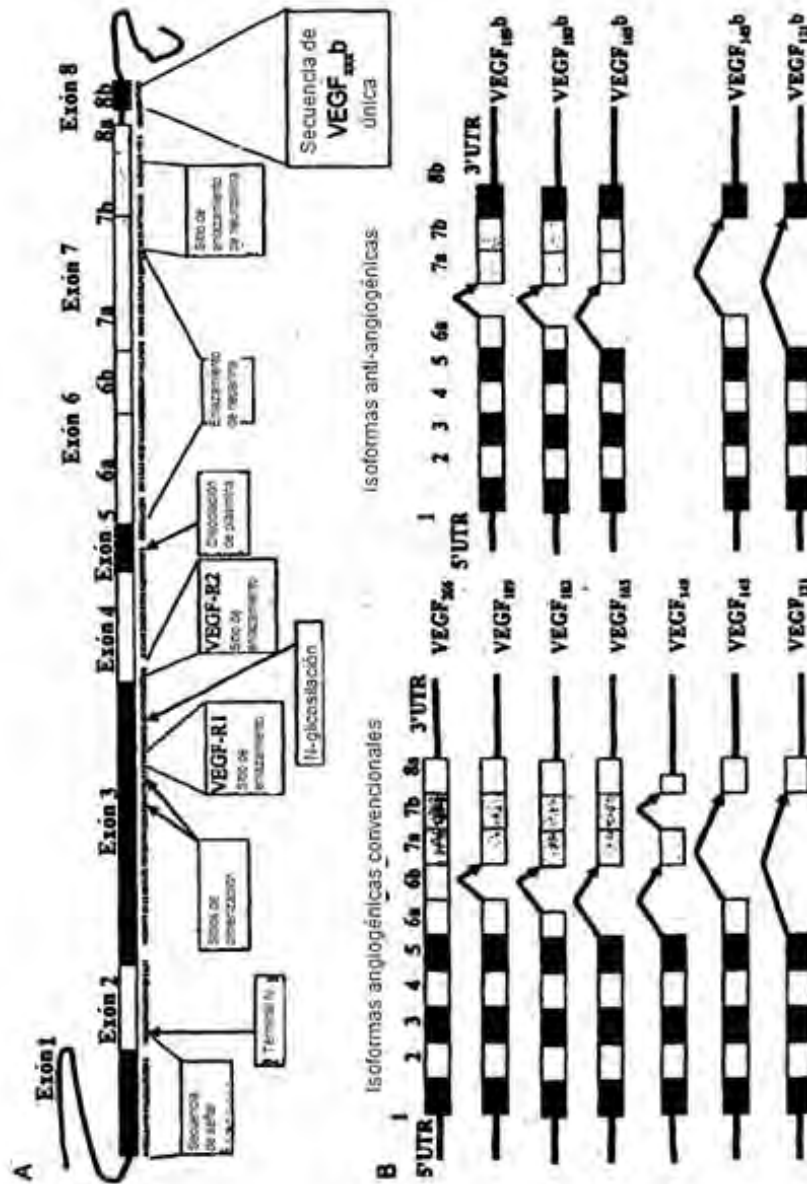
36. Misteli T, Caceres JF, y Spector DL. The dynamics of a pre-ARNm splicing factor in living cells. *Nature* 387: 523-527., 1997.
37. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, y Sukhatme VP. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375: 577-581, 1995.
- 5 38. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, y Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13: 9-22, 1999.
39. Neufeld G, Cohen T, GitayGoren H, Poltorak Z, Tessler S, Sharon R, Gengrinovitch S, y Levi BZ. Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer and Metastasis Reviews* 15: 153-158, 1996.
- 10 40. Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, y Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98: 490-496., 1996.
41. Perkett EA y Klekamp JG. Vascular endothelial growth factor expression is decreased in rat lung following exposure to 24 or 48 hours of hyperoxia: implications for endothelial cell survival. *Chest* 114: 52S-53S., 1998.
- 15 42. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, y Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to proangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48: 2422-2427, 2005.
43. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, y Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 6271-6274., 1994.
- 20 44. Pritchard-Jones RO, Dunn DBA, Qiu Y, Rigby H, Orlyo A, Harper SJ, y Bates DO. Immunohistochemical expression of VEGFxxx predicts metastasis in primary melanoma. *J Pathology*, 2006.
45. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, y Kerbel RS. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4575-4580, 1995.
- 25 46. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, y Mundel P. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 13: 630-638., 2002.
47. Shweiki D, Itin A, Soffer D, y Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845., 1992.
- 30 48. Smith CW. Alternative splicing--when two's a crowd. *Cell* 123: 1-3, 2005.
49. Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Suzuki H, y Yamashita K. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration y up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 193-198., 1996.
- 35 50. Valcourt U, Gouttenoire J, Aubert-Foucher E, Herbage D, y Mallein-Gerin F. Alternative splicing of type II procollagen pre-ARNm in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 y TGF-beta1. *Febs Lett* 545: 115-119, 2003.
51. van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, y Caceres JF. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 y modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol* 149: 307-316, 2000.
- 40 52. Valey AHR, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, Dixon AR, Paraskeva C, Zaccaro O, Hassan AB, Harper SJ, y Bates DO. VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds y inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer In Press* 2008
53. Venables JP. Aberrant y alternative splicing in cancer. *Cancer Res* 64: 7647-7654, 2004.
- 45 54. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, y Bates DO. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822-7835, 2004.

55. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, y Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349: 427-434., 2003.

56. Zhao Y y Young SL. TGF-beta regulates expression of tenascin alternative- splicing isoforms in fetal rat lung. *Am J Physiol* 268: L173-180, 1995.

REIVINDICACIONES

1. Un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS para usar en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis anormalmente incrementada o sobreproducción anormal de isoformas de VEGF pro-angiogénico en un sujeto mamífero;
- 5 en cuyo caso el potenciador de VEGF-exón-8-DSS o el inhibidor de VEGF-exón-8-PSS es SRPIN 340; o análogos funcionalmente activos y fragmento funcionalmente activos del agente anterior; y
en cuyo caso la enfermedad o trastorno se seleccionan de neoplasia maligna, metástasis tumoral, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía proliferativa.
- 10 2. Una composición para usar en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis anormalmente incrementada o sobreproducción de isoformas de VEGF pro-angiogénico en un sujeto mamífero, en cuyo caso la composición comprende una cantidad efectiva de un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS tal como se define en la reivindicación 1, en asociación o mezcla con un soporte, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable; en cuyo caso la enfermedad o trastorno se seleccionan de neoplasia maligna, metástasis tumoral, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración macular
- 15 relacionada con la edad y retinopatía proliferativa.
3. El uso de un potenciador de VEGF-exón-8-DSS o de un inhibidor de VEGF-exón-8-PSS tal como se define en la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para terapia anti-angiogénica en un sujeto mamífero; en cuyo caso la enfermedad o trastorno se seleccionan de neoplasia maligna, metástasis tumoral, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía proliferativa.



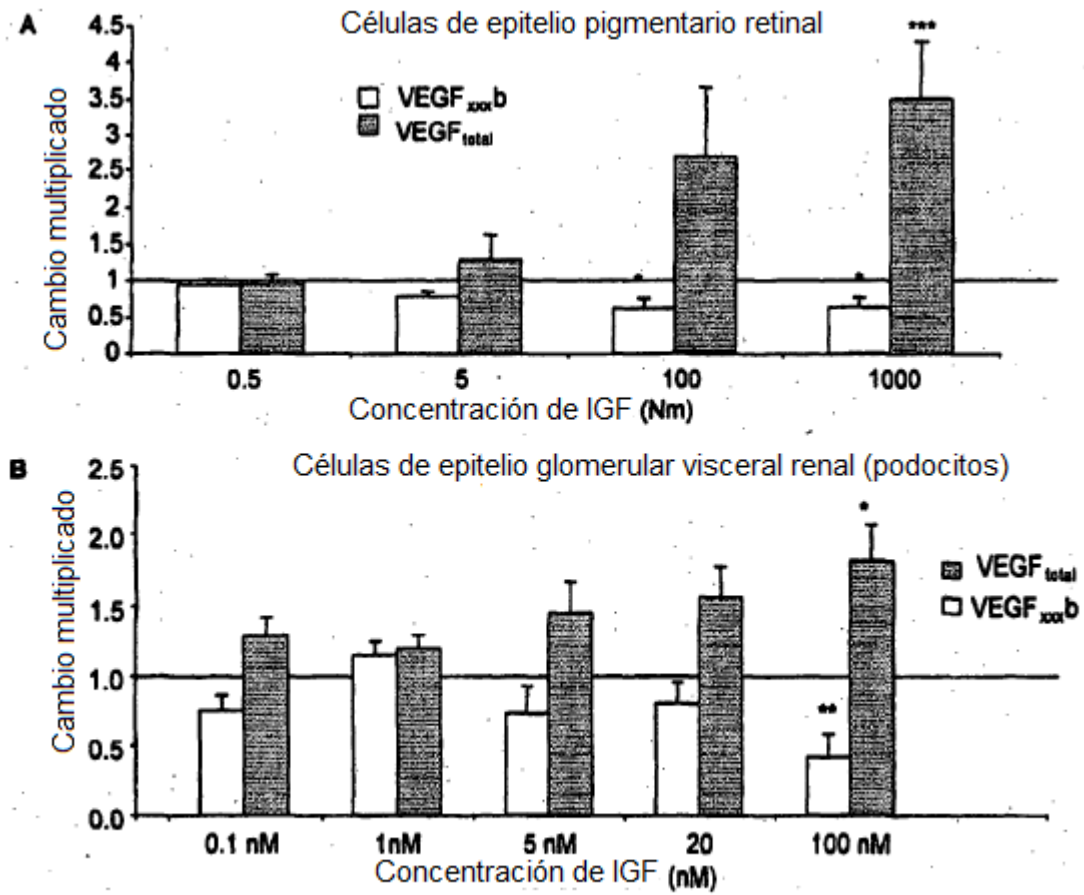


FIG. 2

Efecto de IGF-1 en expresión de proteínas de VEGF_{xxx}b y VEGF_{xxx} en células de A. RPE y B. podocitos. IGF indujo un aumento regulado de VEGF total pero una disminución regulada de VEGF_{xxx}b., $p < 0,05$ vs control respectivo, ANOVA de una vía, prueba de Dunnet, N=3

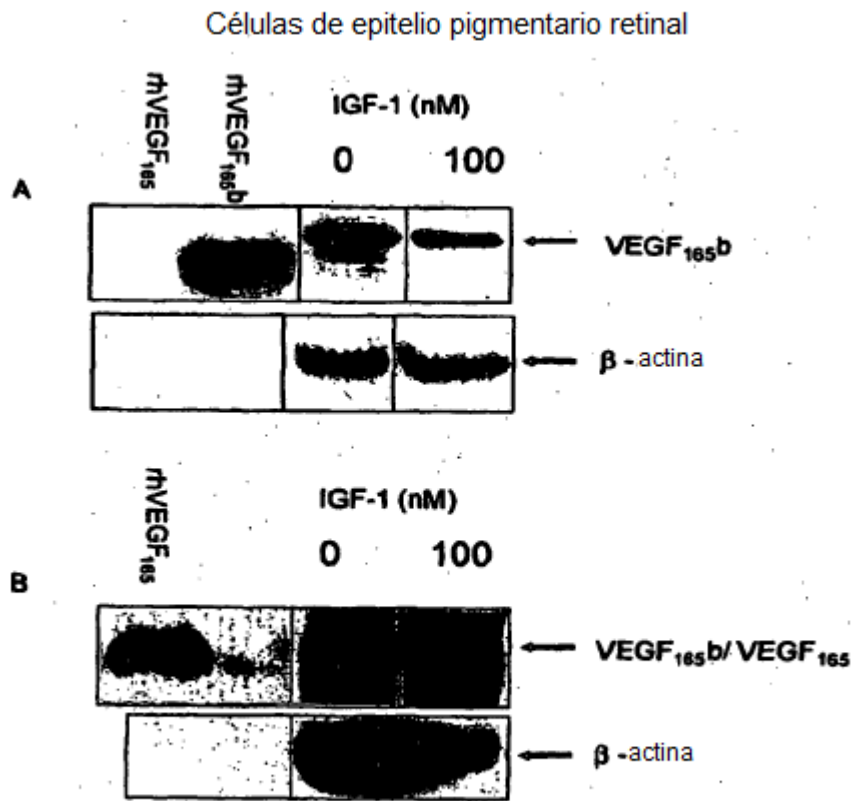
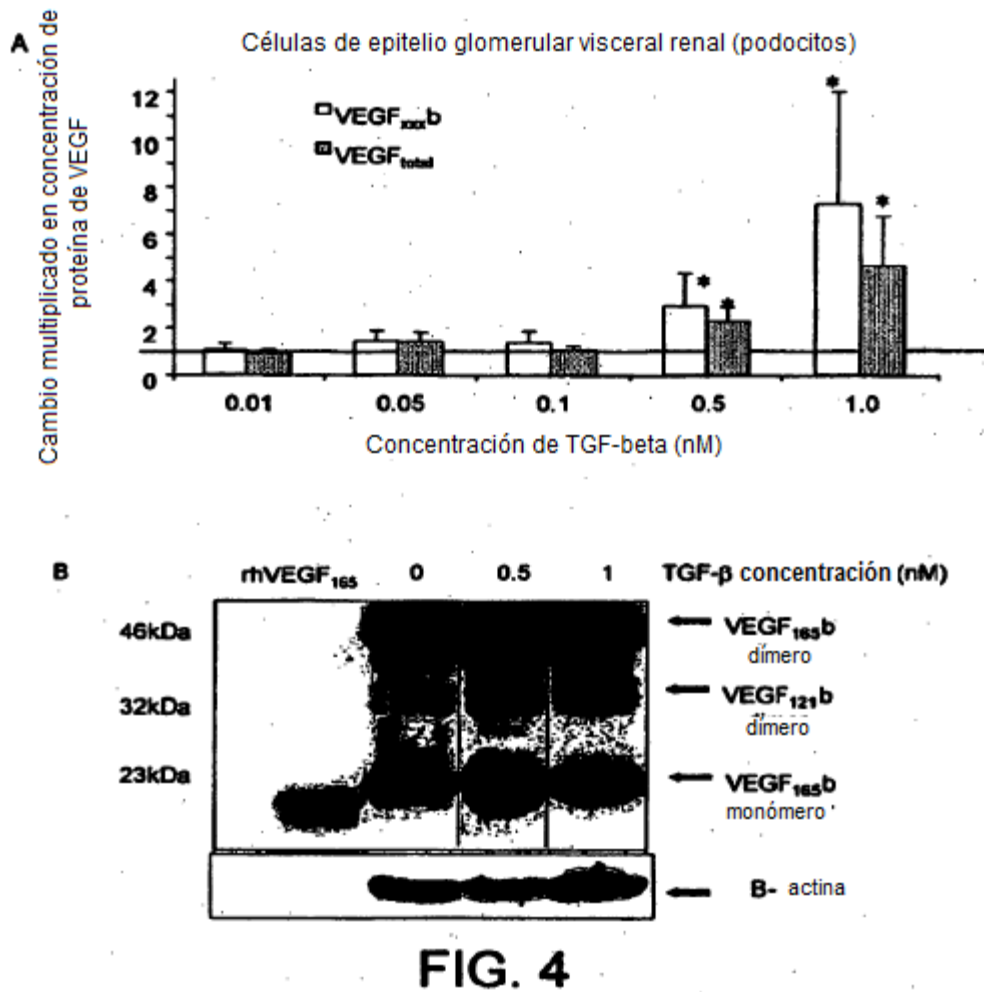


FIG. 3

Efecto de IGF-1 en expresión de A. VEGF_{165b} y B VEGF_{165/165b} en células de RPE. Se usó un gel reductor. Mientras que la proteína de VEGF_{165b} se reducía por IGF, los VEGF₁₆₅ y VEG_{165b} totales combinados no se redujeron y se incrementaron ligeramente



Efecto de TGF-β1 en la expresión de VEGF_{xxx}b y B. VEGF_{total} en podocitos. A. ELISA de lisado celular de podocito muestra que tanto VEGF_{xxx}b como VEGF_{total} fueron aumentados por TGF-β1. B. Western blot no reductor que demuestra que las formas principales de VEGF_{xxx}b aumentadas eran VEGF₁₆₅b y VEGF₁₂₁b.

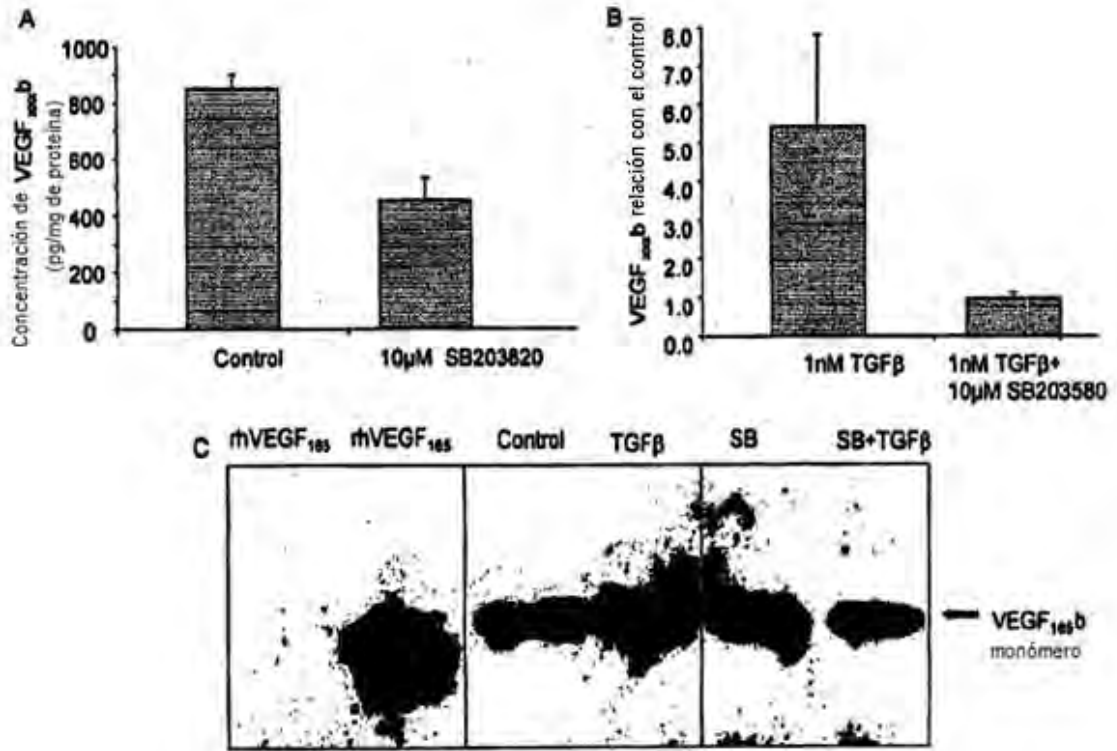


FIG. 5

Inhibición de P38-MAPK reduce selección de sitio de empalme distal en el exón terminal de VEGF. A. Tratamiento con el inhibidor SB203580 de p38MAPK redujo significativamente VEGF_{xxx}b en el sobrenadante de podocitos B. Aumento regulado de VEGF_{xxx}b, mediado por TGF-β1 fue inhibido por el inhibidor SB203580 de p38MAPK. C. Inmunoprecipitación Western reductor de lisado celular de podocito que muestra que el tratamiento con el inhibidor SB203580 de p38MAPK inhibió al aumento regulado de VEGF₁₆₅b mediado por TGF-β1.

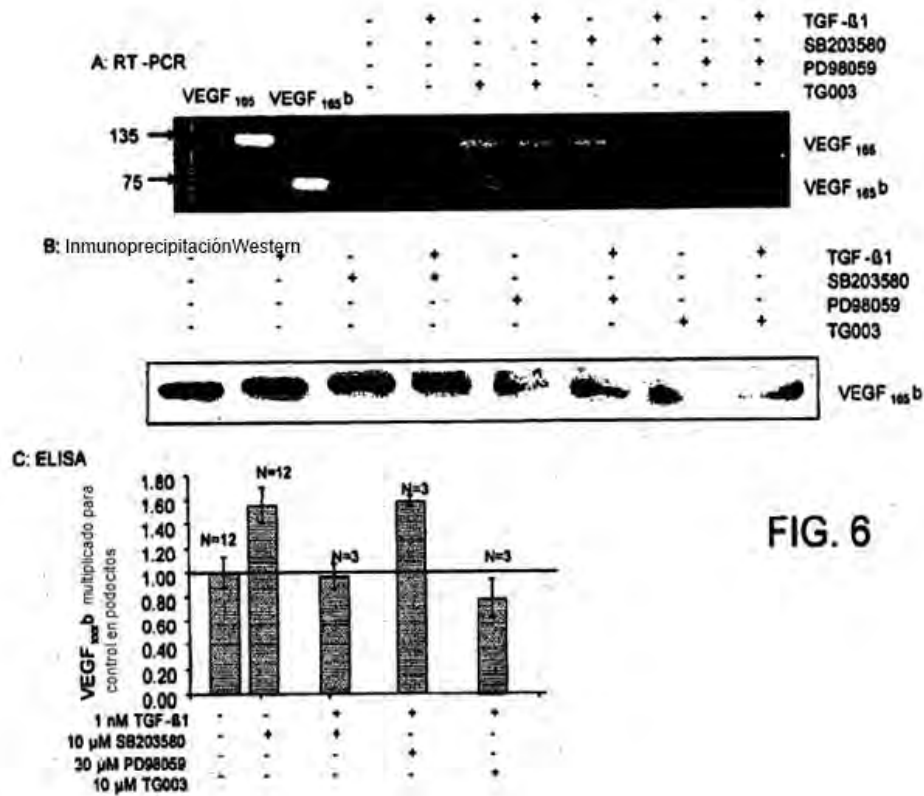
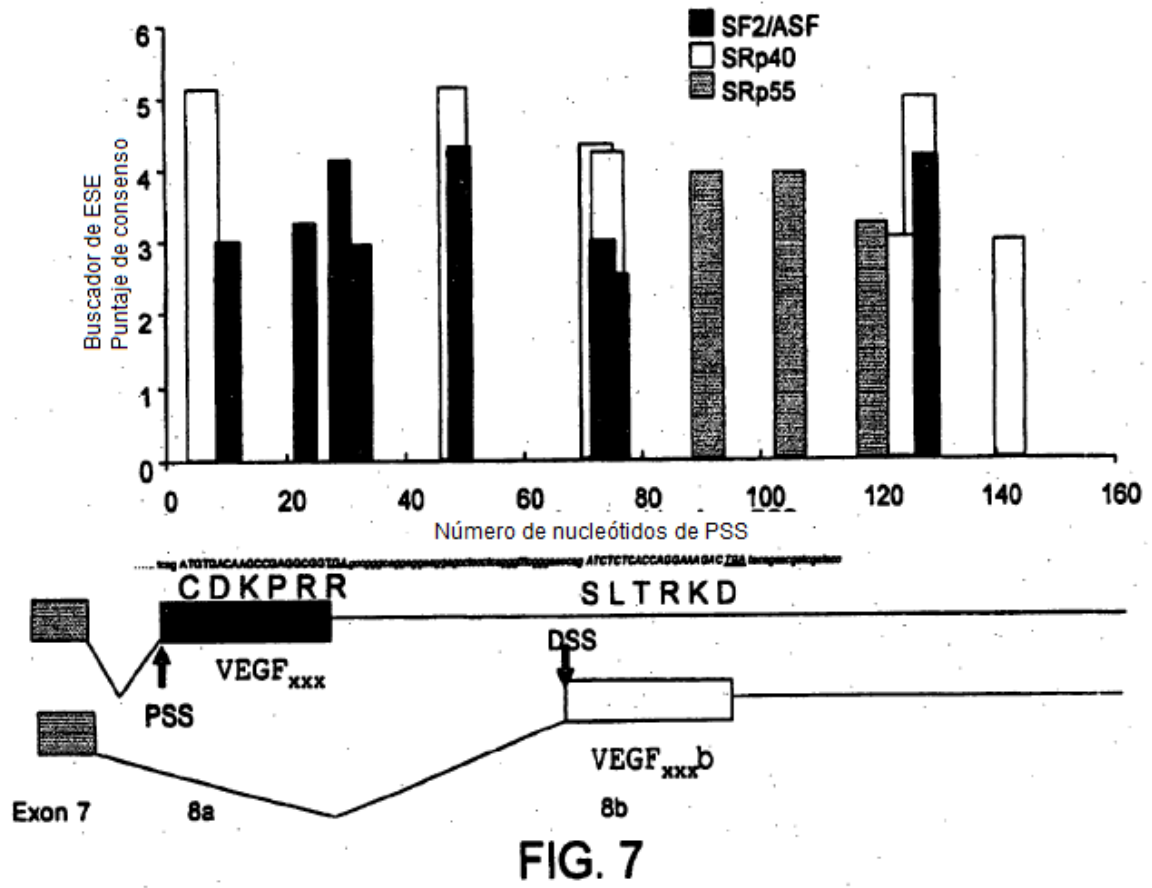


FIG. 6

Regulación de selección de sitio de empalme distal por p38 y p42/p44 MAPK y clk-1/4. A. RT-PCR. B. Inmunoprecipitación Western y C. ELISA de podocitos tratados con el inhibidor SB203580 de p30MAPK (10 μ m), el inhibidor PD98059 de p42/p44 (10 μ m) o el inhibidor TG003 de Clk/Sty. Aumento regulado mediado por TGF- β de empalme distal no fue visto en presencia de SB203580 o TG003 pero estaba presente durante tratamiento de PD98059.



Distribución de secuencias de consenso de ESE en terminal C de gen VEGF.

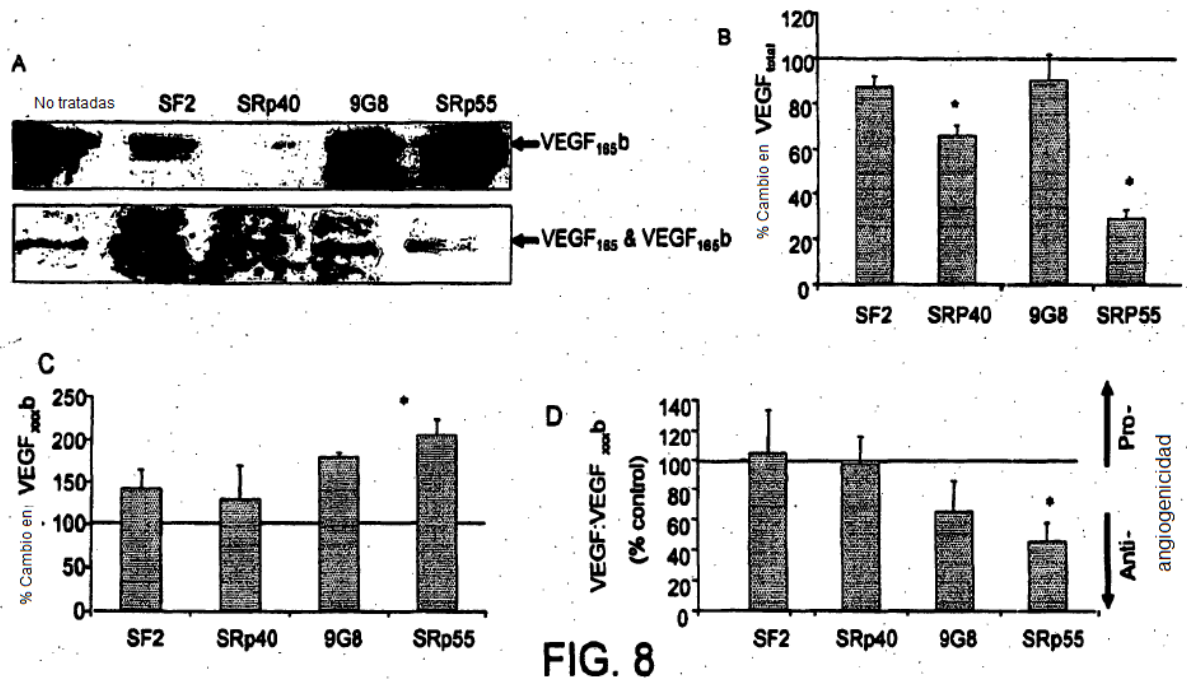


FIG. 8

Efecto de sobre-expresión de factores de empalme en producción de isoforma de VEGF. Transfección de células de epitelio pigmentario retinal con factores de empalme alteró diferencialmente isoformas de empalme distal y nivel de VEGF total. A. Inmunoprecipitación Western de lisados de célula que muestra que la expresión de VEGF165b se incrementó por SRp55, pero se redujo por SRp40 y no se modificó por SF2/ASF o 9G8. En contraste, anticuerpos que detectan tanto VEGF165 como VEGF165b (VEGFtotal) muestran un aumento regulado de SF2/ASF. B. ELISA de sobrenadante celular mostró que la transfección con SRp55 redujo significativamente los niveles de VEGF total. C. En contraste, SRp55 incrementó significativamente producción de VEGF165b en el sobrenadante celular. D. La proporción de VEGFxxx total a VEGFxxx estuvo significativamente disminuida por SRp55 (*= $p < 0,05$ comparada con control, ANOVA)

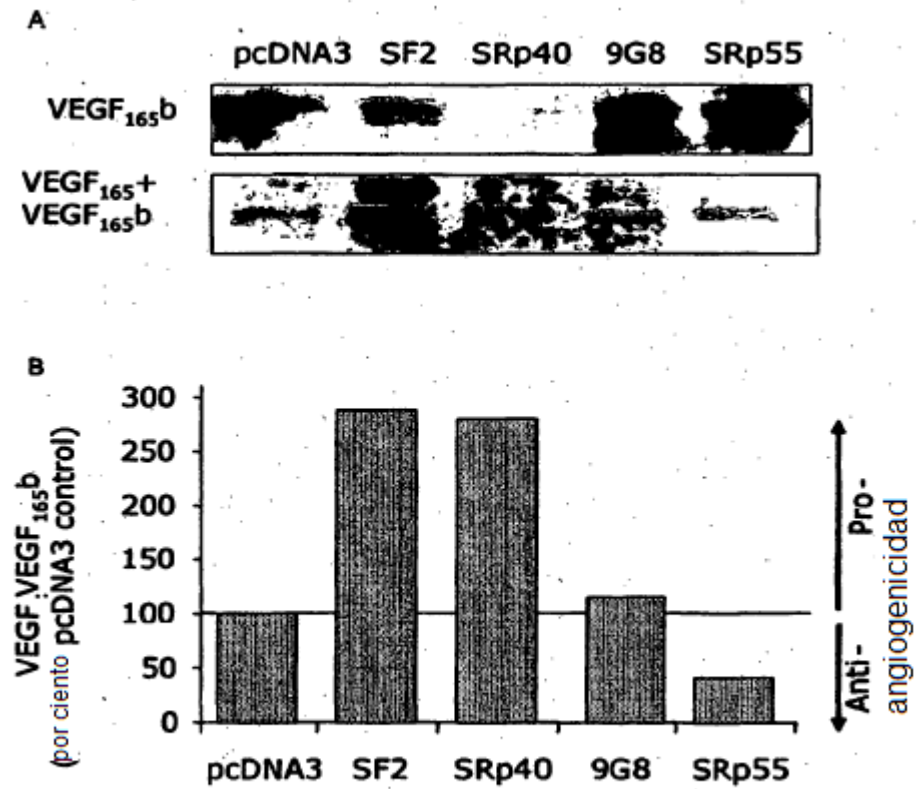


FIG. 9

El balance entre empalme proximal y distal se regula por la expresión de factores de empalme. La sobre-expresión de ASF/SF2 y SRp40 da lugar a un incremento en empalme proximal (VEGF₁₆₅ incrementado relativo a VEGF_{165b}), mientras que sobreexpresión de SRp55 induce empalme distal.

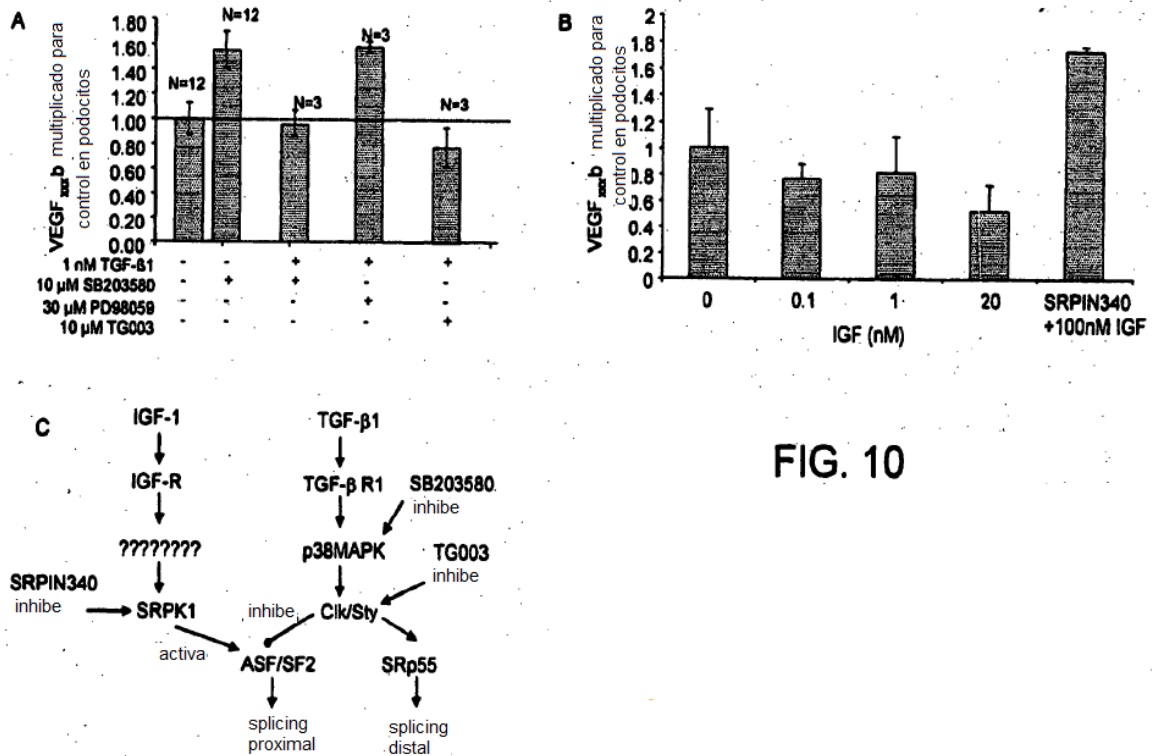


FIG. 10

Empalme distal inducido por TGF-β1 es dependiente de actividad de p38MAPK y actividad de cinasa de familia cinasa tipo cdc42 (clk/sty) pero no de la actividad de MEK. Clk/Sty fosforila ASF/SF2 e inhibe su actividad de empalme. La sobre-expresión de ASF/SF2 da lugar a expresión de VEGFxxx y reduce la expresión de VEGFxxx_b. Clk/Sty fosforila SRp55. La sobre-expresión de SRp55 da lugar a expresión de VEGFxxx_b y reduce la expresión de VEGFxxx. Empalme proximal (evidenciada por empalme distal reducida) se induce por IGF (n=2). Este se inhibe por inhibición de SRP1 (por SRPIN340, n = 2)

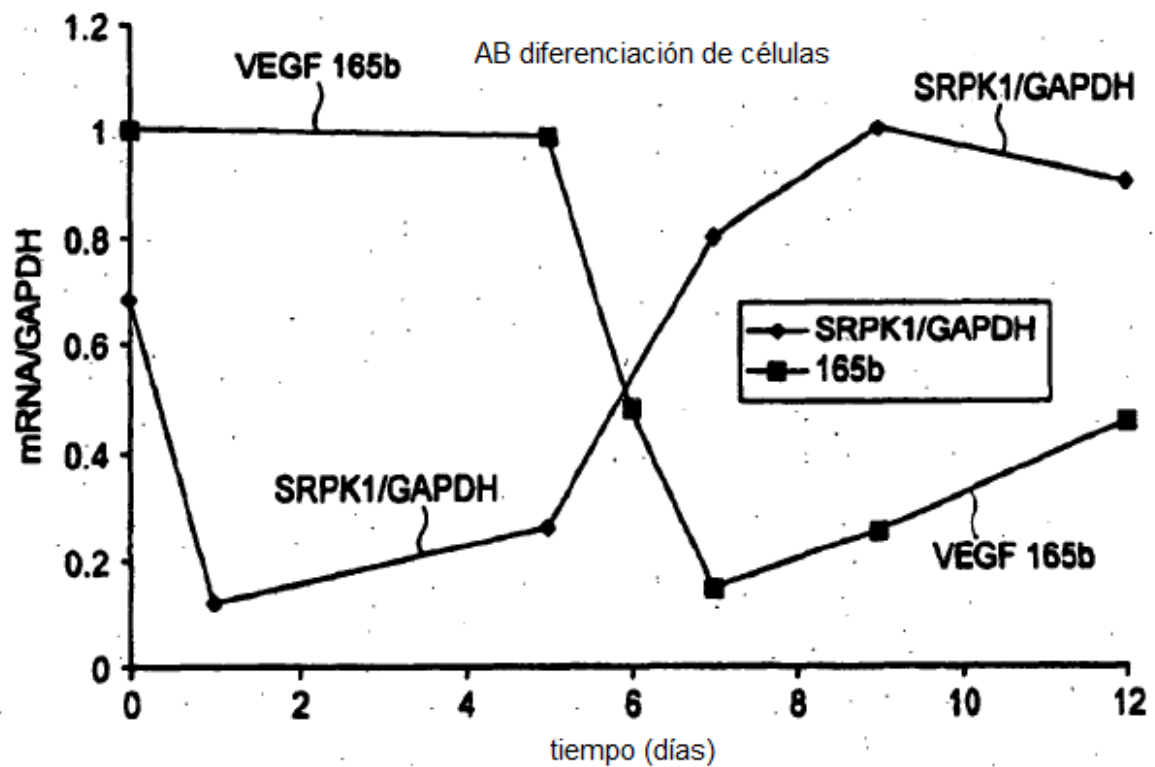


FIG. 11

RT-PCR para SRPK1 y VEGF165b como células que experimentan diferenciación en podocitos. Los niveles de VEGF165b se incrementan a medida que caen los niveles de SRP1, de manera consistente con un cambio mediado por SRP1 de isoformas anti-angiogénicas a pro-angiogénicas.

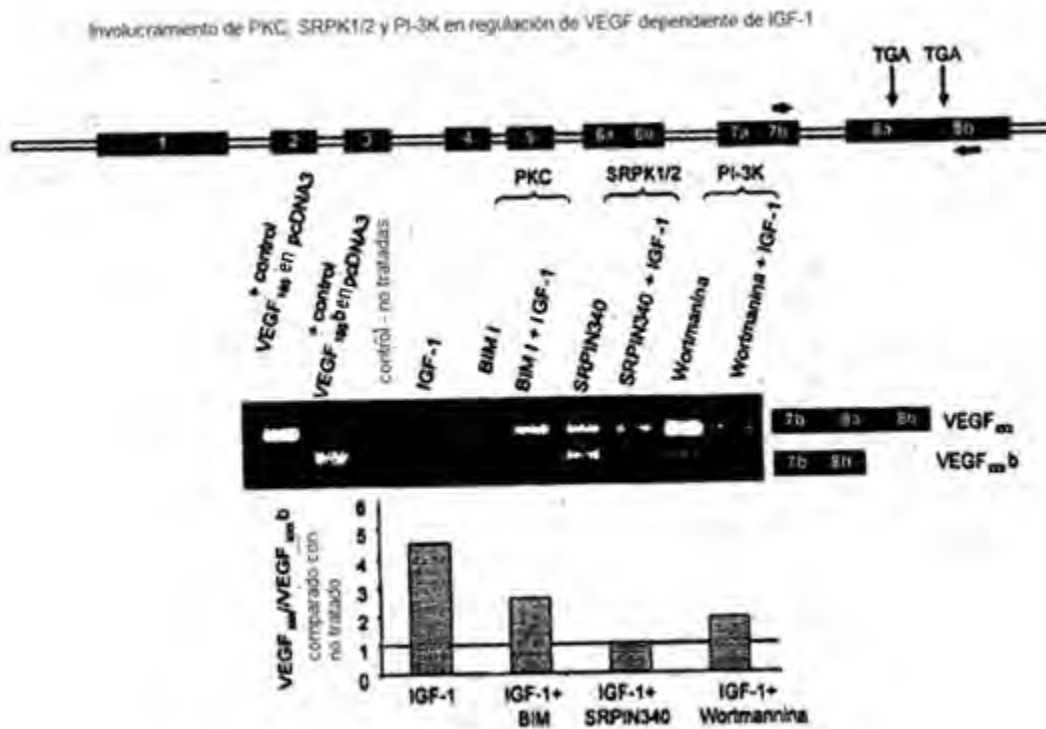


FIG. 12

Tratamiento de podocitos con IGF incrementa con empalme proximal como se evidencia por RT-PCR. Este incremento se inhibe por el inhibidor BIM de PKC y el inhibidor SRPIN340 de cinasa de proteína de SR

Involucramiento de PKC, SRPK1/2 y PI-3K en la regulación de VEGF dependiente de IGF-1

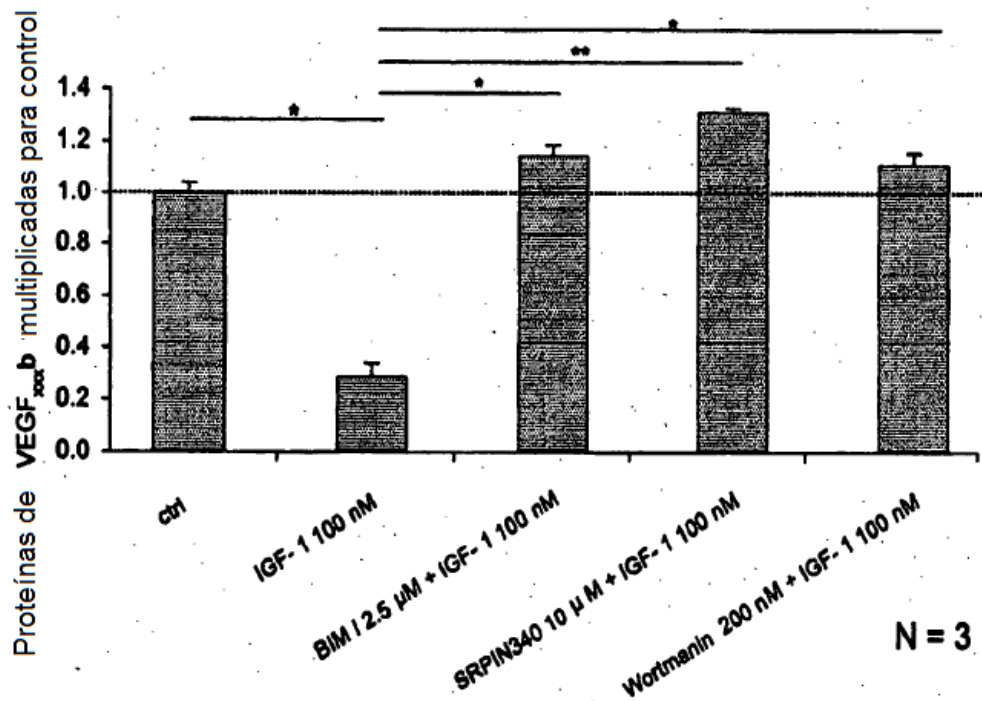


FIG. 13

Tratamiento de podocitos con IGF incrementa producción de proteínas codificadas por empalme proximal como se evidencia por ELISA. Este incremento se inhibe por el inhibidor BIM de PKC y el inhibidor de cinasa de proteína SR

SERPIN340. *P<0,05, **P<0,01 ANOVA de una vía, prueba de Tukey (ELISA)

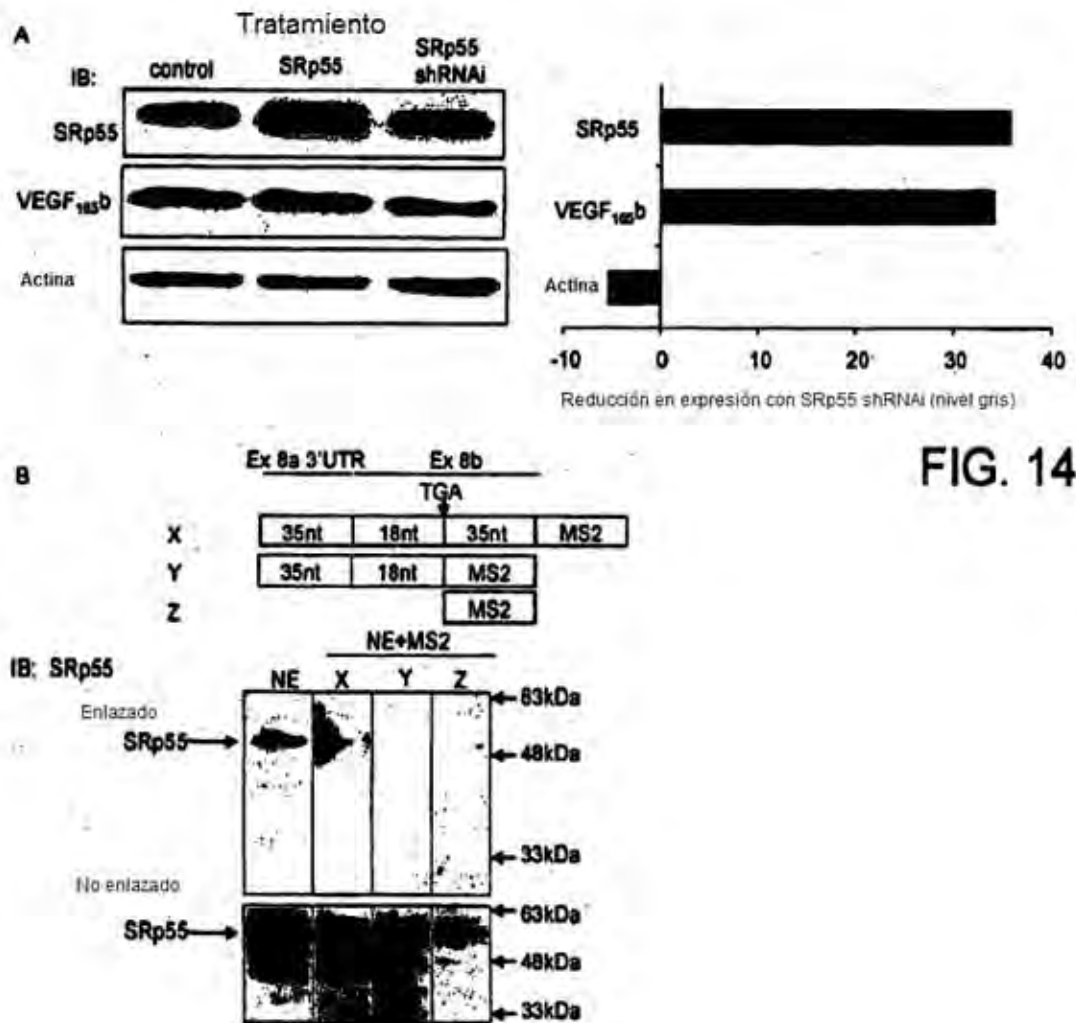


FIG. 14

SRp55 regula selección de sitio de empalme de VEGF en exón 8. A. podocitos fueron transfectados con SRp55 o ARN de horquilla corta para SRP55 y se extrajo proteína después de 48 horas. Immunoblotting mostró que la sobreexpresión incrementó SRp55, pero causó un incremento muy ligero en la expresión de VEGF_{165b}, mientras que siRNA para SARp55 disminuyó reguladamente tanto SRp55 como VEGF_{165b}. B. Ensayo de MS2-MBP para sitios de enlazamiento de ARN. Se generó ARN por transcripción in vitro de tres constructos que terminan con la secuencia de enlazamiento de ARN MS2 que contiene tres secuencias de reconocimiento para la proteína que enlaza maltosa (MBP). El constructo X contenía 88 nucleótidos alrededor de marco de lectura abierto de exón 8b, el constructo Y contenía una supresión de las 35 bp corriente abajo del codón de detención y Z contenía solo la secuencia de MS2. Estos ARNs se incubaron con extracto nuclear de células HEK293 y MS2 y se corrieron en una columna de maltosa. La maltosa enlaza a proteína de MS2-MBP. Las fracciones enlazadas y no enlazadas se recogieron y se sometieron a inmunoblot para SRp55. Una banda de 55 kDa fue vista en la fracción enlazada al ARN de constructo X, y en extracto nuclear fue corrida como un control positivo, pero no en otros constructos, lo que demostró que SRp55 se enlazó a la región de 35 bp corriente abajo del codón de parada en exón 8b. la fracción no enlazada contenía SRp55 en todas las muestras.

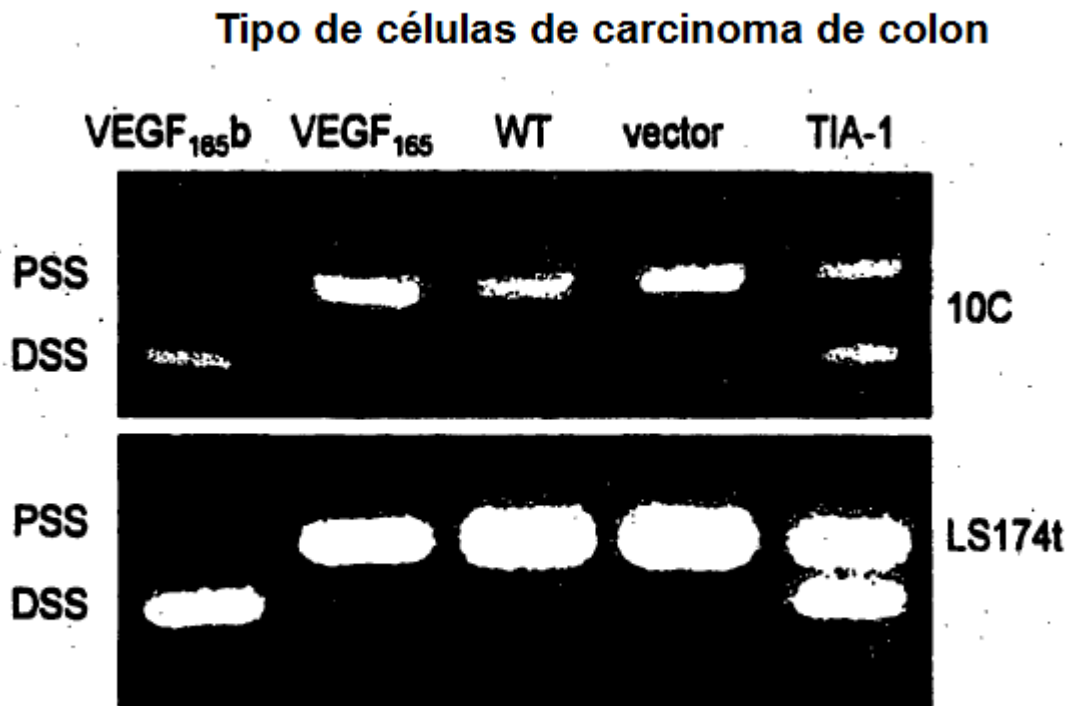
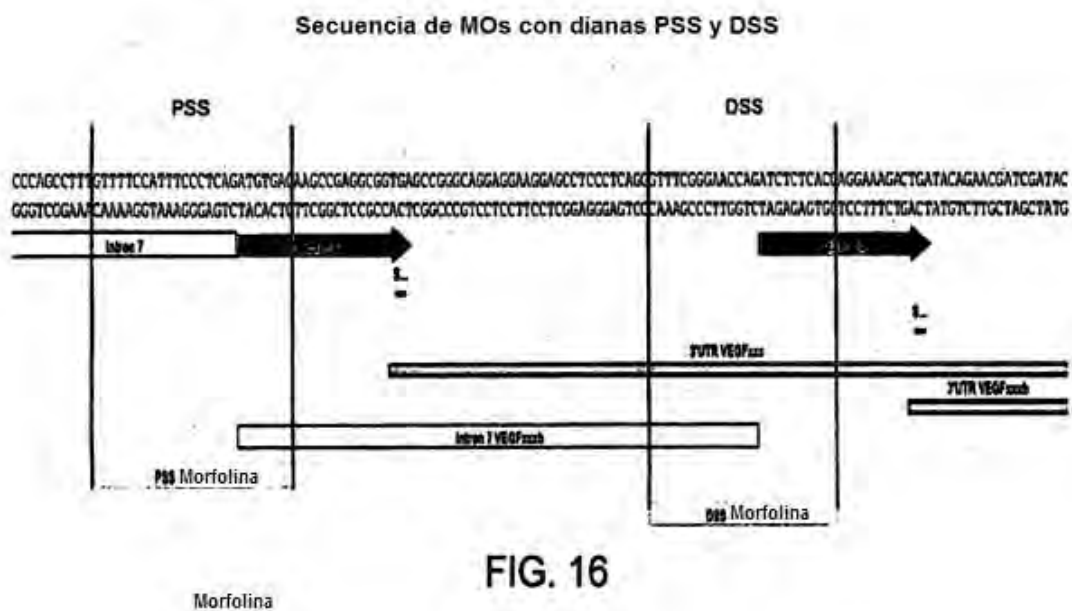


FIG. 15

TIA-1 (antígeno intercelular de células T -1) es un regulador de empalme de VEGF. Las células de carcinoma de colon (10C y LS174t) que normalmente expresan menos (10C) o poco VEGF_{165b} fueron transfectadas con vector vacío o ADNc de TIA-1. TIA-1 es una proteína que enlaza ARN mostrada previamente por Maryam la cual muta en 10C células. Se extrajo ARN y se sometió a PCR usando cebadores delanteros en exón 7 y cebadores opuestos en 3'UTR de ARNm de VEGF. La banda inferior es un resultado de selección de sitio de empalme distal (DSS) (que codifica VEGF_{165b}) y la banda superior de la selección de sitio de empalme proximal (VEGF₁₆₅). Esto indica que la activación de TIA-1 puede ser una estrategia terapéutica anti-angiogénica potencial.



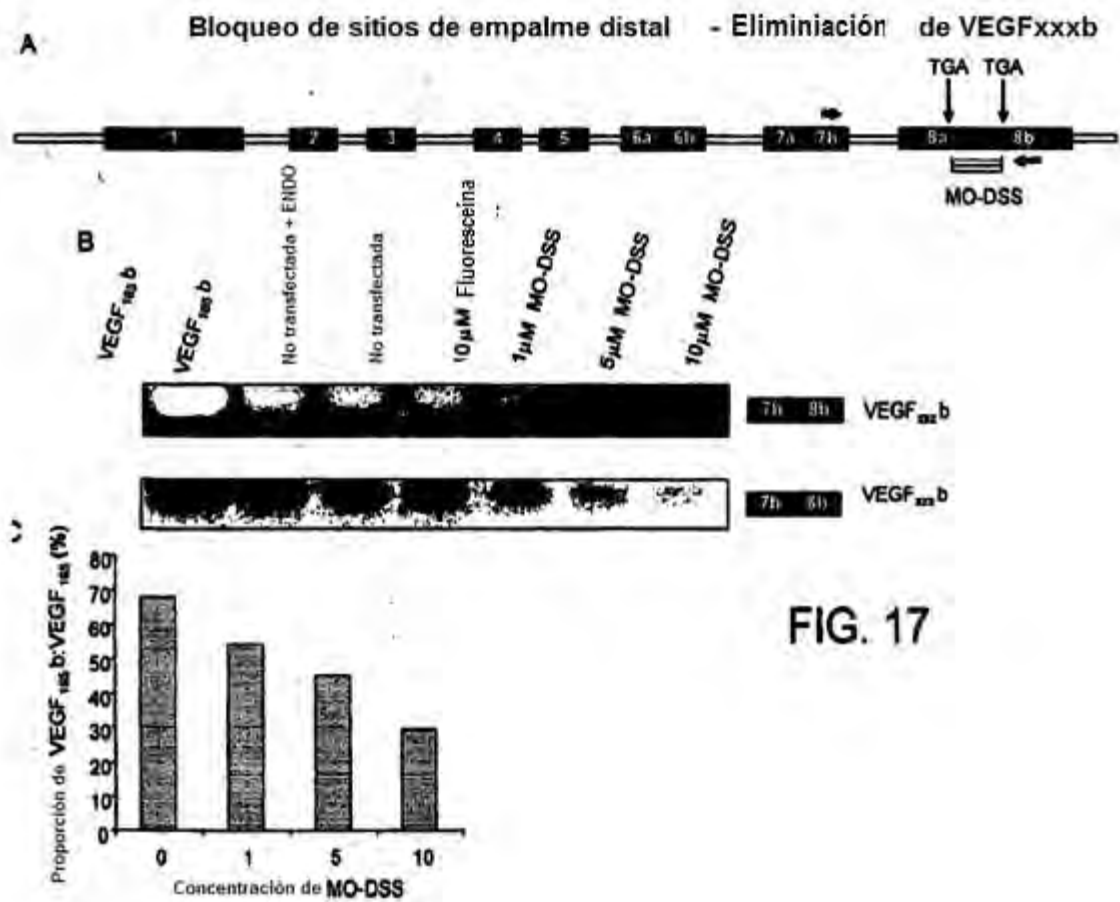


FIG. 17

Tratamiento con morfolino de células de HEK pueden dosificar de modo dependiente reducción de la proporción de VEGF₁₆₅b:VEGF₁₆₅ (%). A. Diagrama de secuencia que muestra localización de morfolino frente a sitio de empalme distal (MO-DSS). B. Reacción de RT-PCR que muestra efecto de incrementar concentración de MO-DSS. C. cuantificación de proporción de VEGF₁₆₅b:VEGF₁₆₅ mediante densitometría.

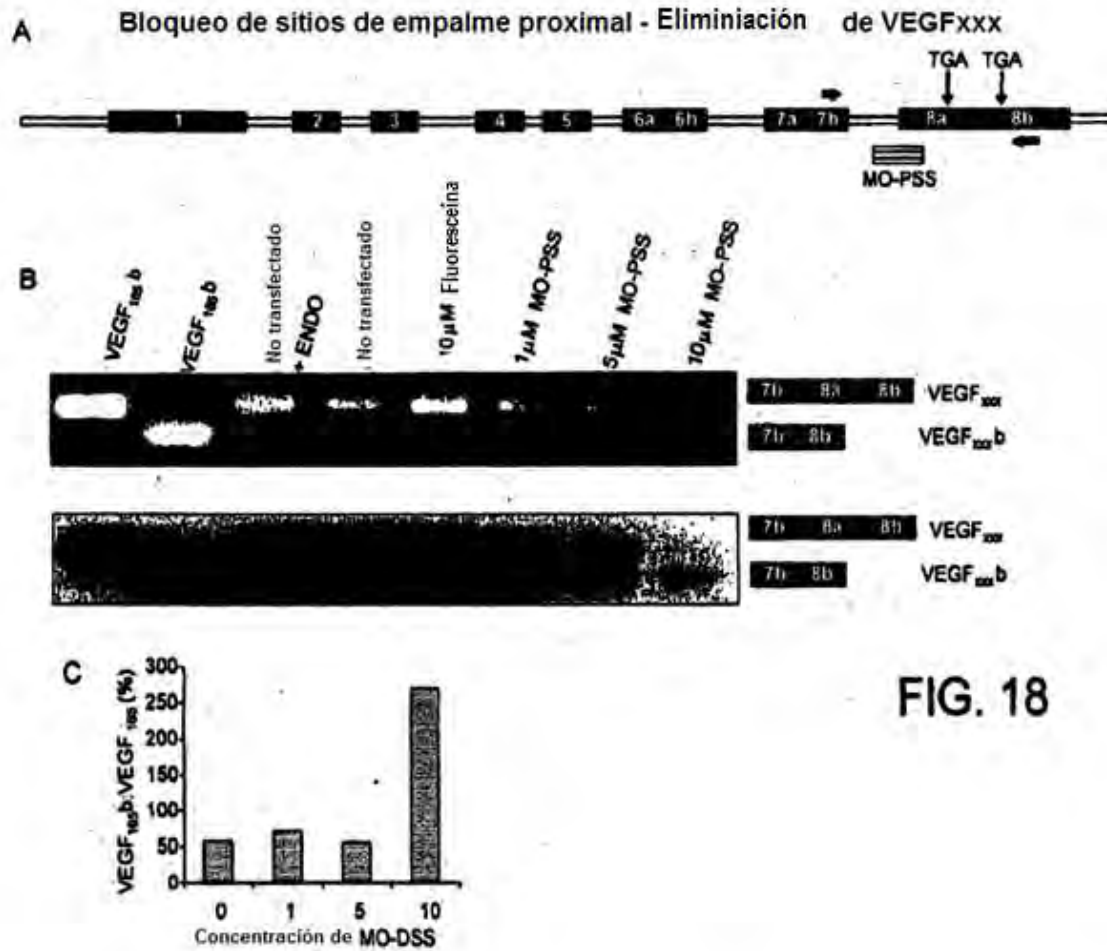


FIG. 18

Tratamiento con morfolino de células de HEK pueden dosificar de modo dependiente incremento de la proporción de VEGF_{165b}:VEGF₁₆₅ (%). A. Diagrama de secuencia que muestra localización de morfolino frente a sitio de empalme proximal (MO-PSS). B. Reacción de RT-PCR que muestra efecto de incrementar concentración de MO-PSS. C. cuantificación de proporción de VEGF_{165b}:VEGF₁₆₅ mediante densitometría.

