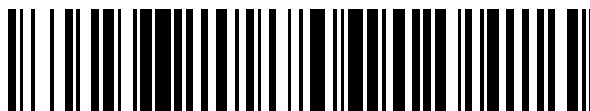


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 851**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2009 PCT/US2009/003047**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO2009139915**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2009 E 09747001 (7)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2285989**

54 Título: **Objetivos novedosos para la regulación de la angiogénesis**

30 Prioridad:

15.05.2008 US 53397 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, North Carolina 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**DEMORE, NANCY, KLAUBER;
PATTERSON, CAM;
BHATI, RAJENDRA y
BONE, BRADLEY, G.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 607 851 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

Objetivos novedosos para la regulación de la angiogénesis

Declaración de apoyo federal

5 Esta invención se hizo, en parte, con el apoyo gubernamental bajo los números de concesión P50-CA58223, 1 K08 CA098034-01A2 y CA009688 de los National Institutes of Health y W23RYX-3340-N609 del Departamento de Defensa. El gobierno de los Estados Unidos tiene derechos ciertos sobre esta invención.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la identificación de polinucleótidos y polipéptidos que tienen una expresión aumentada en vasos sanguíneos tumorales. La invención se refiere además al uso de los polinucleótidos y polipéptidos identificados, e inhibidores de los polinucleótidos y polipéptidos, en la regulación de la angiogénesis y el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como el cáncer.

Antecedentes de la invención

15 La angiogénesis es el crecimiento de nuevos vasos capilares y es un componente crítico del crecimiento de tumores sólidos (Folkman, N. Engl. J. Med. 285: 1182 (1971)). La terapia antiangiogénica dirigida para el cáncer de mama metastásico con bevacizumab, un anticuerpo monoclonal para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ha demostrado eficacia en pacientes con cáncer de mama metastásico (Miller, E2100 Study. Scientific session on monoclonal antibody therapy in breast cancer. Ann. Mtg. Am. Soc. Clin. Oncol. 8-29-2005) y validó la metodología de la terapia antiangiogénica para esta enfermedad. Aunque el VEGF es un factor crítico de crecimiento implicado en la angiogénesis del cáncer de mama (Schneider et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 4: 181 (2007)), una comprensión más
20 detallada de la selección de genes que se expresan en vasos tumorales de mama puede facilitar el desarrollo de novedosos agentes antiangiogénicos direccionados molecularmente.

Varios estudios han establecido pruebas que sugieren que los vasos sanguíneos que abastecen tumores expresan genes no compartidos por vasos sanguíneos que residen en tejidos normales (Buckanovich et al., J. Clin., Oncol. 25: 852 (2007), Madden et al., Am. J. Pathol. 165: 601 (2004), Parker et al., Cancer Res. 64: 7857 (2004), St. Croix et al., Science 259: 1197 (2000)). St. Croix et al. utilizaron una metodología de disociación tisular e inmunopurificación celular para aislar células tumorales y endoteliales normales y luego compararon patrones de expresión génica de células endoteliales derivadas de un cáncer colorrectal y mucosa colónica normal del mismo paciente (St. Croix et al., Science 259: 1197 (2000)). Usando el análisis en serie de la expresión génica, este análisis identificó 46 transcripciones, denominadas marcadores endoteliales tumorales (TEMs), que fueron significativamente
30 sobrerreguladas en el tumor en comparación con el endotelio normal. Utilizando un método similar, Parker et al., aislaron células endoteliales de dos tumores de mama humano y una mamoplastia de reducción normal e identificaron genes que se expresaron diferencialmente en comparación con el tejido mamario normal (Parker et al., Cancer Res. 64: 7857 (2004)). Este estudio identificó 30 genes vasculares del tumor de mama, de los cuales se confirmó que HEYL y PRL3 estaban localizados en el endotelio mediante hibridación in situ. Estos estudios también
35 han mostrado diferencias tumorales específicas en marcadores endoteliales tumorales entre tumores de colon, mama y cerebro. Buckanovich et al. subsecuentemente utilizaron la microdissección por captura láser de células vasculares de cáncer de ovario y ovarios normales y se identificaron 70 TEM expresados diferencialmente (Buckanovich y col., J. Clin Oncol. 25: 852 (2007)).

Los estudios de expresión génica que usan microarreglos de ADN han identificado varios subtipos distintos de
40 cáncer de mama (Perou et al., Nature 406: 747 (2000)) que diferencian los cánceres de mama en grupos separados que difieren marcadamente en el pronóstico (Sorlie et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 98: 10869 (2001)). Los subtipos intrínsecos incluyen 2 subtipos principales de tumores negativos de receptores de estrógenos (ER): Subtipo basal (ER negativo y Her2/neu negativo) y subtipo Her2/neu (Her2/neu positivo y ER negativo); y un ER positivo (subtipo luminal). Dado que los TEM difieren entre los tipos de tumor, y que los cánceres de mama son molecularmente
45 heterogéneos, es conveniente determinar si los TEM difieren dentro de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama.

Mirotsov et al. PNAS 104 (5): 1643-1648 (2007) discute el potencial de SFRP2 en el manejo de la lesión aguda del miocardio y divulga anticuerpos para SFRP2.

Deb et al. STEM CELLS 26 (1): 35-44 (2006) describe cómo SFRP2 inhibe la diferenciación cardiomiogénica y que el silenciamiento de SFRP2 aumenta la diferenciación cardiomiogénica.

En 2007, el inventor Klaber-DeMore planteó la hipótesis de que el uso de inhibidores de SFRP2 podría prevenir la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

- 5 La presente invención aborda inconvenientes previos en la técnica y la hipótesis de 2007 de Klaber-Demore proveyendo novedosos objetivos de angiogénesis que pueden usarse para métodos diagnósticos y terapéuticos.

Resumen de la invención

10 La presente invención se basa, en parte, en la identificación de polinucleótidos y polipéptidos que tienen una expresión incrementada en vasos sanguíneos en tumores y el papel que desempeñan en la angiogénesis. La invención se basa además en el uso de estos polinucleótidos y polipéptidos, e inhibidores de los mismos, en la regulación de la angiogénesis y en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

15 La invención según se reivindica provee el uso de un inhibidor de la expresión y/o actividad de SFRP2 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cáncer o metástasis, o para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada en un sujeto, en donde dicho inhibidor se une o se dirige a SFRP2 y es (i) un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o aptámero direccionado a SFRP2; o (ii) un oligonucleótido antisentido, oligonucleótido de triple hélice, ARNsi, miARN o ribozima direccionados a un ácido nucleico que codifica SFRP2.

20 La invención también provee un método para identificar un compuesto que regula la angiogénesis o es útil para la inhibición del crecimiento o metástasis tumoral, que comprende determinar la expresión y/o actividad de SFRP2 en una muestra en presencia y ausencia de un compuesto de prueba y que selecciona un compuesto que incrementa o disminuye el nivel de expresión y/o actividad de SFRP2 con respecto al nivel en ausencia del compuesto, como un compuesto que regula la angiogénesis o es útil para la inhibición del crecimiento tumoral o metástasis.

La invención provee todavía además un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que se une específicamente al SFRP2 humano en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste de aminoácidos

25 a. 202-220 (EITYINRDTKIILETKSKT-Cys (SEQ ID NO:6)), y

b. 270-295 (ITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQC (SEQ ID NO:7)); y

en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es para tratar o prevenir cáncer o metástasis, o para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada.

30 La invención provee además un inhibidor de la expresión y/o actividad de SFRP2 para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer o metástasis, o para tratar trastornos relacionados con la angiogénesis excesiva o no deseada en un sujeto, en donde dicho inhibidor se une o se dirige a SFRP2 y es (i) un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o aptámero dirigido a SFRP2; o (ii) un oligonucleótido antisentido, oligonucleótido de triple hélice, ARNsi, miARN o ribozima dirigidos a un ácido nucleico que codifica SFRP2.

35 Un aspecto de la divulgación se refiere a métodos para inhibir la angiogénesis en una célula, que comprende disminuir la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la célula.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a métodos para inhibir la angiogénesis en un tejido de un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el tejido del sujeto.

40 En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar trastornos relacionados con la angiogénesis excesiva o no deseada en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto.

La divulgación se refiere además a métodos para tratar o prevenir metástasis en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a métodos para reducir la tumorigenicidad en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en dicho sujeto.

5 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a métodos para inhibir la angiogénesis en un tejido de un sujeto, métodos para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada en un sujeto, métodos para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, métodos para tratar o prevenir metástasis en un sujeto, y/o métodos para reducir la tumorigenicidad en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una calcineurina o inhibidor de NF-ATc, por ejemplo, tacrolimus.

10 En cada uno de estos aspectos, el sujeto puede ser diagnosticado con cáncer, por ejemplo, cáncer de mama. En ciertos aspectos, la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos se reduce disminuyendo el nivel de un ácido nucleico que codifica el polipéptido (por ejemplo, con ARN antisentido, microARN o ARNsi), disminuyendo el nivel del propio polipéptido, o disminuyendo la actividad del polipéptido (por ejemplo, con un anticuerpo, aptámero o molécula pequeña que inhibe específicamente el propio polipéptido o una ruta de señalización corriente arriba o corriente abajo del polipéptido). En un aspecto, el uno o más polipéptidos se selecciona del grupo que consiste de SFRP2, JAK3 y FAP o combinaciones de los mismos. En otra realización, uno o más polipéptidos no incluyen SFRP2. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye JAK3. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye FAP.

20 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a métodos para incrementar la angiogénesis en una célula, que comprende incrementar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la célula. En ciertos aspectos, la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 se incrementa suministrando un ácido nucleico que codifica el polipéptido o el propio polipéptido a la célula.

25 Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para incrementar la angiogénesis en un tejido de un sujeto, que comprende incrementar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el tejido del sujeto. En ciertos aspectos, la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 se incrementa suministrando un ácido nucleico que codifica el polipéptido o el propio polipéptido al sujeto.

30 La divulgación se refiere además a métodos para diagnosticar cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o células) del sujeto y determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, en donde un incremento en la expresión y/o actividad en relación con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativo de cáncer. En un aspecto, se determina la expresión y/o actividad de al menos 2, 5, 10 o más de los polipéptidos listados. En ciertos aspectos, la expresión puede determinarse determinando el nivel de ácido nucleico que codifica el polipéptido o el propio polipéptido.

35 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a métodos para determinar el potencial de angiogénesis de un cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o células) del cáncer del sujeto y determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, en donde un incremento en la expresión y/o actividad en relación con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativo de un aumento del potencial de angiogénesis del cáncer.

40 La divulgación también se refiere a métodos para determinar el potencial metastásico de un cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o células) del cáncer del sujeto y determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 de la muestra, en donde un incremento de la expresión y/o actividad en relación con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativo de un potencial metastásico incrementado del cáncer.

45 Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para monitorizar la efectividad de un tratamiento para cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o células) de un sujeto que ha recibido tratamiento para cáncer, determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, y que comparan el nivel de expresión y/o actividad con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control, en donde una disminución en el nivel de expresión y/o actividad en la muestra con relación a la muestra de control es indicativa de la efectividad del tratamiento.

5 La divulgación se refiere además a métodos para monitorizar la progresión del cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o células) de un sujeto que tiene cáncer, que determinan la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, y que comparan el nivel de expresión y/o actividad con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control, en donde un incremento en el nivel de expresión y/o actividad en la muestra con relación a la muestra de control es indicativo de la progresión del cáncer.

10 La divulgación también se refiere a métodos para distinguir entre subtipos de cáncer de mama, que comprende obtener una muestra de cáncer de mama de un sujeto, que determinan la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra y que determinan el subtipo de cáncer con base en el patrón de expresión y/o actividad. En una realización, el método se utiliza para distinguir entre cánceres de mama ER negativos y ER positivos. En otro aspecto, el método se utiliza para distinguir entre los subtipos basales, subtipos Her2/neu y luminal.

15 La divulgación se refiere además a métodos para distinguir entre cánceres de mama in situ e invasivos, que comprende obtener una muestra de cáncer de mama de un sujeto, que determinan la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra y que determinan el tipo de cáncer con base en el patrón de expresión y/o actividad.

20 Adicionalmente, la divulgación se refiere a métodos para identificar un compuesto que regula la angiogénesis, que comprende determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en un ensayo basado en células o un ensayo no basado en células en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, y seleccionar un compuesto que incrementa o disminuye el nivel de expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos en relación con el nivel en ausencia del compuesto, como un compuesto que regula la angiogénesis.

25 Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para identificar un compuesto útil para la inhibición del crecimiento o metástasis tumoral, que comprende determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en un ensayo basado en células o en un ensayo no basado en células, en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, y seleccionar un compuesto que incrementa o disminuye el nivel de expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos con respecto al nivel en ausencia del compuesto, como un compuesto útil para Inhibición del crecimiento tumoral o metástasis.

30 La divulgación también se refiere a arreglos de ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos) o polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que comprenden ácidos nucleicos que codifican al menos dos polipéptidos listados en la Tabla 1, por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20 o más polipéptidos.

La divulgación se refiere además a moléculas que incrementan o disminuyen la expresión y/o la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1 o un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Las moléculas pueden ser, por ejemplo, ARN antisentido, ARNsi, aptámeros, anticuerpos, moléculas pequeñas y similares. En un aspecto, la divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas.

35 En otro aspecto, la divulgación se refiere a kits para establecer la angiogénesis, que comprenden un reactivo para determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a kits para diagnosticar cáncer, que comprenden un reactivo para determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1.

40 En otro aspecto, la divulgación se refiere a kits para determinar el potencial metastásico de un cáncer, que comprende un reactivo para determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1.

Estos y otros aspectos de la divulgación se exponen con más detalle en la descripción de la invención a continuación.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra la microdissección por captura láser de células vasculares mamarias humanas antes y después de la microdissección (400x).

La figura 2 muestra análisis de integridad de ARN. Los cebadores de RT-PCR para genes de niveles bajos y altos de abundancia se usaron en ADNc de "Montaje entero", que se refiere a una sección congelada de todo el tumor antes de la microdissección, y "LCM", que se refiere a la muestra de vasos microdisseccionados de una sección congelada de un tumor de mama humano. Línea 1, escalera de ADN; Línea 2, extremo 3' del gen del factor I de ribosilación de ADP expresado inferior (ARF F1) del "montaje completo" (239 pb); Línea 3, extremo 5' de ARF F1 desde el "Montaje entero" (336 pb); Línea 4, extremo 3' del gen cuidador GAPDH del "Montaje entero" (540 pb); Línea 5, extremo 5' de GAPDH del "montaje completo" (887 pb); Línea 6, extremo 3' de ARF F1 de las células del vaso microdisseccionadas; Línea 7, extremo 5' de ARF F1 a partir de las células del vaso microdisseccionadas; Línea 8, extremo 3' de GAPDH de las células del vaso microdisseccionadas; Línea 9, extremo 5' de GAPDH de las células del vaso microdisseccionadas.

La figura 3 muestra el análisis de la expresión génica que confirma la identidad vascular. Los arreglos para células de vasos LCM, líneas celulares endoteliales y líneas celulares derivadas de tumores de mama se ordenaron de izquierda a derecha. Los arreglos de células endoteliales cultivadas in vitro se marcan: célula endotelial dermalmicrovascular, célula endotelial de la vena umbilical, células endoteliales de la vena umbilical, célula del músculo liso aórtico. Los arreglos de líneas celulares derivadas de tumores de mama in vitro se marcan: T47D-1, T47D-2, MCF7, MDA-MB-365, MDA-MB-453, HCC1937-1, HCC1937-2. Los datos para diferentes conjuntos de genes fueron identificados y agrupados dentro de cada categoría relevante, que están en orden descendente: A) genes endoteliales, B) TEMs, C) genes hematopoyéticos, D) genes periciticos y E) genes epiteliales.

La figura 4 muestra la confirmación del origen vascular de los genes marcadores vasculares. Las imágenes se tomaron con una ampliación de 600x.

Las figuras 5A-5D muestran la expresión diferencial de proteínas de genes vasculares entre vasos de tumor de mama y vasos de mama normales.

La figura 6 muestra que SFRP2 induce angiogénesis en la membrana corioalantoide.

La figura 7 muestra que SFRP2 incrementa la migración de células endoteliales en un ensayo de rayado de heridas.

La figura 8 muestra que SFRP2 induce formación de tubo endotelial a las 8 horas de una manera dependiente de la concentración.

La figura 9 muestra que SFRP2 induce la angiogénesis en el ensayo de tapón de Matrigel de ratón.

La figura 10 muestra que SFRP2 inhibe la apoptosis inducida por hipoxia en células MEC.

La figura 11 muestra el perfil de expresión génica de células endoteliales tratadas con y sin SFRP2.

La figura 12 muestra el análisis de transferencia Western para la expresión nuclear y citoplásmica de β -catenina en células endoteliales de ratón tratadas con SFRP2.

La figura 13 muestra análisis de transferencia Western de fracciones nucleares de células MEC tratadas con y sin SFRP2 (700 pM) durante 1 hora.

La figura 14 muestra que el tacrolimus inhibe la formación de tubo de células endoteliales de ratón inducida por SFRP2 in vitro.

La figura 15 muestra que el tacrolimus invierte la formación de tubos de células endoteliales de ratón inducida por SFRP2 in vitro.

La figura 16 muestra que SFRP2 se incrementa en la línea celular de angiosarcoma SVR en comparación con las células endoteliales de ratón de control.

Las figuras. 17A - 17D muestran A) SFRP2 induce formación de tubos en células MEC; B) el tacrolimus inhibe la formación de tubos en células MEC inducidas por SFRP2; C) tacrolimus inhibe la formación de tubos en células de angiosarcoma de SVR; y D) la formación de tubo SVR es inhibida por un anticuerpo policlonal a SFRP2.

La figura 18 muestra que el tacrolimus inhibe la formación de tubos de células endoteliales de ratón inducida por SFRP2 en células 2H11 in vitro.

La figura 19 muestra que el tacrolimus inhibe la formación de tubos de células endoteliales de ratón inducida por VEGF en células 2H11 in vitro.

Las figuras. 20A - 20B muestran que un anticuerpo policlonal contra SFRP2 inhibe la formación de tubo SVR in vitro.

La figura 21 muestra que un RNAsi a SFRP2 inhibe la formación de tubo SVR in vitro.

5 La figura 22 muestra la actividad inhibidora de anticuerpos policlonales elevados contra diferentes epítomos de SFRP2. Se utilizaron sueros de ratones inmunizados contra secuencias peptídicas de SFRP2 (AbA, AbB, AbC, AbD, AbE) y sueros de control a una dilución de 1:100. Los anticuerpos para el péptido AbA, AbB, AbC y AbD todos inhibieron la formación de tubos, sin embargo AbB y AbC tenían la mayor inhibición. N = 4 para todos los grupos.

10 Las figuras. 23A-23C muestran que los anticuerpos monoclonales elevados contra SFRP2 inhiben la formación de tubos. A) Pozo de control representativo. B) Células de angiosarcoma tratadas con sobrenadante de un hibridoma que secreta anticuerpos que muestra inhibición de formación de tubo. C) Puntos de ramificación de células de angiosarcoma de control en comparación con los sobrenadantes de los 8 hibridomas seleccionados para subclonación adicional.

15 La figura 24 muestra que SFRP2 está sobreexpresado en suero de pacientes con cáncer. Las líneas C1-C3 son controles y las líneas P1-P6 son muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ($P < 0,0001$).

La figura 25 muestra que la proteína SFRP2 está presente en el endotelio en una amplia variedad de tipos de tumores por inmunohistoquímica. Las secciones embebidas en parafina de tumores humanos se tiñeron con un anticuerpo para SFRP2. Las imágenes se toman con una ampliación de 600 X.

20 La figura 26 muestra que tacrolimus inhibe el crecimiento de xenoinjertos de angiosarcoma de SVR en ratones lampiños. La imagen muestra un tumor de ratón de control representativo y un tumor de ratón tratado con tacrolimus representativo el día 19 del tratamiento.

La figura 27 muestra que el tacrolimus inhibe la tasa de crecimiento de los tumores de ratón transgénicos MMTV-neu ($n = 12$ tratados con tacrolimus, $n = 9$ sin tratamiento, $p = 0,04$).

25 La figura 28 muestra la capacidad de Jak3 para promover la angiogénesis in vivo utilizando un ensayo de membrana corioalantoide de pollo (CAM). Las gráficas muestran un análisis cuantitativo de los vasos que rodean el control versus a los discos tratados con Jak3. Las fotografías ilustran la angiogénesis en vasos que rodean los discos tratados con Jak3 versus los discos de control.

30 La figura 29 muestra las propiedades de migración de Jak3 en HCAEC usando un ensayo de herida por rayado. La gráfica muestra el análisis cuantitativo de la tasa de cierre de heridas en todos los pozos. Las fotografías ilustran el cierre relativo de la herida del control versus las células tratadas con Jak3 a las 28 horas.

La figura 30 muestra las propiedades de formación de tubos de Jak3 en HCAEC usando un ensayo de formación de tubos de células endoteliales. La gráfica muestra el análisis cuantitativo del número de puntos de ramificación en todos los pozos. Las fotografías ilustran la formación relativa de tubos en el control versus las células tratadas con Jak3.

35 La figura 31 muestra el efecto de Jak3 sobre la apoptosis inducida por hipoxia en HCAEC.

La figura 32 muestra la proliferación de HCAEC en presencia de Jak3.

40 La figura 33 muestra el papel de la activación de STAT3 en la formación de tubos mediada por Jak3 usando un pequeño inhibidor peptídico de STAT3 fosforilado (P-STAT3). La gráfica muestra el análisis cuantitativo del número de puntos de ramificación en todos los pozos. Las fotografías ilustran la formación relativa de tubos en células tratadas con Jak3 versus células tratadas con Jak3 + inhibidor P-STAT3.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se describirá ahora con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención.

5 Las secuencias de nucleótidos se presentan aquí por solamente una sola hebra, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, a menos que se indique específicamente otra cosa. Los nucleótidos y aminoácidos se representan aquí de la manera recomendada por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, o (para aminoácidos) por el código de una letra, o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37 C.F.R. § 1.822 y uso establecido.

10 Excepto que se indique otra cosa, los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para clonar genes, amplificar y detectar ácidos nucleicos, y similares. Tales técnicas son conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

I. Definiciones

Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el, ella" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

15 También, tal como se usa aquí, "y/o" se refiere a y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los ítems listados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

20 El término "consiste esencialmente de" (y variantes gramaticales), tal como se aplica a una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de esta invención, significa un polinucleótido o polipéptido que consiste tanto de la secuencia citada (por ejemplo, SEQ ID NO) como de un total de diez o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) nucleótidos o aminoácidos adicionales en los extremos 5' y/o 3' o terminal N y/o terminal C de la secuencia citada de tal manera que la función del polinucleótido o polipéptido no se altera materialmente. El total de diez o menos nucleótidos o aminoácidos adicionales incluye el número total de nucleótidos o aminoácidos adicionales en ambos extremos añadidos entre sí. El término "alterado materialmente", tal como se aplica a polinucleótidos de la invención, se refiere a un incremento o disminución en la capacidad para expresar el polipéptido codificado de al menos aproximadamente 50% o más en comparación con el nivel de expresión de un polinucleótido que consiste de la secuencia citada.

El término "regular", "regula" o "regulación" se refiere a la mejora (por ejemplo, un incremento) o inhibición (por ejemplo, una disminución) en el nivel o actividad especificada.

30 El término "mejorar" o "incrementar" se refiere a un incremento en el parámetro especificado de al menos aproximadamente 1,25 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, doce veces o incluso quince veces.

35 El término "inhibir" o "reducir" o variaciones gramaticales del mismo tal como se usa aquí se refiere a una reducción o disminución en el nivel o actividad especificada de al menos aproximadamente 15%, 25%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o más. En realizaciones particulares, la inhibición o reducción da como resultado una actividad pequeña o esencialmente no detectable (como máximo, una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de aproximadamente 10% o incluso 5%).

40 Una cantidad "terapéuticamente efectiva" tal como se utiliza aquí es una cantidad que provee alguna mejora o beneficio para el sujeto. Alternativamente indicado, una cantidad "terapéuticamente efectiva" es una cantidad que proveerá algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico en el sujeto (por ejemplo, en el caso de cáncer, reducción de la carga tumoral, prevención de crecimiento tumoral adicional, prevención de metástasis, o incremento del tiempo de supervivencia). Los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto.

45 Por los términos "trato", "tratar" o "tratamiento", se pretende que la gravedad de la condición del sujeto sea reducida o al menos parcialmente mejorada o modificada y que se consiga algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico.

La palabra "tumorigenicidad" se refiere principalmente al estatus tumoral de una célula o células (por ejemplo, el grado de la transformación neoplásica de una célula, la malignidad de una célula, la propensión de una célula para

5 formar un tumor y/o tener características de un tumor o simplemente la presencia o ausencia de células tumorales en un paciente o tejido/órgano), que es un reflejo de un cambio de una célula o población de células de un estado normal a maligno. La tumorigenicidad indica que las células tumorales están presentes en una muestra, y/o que la transformación de células de células normales a tumorales está en progreso, como puede ser confirmado por cualquier estándar de medición del desarrollo tumoral. El cambio involucra típicamente proliferación celular a una tasa que es más rápida que el crecimiento observado para las células normales bajo las mismas condiciones y que se caracteriza típicamente por uno o más de los siguientes rasgos: crecimiento continuo incluso después de que el factor instigante (por ejemplo, carcinógeno, virus) ya no está presente; una carencia de organización estructural y/o coordinación con tejido normal y, típicamente, una formación de una masa de tejido o tumor. Por lo tanto, un tumor se describe más generalmente como una proliferación de células (por ejemplo, una neoplasia, un crecimiento, un pólipo) resultante del crecimiento neoplásico y es más típicamente un tumor maligno. En el caso de una transformación neoplásica, una neoplasia es maligna o está predispuesta a ser maligna. Los tumores malignos se caracterizan típicamente por ser anaplásicos (crecimiento celular primitivo caracterizado por una carencia de diferenciación), invasivos (se desplaza hacia y destruye los tejidos circundantes) y/o metastásicos (se dispersan a otras partes del cuerpo).

La expresión "trastorno relacionado con la angiogénesis excesiva o no deseada", como se usa aquí, se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o condición en la que ocurre la angiogénesis no deseada. Ejemplos de tales trastornos incluyen, sin limitación, cáncer, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes, malformaciones vasculares, síndrome de DiGeorge, HHT, hemangioma cavernoso, aterosclerosis, arteriopatía de trasplante, obesidad, psoriasis, verrugas, dermatitis alérgica, queloides de cicatriz, granulomas piogénicos, enfermedad de formación de ampollas, sarcoma de Kaposi, síndrome vítreo hiperplásico persistente, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, neovascularización coroidea, hipertensión pulmonar primaria, asma, pólipos nasales, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad periodontal, ascitis, adherencias peritoneales, endometriosis, sangrado uterino, quistes ováricos, hiperestimulación ovárica, embarazo ectópico, artritis, sinovitis, osteomielitis y/o formación de osteofitos.

El término "cáncer", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier crecimiento anormal de células, benigno o maligno. Ejemplos incluyen, sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de colon, melanoma, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, carcinoma de cerebro primario, cáncer de cabeza-cuello, glioma, glioblastoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de cabeza o cuello, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumor de Wilms, carcinoma cervical, carcinoma testicular, carcinoma de vejiga, carcinoma de páncreas, carcinoma de estómago, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma prostático, carcinoma genitourinario, carcinoma de tiroides, carcinoma esofágico, mieloma, mieloma múltiple, carcinoma adrenal, carcinoma de células renales, carcinoma endometrial, carcinoma de la corteza suprarrenal, insulinooma pancreático maligno, carcinoma carcinoide maligno, coriocarcinoma, micosis fungoides, hipercalcemia maligna, hiperplasia cervical, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia de células pilosas, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, policitemia vera, trombocitosis esencial, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de tejidos suaves, sarcoma osteogénico, macroglobulinemia primaria y retinoblastoma. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo de cánceres que forman tumores.

El término "cáncer de mama", como se usa aquí, se refiere a un cáncer que comienza en las células de la mama de un sujeto. El término incluye cánceres invasivos e in situ, y abarca todos los subtipos de cáncer de mama, incluyendo el subtipo basal (ER negativo y Her2/neu negativo), subtipo Her2/neu (Her2/neu positivo y ER negativo); y subtipo luminal (ER positivo).

El término "muestra de control", tal como se utiliza aquí, se refiere a una muestra de tejido o célula que se utiliza para comparar el nivel de expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de interés. La muestra de control puede ser, por ejemplo, de una porción normal (es decir, no enferma) del mismo tipo de tejido o célula en el sujeto, de un tipo de tejido o célula diferente en el sujeto, de un individuo emparejado o puede ser un estándar derivado del promedio de mediciones tomadas de una población de sujetos. En otra realización, la muestra de control puede ser del tejido de la enfermedad del sujeto, por ejemplo, en el momento del diagnóstico, antes del tratamiento, o después de una etapa de tratamiento.

Como se usa aquí, se usan indistintamente "ácido nucleico", "secuencia nucleotídica" y "polinucleótido" y abarcan tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, ARNm, ADN o ARN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente) y quimeras de ARN Y ADN. El término polinucleótido, secuencia de nucleótidos o ácido nucleico se refiere a una cadena de nucleótidos sin tener en cuenta la longitud de la cadena. El ácido nucleico puede ser de cadena doble o monocatenario. Cuando es monocatenario, el ácido nucleico puede ser una cadena en sentido o una cadena antisentido. El ácido nucleico se puede sintetizar usando análogos o derivados de oligonucleótidos (por ejemplo, nucleósidos de inosina o fosforotioato). Tales oligonucleótidos pueden usarse, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades de apareamiento de bases alteradas o resistencia incrementada a nucleasas. La presente invención provee además un ácido nucleico que es el complemento (que puede ser un complemento completo o un complemento parcial) de un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polinucleótidos de esta invención.

Un "polinucleótido aislado" es una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN) que no es inmediatamente contigua con secuencias de nucleótidos con las que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del cual se deriva. Por tanto, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas o todas las secuencias 5' no codificantes (por ejemplo, promotoras) que son inmediatamente contiguas a una secuencia codificante. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción), independientemente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un ácido nucleico híbrido que codifica un polipéptido o secuencia peptídica adicional. Un polinucleótido aislado que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye tal gen, sino que más bien incluye la región codificadora y regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no se encuentran naturalmente genes adicionales en el cromosoma.

El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polipéptido que es sustancialmente libre de material celular, material viral y/o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando es sintetizado químicamente). Por otra parte, un "fragmento aislado" es un fragmento de un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polipéptidos que no se produce naturalmente como un fragmento y no se encontraría en el estado natural. "Aislado" no significa que la preparación sea técnicamente pura (homogénea), pero es suficientemente pura para proveer el polipéptido o ácido nucleico en una forma en la que pueda usarse para el propósito previsto.

Una célula aislada se refiere a una célula que está separada de otros componentes con los que está normalmente asociada en su estado natural. Por ejemplo, una célula aislada puede ser una célula en medio de cultivo y/o una célula en un vehículo farmacéuticamente aceptable de esta invención. Así, una célula aislada puede ser suministrada a y/o introducida en un sujeto. En algunas realizaciones, una célula aislada puede ser una célula que se elimina de un sujeto y se manipula como se describe aquí ex vivo y luego se devuelve al sujeto.

El término "fragmento", tal como se aplica a un polinucleótido, se entenderá que significa una secuencia de nucleótidos de longitud reducida con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos o nucleótidos o nucleótidos de referencia y que comprende, que consiste esencialmente de, y/o que consiste de una secuencia de nucleótidos de nucleótidos contiguos idénticos o casi idénticos (por ejemplo, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% idénticos) a la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico de referencia. Tal fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser, cuando sea apropiado, incluido en un polinucleótido mayor del que es un constituyente. En algunas realizaciones, tales fragmentos pueden comprender, consisten esencialmente de, y/o consisten de oligonucleótidos que tienen una longitud de al menos aproximadamente 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, o más nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico o nucleótido de acuerdo con la invención.

El término "fragmento", tal como se aplica a un polipéptido, se entenderá que significa una secuencia de aminoácidos de longitud reducida con respecto a un polipéptido de referencia o una secuencia de aminoácidos y que comprende, que consiste esencialmente de, y/o que consiste de una secuencia de aminoácidos de aminoácidos contiguos idénticos o casi idénticos (por ejemplo, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% idénticos) al polipéptido de referencia o secuencia de aminoácidos. Tal fragmento de polipéptido de acuerdo con la invención puede ser, cuando sea apropiado, incluido en un polipéptido mayor del cual es un constituyente. En algunas realizaciones, tales fragmentos pueden comprender, consisten esencialmente de, y/o consisten de péptidos que tienen una longitud de al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, o más aminoácidos consecutivos de un polipéptido o secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención.

Un "vector" es cualquier molécula de ácido nucleico para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula. Un vector puede ser un replicón al que se puede unir otra secuencia de nucleótidos para permitir la replicación de la secuencia de nucleótidos unida. Un "replicón" puede ser cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, genoma viral) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ácido nucleico in vivo, es decir, capaz de replicarse bajo su propio control. El término "vector" incluye moléculas de ácido nucleico virales y no virales (por ejemplo, plásmido) para introducir un ácido nucleico en una célula in vitro, ex vivo y/o in vivo. Se puede utilizar un gran número de vectores conocidos en la técnica para manipular ácidos nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores en genes, etc. Por ejemplo, puede realizarse la inserción de los fragmentos de ácido nucleico correspondientes a elementos de respuesta y promotores en un vector adecuado ligando los fragmentos de ácido nucleico apropiados en un vector elegido que tenga terminales cohesivos complementarios. Alternativamente, los extremos de las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificados enzimáticamente o cualquier sitio puede ser producido ligando secuencias de nucleótidos (enlazantes) a los terminales de ácido nucleico. Tales vectores pueden ser modificados genéticamente para que contengan secuencias que codifiquen marcadores seleccionables que proveen la selección de células que contienen el vector y/o han incorporado el ácido nucleico del vector en el genoma celular. Tales marcadores permiten la identificación y/o selección de células huésped que incorporan y expresan las proteínas codificadas por el marcador. Un vector "recombinante" se refiere a un vector viral o no viral que comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogos (es decir, transgenes), por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de nucleótidos heterólogos.

Los vectores virales se han usado en una amplia variedad de aplicaciones de suministro génico en células, así como en sujetos animales vivos. Los vectores víricos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, lentivirus, virus adeno-asociados, poxvirus, alfavirus, baculovirus, virus de la vacuna, virus del herpes, virus de Epstein-Barr y vectores de adenovirus. Los vectores no víricos incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos ácido nucleico-proteína y biopolímeros. Además de un ácido nucleico de interés, un vector puede comprender también una o más regiones reguladoras y/o marcadores seleccionables útiles para seleccionar, medir y monitorizar los resultados de transferencia de ácidos nucleicos (suministro a tejidos específicos, duración de la expresión, etc.).

Los vectores pueden introducirse en las células deseadas por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosoma), uso de una pistola genética o un transportador de vectores de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Wu et al., J. Biol. Chem. 267: 963 (1992), Wu et al., J. Biol. Chem. 263: 14621 (1988) y Hartmut et al. Solicitud de Patente Canadiense No. 2,012,311, presentada el 15 de Marzo de 1990).

En algunos aspectos, un polinucleótido de esta divulgación puede ser suministrado a una célula in vivo por lipofección. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y los peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas pueden usarse para preparar liposomas para la transfección in vivo de una secuencia de nucleótidos de esta divulgación (Feigner et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987), Mackey et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 8027 (1988) y Ulmer et al., Science 259: 1745 (1993)). El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente y también promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner et al., Science 337: 387 (1989)). Compuestos lipídicos particularmente útiles y composiciones para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en las Publicaciones de Patentes Internacionales WO95/18863 y WO96/17823, y en la Patente de Estados Unidos No. 5,459,127. El uso de la lipofección para introducir secuencias de nucleótidos exógenas en órganos específicos in vivo tiene ciertas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Es claro que dirigir la transfección a tipos celulares particulares sería particularmente preferido en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden estar acoplados químicamente a otras moléculas con el fin de direccionar (Mackey, et al., 1988, supra). Los péptidos direccionados, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no pépticas pueden acoplarse químicamente a los liposomas.

En diversos aspectos, pueden usarse otras moléculas para facilitar el suministro de un ácido nucleico in vivo, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de enlazamiento a ácidos nucleicos (por ejemplo, WO96/25508), y/o un polímero catiónico (por ejemplo, WO95/21931).

También es posible introducir un vector in vivo como ácido nucleico lampiño (véanse las patentes de los Estados Unidos números 5,693,622, 5,589,466 y 5,580,859). También pueden usarse enfoques de suministro de ácido

nucleico mediados por receptores (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3: 147 (1992), Wu et al., J. Biol. Chem. 262: 4429 (1987)).

5 El término transfección o transducción significa la captación de ácido nucleico exógeno o heterólogo (ARN y/o ADN) por una célula. Una célula ha sido "transfectada" o "transducida" con un ácido nucleico exógeno o heterólogo cuando tal ácido nucleico ha sido introducido o suministrado dentro de la célula. Una célula ha sido "transformada" por ácido nucleico exógeno o heterólogo cuando el ácido nucleico transfectado o transducido imparte un cambio fenotípico en la célula y/o un cambio en una actividad o función de la célula. El ácido nucleico transformante puede integrarse (enlazado covalentemente) al ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula o puede estar presente como un plásmido estable.

10 Como se usa aquí, los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente y abarcan tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique otra cosa.

15 Una "proteína de fusión" es un polipéptido producido cuando dos secuencias nucleotídicas heterólogas o sus fragmentos que codifican dos (o más) polipéptidos diferentes no encontrados fusionados juntos en la naturaleza se fusionan juntos en el marco de lectura de traducción correcto. Los polipéptidos de fusión ilustrativos incluyen fusiones de un polipéptido de la invención (o un fragmento del mismo) a toda o una parte de glutatión-S-transferasa, proteína de enlazamiento a maltosa, o una proteína informadfora (por ejemplo, Proteína Fluorescente Verde, β -glucuronidase, B-galactosidasa, luciferasa, etc.), hemaglutinina, c-myc, epítopo FLAG, etc.

20 Como se usa aquí, un polipéptido "funcional" o "fragmento funcional" es aquel que sustancialmente retiene al menos una actividad biológica normalmente asociada con ese polipéptido (por ejemplo, actividad angiogénica, enlazante a proteína, enlazamiento de ligando o receptor). En realizaciones particulares, el polipéptido "funcional" o "fragmento funcional" retiene sustancialmente todas las actividades poseídas por el péptido no modificado. Por "sustancialmente retiene" actividad biológica, se entiende que el polipéptido retiene al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más de la actividad biológica del polipéptido nativo (e incluso puede tener un nivel de actividad más alto que el polipéptido nativo). Un polipéptido "no funcional" es aquel que presenta poca o esencialmente ninguna actividad biológica detectable normalmente asociada con el polipéptido (por ejemplo, como máximo, sólo una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de aproximadamente 10% o incluso 5%). Las actividades biológicas tales como el enlazamiento a proteínas y la actividad angiogénica se pueden medir usando ensayos que son bien conocidos en la técnica y como se describen aquí.

30 Por el término "expresar" o "expresión" de una secuencia codificadora de polinucleótido, se entiende que la secuencia se transcribe y, opcionalmente, se traduce. Típicamente, de acuerdo con la presente invención, la expresión de una secuencia codificante de la invención dará como resultado la producción del polipéptido de la invención. El polipéptido o fragmento completo expresado también puede funcionar en células intactas sin purificación.

35 El término "aproximadamente", tal como se utiliza aquí cuando se hace referencia a un valor medible, tal como una cantidad de polipéptido, dosis, tiempo, temperatura, actividad enzimática u otra actividad biológica y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

II. Polinucleótidos y polipéptidos no regulados en células tumorales de vasos sanguíneos

40 Los inventores han identificado y caracterizado polipéptidos, y polinucleótidos que codifican los polipéptidos, que están significativamente sobre regulados en células de vasos sanguíneos tumorales en comparación con vasos sanguíneos no tumorales. La Tabla 1 lista 55 polinucleótidos que están sobre regulados al menos cuatro veces en células asociadas con vasos sanguíneos de tumor de mama. Cada uno de estos polinucleótidos y polipéptidos sobre regulados representa un objetivo útil para el estudio de la angiogénesis, formación de tumores, crecimiento y metástasis. Además, estos objetivos son útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la angiogénesis, por ejemplo, cáncer, isquemia, etc. Adicionalmente, estos objetivos pueden usarse para seleccionar agentes que pueden usarse para diagnosticar y tratar enfermedades relacionadas con la angiogénesis y trastornos.

Tabla 1. Genes sobre regulados en células del vaso tumoral con más de cuatro repeticiones

ES 2 607 851 T3

Símbolo del Gen	No. de Accvesso GenBank.	Nombre del Gen	Repeticiones
NAT1	NM_000662	N-acetiltransferasa 1 (arilamina N-acetiltransferasa)	17.6
DHRS2	NM_005794	Miembro 2 de Deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)	11.9
IF127	NM_005532	Interferón, proteína 27 alfa-inducible	11.7
S100A8	NM_002964 VVGYO'+	S100A8 S100 Proteína de unión al calcio A8 (calgranulina A)	11.7
MTL5	NM_004923	MTL5 5 similar a Metalotioneina, específico para los testículos (tesmin)	10.9
FAP	NM_004460	FAP Proteína de activación de fibroblastos	10.7
IFI27	NM_005532	Interferón, proteína 27 alfa-inducible	10.1
UNG2	NM_021147	Uracilo-ADN glicosilasa 2	9.0
		THC1546313	8.9
APXL2	AB075840	Proteína Apical 2	8.8
MGC16121	NM_032762	Proteína Hipotética MGC16121	8.7
MMP1	NM_002421	metaloproteinasas 1 de matriz (colagenasa intersticial)	8.1
MMP11	NM_005940	metaloproteinasas 11 de Matriz (estromelina 3)	8.1
SULF1	NM_015170	Sulfatasa 1	7.9
SLITRK6	NM_032229	SLIT y familia similar a NTRK, miembro 6	7.6
LTB	NM_002341	Linfotoxina beta (superfamilia TNF, miembro 3)	7.3
INHBA	NM_002192	Inhibina, beta A (activina A, activin AB polipéptido alfa)	7.2
		THC1598071	6.6
PREX1	NM_020820	Fosfatidilinositol intercombinador 1 de RAC dependiente de 3,4,5-trisfosfato	6.4
CHST8	NM_022467	Carbohidrati (N-acetilgalactosamina 4-0) sulfotransferasa 8	6.4
SFRP2	AF311912	Proteína 2 relacionada con frizzled secretada	6.3
SMPD3	NM_024703	Esfingomielina fosfodiesterasa 3, membrana neutra	6.3
KAZALD1	AF333487	Dominio 1 inhibidor de la serina peptidasa tipo Kazal	6.2
FGFR3	NM_000142	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos	6.2
SPOCD1	NM_144569	SPOC dominio que contiene	6.1
IRF7	NM_004030	Factor 7 regulador de Interferón	5.9
COL1A2	NM_000089	Colágeno, tipo I, alfa 2	5.8
CD19	NM_001770	Antígeno CD 19	5.7
BF	NM_001710	B-factor, properdina	5.6
SQLE	NM_003129	Escualeno epoxidasa	5.6
HOXB6	NM_156036	Homeo box B6	5.6
MLPH	NM_024101	Melanofilina	5.2
DKFZp434E2321	NM_207310	Proteína hipotética DKFZp434E2321	5.2
HTRA3	NM_053044	HtrA serina peptidasa 3	5.1

T3JAM	NM_025228	Modulador que activa Jun N-terminal quinasa (JNK) que interactúa con TRAF3	4.9
ASCL2	NM_005170	2 como complejo Achaete-scute 2 (Drosophila)	4.9
		I_960623	4.7
HSPB1	NM_001540	Choque térmico 27kDa proteína 1	4.6
COL12A1	NM_004370	Colágeno, tipo XII, alfa 1	4.6
HOXB2	NM_002145	Homeo box B2	4.6
HIG2	NM_013332	Proteína 2 inducible por Hipoxia 2	4.6
FLJ00332	BC036873	Proteína FLJ00332	4.6
JAK3	BC028068	Janus quinasa 3 (una proteína tirosina quinasa, leucocito)	4.5
S100P	NM_005980	S100 Proteína P de unión al calcio	4.5
RAMP1	NM_005855	Proteína 1 modificadora de la actividad del receptor (calcitonina)	4.4
COL5A1	NM_000093	Colágeno, tipo V, alfa 1	4.4
CENPF	NM_016343	Centromero proteína F, 350/400ka (mitosina)	4.3
DOK3	BC004867	Proteína 3 de acoplamiento	4.2
	AA516420	AA516420	4.2
NID2	NM_007361	Nidogen 2 (osteonidogen)	4.2
		I_1000437	4.1
FGD3	NM_033086	Familia FGD1, miembro 3	4.1
	AK098833	Gen hipotético apoyado por AK098833	4.1
AEBP1	NM_001129	AE proteína 1 de unión	4.0
		A_23_BS21882	4.0

III. Inhibición de la angiogenesis

De acuerdo con lo anterior, como un aspecto, la divulgación provee métodos para inhibir la angiogenesis en una célula, que comprende disminuir la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la célula.

En otro aspecto, la divulgación provee métodos para inhibir la angiogenesis en un tejido de un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el tejido del sujeto.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto.

La divulgación se refiere además a métodos para tratar o prevenir metástasis en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a métodos para reducir la tumorigenicidad en un sujeto, que comprende disminuir la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto.

La divulgación se refiere además a métodos para regular la fertilidad en un sujeto femenino (por ejemplo, prevenir la concepción o finalizar un embarazo), que comprende disminuir la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el sujeto (véase Patente de EE.UU. 6,017,949).

En un aspecto de cada uno de estos aspectos, el sujeto puede ser uno que ha sido diagnosticado con cáncer, por ejemplo, cáncer de mama. En otro aspecto, el sujeto puede ser uno que está en riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, predispuesto debido a factores hereditarios, fumar, infección viral, exposición a productos químicos, etc.). En otro aspecto, el sujeto puede ser uno que ha sido diagnosticado con otra enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis excesiva o anormal, por ejemplo, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes, malformaciones vasculares, síndrome de DiGeorge, HHT, hemangioma cavernoso, aterosclerosis, arteriopatía de trasplante, obesidad, psoriasis, verrugas, dermatitis alérgica, queloides cicatrizales, granulomas piogénicos, enfermedad de formación de ampollas, sarcoma de Kaposi, síndrome vítreo hiperplásico persistente, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, neovascularización coroidea, hipertensión pulmonar primaria, asma, pólipos nasales, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad periodontal, ascitis, adhesiones peritoneales, endometriosis, hemorragia uterina, quistes ováricos, hiperestimulación ovárica, artritis, sinovitis, osteomielitis y/o formación de osteofitos.

En un aspecto, la expresión y/o la actividad de 2, 3, 4, 5 o más de los polipéptidos listados en la Tabla 1 pueden disminuir. Puede inhibirse cualquier polipéptido individual o combinación de polipéptidos en la lista. Se contempla además que uno cualquiera o más polipéptidos listados en la Tabla 1 pueden excluirse de los métodos, por ejemplo, el método se puede practicar con cualquier polipéptido listado excepto SFRP2. En un aspecto, los polipéptidos se seleccionan del grupo que consiste de SFRP2, JAK3, y FAP, o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye SFRP2. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye JAK3. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye FAP.

En un aspecto de la divulgación, la disminución de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende disminuir el nivel de un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica el polipéptido o el nivel de expresión del polipéptido desde el nucleico ácido. Se conocen numerosos métodos para reducir el nivel y/o la expresión de polinucleótidos in vitro o in vivo. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos codificantes y no codificantes para los polipéptidos listados en la Tabla 1 son conocidas por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles en bases de datos de secuencias tales como GenBank. Una secuencia de nucleótidos antisentido o ácido nucleico que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido se puede generar por cualquier porción de la misma de acuerdo con técnicas conocidas.

El término "secuencia de nucleótidos antisentido" o de "oligonucleótido antisentido" tal como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de ADN o ARN especificada. Los oligonucleótidos antisentido y los ácidos nucleicos que expresan los mismos pueden hacerse de acuerdo con técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,023,243 de Tullis; La Patente de Estados Unidos No. 5,149,797 de Pederson et al. La secuencia de nucleótidos antisentido puede ser complementaria a toda la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o una porción de la misma de al menos 10, 20, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300 o 500 bases contiguas y reducirá el nivel de producción de polipéptidos.

Los expertos en la técnica apreciarán que no es necesario que la secuencia de nucleótidos antisentido sea totalmente complementaria a la secuencia objetivo mientras el grado de similitud de secuencia sea suficiente para que la secuencia de nucleótidos antisentido se hibride con su objetivo y reduzca la producción del polipéptido. Como es conocido en la técnica, en general se requiere un mayor grado de similitud de secuencia para secuencias de nucleótidos antisentido cortas, mientras que un mayor grado de bases no coincidentes será tolerado por secuencias de nucleótidos antisentido más largas.

Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias de nucleótidos puede llevarse a cabo bajo condiciones de rigurosidad reducida, rigurosidad media o incluso condiciones rigurosas (por ejemplo, condiciones representadas por una rigidez de lavado de 35-40% de formamida con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 1x SSPE a 37°C, condiciones representadas por una rigidez al lavado de 40-45% de formamida con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 1x SSPE a 42°C y/o condiciones representadas por una rigidez al lavado de formamida al 50% con 5x Denhardt, SDS al 0,5% y 1 x SSPE a 42°C, respectivamente) para las secuencias de nucleótidos específicamente descritas aquí. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989).

En otros aspectos, las secuencias de nucleótidos antisentido de la invención tienen una similitud de secuencia de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% o más con el complemento de las secuencias codificantes específicamente descritas aquí y reducirán el nivel de la producción de polipéptidos.

En otros aspectos, la secuencia de nucleótidos antisentido puede dirigirse contra cualquier secuencia de codificación, cuyo silenciamiento da como resultado una modulación de un polipéptido listado en la Tabla 1.

La longitud de la secuencia de nucleótidos antisentido (es decir, el número de nucleótidos en la misma) no es crítica a condición de que se una selectivamente a la localización deseada y reduzca la transcripción y/o traducción de la secuencia objetivo y se puede determinar de acuerdo con procedimientos de rutina. En general, la secuencia de nucleótidos antisentido tendrá una longitud de aproximadamente ocho, diez o doce nucleótidos hasta aproximadamente 20, 30, 50, 75 o 100 nucleótidos o más de longitud.

Una secuencia de nucleótidos antisentido se puede construir usando síntesis química y reacciones de ligación enzimática por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos antisentido puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o diversos nucleótidos modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre las secuencias de nucleótidos antisentido y en sentido, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar la secuencia de nucleótidos antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2 metilguanina, 3 metilcitosina, 5 metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5- metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil éster del ácido uracil-5- oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos antisentido se puede producir usando un vector de expresión en el que un ácido nucleico ha sido clonado en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido frente a un ácido nucleico objetivo de interés).

Las secuencias de nucleótidos antisentido de la invención incluyen además secuencias de nucleótidos en donde al menos uno, o todos los residuos de fosfato de puente internucleotídico son fosfatos modificados, tales como fosfonatos de metilo, fosfonotioatos de metilo, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidato y fosforamidato. Por ejemplo, cada uno de los residuos de fosfato de puente internucleotídico puede modificarse como se ha descrito. En otro ejemplo no limitante, la secuencia de nucleótidos antisentido es una secuencia de nucleótidos en la que uno o todos los nucleótidos contienen una unidad estructural de alquilo inferior de 2' (por ejemplo C₁-C₄, alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, cada uno de los nucleótidos puede ser modificado como se describe. Véase también, Furdon et al., *Nucleic Acids Res.* 17: 9193 (1989); Agrawal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1401 (1990); Baker et al., *Nucleic Acids Res.* 18: 3537 (1990); Sproat et al., *Nucleic Acids Res.* 17: 3373 (1989); Walder y Walder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5011 (1988).

También se pueden emplear métodos de apareamiento de bases de triple hélice para inhibir la producción de polipéptidos listados en la Tabla 1. Se cree que el apareamiento de triple hélice trabaja inhibiendo la capacidad de la doble hélice de abrirse suficientemente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras. Los avances terapéuticos recientes que usan el ADN triplex se han descrito en la literatura (por ejemplo, Gee et al., (1994) In: Huber et al., *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY).

El ARN de interferencia pequeña (si), también conocido como moléculas de interferencia de ARN (ARNi), provee otra metodología para modular la expresión de polipéptidos listados en la Tabla 1. El ARNsi puede dirigirse contra secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos listados o cualquier otra secuencia que da como resultado modulación de la expresión de los polipéptidos listados.

El ARNsi es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes en el que ARN bicatenario (ARNds) que corresponde a una secuencia codificante de interés se introduce en una célula o un organismo, dando como resultado la degradación del mRNA correspondiente. El mecanismo por el cual el ARNsi alcanza el silenciamiento génico ha sido revisado en Sharp et al., *Genes Dev.* 15: 485 (2001); y Hammond et al., *Nature Rev. Gen.* 2: 110 (2001)). El efecto de ARNsi persiste para múltiples divisiones celulares antes de recuperar la expresión génica. El ARNsi es por lo tanto un método de gran alcance para hacer anulación o "modificación" direccionada en el nivel de ARN. El ARNsi ha demostrado ser exitoso en células humanas, incluyendo riñón embrionario humano y células

5 HeLa (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *Nature* 411: 494 (2001)). En una realización, el silenciamiento puede inducirse en células de mamífero mediante la imposición de expresión endógena de horquillas de ARN (véase Paddison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 1443 (2002)). En otra realización, la transfección de ARNs pequeño (21-23 nt) inhibe específicamente la expresión del ácido nucleico (revisado en Caplen, *Trends Biotechnol.*, 20:49 (2002)).

10 La tecnología de ARNs utiliza métodos estándar de biología molecular. El ARNs que corresponde a la totalidad o a una parte de una secuencia codificante objetivo que va a ser inactivada se puede producir mediante métodos estándar, por ejemplo, mediante transcripción simultánea de ambas cadenas de un ADN molde (correspondiente a la secuencia objetivo) con ARN polimerasa T7. Los kits para la producción de ARNs para uso en ARNs están disponibles comercialmente, por ejemplo, de New England Biolabs, Inc. Los métodos de transfección de ARNs A o de plásmido diseñados para hacer ARNs son rutina en la técnica.

Se pueden usar microARN (miARN), moléculas de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud, de manera similar al ARNs para modular la expresión génica (véase la Patente de Estados Unidos No. 7,217,807).

15 Se ha informado de efectos de silenciamiento similares a los producidos por ARNs en células de mamífero con transfección de un constructo híbrida de mARN-ADNc (Lin et al., *Biochem. Biophys Res. Commun.* 281: 639 (2001)), provyeno aún otra estrategia para silenciar una secuencia codificante de interés.

20 La expresión de los polipéptidos listados en la Tabla 1 también puede inhibirse usando ribozimas. Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que escinden ácidos nucleicos de una manera específica del sitio. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (Kim et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 8788 (1987), Gerlach et al., *Nature* 328: 802 (1987), Forster and Symons, *Cell* 49:211 (1987)). Por ejemplo, un gran número de ribozimas acelera las reacciones de transferencia del fosfoéster con un alto grado de especificidad, frecuentemente escindiendo solamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.* 216: 585 (1990) Reinhold-Hurek and Shub, *Nature* 357:173 (1992)). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se une a través de interacciones de apareamiento de bases específicas con la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

30 La catálisis de ribozima se ha observado principalmente como parte de las reacciones de escisión/ligación específicas de secuencia que involucra ácidos nucleicos (Joyce, *Nature* 338: 217 (1989)). Por ejemplo, la patente U.S. No. 5,354,855 informa que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia mayor que la de las ribonucleasas conocidas y aproximándose a la de las enzimas de restricción de ADN. Por lo tanto, la inhibición de la expresión génica mediada por ribozima específica de secuencia puede ser particularmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10591 (1991); Sarver et al., *Science* 247:1222 (1990); Sioud et al., *J. Mol. Biol.* 223:831 (1992)).

35 En otra realización de la divulgación, la disminución de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende disminuir la actividad de dicho polipéptido. La actividad del polipéptido se puede modular mediante la interacción con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse al polipéptido o a cualquier otro polipéptido de interés, siempre que la unión entre el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo y el polipéptido objetivo de como resultado modulación de la actividad del polipéptido listado.

40 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" tal como se utiliza aquí se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede ser de cualquier especie de origen, incluyendo (por ejemplo) ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja, camello o humano, o puede ser un anticuerpo quimérico. Véase, por ejemplo, Walker et al., *Molec. Immunol.* 26: 403 (1989). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes producidos de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4,474,893 o en la Patente de Estados Unidos No. 4,816,567. Los anticuerpos también pueden construirse químicamente de acuerdo con el método descrito en la Patente de Estados Unidos No. 4,676,980.

50 Los fragmentos de anticuerpos incluidos dentro del alcance de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos de dominio, diacuerpos; vaccicuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Tales fragmentos se pueden producir mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab se pueden generar

reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab para permitir la rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse et al., Science 254: 1275 (1989)).

5 Los anticuerpos de la divulgación pueden alterarse o mutarse para compatibilidad con especies distintas de la especie en la que se produjo el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser humanizados o camelizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murínicos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se enlazan a antígenos) que contienen secuencia mínima derivada de Inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los
10 residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias marco. En general,
15 el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno y, típicamente, dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature, 332: 323 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 (1992)).
20

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En genral, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos de
25 "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)), sustituyendo las CDR de roedor o secuencias CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente
30 de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en el arte, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Anticorps Monoclonal and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)). De forma similar, los anticuerpos humanos pueden hacerse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la exposición, se observa la
40 producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856 (1994); Morrison, Nature 368:812 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14:845 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65 (1995).
45

Los anticuerpos policlonales utilizados para llevar a cabo la presente divulgación pueden producirse mediante la inmunización de un animal adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, etc.) con un antígeno al que se une un anticuerpo monoclonal al objetivo, recolectando suero inmune del animal y separando los anticuerpos policlonales del suero inmune, de acuerdo con procedimientos conocidos.

50 Los anticuerpos monoclonales utilizados para llevar a cabo la presente divulgación pueden producirse en una línea celular de hibridoma de acuerdo con la técnica de Kohler y Milstein, Nature 265: 495 (1975). Por ejemplo, se puede inyectar una solución que contiene el antígeno apropiado en un ratón y, después de un tiempo suficiente, el ratón es sacrificado y se obtienen células de bazo. Las células del bazo se immortalizan entonces fusionándolas con células

de mieloma o con células de linfoma, típicamente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Las células de hibridoma se hacen crecer entonces en un medio adecuado y el sobrenadante es tamizado para obtener anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada. Los fragmentos Fab monoclonales se pueden producir en *E. coli* mediante técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Huse, *Science* 246: 1275 (1989).

También pueden obtenerse anticuerpos específicos del polipéptido objetivo mediante técnicas de presentación de fagos conocidas en el arte.

Pueden usarse diversos inmunoensayos para el cribado para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada para los polipéptidos de esta divulgación. Son bien conocidos en la técnica numerosos protocolos para ensayos de enlazamiento competitivo o inmunoradiométricos usando anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidad establecida. Tales inmunoensayos involucran típicamente la medición de la formación de complejos entre un antígeno y su anticuerpo específico (por ejemplo, formación de complejo antígeno/anticuerpo). Se puede usar un inmunoensayo basado en monoclonales de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes sobre los polipéptidos o péptidos de esta divulgación, así como un ensayo de enlazamiento competitivo.

Los anticuerpos pueden conjugarse con un soporte sólido (por ejemplo, perlas, placas, láminas o pozos formados a partir de materiales tales como látex o poliestireno) de acuerdo con técnicas conocidas. Los anticuerpos también pueden conjugarse a grupos detectables tales como radiomarcadores (por ejemplo, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) y marcadores de fluorescencia (por ejemplo, fluoresceína) de acuerdo con técnicas conocidas. La determinación de la formación de un complejo anticuerpo/antígeno en los métodos de esta invención puede ser por detección de, por ejemplo, precipitación, aglutinación, floculación, radiactividad, desarrollo o cambio de color, fluorescencia, luminiscencia, etc., como es bien conocido en el arte.

En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se enlaza específicamente a SFRP2. El anticuerpo puede enlazarse a un epítipo específico sobre SFRP2, por ejemplo, el dominio de enlazamiento a WNT (aproximadamente de los aminoácidos 30-160) o el dominio NTR (aproximadamente de los aminoácidos 169-295), que causa la inhibición de la actividad de SFRP2. Los epítopos adecuados para aumentar anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los aminoácidos 29-40 de SFRP2 humano GQPDFSYRSNC (SEQ ID NO:1)), 85-96 (KQCHPDTKKELC (SEQ ID NO:2)), 119-125 (VQVKDRC (SEQ ID NO:3)) 138-152 (DMLECDRFPQDNDLC (SEQ ID NO:4)), 173-190 (EACKNKNDNDIMETLC (SEQ ID NO:5)), 202-220 (EITYINRDTKIILETKSKT-Cys (SEQ ID NO:6)), o 270-295 (ITSVKRWQKQREFKRISRSIRKLQC (SEQ ID NO:7)). En otro aspecto, el epítipo es un fragmento de la proteína desde aproximadamente el aminoácido 156 hasta aproximadamente el aminoácido 295. La numeración de aminoácidos se basa en la lista de GenBank para SFRP2 humano (número de acceso AAH08666).

En un aspecto, la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 se inhibe usando aptámeros. Recientemente, los ARN de cadena sencilla de estructura pequeña, también conocidos como aptámeros de ARN, han surgido como alternativas viables para moléculas pequeñas y terapia basada en anticuerpos (Que-Gewirth et al., *Gene Ther.* 14: 283 (2007), Ireson et al., *Mol. Cancer Ther.* 5: 2957 (2006)). Los aptámeros de ARN unen específicamente proteínas objetivo con alta afinidad, son bastante estables, carecen de inmunogenicidad y provocan respuestas biológicas. Los aptámeros se desarrollan por medio de un método de selección iterativo llamado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para reconocer específicamente y enlazar estrechamente sus objetivos mediante estructuras tridimensionales complementarias bien definidas.

Los aptámeros de ARN representan una clase emergente única de agentes terapéuticos (Que-Gewirth et al., *Gene Ther.* 14: 283 (2007), Ireson et al., *Mol. Cancer Ther.* 5: 2957 (2006)). Son oligonucleótidos de ARN de cadena sencilla (12-30 nucleótidos) relativamente cortos que asumen una forma tridimensional estable para unir estrecha y específicamente las proteínas seleccionadas para obtener una respuesta biológica. En contraste con los oligonucleótidos antisentido, los aptámeros de ARN pueden direccionar efectivamente objetivos extracelulares. Al igual que los anticuerpos, los aptámeros poseen afinidades de enlazamiento en el rango nanomolar a picomolar bajo. Además, los aptámeros son estables al calor, carecen de inmunogenicidad y poseen una variabilidad interlotes mínima. Las modificaciones químicas, tales como sustituciones amino o fluoro en la posición 2' de pirimidinas, pueden reducir la degradación por nucleasas. La biodistribución y eliminación de aptámeros también pueden alterarse por adición química de unidades estructurales tales como polietilenglicol y colesterol. Además, SELEX

permite la selección de bibliotecas que consisten de hasta 10^{15} ligandos para generar ligandos de oligonucleótidos de alta afinidad a objetivos bioquímicos purificadas.

En otro aspecto, el método para disminuir la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1 comprende suministrar a una célula o a un sujeto un compuesto que disminuye la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1, el compuesto administrado en una cantidad efectiva para modular la actividad del polipéptido listado en la Tabla 1. El compuesto puede interactuar directamente con el polipéptido listado en la Tabla 1 para disminuir la actividad del polipéptido. Alternativamente, el compuesto puede interactuar con cualquier otro polipéptido, ácido nucleico u otra molécula si tal interacción da como resultado una disminución de la actividad del polipéptido listado en la Tabla 1.

El término "compuesto" tal como se usa aquí está destinado a ser interpretado ampliamente y abarca moléculas orgánicas e inorgánicas. Los compuestos orgánicos incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, polipéptidos, lípidos, carbohidratos, coenzimas, aptámeros y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, vectores de suministro de genes, oligonucleótidos antisentido, ARNs, todos como se describieron más arriba).

Los polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (descritos en más detalle anteriormente) y enzimas. Los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, moléculas quiméricas de ADN, ARN y ADN-ARN. Las moléculas de ARN adecuadas incluyen ARNs, moléculas de ARN antisentido y ribozimas (todas las cuales se describen con más detalle anteriormente). El ácido nucleico puede codificar además cualquier polipéptido de tal manera que la administración del ácido nucleico y la producción del polipéptido de como resultado una disminución de la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1.

El compuesto puede además ser un compuesto que se identifica por cualquiera de los métodos de selección descritos más adelante.

En un aspecto de la divulgación, el polipéptido listado en la Tabla 1 es SFRP2, que parece estimular la angiogénesis mediante la activación de la ruta no canónica Wnt. La actividad angiogénica de SFRP2 puede inhibirse suministrando a un sujeto un inhibidor de esta ruta, por ejemplo, un inhibidor de calcineurina o NF-ATc, por ejemplo, un agente que inhiba la desfosforilación de NF-ATc de calcineurina; un agente que inhiba la translocación nuclear de NF-ATc desfosforilada (agentes que bloquean la importación nuclear de NF-ATc3 y NF-ATc4, un agente que inhibe el enlazamiento a ADN de un complejo de enlazamiento a una proteína asociada a NF-ATc, por ejemplo, a través del enlazamiento a una porción de enlazamiento a ADN de NF-ATc y/o a la región de enlazamiento de proteína asociada, que incluye agentes que inhiben el enlazamiento a ADN por NF-ATc y agentes que previenen la interacción de NF-ATc con sus proteínas nucleares asociadas, un agente que reduce la cantidad de NF-ATc intracelular, por ejemplo, agentes que inhiben la expresión de NF-ATc (tal como antisentido o ARNs), o un agente que incrementa la tasa de exportación nuclear mediante la activación de GSK3, PKA u otras quinasas de NFAT. Ejemplos de inhibidores que pueden usarse en la invención incluyen, sin limitación, tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina, rapamicina, y los inhibidores divulgados en las Patentes de Estados Unidos Nos. 7,323,439; 7,160,863; 7,084,241; 7,019,028; 6,967,077; 6,875,571; 6,780,597; 6,686,450; 6,537,810; 6,399,322; y 5,807,693.

Los compuestos de la presente divulgación pueden suministrarse opcionalmente junto con otros agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos adicionales pueden suministrarse concurrentemente con los compuestos de la divulgación. Tal como se utiliza aquí, la palabra "simultáneamente" significa suficientemente próximo en el tiempo para producir un efecto combinado (es decir, concurrentemente puede ser simultáneamente, o puede ser dos o más eventos que ocurren dentro de un corto período de tiempo antes o después uno de otro). En un aspecto, los compuestos de la invención se administran conjuntamente con agentes anticancerígenos, tales como 1) alcaloides vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina); 2) epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido y tenipósido); 3) antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina, rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); 4) enzimas (por ejemplo, L- asparaginasa); 5) modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, Interferón alfa); 6) complejos de coordinación de platino (por ejemplo, cisplatino y carboplatino); 7) antracendionas (por ejemplo, mitoxantrona); 8) ureas sustituidas (por ejemplo, hidroxiourea); 9) derivados de metilhidrazina (por ejemplo, procarbazona (N-metilhidrazina, MIH)); 10) supresores adrenocorticales (por ejemplo, mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida); 11) adrenocorticosteroides (por ejemplo, prednisona); 12) progestinas (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol); 13) estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol y etinilestradiol); 14) antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno); 15) andrógenos (por ejemplo, propionato de testosterona y fluoximesterona); 16) antiandrógenos (por ejemplo, flutamida); y 17) análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (por ejemplo, leuprolida). En otra realización, los compuestos de la invención se administran conjuntamente con agentes

antiangiogénesis, tales como anticuerpos para VEGF (por ejemplo, bevacizumab (AVASTIN), ranibizumab (LUCENTIS)) y otros promotores de angiogénesis (por ejemplo, bFGF, angiopoyetina-1), anticuerpos para la integrina vascular alfa-v/beta-3 (por ejemplo, VITAXIN), angiostatina, endostatina, dalteparina, ABT-510, conjugado CNGRC péptido TNF alfa, ciclofosfamida, fosfato de combretastatina A4, ácido dimetilxantenona acético, docetaxel, lenalidomida, enzastaurina, paclitaxel, formulación de nanopartículas estabilizadas con albúmina de paclitaxel (Abraxane), isoflavona de soja (Genistein), citrato de tamoxifeno, talidomida, ADH-1 (EXERINA), AG-013736, AMG-706, AZD2171, tosilato de sorafenib, BMS- 582664, CHIR- 265, pazopanib, PI-88, vatalanib, everolimus, suramina, malato de sunitinib, XL184, ZD6474, ATN-161, cilenigtida y celecoxib.

IV. Estimulación de la angiogenesis

10 Un aspecto de la divulgación se refiere a métodos para incrementar la angiogénesis en una célula, que comprende incrementar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la célula.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para incrementar la angiogénesis en un tejido de un sujeto, que comprende incrementar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en el tejido del sujeto. En un aspecto, el sujeto es uno que tiene deficiencias vasculares, enfermedad cardiovascular, o se beneficiaría de la estimulación de la activación y estabilización de células endoteliales de microvasos u otros vasos recién formados, tales como en apoplejía, infarto del miocardio, u otros tipos de isquemia, o sujetos que necesitan curación de heridas, por ejemplo, sujetos con úlceras, llagas de cama, quemaduras, etc.

En un aspecto, el incremento de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende suministrar un ácido nucleico que codifica el polipéptido o un fragmento o homólogo de éste a la célula o tejido. En otro aspecto, el incremento de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende suministrar los propios polipéptidos o un fragmento o homólogo de los mismos a la célula o tejido. Tal como se usa aquí, el término "homólogo" se usa para referirse a un polipéptido que difiere de un polipéptido de origen natural mediante modificaciones menores al polipéptido de origen natural, pero que conserva significativamente una actividad biológica del polipéptido de origen natural. Las modificaciones menores incluyen, sin limitación, cambios en una o algunas cadenas laterales de aminoácidos, cambios en uno o algunos aminoácidos (incluyendo supresiones, inserciones y sustituciones), cambios en estereoquímica de uno o unos pocos átomos y derivaciones menores, Incluyendo, sin limitación, metilación, glicosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación y adición de glucosilfosfatidil inositol. El término "sustancialmente retiene", tal como se utiliza aquí, se refiere a un fragmento, homólogo u otra variante de un polipéptido que retiene al menos aproximadamente el 20% de la actividad del polipéptido de origen natural (por ejemplo, actividad angiogénica), por ejemplo, aproximadamente 30%, 40%, 50% o más. La actividad angiogénica se puede medir, por ejemplo, midiendo la proliferación celular, el brote angiogénico, la formación de túbulos o la capacidad de migración e invasión. Otras actividades biológicas, que dependen del polipéptido, pueden incluir la actividad enzimática, la unión al receptor, la unión al ligando, la inducción de un factor de crecimiento, un evento de transducción de señales celulares, etc.

En un aspecto, el método comprende suministrar al sujeto un polipéptido aislado listado en la Tabla 1. En aspectos de ejemplo, el polipéptido comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia de aminoácidos conocida públicamente del polipéptido (divulgada en los números de acceso GenBank en la Tabla 1) o un fragmento funcional de la misma. En otro aspecto, el polipéptido aislado comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 70%, por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos conocida públicamente o a un fragmento funcional de la misma (y secuencias polinucleotídicas que codifican la misma).

El polipéptido de la divulgación también incluye porciones funcionales o fragmentos (y secuencias polinucleotídicas que codifican la misma). La longitud del fragmento no es crítica a condición de que retenga sustancialmente la actividad biológica del polipéptido (por ejemplo, actividad angiogénica). Los fragmentos ilustrativos comprenden al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, o más aminoácidos contiguos de un polipéptido listado en Tabla 1.

Del mismo modo, los expertos en la técnica apreciarán que la presente divulgación también abarca polipéptidos de fusión (y secuencias de polinucleótidos que codifican la misma) que comprenden el polipéptido listado en la Tabla 1 (o un fragmento funcional del mismo). Por ejemplo, puede ser útil expresar el polipéptido (o fragmento funcional) como una proteína de fusión que puede ser reconocida por un anticuerpo comercialmente disponible (por ejemplo, motivos FLAG) o como una proteína de fusión que de otra manera puede purificarse más fácilmente (por ejemplo,

5 por adición de una cola poli-His). Adicionalmente, pueden producirse proteínas de fusión que mejoran la estabilidad del polipéptido, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden proteína de unión a maltosa (MBP) o glutatión-S-transferasa. Como otra alternativa, la proteína de fusión puede comprender una molécula informadora. En otros aspectos, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido que provee una función o actividad que es la misma o diferente de la actividad del polipéptido, por ejemplo, una actividad o función de direccionamiento, enlazamiento o enzimática.

10 Igualmente, se entenderá que los polipéptidos específicamente descritos aquí tolerarán típicamente sustituciones en la secuencia de aminoácidos y conservarán sustancialmente la actividad biológica. Para identificar polipéptidos de la invención distintos de los específicamente divulgados aquí, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en cualquier característica conocida en la técnica, incluyendo la similitud o diferencias relativas de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares.

Las sustituciones de aminoácidos distintas de las descritas aquí pueden conseguirse cambiando los codones de la secuencia de ADN (o secuencia de ARN), de acuerdo con la siguiente tabla de codones:

TABLA 2

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCT
Cisteina	Cys	C	TGC TGT
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAT
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	TTC TTT
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGT
Histidina	His	H	CAC CAT
Isoleucina	Ile	I	ATA ATC ATT
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	TTA TTG CTA CTC CTG CTT
Metionina	Met	M	ATG
Asparagina	Asn	N	AAC AAT
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCT
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT
Serina	Ser	S	AGC ACT TCA TCC TCG TCT
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACT
Valina	Val	V	GTA GTC GTG GTT
Triptófano	Trp	W	TGG
Tirosina	Tyr	Y	TAC TAT

15 En la identificación de secuencias de aminoácidos que codifican polipéptidos distintos de los específicamente descritos aquí, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos en conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (véase, Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol. 157: 105 (1982)). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

20

A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte and Doolittle, id.), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

De acuerdo con lo anterior, el índice hidropático del aminoácido (o secuencia de aminoácidos) puede ser considerado cuando se modifican los polipéptidos específicamente divulgados aquí.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos puede hacerse sobre la base de la hidrofobicidad. La Patente de Estados Unidos No. 4,554,101 establece que la mayor hidrofobicidad promedio local de una proteína, según se rige por la hidrofobicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos No. 4,554,101, se han asignado los siguientes valores de hidrofobicidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina ($\pm 3,0$); aspartato ($+3,0 \pm 1$); glutamato ($+3,0 \pm 1$); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina ($-0,5 \pm 1$); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Por lo tanto, la hidrofobicidad del aminoácido (o secuencia de aminoácidos) puede ser considerada cuando se identifican polipéptidos adicionales más allá de los específicamente divulgados aquí.

En aspectos de la divulgación, el polinucleótido que codifica el polipéptido listado en la Tabla 1 (o fragmento funcional) se hibridará con las secuencias de ácido nucleico específicamente descritas aquí o fragmentos de las mismas bajo condiciones estándar como las conocidas por los expertos en la técnica y codifican un polipéptido funcional o fragmento funcional del mismo.

Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo bajo condiciones de rigurosidad reducida, rigurosidad media o incluso condiciones rigurosas (por ejemplo, condiciones representadas por una rigidez de lavado de 35-40% de formamida con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 1x SSPE a 37°C, condiciones representadas por una rigidez al lavado de 40-45% de formamida con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 1x SSPE a 42°C y condiciones representadas por una rigidez al lavado de formamida al 50% con 5x solución de Denhardt, 0,5 % SDS y 1x SSPE a 42°C, respectivamente) a las secuencias polinucleotídicas que codifican los polipéptidos listados en la Tabla 1 o fragmentos funcionales de los mismos específicamente descritos aquí. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989).

En otros aspectos, las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos listados en la Tabla 1 tienen una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia con las secuencias de ácidos nucleicos conocidas públicamente (divulgadas en los números de acceso de GenBank en la Tabla 1) o fragmentos funcionales de las mismas y codifican un polipéptido funcional o fragmento funcional del mismo.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que puede haber variabilidad en los polinucleótidos que codifican los polipéptidos (y fragmentos de los mismos) de la presente divulgación debido a la degeneración del código genético. La degeneración del código genético, que permite que diferentes secuencias de ácido nucleico codifiquen para el mismo polipéptido, es bien conocida en la literatura (véase, por ejemplo, la Tabla 2).

Del mismo modo, los polipéptidos (y fragmentos de los mismos) de la divulgación incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias polipeptídicas conocidas públicamente.

Como se conoce en la técnica, se pueden usar varios programas diferentes para identificar si un polinucleótido o polipéptido tiene identidad o similitud de secuencia con una secuencia conocida. La identidad o similitud de secuencia puede determinarse usando técnicas estándar conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Mates.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de

Software Genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12: 387 (1984), preferiblemente usando los ajustes predeterminados, o por inspección.

5 Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, por parejas. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupación utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351 (1987); El método es similar al descrito por Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151 (1989).

10 Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990) y Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 (1993). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WUBLAST - 2 que se obtuvo de Altschul et al., Meth. Enzymol, 266: 460 (1996); Blast.wustl/edu/blast/README.html. WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, que preferiblemente se ajustan a los valores predeterminados. Los parámetros son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia y composición particulares de la base de datos particular contra la que se busca la secuencia de interés; Sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

15 Un algoritmo útil adicional es gapped BLAST según lo informado por Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 (1997).

20 Un porcentaje de valor de identidad de secuencia de aminoácidos se determina por el número de residuos idénticos que coinciden dividido por el número total de residuos de la secuencia "más larga" en la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene los residuos más reales en la región alineada (las brechas introducidas por WU-Blast-2 para maximizar la puntuación de alineación se ignoran).

De una manera similar, el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a la secuencia codificante de los polipéptidos divulgados aquí se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en la secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en el polinucleótido específicamente divulgado aquí.

25 La alineación puede incluir la introducción de brechas en las secuencias que se van a alinear. Además, para las secuencias que contienen más o menos aminoácidos que los polipéptidos específicamente divulgados aquí, se entiende que en un aspecto, el porcentaje de identidad de secuencia se determinará en base al número de aminoácidos idénticos en relación con el número total de aminoácidos. Por lo tanto, por ejemplo, la identidad de secuencia de secuencias más cortas que una secuencia específicamente divulgada aquí, se determinará usando el número de aminoácidos en la secuencia más corta, en un aspecto. En porcentajes de cálculo de identidad, el peso relativo no está asignado a diversas manifestaciones de variación de secuencia, tales como inserciones, eliminaciones, sustituciones, etc.

30 En un aspecto, sólo las identidades se califican positivamente (+1) y todas las formas de variación de secuencia que incluyen las brechas se asignan un valor de "0", lo que evita la necesidad de una escala o parámetros ponderados como se describe a continuación para los cálculos de similitud de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular, por ejemplo, dividiendo el número de residuos idénticos coincidentes por el número total de residuos de la secuencia "más corta" en la región alineada y multiplicando por 100. La secuencia "más larga" es la que tiene más residuos reales en la región alineada.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que los polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la divulgación se asociarán típicamente con secuencias de control de expresión apropiadas, por ejemplo, señales de control de transcripción/traducción y señales de poliadenilación.

40 Se apreciará además que puede usarse una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y de la expresión específica del tejido deseada. El promotor puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor puede ser nativo o extraño y puede ser una secuencia natural o una secuencia sintética. Por extraños, se entiende que la región de iniciación transcripcional no se encuentra en el huésped de tipo silvestre en el que se introduce la región de iniciación transcripcional. El promotor se escoge de manera que funcione en las células de interés.

45 Para ilustrar, la secuencia codificadora del polipéptido puede estar operativamente asociada con un promotor inmediato-temprano principal de citomegalovirus (CMV), un promotor de la albúmina, un promotor del Factor de

Elongación 1- α (EF1- α), un promotor PyK, un promotor MFG o un promotor MFG, o un promotor del virus del sarcoma de Rous.

Los elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles por hormonas e inducibles por metal, y otros promotores regulados por compuestos suministrados exógenamente, incluyendo, sin limitación, el promotor metalotioneína (MT) inducible por cinc; el promotor del virus del tumor mamario de ratón inducible de dexametasona (Dex) (MMTV); el sistema promotor de polimerasa T7 (véase el documento WO 98/10088); el promotor de insecto ecdisoma (No et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 3346 (1996)); el sistema represor de la tetraciclina (Gossen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 5547 (1992)); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., Science 268: 1766 (1995), véase también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 512 (1998)); el sistema inducible por RU486 (Wang et al., Nat. Biotech., 15: 239 (1997), Wang et al., Gene Ther., 4: 432 (1997)); y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., J. Clin. Invest. 100: 2865 (1997)).

Otros promotores específicos del tejido o o promotores reguladores incluyen, pero no se limitan a, promotores que típicamente confieren especificidad tisular en las células endoteliales. Estos incluyen, pero no se limitan a, promotores para VE-caderina, PPE-1, PPE-1-3x, TIE-1, TIE-2, Endoglin, von Willebrand, KDR/flk-1, FLT-1, 1, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, y proteína similar a la carboxipeptidasa aórtica (ACLP).

Además, generalmente se requieren señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias de codificación de polipéptidos insertados. Estas secuencias de control de traducción, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

La presente divulgación provee además células que comprenden los polinucleótidos y polipéptidos aislados de la divulgación. La célula puede ser una célula cultivada o una célula in vivo, por ejemplo, para uso en métodos terapéuticos, métodos de diagnóstico, métodos de cribado, métodos para estudiar la acción biológica de los polipéptidos listados en la Tabla 1, en métodos de producción de los polipéptidos o en métodos de mantenimiento o amplificación de los polinucleótidos de la invención, etc. En otro aspecto, la célula es una célula ex vivo que ha sido aislada de un sujeto. La célula ex vivo puede modificarse y luego reintroducirse en el sujeto con fines diagnósticos o terapéuticos.

En aspectos particulares, la célula es una célula endotelial no transformada o una célula de una línea celular endotelial. Las células endoteliales y las líneas celulares incluyen, sin limitación, HUVEC, HCEC, HGEC, HMEC-1, HUV-ST, ECV304, ECV304 y EA.hy926. En otras realizaciones, la célula es un pericito u otro tipo celular asociado con vasos sanguíneos.

El polinucleótido aislado puede incorporarse en un vector de expresión. Los vectores de expresión compatibles con diversas células huésped son bien conocidos en la técnica y contienen elementos adecuados para la transcripción y traducción de ácidos nucleicos. Típicamente, un vector de expresión contiene un "casete de expresión", que incluye, en la dirección 5' a 3', un promotor, una secuencia codificante que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1 o un fragmento funcional del mismo asociado operativamente con el promotor y opcionalmente, una secuencia de terminación que incluye una señal de parada para ARN polimerasa y una señal de poliadenilación para poliadenilasa.

Ejemplos no limitantes de promotores de esta divulgación incluyen promotores de CYC1, HIS3, GAL1, GAL4, GAL10, ADH1, PGK, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TP1 y fosfatasa alcalina (útiles para la expresión en *Saccharomyces*); Promotor AOX1 (útil para la expresión en *Pichia*); Promotores de β -lactamasa, lac, ara, tet, trp, IP_L, IP_R, T7, tac y trc (útiles para la expresión en *Escherichia coli*); patogénesis regulada por la luz, específica de la semilla, específica del polen, específica del ovario o promotores relacionados con la enfermedad, virus del mosaico de la coliflor 35S, CMV 35S mínimo, virus de mosaico de la vena del cassaya (CsVMV), proteína de unión a la clorofila a/b, ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, promotores específicos de brotes, promotores específicos de la raíz, quitinasa, promotores inducibles por estrés, virus tungro bacilliforme de arroz, superpromotor de plantas, aminopeptidasa de leucina de patata, nitrato reductasa, manopin sintasa, nopalina sintasa, ubiquitina, proteína zeína promotores de antocianina (útiles para la expresión en células vegetales).

Ejemplos adicionales de promotores animales y de mamíferos conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, la región promotora temprana de SV40 (SV40e), el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR) de 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV), los promotores de los genes E1A o promotor tardío principal (MLP) de adenovirus (Ad), promotor temprano de citomegalovirus (CMV), el virus de herpes simple, promotor de timidina quinasa (TK), promotor IE1 de baculovirus, promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1), promotor de fosfoglicerato quinasa

(PGK) promotor de la ubiquitina (Ubc), un promotor de la albúmina, las secuencias reguladoras del promotor de la metalotioneína-L de ratón y las regiones de control transcripcional, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina, α -actina, tubulina y similares), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP y similares), los promotores de genes terapéuticos (del tipo MDR, CFTR o de factor VIII, y similares), patogénesis y/o promotores relacionados con la enfermedad y promotores que exhiben especificidad tisular, tal como la región de control del gen de la elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de la insulina activa en las células beta pancreáticas, la región de control del gen de la inmunoglobulina activa en células linfoides, la región de control del virus del tumor mamario de ratón activa en células testiculares, mamarias, linfoides y de mastocitos; el promotor del gen de la albúmina, las regiones de control Apo AI y Apo AII activas en el hígado, la región de control del gen alfa-fetoproteína activa en el hígado, la región de control del gen alfa 1-antitripsina activa en el hígado, la región de control del gen beta-globina en las células mieloides, la región de control del gen de la proteína básica de la mielina activa en las células oligodendrocíticas en el cerebro, la región de control del gen 2 de la cadena ligera de la miosina activa en el músculo esquelético y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica activa en el hipotálamo, el promotor de la piruvato quinasa, el promotor de la vilina, el promotor de la proteína intestinal enlazada a los ácidos grasos, el promotor de la α -actina de las células del músculo liso, y similares. Además, cualquiera de estas secuencias de expresión de esta invención puede modificarse por adición de secuencias potenciadoras y/o reguladoras y similares.

Los potenciadores que pueden usarse en aspectos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a: un potenciador de SV40, un potenciador de citomegalovirus (CMV), un potenciador de factor de elongación I (EF1), potenciadores de levaduras, potenciadores de genes virales y similares.

Las regiones de control de terminación, es decir, secuencias de terminación o poliadenilación, pueden derivarse de diversos genes nativos de los huéspedes preferidos. En algunos aspectos de la invención, la región de control de terminación puede comprender o derivarse de una secuencia sintética, una señal de poliadenilación sintética, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina (BGH), secuencias terminatorias virales, o similares.

Será evidente para los expertos en la técnica que cualquier vector adecuado puede usarse para suministrar el polinucleótido a una célula o sujeto. El vector puede suministrarse a las células in vivo. En otros aspectos, el vector puede suministrarse a células ex vivo, y luego las células que contienen el vector se suministran al sujeto. La selección del vector de suministro puede hacerse basándose en un número de factores conocidos en la técnica, incluyendo la edad y las especies del huésped objetivo, el suministro in vitro versus in vivo, el nivel y la persistencia de la expresión deseada, el propósito pretendido (por ejemplo, para terapia o cribado), la célula u órgano objetivo, la ruta de suministro, el tamaño del polinucleótido aislado, las preocupaciones de seguridad y similares.

Los vectores adecuados incluyen vectores de plásmidos, vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, alfavirus, virus de la vacuna, adenovirus, virus adenoasociado y otros parvovirus, lentivirus, poxvirus o virus herpes simplex), vectores lipídicos, vectores poliesilina, vectores poliméricos poliamino sintéticos, y similares.

Cualquier vector viral que se conoce en la técnica puede usarse en la presente divulgación. Los protocolos para producir vectores virales recombinantes y para el uso de vectores virales para el suministro de ácido nucleico pueden encontrarse en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) y otros manuales de laboratorio estándar (por ejemplo, *Vectors for Gene Therapy*. In: *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley and Sons, Inc.: 1997).

También se pueden emplear métodos de transferencia no virales. Muchos métodos no virales de transferencia de ácido nucleico se basan en mecanismos normales utilizados por células de mamífero para la captación y transporte intracelular de macromoléculas. En aspectos particulares, los sistemas de suministro de ácido nucleico no virales se basan en vías endocíticas para la captación de la molécula de ácido nucleico por la célula objetivo. Los sistemas de ejemplo de suministro de ácido nucleico de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de polilisina y envolturas víricas artificiales.

En aspectos particulares, se usan vectores plasmídicos en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, los plásmidos lampiños se pueden introducir en las células musculares mediante inyección en el tejido. La expresión puede prolongarse durante muchos meses, aunque el número de células positivas es típicamente bajo (Wolff et al., *Science* 247: 247 (1989)). Se ha demostrado que los lípidos catiónicos ayudan en la introducción de ácidos nucleicos en algunas células en cultivo (Felgner and Ringold, *Nature* 337: 387 (1989)). Se ha demostrado que la

inyección de complejos de ADN de plásmido lipídico catiónico en la circulación de ratones da como resultado la expresión del ADN en el pulmón (Brigham et al., *Am. J. Med. Sci.* 298: 278 (1989)). Una ventaja del ADN del plásmido es que puede introducirse en células que no se replican.

5 En un aspecto representativo, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) puede ser atrapada en una partícula lipídica que porta cargas positivas sobre su superficie y, opcionalmente, marcada con anticuerpos contra antígenos de superficie celular del tejido objetivo (Mizuno et al., *No Shinkei Geka* 20: 547 (1992), publicación PCT WO 91/06309, solicitud de patente japonesa 1047381 y publicación de patente europea EP-A-43075).

10 Los liposomas que consisten en moléculas catiónicas anfífilas son útiles como vectores no víricos para el suministro de ácido nucleico in vitro e in vivo (revisado en Crystal, *Science* 270: 404 (1995), Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2: 291 (1995), Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 382 (1994), Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 647 (1994) y Gao et al., *Gene Therapy* 2: 710 (1995)). Se cree que los liposomas cargados positivamente se complejan con ácidos nucleicos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas para formar complejos de lípido: ácido nucleico. Los complejos lípido: ácido nucleico tienen varias ventajas como vectores de transferencia de ácido nucleico. A diferencia de los vectores virales, los complejos de lípido: ácido nucleico pueden usarse para transferir casetes de expresión de tamaño esencialmente ilimitado. Dado que los complejos carecen de proteínas, pueden evocar menos respuestas inmunógenas e inflamatorias. Además, no pueden replicarse o recombinarse para formar un agente infeccioso y tienen baja frecuencia de integración. Varias publicaciones han demostrado que los lípidos catiónicos anfífilos pueden mediar el suministro de ácido nucleico in vivo e in vitro (Felgner et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 7413 (1987), Loeffler et al., *Meth. Enzymol* 217: 599 (1993), Felgner et al., *J. Biol. Chem.* 269: 2550 (1994)).

15 Varios grupos han informado del uso de complejos de lípidos catiónicos anfífilos: ácidos nucleicos para la transfección in vivo tanto en animales como en humanos (revisados en Gao et al., *Gene Therapy* 2: 710 (1995), Zhu et al., *Science* 261: 209 (1993) y Thierry et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 9742 (1995)). La patente de Estados Unidos No. 6,410,049 describe un método para preparar complejos de lípidos catiónicos: ácidos nucleicos que tienen una vida útil prolongada.

20 Los vectores de expresión pueden diseñarse para la expresión de polipéptidos en células procarióticas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, el sistema de expresión de baculovirus), células de levadura, células vegetales o células de mamífero. Algunas células huésped adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990). Ejemplos de vectores bacterianos incluyen pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); Ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, y pRIT5 (Pharmacia). Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari y col., *EMBO J.* 6: 229 (1987)), pMFa (Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30: 933 (1982)), pJRY88 (Schultz et al, *Gene* 54: 113 (1987)), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de ácidos nucleicos para producir proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) incluyen la serie pAc (Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156 (1983)) y la serie pVL Lucklow y Summers *Virology* 170: 31 (1989)).

30 Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, PBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia), pCDM8 (Seed, *Nature* 329: 840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman et al. *J.* 6: 187 (1987)). Cuando se usan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son frecuentemente provistas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente usados se derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de Simio 40.

45 Los vectores virales se han usado en una amplia variedad de aplicaciones de suministro génica en células, así como en sujetos animales vivos. Los vectores víricos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, virus retrovirus, lentivirus, virus adeno-asociados, poxvirus, alfavirus, baculovirus, virus vaccinia, virus herpes, virus Epstein-Barr, adenovirus, geminivirus y vectores caulimovirus. Los vectores no víricos incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos de proteínas de ácidos nucleicos y biopolímeros. Además de un ácido nucleico de interés, un vector puede comprender también una o más regiones reguladoras y/o marcadores seleccionables útiles para seleccionar, medir y monitorizar los resultados de transferencia de ácidos nucleicos (suministro a tejidos específicos, duración de la expresión, etc.).

50

Además de las secuencias de control reguladoras discutidas anteriormente, el vector de expresión recombinante puede contener secuencias de nucleótidos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión recombinante puede codificar un gen marcador seleccionable para identificar células huésped que tienen incorporado el vector.

5 El ADN vector puede introducirse en células procarióticas o eucariotas a través de técnicas convencionales de transformación o transfección. Los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una variedad de técnicas reconocidas en el arte para introducir ácidos nucleicos extraños (por ejemplo, ADN y ARN) en una célula huésped, incluyendo fosfato de calcio o coprecipitación de cloruro de calcio, transfección mediada por dextrano-DEAE, lipofección, electroporación, microinyección, liposomas cargados de ADN, complejos de lipofectamina-ADN, sonicación celular, bombardeo de genes utilizando microproyectiles de alta velocidad y transfección mediada por virus. Métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook et al.,
10 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

Si se desea una integración estable, frecuentemente sólo una pequeña fracción de células (en particular, células de mamífero) integran el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar integrantes, un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se puede introducir en las
15 células huésped junto con el ácido nucleico de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula huésped en el mismo vector que el que comprende el ácido nucleico de interés o pueden introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección de fármacos (por ejemplo,
20 las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Los polipéptidos y fragmentos de la invención pueden modificarse para su uso in vivo mediante la adición, en los extremos de los terminales amino- y/o carboxilo, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido relevante in vivo. Esto puede ser útil en aquellas situaciones en las que los péptidos terminales tienden a ser degradados por proteasas antes de la captación celular. Tales agentes bloqueantes pueden incluir, sin limitación,
25 secuencias peptídicas adicionales relacionadas o no relacionadas que se pueden unir a los residuos amino y/o carboxilo terminales del péptido a administrar. Esto puede hacerse químicamente durante la síntesis del péptido o mediante tecnología de ADN recombinante por métodos conocidos para artesanos de exoeiencia promedio. Alternativamente, los agentes bloqueantes tales como el ácido piroglutámico u otras moléculas conocidas en la técnica se pueden unir a los residuos amino y/o carboxilo terminales o el grupo amino en el extremo amino o grupo
30 carboxilo en el extremo carboxilo puede reemplazarse con una unidad estructural diferente. Del mismo modo, los péptidos pueden estar covalentemente o no covalentemente acoplados a proteínas "portadoras" farmacéuticamente aceptables antes de la administración.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a homólogos de los polipéptidos de la invención que son compuestos peptidomiméticos que se diseñan basándose en las secuencias de aminoácidos de los fragmentos polipeptídicos
35 funcionales. Los compuestos peptidomiméticos son compuestos sintéticos que tienen una conformación tridimensional (es decir, un "motivo peptídico") que es sustancialmente igual que la conformación tridimensional de un péptido seleccionado. El motivo peptídico provee el compuesto peptidomimético con la capacidad de potenciar la angiogénesis de una manera cualitativamente idéntica a la del fragmento funcional del que se derivó el peptidomimético. Los compuestos peptidomiméticos pueden tener características adicionales que potencian su
40 utilidad terapéutica, tales como una permeabilidad celular aumentada y una vida media biológica prolongada.

Los peptidomiméticos tienen típicamente un esqueleto principal que es parcial o totalmente no péptido, pero con grupos laterales que son idénticos a los grupos laterales de los residuos de aminoácidos que se producen en el péptido en el que se basa el peptidomimético. Se conocen en la técnica varios tipos de enlaces químicos, por ejemplo, éster, tioéster, tioamida, retroamida, enlaces reducidos de carbono A, dimetileno y cetometileno, para ser
45 sustitutos generalmente útiles para enlaces peptídicos en la construcción de peptidomiméticos resistentes a las proteasas.

En un aspecto, los polinucleótidos, polipéptidos, u homólogos de los mismos de la divulgación se administran directamente al sujeto. Generalmente, los compuestos de la invención se suspenderán en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina fisiológica) y se administrarán por vía oral o por infusión
50 intravenosa o se inyectarán por vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, o intrapulmonarmente. Se suministran preferiblemente directamente al sitio de la enfermedad o trastorno, tales como células tumorales, por ejemplo, a un tumor o un lecho tumoral después de la

extirpación quirúrgica del tumor, con el fin de eliminar cualquier célula tumoral restante. La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; el tamaño, el peso, el área de la superficie, la edad y el sexo del sujeto; otros fármacos que se administran; y el juicio del médico que lo atiende. Las dosificaciones adecuadas están en el rango de 0,01-100,0 µg/kg. Se esperan amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de polipéptidos y fragmentos disponibles y de las diferentes eficiencias de diversas rutas de administración. Por ejemplo, se espera que la administración oral requiera dosificaciones más altas que la administración por inyección i.v. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándar para la optimización como se entiende bien en la técnica. Las administraciones pueden ser simples o múltiples (por ejemplo, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 o más veces). La encapsulación del polipéptido en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia del suministro, particularmente para administración oral.

De acuerdo con ciertos aspectos, los polinucleótidos o vectores pueden direccionarse a células o tejidos específicos in vivo. Se conocen en la técnica vehículos de suministro dirigidos, incluyendo liposomas y sistemas de vectores virales. Por ejemplo, un liposoma puede dirigirse a una célula o tejido objetivo particular usando un agente de direccionamiento, tal como un anticuerpo, receptor soluble o ligando, incorporado con el liposoma, para direcciona a una célula o tejido particular al que la molécula de direccionamiento puede unirse. Los liposomas de direccionamiento se describen, por ejemplo, en Ho et al., *Biochemistry* 25: 5500 (1986); Ho et al., *J. Biol. Chem.* 262: 13979 (1987); Ho et al., *J. Biol. Chem.* 262: 13973 (1987); y Pat. 4.957.735 de Huang et al.). Los vectores virales envueltos pueden modificarse para suministrar una molécula de ácido nucleico a una célula objetivo mediante la modificación o sustitución de una proteína de envoltura de tal manera que el virus infecte un tipo celular específico. En vectores adenovirales, el gen que codifica las fibras de unión se puede modificar para codificar un dominio de proteína que se une a un receptor específico de célula. Los vectores del herpesvirus se dirigen naturalmente a las células del sistema nervioso central y periférico. Alternativamente, la ruta de administración puede usarse para dirigirse a una célula o tejido específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración intracoronaria de un vector adenoviral es efectivo para el suministro de un gen de miocitos cardiacos (Maurice et al., *J. Clin. Invest.* 104: 21 (1999)). Se ha demostrado que la administración intravenosa de liposomas catiónicos que contienen colesterol se dirige preferentemente a tejidos pulmonares (Liu et al., *Nature Biotechnol.*, 15: 167 (1997)), y media efectivamente la transferencia y expresión de genes in vivo. En la técnica se conocen otros ejemplos de administración exitosa in vivo de moléculas de ácido nucleico. Finalmente, una molécula de ácido nucleico recombinante puede ser expresada selectivamente (es decir, preferencialmente, sustancialmente exclusivamente) en una célula objetivo seleccionando una secuencia de control de transcripción, y preferiblemente un promotor, que se induce selectivamente en la célula objetivo y permanece sustancialmente inactivo en células no objetivo.

V. Diagnóstico y monitorización de enfermedades relacionadas con la angiogenesis

La identificación de polinucleótidos y polipéptidos que son sobrerregulados en vasos sanguíneos tumorales provee objetivos para ser utilizados para la detección de angiogenesis y diagnóstico de enfermedades y trastornos relacionados con la angiogenesis.

Un aspecto de la divulgación se refiere a métodos para detectar angiogenesis en un tejido de un sujeto, que comprende obtener una muestra del tejido y determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, en donde un incremento en expresión y/o actividad relativa al nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativa de angiogenesis. En una realización, el tejido es tejido enfermo tal como tejido de cáncer, por ejemplo, tejido de cáncer de mama. En otro aspecto, el tejido no es tejido enfermo.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para diagnosticar cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra de tejido del sujeto y determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, en donde un incremento en la expresión y/o actividad relativa al nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativa de cáncer.

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a métodos para determinar el potencial de angiogenesis de un tejido en un sujeto, que comprende obtener una muestra del tejido del sujeto y determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en donde un incremento en la expresión y/o actividad en relación con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativo de un potencial de angiogenesis incrementado de dicho tejido.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para determinar el potencial metastásico de un cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra de tejido del cáncer del sujeto y determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, en donde un incremento en la expresión y/o actividad en relación con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativo de un potencial metastásico incrementado de dicho cáncer.

En cada uno de estos aspectos, se puede determinar la expresión y/o actividad de más de un polipéptido listado en la Tabla 1, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o más polipéptidos. En un aspecto, dichos uno o más polipéptidos se seleccionan del grupo que consiste de SFRP2, JAK3 y FAP, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye SFRP2. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye JAK3. En otro aspecto, el uno o más polipéptidos no incluye FAP. La muestra de tejido puede ser obtenida por cualquier método conocido en la técnica, tal como cirugía, biopsia, lavado, aspiración, etc. La muestra puede ser un fluido corporal, por ejemplo, sangre, suero, plasma, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, transpiración, etc. La muestra de control puede ser de una porción normal (es decir, no enferma) del mismo tipo de tejido o célula en el sujeto, de un tipo de tejido o célula diferente en el sujeto, de un individuo emparejado, o puede ser un estándar derivado del promedio de mediciones tomadas de una población de sujetos. En un aspecto, la muestra de tejido es vasos sanguíneos aislados o células endoteliales aisladas. Los vasos sanguíneos pueden aislarse por cualquier medio conocido en la técnica y como se describe aquí. Las células endoteliales se pueden aislar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, clasificación celular, inmunoprecipitación, etc.

En un aspecto, el sujeto tiene cáncer, por ejemplo, cáncer de mama.

En un aspecto, la determinación de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende determinar el nivel de un ácido nucleico que codifica dicho uno o más polipéptidos. La determinación del nivel de un ácido nucleico puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido en la técnica y como se describe aquí, tal como inmunoprecipitación Northern, inmunoprecipitación de manchas, PCR, RTPCR, PCR cuantitativa, análisis de secuencias, análisis de microarreglos de genes, hibridación in situ y detección de un gen informador. Los ensayos para la expresión y/o actividad se pueden llevar a cabo automática o parcialmente de manera automática en una máquina o aparato diseñado para realizar tales ensayos, por ejemplo, usando métodos asistidos por ordenador. Los resultados de los ensayos pueden almacenarse en una base de datos informática y analizarse para producir resultados de diagnóstico. En algunos aspectos, los datos de diagnóstico se pueden analizar, por ejemplo, comparando los resultados intra-pacientes en el tiempo o antes y después del tratamiento o comparando los resultados inter-pacientes para determinar valores basales y/o anormales en una población.

En otro aspecto, la determinación de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende determinar el nivel de dichos uno o más polipéptidos. La determinación del nivel de un polipéptido puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido en la técnica y como se describe aquí, tales como inmunotransferencias Western, inmunotransferencias, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, ensayos inmunosorbentes enlazados a enzimas y radioinmunoensayos.

En otro aspecto, la determinación de la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 comprende determinar la actividad de dichos uno o más polipéptidos. La actividad puede ser cualquier actividad asociada con el polipéptido, incluyendo, sin limitación, actividad angiogénica, actividad enzimática, interacción proteica, enlazamiento al receptor, enlazamiento al ligando, inducción de un factor de crecimiento, un evento de transducción de señales celulares, etc.

La divulgación también se refiere a métodos para distinguir entre subtipos de cáncer de mama, que comprende obtener una muestra de cáncer de mama de un sujeto, determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra y determinar el subtipo de cáncer basado en el patrón de expresión y/o actividad. En un aspecto, el método se utiliza para distinguir entre los cánceres de mama ER negativos y ER positivos. En otro aspecto, el método se utiliza para distinguir entre los subtipos basales, Her2/neu y luminal.

La divulgación se refiere además a métodos para distinguir entre cánceres de mama in situ e invasivos, que comprende obtener una muestra de cáncer de mama de un sujeto, determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra y determinar el tipo de cáncer basado en el patrón de expresión y/o actividad.

Un aspecto de la divulgación se refiere al uso de los marcadores identificados de angiogénesis para monitorizar la regulación de la angiogénesis debido a enfermedad o tratamiento de la enfermedad. En un aspecto, la divulgación

se refiere a métodos para monitorizar la efectividad de un tratamiento para cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra de un sujeto que ha recibido tratamiento para cáncer, determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos enumerados en Tabla 1 en la muestra, y comparar el nivel de expresión y/o actividad con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control, en donde una disminución en el nivel de expresión y/o actividad en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de la efectividad del tratamiento.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para controlar la progresión del cáncer en un sujeto, que comprende obtener una muestra de un sujeto que tiene cáncer, determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en la muestra, y comparar el nivel de expresión y/o actividad con el nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control, en donde un incremento en el nivel de expresión y/o actividad en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de la progresión del cáncer .

La muestra de control puede ser de una porción normal (es decir, no enferma) del mismo tipo de tejido o célula en el sujeto, de un tipo de tejido o célula diferente en el sujeto, de un individuo emparejado o puede ser un estándar derivado del promedio de mediciones tomadas de una población de sujetos. En otro aspecto, la muestra de control puede ser del tejido de la enfermedad del sujeto, por ejemplo, en el momento del diagnóstico, antes del tratamiento o después de una etapa de tratamiento.

En cada uno de estos aspectos, se puede determinar un nivel basal de expresión y/o actividad sobre el diagnóstico inicial de cáncer o antes del primer tratamiento. Después de establecer una línea base, la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos se pueden determinar repetidamente, por ejemplo, en un horario regular (por ejemplo, una vez cada 2, 3, 4, 5 o 6 días, 1, 2, 3 o 4 semanas, o más) o según se desee (por ejemplo, después de cada tratamiento terapéutico). La expresión y/o la actividad se pueden determinar como se ha descrito anteriormente, y pueden estar en el nivel de ácido nucleico o polipéptido. La información obtenida de la monitorización puede usarse para modificar el tratamiento que recibe el sujeto.

Un aspecto de la divulgación se refiere a kits útiles para llevar a cabo los métodos de la invención. Un aspecto se refiere a kits para evaluar la angiogénesis, que comprende un reactivo para determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1. Otra realización se refiere a kits para diagnosticar cáncer, que comprende un reactivo para determinar la expresión y/o la actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1. En cada realización, los kits pueden contener reactivos para determinar la expresión y/o la actividad de 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, o más polipéptidos listados en la Tabla 1. Los reactivos pueden ser ácidos nucleicos (por ejemplo, un oligonucleótido que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1 y puede usarse como sonda de hibridación o un cebador de amplificación), anticuerpos (por ejemplo uno que se une específicamente a un polipéptido listado en la Tabla 1), u otros agentes que reconocen específicamente los polinucleótidos o polipéptidos de la invención.

Los reactivos pueden conjugarse con una etiqueta detectable o marcador detectable. Tal etiqueta puede ser cualquier etiqueta adecuada que permita la detección de los reactivos e incluye, pero no se limita a, cualquier composición o marcador detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente divulgación incluyen biotina para tinción con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

Además, los reactivos pueden inmovilizarse sobre un sustrato. Tal sustrato puede incluir cualquier sustrato adecuado para la inmovilización de un reactivo de detección tal como se utilizaría en cualquiera de los métodos de detección descritos anteriormente. En resumen, un sustrato adecuado para la inmovilización de un reactivo de detección incluye cualquier soporte sólido, tal como cualquier soporte orgánico sólido, biopolímero o inorgánico que pueda formar una unión con el reactivo de detección sin afectar significativamente la actividad y/o capacidad del reactivo de detección para detectar la molécula objetivo deseada. Soportes sólidos orgánicos de ejemplo incluyen polímeros tales como poliestireno, nailon, resinas de fenol-formaldehído, copolímeros acrílicos (por ejemplo, poliacrilamida), células enteras intactas estabilizadas y homogeneizados de células enteras crudas estabilizadas /membranas. Soportes de biopolímeros de ejemplo incluyen celulosa, polidextranos (por ejemplo, Sephadex®), agarosa, colágeno y quitina. Soportes inorgánicos de ejemplo incluyen perlas de vidrio (porosas y no porosas), acero inoxidable, óxidos metálicos (por ejemplo cerámicas porosas tales como ZrO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , y NiO) y arena.

Los kits pueden comprender además otros componentes útiles para detectar expresión o actividad, por ejemplo, reguladores, células, medios de cultivo, enzimas, reactivos de marcaje, recipientes, etc.

5 En un aspecto, el kit comprende un arreglo de reactivos para determinar la expresión y/o la actividad. El arreglo puede comprender un sustrato que tiene una pluralidad de direcciones. Al menos una dirección de la pluralidad incluye una sonda de captura que se une específicamente a un polinucleótido o polipéptido de la invención. El arreglo puede comprender sondas de captura que corresponden a 5, 10, 15, 20, 25 o más de los polipéptidos listados en la Tabla 1. El arreglo puede tener una densidad de al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500, 700, 1.000, 2.000, 5.000 o 10.000 o más direcciones/cm², y varía entre. El sustrato puede ser un sustrato bidimensional tal como láminas de vidrio, una oblea (por ejemplo, de sílica o plástico), una placa de espectroscopia de masas o un sustrato tridimensional tal como una almohadilla de gel. Las direcciones además de direcciones de la pluralidad pueden estar dispuestas en el arreglo.

15 En un aspecto, al menos una dirección de la pluralidad incluye una sonda de captura de ácido nucleico que hibrida específicamente con un polinucleótido de la divulgación, por ejemplo, la cadena en sentido o antisentido. Cada dirección del subconjunto puede incluir una sonda de captura que hibrida con una región diferente de un polinucleótido. Un arreglo puede ser generado por cualquiera de una variedad de métodos. Métodos apropiados incluyen, por ejemplo, métodos fotolitográficos (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,143,854; 5,510,270; y 5,527,681), métodos mecánicos (por ejemplo, procedimientos de flujo dirigido como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,384,261) métodos basados en pasadores (por ejemplo, como se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5,288,514), y técnicas basadas en perlas (por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/022684).

20 En otro aspecto, al menos una dirección de la pluralidad incluye una sonda de captura de polipéptido que se une específicamente a un polipéptido de la invención o fragmento del misma. La sonda de captura del polipéptido puede ser un asociado de interacción de origen natural de un polipéptido listado en la Tabla 1, por ejemplo, en el que el polipéptido es un receptor o un receptor en el que el polipéptido es un ligando. En un aspecto, el polipéptido es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo específico para un polipéptido listado en la Tabla 1, tal como un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monocatenario.

VI. Ensayos de detección y modelos animales

30 La identificación de polinucleótidos y polipéptidos que son sobrerregulados en vasos sanguíneos tumorales provee objetivos que pueden usarse para cribar agentes que regulan la angiogénesis así como modelos para estudiar el proceso de angiogénesis in vitro o en animales.

35 Un aspecto de la divulgación se refiere a métodos para identificar un compuesto que regula la angiogénesis, que comprende determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo y seleccionar un compuesto que incrementa o disminuye el nivel de expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos en relación con el nivel en ausencia del compuesto, como un compuesto que regula la angiogénesis.

40 Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para identificar un compuesto útil para la inhibición del crecimiento tumoral o metástasis, que comprende determinar la expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos listados en la Tabla 1 en presencia y ausencia de un compuesto de prueba y seleccionar un compuesto que incrementa el nivel de expresión y/o actividad de uno o más polipéptidos en relación con el nivel en ausencia del compuesto, como un compuesto útil para la inhibición del crecimiento tumoral o metástasis.

45 En cada aspecto anterior, el ensayo puede ser un ensayo basado en células o sin células. En un aspecto, la célula puede ser una célula primaria, por ejemplo, una célula endotelial o una célula tumoral, tal como una célula de tumor de mama. En otro aspecto, la célula es de una línea celular, por ejemplo, una línea celular endotelial o una línea celular tumoral. Las células endoteliales y las líneas celulares incluyen, sin limitación, HUVEC, HCEC, HGEC, HMEC-1, HUV-ST, ECY304, ECV304 y EA.hy926. La célula puede ponerse en contacto con el compuesto in vitro (por ejemplo, en un plato de cultivo) o en un animal (por ejemplo, un animal transgénico o un modelo animal). En un aspecto, el incremento o disminución detectados en la expresión y/o actividad es estadísticamente significativo, por ejemplo, al menos $p < 0,05$, por ejemplo, $p < 0,01$, $0,005$ o $0,001$. En otro aspecto, el incremento o disminución detectado es al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más.

Cualquier punto final deseado se puede detectar en un ensayo de cribado, por ejemplo, enlazamiento al polipéptido, gen o ARN, modulación de la actividad del polipéptido, modulación de rutas relacionadas con la angiogénesis y/o interferencia con el enlazamiento por un regulador conocido de un polinucleótido o polipéptido. Los métodos de detección de las actividades anteriores son conocidos en la técnica e incluyen los métodos divulgados aquí.

5 Cualquier compuesto de interés se puede cribar de acuerdo con la presente divulgación. Compuestos de prueba adecuados incluyen moléculas orgánicas e inorgánicas. Las moléculas orgánicas adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas pequeñas (compuestos de menos de aproximadamente 1000 Daltons), polipéptidos (incluyendo enzimas, anticuerpos y fragmentos Fab'), carbohidratos, lípidos, coenzimas y moléculas de ácido nucleico (incluyendo ADN, y quiméricos y análogos de los mismos) y nucleótidos y análogos de nucleótidos. En
10 aspectos particulares, el compuesto es un ácido nucleico antisentido, un ARNsi o una ribozima que inhibe la producción de un polipéptido listado en la Tabla 1.

Además, los métodos de la divulgación se pueden practicar para cribar una biblioteca de compuestos, por ejemplo, una biblioteca de moléculas pequeñas, una biblioteca combinatoria de compuestos químicos, una biblioteca de polipéptidos, una biblioteca de ADNc, una biblioteca de ácidos nucleicos antisentido y similares, o una colección
15 dispuesta de compuestos tales como arreglos de polipéptidos y ácido nucleico.

En un aspecto representativo, la divulgación provee métodos de cribado de compuestos de prueba para identificar un compuesto de prueba que se une a un polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo. Los compuestos que se identifican como que se enlazan al polipéptido o al fragmento funcional pueden someterse a
20 cribado adicional (por ejemplo, para la modulación de la angiogénesis) usando los métodos descritos aquí u otras técnicas adecuadas.

También se proveen métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos que modulan la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo. El término "modular" se refiere a compuestos que potencian (por ejemplo, incrementan) o inhiben (por ejemplo, reducen) la actividad del polipéptido (o fragmento
25 funcional). Por ejemplo, se puede evaluar la interacción del polipéptido o fragmento funcional con un asociado de enlazamiento. Como otra alternativa, los métodos físicos, tales como la RMN, pueden usarse para evaluar la función biológica. La actividad de los polipéptidos listados en la Tabla 1 o fragmento funcional se puede evaluar por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los métodos descritos aquí.

Los compuestos que se identifican como moduladores de la actividad pueden opcionalmente ser seleccionados adicionalmente usando los métodos descritos aquí (por ejemplo, para el enlazamiento al polipéptido listado en la
30 Tabla 1 o fragmento funcional del mismo, polinucleótido o ARN, modulación de mineralización y similares). El compuesto puede interactuar directamente con el polipéptido o fragmento funcional, polinucleótido o mRNA y, de este modo, modular su actividad. Alternativamente, el compuesto puede interactuar con cualquier otro polipéptido, ácido nucleico u otra molécula, siempre que la interacción de como resultado una modulación de la actividad del polipéptido o fragmento funcional.

35 Como otro aspecto, la divulgación provee un método para identificar compuestos que modulan la angiogénesis. En un aspecto representativo, el método comprende poner en contacto un polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo con un compuesto de prueba; y detectar si el compuesto de prueba se enlaza al polipéptido o fragmento funcional y/o modula la actividad del polipéptido (o fragmento). En otro aspecto de ejemplo, el método comprende introducir un compuesto de prueba en una célula que comprende el polipéptido listado en la Tabla 1 o
40 fragmento funcional; y detectar si el compuesto se une al polipéptido o fragmento funcional y/o modula la actividad del polipéptido o fragmento funcional en la célula. El polipéptido puede producirse endógenamente en la célula. Alternativamente o adicionalmente, la célula puede ser modificada para comprender un polinucleótido aislado que codifica, y opcionalmente que sobreexpresa, el polipéptido o fragmento funcional del mismo.

El ensayo de cribado puede ser un ensayo basado en células o sin células. Además, el polipéptido listado en la
45 Tabla 1 (o fragmento funcional del mismo) o polinucleótido puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, expresado en una superficie celular o situado dentro de una célula.

Con respecto a los ensayos de enlazamiento libres de células, los compuestos de prueba pueden sintetizarse o fijarse de otro modo a un sustrato sólido, tales como pasadores de plástico, láminas de vidrio, pozos de plástico y similares. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y
50 estreptavidina mediante técnicas bien conocidas en el arte. Los compuestos de prueba se ponen en contacto con el polipéptido o su fragmento funcional y se lavan. El polipéptido enlazado puede detectarse usando técnicas estándar

en la técnica (por ejemplo, mediante marcaje radioactivo o de fluorescencia del polipéptido o fragmento funcional, por métodos ELISA y similares).

5 Alternativamente, el objetivo puede inmovilizarse en un sustrato sólido y los compuestos de prueba se ponen en contacto con el polipéptido enlazado o fragmento funcional del mismo. La identificación de los compuestos de prueba que se enlazan y/o modulan el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional puede llevarse a cabo con técnicas de rutina. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Como otro ejemplo ilustrativo, los anticuerpos reactivos con el polipéptido o fragmento funcional pueden unirse a los pozos de la placa, y el polipéptido atrapado en los pozos por conjugación de anticuerpos. Las preparaciones de compuestos de prueba pueden
10 incubarse en los pozos que presentan el polipéptido (o fragmento funcional) y la cantidad de complejo atrapado en el pozo puede cuantificarse.

En otro aspecto representativo, se puede proveer una proteína de fusión que comprende un dominio que facilita el enlazamiento del polipéptido a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas
15 con glutatión, que luego se combinan con lisados celulares (por ejemplo marcados con ³⁵S) y el compuesto de prueba, y la mezcla se incuba bajo condiciones que conducen a la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas se lavan para eliminar cualquier marcador no unido, y la matriz inmovilizada y radiomarcadora se detecta directamente, o en el sobrenadante después de que los complejos están disociados. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz,
20 separados por SDS-PAGE, y el nivel de polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo encontrado en la fracción de perlas cuantificada a partir del gel usando técnicas electroforéticas estándar.

Otra técnica para el cribado de compuestos provee un cribado de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada al polipéptido de interés, tal como se describe en la solicitud PCT publicada WO84/03564. En este método, un gran número de diferentes compuestos de prueba pequeños se sintetizan sobre
25 un sustrato sólido, tal como pasadores de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de prueba se hacen reaccionar con el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo y se lavan. El polipéptido unido se detecta entonces mediante métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido purificado o un fragmento funcional también puede recubrirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de detección de fármacos anteriormente mencionadas. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido
30 e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Con respecto a los ensayos basados en células, se puede utilizar cualquier célula adecuada, incluyendo bacterias, levaduras, células de insecto (por ejemplo, con un sistema de expresión de baculovirus), células aviares, células de mamíferos, o células vegetales. En aspectos de ejemplo, el ensayo se lleva a cabo en una línea celular que expresa de forma natural el polinucleótido o produce el polipéptido, por ejemplo, células endoteliales o pericitos. Además, en
35 otros aspectos, es deseable usar células no transformadas (por ejemplo, células primarias) ya que la transformación puede alterar la función del polipéptido.

El ensayo de cribado puede usarse para detectar compuestos que se unen o modulan la actividad del polipéptido nativo listado en la Tabla 1 (por ejemplo, polipéptido que normalmente se produce por la célula). Alternativamente, la célula puede ser modificada para expresar (por ejemplo, sobreexpresar) un polipéptido recombinante o fragmento
40 funcional del mismo. De acuerdo con esta realización, la célula puede transformarse transitoriamente o de forma estable con un polinucleótido que codifica el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional, pero preferiblemente se transforma de forma estable, por ejemplo, mediante integración estable en el genoma del organismo o por expresión de un episoma mantenido de forma estable (por ejemplo, episomas derivados de Virus Epstein Barr). En otro aspecto, un polinucleótido que codifica una molécula informadora puede estar enlazado a un
45 elemento regulador del polinucleótido que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1 y utilizado para identificar compuestos que modulan la expresión del polipéptido.

En un ensayo basado en células, el compuesto que va a ser cribado puede interactuar directamente con el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo (es decir, unirse a él) y modular su actividad. Alternativamente, el compuesto puede ser uno que modula la actividad del polipéptido (o la actividad de un
50 fragmento funcional) al nivel del ácido nucleico. Para ilustrar, el compuesto puede modular la transcripción del gen (o transgén), modular la acumulación de mRNA (por ejemplo, afectando la tasa de transcripción y/o la rotación del mRNA), y/o modular la tasa y/o cantidad de traducción del transcripto de mRNA.

5 Como un tipo adicional de ensayo de unión a base de células, el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo puede usarse como una "proteína cebo" en un ensayo de dos híbridos o tres híbridos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,283,317, Zervos et al., Cell 72: 223 (1993), Madura et al., J. Biol. Chem. 268: 12046 (1993), Bartel et al., Biotechniques 14: 920 (1993), Iwabuchi et al. Oncogene 8: 1693 (1993) y la publicación PCT WO94/10300), para identificar otros polipéptidos que se unen o interactúan con el polipéptido de la invención o fragmento funcional del mismo.

10 El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios separables de unión al ADN y de activación. En resumen, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el polinucleótido que codifica el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo se fusiona con un ácido nucleico que codifica el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En el otro constructo, se fusiona una secuencia de ADN, opcionalmente a partir de una biblioteca de secuencias de ADN, que codifica una proteína no identificada ("presa" o "muestra") a un ácido nucleico que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas "cebo" y "presa" son capaces de interactuar in vivo, formando un complejo, los dominios de unión al ADN y de activación del factor de transcripción se acercan a la proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de una secuencia informadora (por ejemplo, LacZ), que está operativamente enlazada a un sitio regulador transcripcional sensible al factor de transcripción. La expresión del informador puede ser detectada y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional pueden aislarse y usarse para obtener el ácido nucleico que codifica el polipéptido que exhibe unión al polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional.

20 Como otro ensayo basado en células, la divulgación provee un método de selección de un compuesto para la modulación de la angiogénesis. En aspectos particulares, la célula comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo. De acuerdo con este aspecto, se prefiere que el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido o fragmento funcional se incorpore de forma estable en la célula (es decir, mediante integración estable en el genoma del organismo o por expresión a partir de un episoma mantenido de forma estable tal como episomas derivados del virus Epstein Barr).

25 Los ensayos de cribado también pueden llevarse a cabo in vivo en animales. Por lo tanto, como todavía un aspecto adicional, la divulgación provee un animal no humano transgénico que comprende un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento funcional del mismo, que puede producirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. El animal transgénico no humano puede ser de cualquier especie, incluyendo aves y mamíferos no humanos. De acuerdo con este aspecto de la divulgación, los mamíferos no humanos adecuados incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, cabras, ovejas, cerdos y ganado vacuno. Los aviares apropiados incluyen pollos, patos, gansos, codornices, pavos, y faisanes.

30 El polinucleótido que codifica el polipéptido o fragmento funcional puede incorporarse de forma estable en células dentro del animal transgénico (típicamente, mediante integración estable en el genoma o por constructos episómicos mantenidos de forma estable). No es necesario que cada célula contenga el transgén, y el animal pueda ser una quimera de células modificadas y no modificadas, siempre y cuando un número suficiente de células comprendan y expresen el polinucleótido que codifica el polipéptido o fragmento funcional para que el animal sea útil herramienta de selección.

35 Métodos de ejemplo de utilización de los animales transgénicos no humanos de la invención para el cribado in vivo de compuestos que modulan la angiogénesis, el crecimiento tumoral, la metástasis y/o la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1 comprenden administrar un compuesto de prueba a un animal no humano transgénico (por ejemplo, un mamífero tal como un ratón) que comprende un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1 o un fragmento funcional del mismo incorporado de forma estable en el genoma y que detecta si el compuesto de ensayo modula la angiogénesis, el crecimiento tumoral, la metástasis y/ o la actividad del polipéptido (o la actividad de un fragmento funcional).

40 Se conoce en la técnica cómo medir estas respuestas in vivo. Los enfoques ilustrativos incluyen la observación de cambios que se pueden estudiar mediante examen macroscópico (por ejemplo, formación de túbulos y vasos sanguíneos), histopatología, marcadores celulares y actividad enzimática.

45 En la técnica se conocen métodos para producir animales transgénicos. Los constructos de ADN o ARN pueden introducirse en la línea germinal de un ave o mamífero para hacer un animal transgénico. Por ejemplo, una o varias copias del constructo pueden incorporarse al genoma de un embrión mediante técnicas transgénicas estándar.

5 En un aspecto de ejemplo, se produce un animal transgénico no humano introduciendo un transgén en la línea germinal del animal no humano. Los transgenes se pueden introducir en las células objetivo embrionarias en diversas etapas de desarrollo. Se utilizan diferentes métodos dependiendo de la etapa de desarrollo de la célula objetivo embrionaria. La línea o líneas específicas de cualquier animal utilizado deben ser, si es posible, seleccionadas para una buena salud general, buenos rendimientos embrionarios, buena visibilidad pronuclear en el embrión y buena capacidad reproductora.

10 La introducción del transgén en el embrión puede realizarse por cualquiera de una variedad de medios conocidos en la técnica tales como microinyección, electroporación, lipofección o un vector viral. Por ejemplo, el transgén puede introducirse en un mamífero por microinyección del constructo en los pronúcleos del óvulo de mamíferos fertilizados para hacer que una o más copias del constructo sean retenidas en las células del (de los) mamífero (s) en desarrollo. Después de la introducción del constructo transgénico en el óvulo fertilizado, el óvulo puede incubarse in vitro durante cantidades variables de tiempo, o reimplantarse en el huésped sustituto, o ambos. Un método común es incubar los embriones in vitro durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y luego reimplantarlos en el huésped sustituto.

15 La progenie de los embriones transgénicamente manipulados puede ser probada para detectar la presencia del constructo mediante análisis por transferencia Southern de un segmento de tejido. Un embrión que tiene una o más copias del constructo clonado exógeno integrado de forma estable en el genoma puede usarse para establecer una línea animal transgénica permanente.

20 Los animales alterados transgénicamente pueden ser ensayados después del nacimiento para la incorporación del constructo en el genoma de la descendencia. Esto puede hacerse hibridando una sonda correspondiente a la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido o un segmento del mismo sobre el material cromosómico de la progenie. Aquellas progenies que se ha encontrado que contienen al menos una copia del constructo en su genoma se hacen madurar.

25 También se conocen métodos de producción de aves transgénicas en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,162,215.

30 En aspectos particulares, para crear un modelo animal en el que se disminuye la actividad o expresión de un polipéptido listado en la Tabla 1, es deseable inactivar, reemplazar o anular el gen endógeno que codifica el polipéptido mediante recombinación homóloga con un transgén usando células madre de embrión. En este contexto, se entiende que un transgén se refiere a ácido nucleico heterólogo que al insertarse dentro o adyacente al gen da como resultado una disminución o inactivación de la expresión o la cantidad o actividad del polipéptido.

35 Una anulación de un gen significa una alteración en la secuencia de un gen que da como resultado una disminución de la función del gen, preferiblemente de tal manera que la expresión del gen o la cantidad o actividad del polipéptido sea indetectable o insignificante. Las anulaciones tal como se usan aquí incluyen también anulaciones condicionales, en los que la alteración del gen puede producirse, por ejemplo, mediante la exposición del animal a una sustancia que promueve la alteración génica (por ejemplo tetraciclina o ecdisona), la introducción de una enzima que promueve recombinación en un sitio del gen (por ejemplo, Cre en el sistema Cre-lox), u otro método para dirigir la alteración genética después del nacimiento. Los animales anulados pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hogan, et al. (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

40 Un constructo anulado es una secuencia de ácido nucleico, tal como un constructo de ADN o ARN, que, cuando se introduce en una célula, da como resultado la supresión (parcial o completa) de la expresión de un polipéptido codificado por ADN endógeno en la célula. Un constructo anulado tal como se utiliza aquí puede incluir un constructo que contiene un primer fragmento del extremo 5' del gen que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1, un segundo fragmento del extremo 3' del gen y un fragmento de ADN que codifica un marcador seleccionable colocado entre el primer y segundo fragmentos. Debe ser entendido por el experto en la técnica que cualquier fragmento 5' y 45 3' adecuado de un gen puede usarse mientras la expresión del gen correspondiente se suprime parcial o completamente mediante la inserción del transgén. Los marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero no se limitan a, neomicina, puromicina e higromicina. Además, el constructo puede contener un marcador, tal como la toxina A de difteria o la timidina quinasa, para incrementar la frecuencia de obtención de células correctamente 50 direccionadas. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, pBLUESCRIPT, pBR322 y pGEM7.

- Alternativamente, un constructo anulado puede contener moléculas de ARN tales como ARN antisentido, ARNsi y similares para disminuir la expresión de un gen que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1. Típicamente, para expresión estable la molécula de ARN se coloca bajo el control de un promotor. El promotor puede ser regulado, si las deficiencias en la proteína de interés pueden conducir a un fenotipo letal, o el promotor puede impulsar la expresión constitutiva de la molécula de ARN de tal manera que el gen de interés se silencie bajo todas las condiciones de crecimiento. Mientras que la recombinación homóloga entre el constructo anulado y el gen de interés puede no ser necesaria cuando se usa una molécula de ARN para disminuir la expresión génica, puede ser ventajoso direccionar el constructo anulado a una ubicación particular en el genoma del organismo huésped de tal manera que los fenotipos no deseados no se generan por inserción aleatoria del constructo anulado.
- El constructo anulado puede ser subsecuentemente incorporado en un vector viral o no viral para su suministro al animal huésped o puede introducirse en células madre de embrión (ES). Las células ES se seleccionan típicamente por su capacidad para integrarse y convertirse en parte de la línea germinal de un embrión en desarrollo de tal manera que crea la transmisión de la línea germinal del constructo anulado. Por lo tanto, cualquier línea de células ES que pueda hacerlo es adecuada para su uso en la presente invención. Líneas celulares adecuadas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la línea celular 129J ES o la línea celular J1 ES. Las células se cultivan y se preparan para la inserción de ADN usando métodos bien conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo, véase Robertson (1987) In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, EJ Robertson, ed. Bradley et al., Curr. Topics Develop. Biol. 20: 357 (1986), Hogan et al., (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- La inserción del constructo anulado en las células ES puede realizarse usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, electroporación, microinyección y tratamiento con fosfato de calcio. Para la inserción de la secuencia de ADN o ARN, se añaden los ácidos nucleicos de construcción anulado a las células ES bajo condiciones apropiadas para el método de inserción elegido. Si las células van a ser electroporadas, las células ES y los ácidos nucleicos del constructo se exponen a un pulso eléctrico usando una máquina de electroporación (electroporador) y siguiendo las directrices del fabricante para su uso. Después de la electroporación, se deja que las células se recuperen bajo condiciones de incubación adecuadas. A continuación, las células son cribadas para detectar la presencia del constructo anulado.
- Cada constructo anulado que se va a introducir en la celda primero se linealiza de manera típica si el constructo anulado se ha insertado en un vector. La linealización se logra digiriendo el constructo anulado con una endonucleasa de restricción adecuada seleccionada para cortar solamente dentro de la secuencia del vector y no dentro de la secuencia del constructo anulado.
- El cribado para las células que contienen el constructo anulado (recombinantes homólogos) se puede hacer usando una variedad de métodos. Por ejemplo, tal como se describe aquí, las células pueden procesarse según sea necesario para hacer que el ADN en ellas esté disponible para la hibridación con una sonda de ácido nucleico diseñada para hibridarse solamente con células que contienen el constructo. Por ejemplo, el ADN celular puede ser sondeado con ADN marcado con ³²P que se localiza fuera del fragmento objetivo. Esta técnica se puede utilizar para identificar esas células con la integración apropiada del constructo anulado. El ADN se puede extraer de las células usando métodos estándar (por ejemplo, véase Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989)). El DNA puede entonces ser analizado por transferencia Southern con una sonda o sondas diseñadas para hibridarse en un patrón específico al ADN genómico digerido con una o más enzimas de restricción particulares.
- Una vez que se identifican las células ES apropiadas, se introducen en un embrión utilizando métodos estándar. Pueden introducirse por microinyección, por ejemplo. Se obtienen embriones en la etapa apropiada de desarrollo para la integración de la célula ES que se produce, tal como por perfusión del útero de mujeres embarazadas. Por ejemplo, los embriones de ratón a los 3-4 días de desarrollo pueden obtenerse e inyectarse con células ES usando una micropipeta. Después de la introducción de la célula ES en el embrión, el embrión se introduce en el útero de un ratón hembra pseudopregnant. La etapa de la seudopre- nancia se selecciona para aumentar las posibilidades de implantación exitosa. En ratones, son apropiadas las hembras pseudoembarazadas de 2-3 días.
- La transmisión en línea germinal del constructo anulado se puede determinar usando métodos estándar. La genotipia resultante de la implantación de embriones que contienen las células ES descritas anteriormente se examinan en busca de la presencia de la alteración deseada (por ejemplo, anulación del polipéptido listado en la Tabla 1). Esto puede hacerse, por ejemplo, obteniendo ADN de progenie (por ejemplo, ADN de cola) para evaluar el

constructo anulado, usando métodos conocidos (por ejemplo, análisis Southern, análisis inmunoprecipitación de mancha, análisis PCR). Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989). La genotipia identificada como quimeras puede cruzarse entre sí para producir animales con eliminación de homocigóticos.

- 5 Los ratones se usan frecuentemente como modelos animales porque son fáciles de albergar, relativamente baratos y fáciles de criar. Sin embargo, también se pueden hacer otros animales anulados de acuerdo con la presente invención tales como, pero sin limitarse a, monos, ganado, ovejas, cerdos, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos y ratas. Por consiguiente, se pueden seleccionar y utilizar vectores y promotores apropiados bien conocidos en la técnica para generar un animal transgénico deficiente en la expresión de un polipéptido listado en la Tabla 1.
- 10 En otro aspecto, pueden crearse modelos animales usando animales que no son transgénicos. Por ejemplo, se pueden usar modelos de tumores (por ejemplo, creados mediante la administración de células tumorigénicas en animales inmunocomprometidos) para estudiar los efectos de los reguladores de la angiogénesis sobre el crecimiento tumoral y la metástasis. En otro ejemplo, las células tumorigénicas que sobreexpresan o subexpresan un polipéptido listado en la Tabla 1 pueden suministrarse a un animal bajo condiciones en las que se desarrollan
- 15 tumores a partir de las células. El crecimiento tumoral en los animales puede compararse con el crecimiento tumoral en animales que contienen células que no sobreexpresan o subexpresan el polipéptido.

VIII. Composiciones farmacéuticas

- Como un aspecto adicional, la divulgación provee formulaciones farmacéuticas y métodos de administración de la misma para lograr cualquiera de los efectos terapéuticos (por ejemplo, inhibición o estimulación de la angiogénesis)
- 20 discutidos anteriormente. La formulación farmacéutica puede comprender cualquiera de los reactivos descritos anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido listado en la Tabla 1 o un fragmento del mismo, un polipéptido listado en la Tabla 1 o fragmento del mismo, un anticuerpo contra un polipéptido listado en Tabla 1, un oligonucleótido antisentido, una molécula de ARNsi, una ribozima, un aptámero, un peptidomimético, una molécula pequeña, o cualquier otro compuesto que
- 25 modula la actividad de un polipéptido listado en la Tabla 1, incluyendo compuestos identificados por los métodos de cribado descritos aquí.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable tal como toxicidad.

- Las formulaciones de la divulgación pueden comprender opcionalmente agentes medicinales, agentes
- 30 farmacéuticos, portadores, adyuvantes, agentes dispersantes, diluyentes y similares.

- Los compuestos de la divulgación pueden formularse para administración en un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (9ª edición, 1995). En la fabricación de una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, el compuesto (incluyendo sus sales fisiológicamente aceptables) se mezcla típicamente, entre otros, con un vehículo aceptable. El vehículo puede ser un
- 35 sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta, que puede contener desde 0,01% o 0,5% a 95% o 99% en peso del compuesto. Se pueden incorporar uno o más compuestos en las formulaciones de la divulgación, que pueden prepararse mediante cualquiera de las técnicas bien conocidas de farmacia.

- Un aspecto adicional de la divulgación es un método para tratar sujetos in vivo, que comprende administrar a un
- 40 sujeto una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La administración de los compuestos de la presente invención a un sujeto humano oa un animal en necesidad del mismo puede ser por cualquier medio conocido en la técnica para administrar compuestos.

- Las formulaciones de la divulgación incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica, bucal (por
- 45 ejemplo, sublingual), vaginal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular incluyendo músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo de diafragma y músculo liso, intradérmico, intraperitoneal), tópica (es decir, tanto superficies de la piel como de las mucosas, incluidas las superficies de las vías respiratorias), intranasal, transdérmica, intraarticular, intratecal e inhalatoria, administración al hígado por suministro intraporal, así como
- 50 inyección directa a órganos, (por ejemplo, en el hígado, en el cerebro para su administración al sistema nervioso central, al páncreas, o a un tumor o al tejido que rodea al tumor). La ruta más adecuada en un caso dado dependerá

de la naturaleza y gravedad de la condición que se esté tratando y de la naturaleza del compuesto particular que se está utilizando.

5 Para inyección, el vehículo será típicamente un líquido, tal como agua estéril exenta de pirógenos, solución salina regulada con fosfato exenta de pirógenos, agua bacteriostática o Cremophor EL[R] (BASF, Parsippany, N.J.). Para otros métodos de administración, el vehículo puede ser sólido o líquido.

10 Para la administración oral, el compuesto puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. Los compuestos pueden encapsularse en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y vehículos en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y similares. Ejemplos de ingredientes inactivos
15 adicionales que pueden añadirse para proveer color, sabor, estabilidad, capacidad de regulación y dispersión deseables u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, sílica gel, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden usar diluyentes similares para preparar tabletas comprimidas. Tanto las tabletas como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proveer liberación continua de la medicación durante un período de horas. Las tabletas comprimidas pueden recubrirse con azúcar o recubrirse con película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera o recubrirse con un recubrimiento entérico para desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para incrementar la aceptación del paciente.

20 Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen comprimidos para deshacer en la boca que comprenden el compuesto en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; Y pastillas que comprenden el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

25 Las formulaciones de la presente divulgación adecuadas para la administración parenteral comprenden soluciones de inyección acuosas y no acuosas estériles del compuesto, preparaciones que preferiblemente son isotónicas con la sangre del receptor deseado. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes unitarios o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo
30 líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua-para-inyección inmediatamente antes del uso.

Pueden prepararse soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo anteriormente descrito. Por ejemplo, en un aspecto de la presente divulgación, se provee una composición estéril, estable e inyectable que comprende un compuesto de la invención, en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. El compuesto o sal se provee en forma de un liofilizado que es capaz
35 de ser reconstituido con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para su inyección en un sujeto. La forma de dosificación unitaria comprende típicamente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10 gramos del compuesto o sal. Cuando el compuesto o sal es substancialmente insoluble en agua, se puede emplear una cantidad suficiente de agente emulsionante que sea farmacéuticamente aceptable en cantidad suficiente para emulsionar el compuesto o sal en un vehículo acuoso. Uno
40 de tales agentes emulsionantes útiles es fosfatidilcolina.

Las formulaciones adecuadas para la administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Éstos se pueden preparar mezclando el compuesto con uno o más vehículos sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y luego moldeando la mezcla resultante.

45 Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica en la piel preferiblemente toman la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, aspersion, aerosol o aceite. Los vehículos que pueden usarse incluyen gel de petróleo, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de dos o más de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden administrarse por
50 iontoforesis (véase, por ejemplo, Tyle, Pharm. Res. 3: 318 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución

acuosa opcionalmente regulada del compuesto. Las formulaciones adecuadas comprenden citrato o regulador bis(tris) (pH 6) o etanol/agua y contienen de 0,1 a 0,2 M del compuesto.

5 El compuesto puede ser formulado alternativamente para administración nasal o administrado de otra manera a los pulmones de un sujeto por cualquier medio adecuado, por ejemplo, administrado por una suspensión en aerosol de partículas respirables que comprenden el compuesto, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. El término "aerosol" incluye cualquier fase suspendida de origen gaseoso, que es capaz de ser inhalada en los bronquiolos o en los conductos nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión de gotitas de origen gaseoso, tal como se puede producir en un inhalador de dosis medida o nebulizador, o en un pulverizador de neblina. El aerosol también incluye una composición de polvo seco suspendida en aire u otro gas portador, que puede suministrarse por insuflación desde un dispositivo inhalador, por ejemplo. Véase Ganderton y Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 6: 273 - 313; Y Raeburn et al., J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 27: 143 (1992). Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto pueden producirse por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador de aerosol a presión o un nebulizador ultrasónico, como es conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,501,729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto se pueden producir igualmente con cualquier generador de aerosol de medicamento en partículas sólidas, por técnicas conocidas en el arte farmacéutico.

Alternativamente, se puede administrar el compuesto de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

20 Además, la presente divulgación provee formulaciones liposómicas de los compuestos divulgados aquí y sus sales. La tecnología para formar suspensiones liposomales es bien conocida en la técnica. Cuando el compuesto o sal del mismo es una sal soluble en agua, usando tecnología de liposomas convencional, el mismo puede ser incorporado en vesículas lipídicas. En tal caso, debido a la solubilidad en agua del compuesto o sal, el compuesto o sal será sustancialmente arrastrado dentro del centro o núcleo hidrofílico de los liposomas. La capa lipídica empleada puede ser de cualquier composición convencional y puede contener colesterol o puede estar libre de colesterol. Cuando el compuesto o sal de interés es insoluble en agua, empleando de nuevo la tecnología convencional de formación de liposomas, la sal puede ser sustancialmente arrastrada dentro de la bicapa lipídica hidrófoba que forma la estructura del liposoma. En cualquier caso, los liposomas que se producen pueden ser reducidos en tamaño, tal como mediante el uso de técnicas estándar de sonicación y homogeneización.

30 Las formulaciones liposomales que contienen los compuestos divulgados aquí o sus sales pueden ser liofilizadas para producir un liofilizado que puede ser reconstituido con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua, para regenerar una suspensión liposomal.

35 En el caso de compuestos insolubles en agua, se puede preparar una composición farmacéutica que contiene el compuesto insoluble en agua, tal como por ejemplo, en una emulsión de base acuosa. En tal caso, la composición contendrá una cantidad suficiente de agente emulsionante farmacéuticamente aceptable para emulsionar la cantidad deseada del compuesto. Los agentes emulsionantes particularmente útiles incluyen fosfatidil colinas y lecitina.

40 En aspectos particulares, el compuesto se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva, tal como se define anteriormente. Las dosificaciones de compuestos farmacéuticamente activos pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa). La dosificación terapéuticamente efectiva de cualquier compuesto específico variará algo de compuesto a compuesto y de paciente a paciente y dependerá de la condición del paciente y de la ruta de administración. Como proposición general, una dosificación de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg tendrá eficacia terapéutica, calculándose todos los pesos basándose en el peso del compuesto, incluyendo los casos en los que se emplea una sal. Los problemas de toxicidad en el nivel superior pueden restringir las dosificaciones intravenosas a un nivel inferior tal como hasta aproximadamente 10 mg/kg, calculándose todos los pesos basándose en el peso del compuesto, incluyendo los casos en los que se emplea una sal. Se puede emplear una dosificación de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg para la administración oral. Típicamente, se puede emplear una dosificación de aproximadamente 0,5 mg/kg a 5 mg/kg para inyección intramuscular. Las dosificaciones particulares son de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/kg}$ a 50 $\mu\text{mol/kg}$, y más particularmente a aproximadamente 22 $\mu\text{mol/kg}$ y a 33 $\mu\text{mol/kg}$ del compuesto para administración intravenosa u oral, respectivamente.

En aspectos particulares de la divulgación, se puede emplear más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) a través de una variedad de intervalos de tiempo (por ejemplo, hora, diaria, semanal, mensual, etc.) para lograr efectos terapéuticos.

5 La presente invención encuentra su uso en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aviarios como mamíferos, prefiriéndose los mamíferos. El término "aviar", tal como se usa aquí, incluye, pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término "mamífero" tal como se usa aquí incluye, pero no se limita a, humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos incluyen neonatos, infantes, juveniles y adultos. En otras realizaciones, el sujeto es un modelo animal de enfermedad ósea.

10 La presente divulgación se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que se pretende que sean ilustrativos solamente puesto que numerosas modificaciones y variaciones en ellos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Ejemplo 1

Metodos experimentales

15 Fuente del tejido mamario: Los tejidos y tumores congelados utilizados se obtuvieron de la Lineberger Comprehensive Cancer Center Tissue Procurement and Analysis Core y se han obtenido de los pacientes que fueron debidamente informados y que han consentido a que su tejido obtenido para la investigación. El tejido se obtuvo a partir de tumores de mama primario en pacientes que no fueron tratados con quimioterapia neoadyuvante, o de pacientes sin cáncer sometidos a mamoplastia de reducción. Los tumores de mama utilizados para la
20 microdissección fueron ER⁺, Her2/neu- (inmunofenotipo A luminal).

Inmunohistoquímica para la microdissección por captura láser: Se fijaron porciones de tejido mamario congelado de forma instantánea en un compuesto OCT y se seccionaron a -35°C en un criostato a 8 µm sobre láminas de vidrio de membrana de polietileno naftalato (Arcturus Bioscience, Mt View, CA, catálogo # LCM0522). Se utilizó la técnica de RNAse libre durante todo el procedimiento y se usaron reguladores y soluciones de alcohol frescas cada vez. Las
25 láminas se fijaron en acetona durante 2 minutos a 4°C y se enjuagaron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Gibco, Grand Island, NY). Las láminas se incubaron con un anticuerpo antihumano de ratón contra el antígeno relacionado con el factor VIII (BioGenex, San Ramon, CA, catálogo # MU016-UC) a una dilución 1: 6 durante 7 minutos a 4°C. El IHC se realizó con el sistema DakoCytomation LSAB 2 (Carpintería, CA), un sistema de estreptavidina-biotina de tres etapas con las siguientes modificaciones. Después de lavar en HBSS, el enlace
30 biotinilado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se usó un revelador de fosfatasa alcalina BCIP/NBT (Vector Labs, Burlingame, CA) a una concentración muy alta (3 gotas/300 µl de regulador) y se incubó durante 10-15 minutos a 4°C. Las láminas se deshidrataron en ETOH al 75% durante 30 segundos, ETOH al 95% durante 30 segundos y ETOH al 100% durante 2 minutos (Arcturus, Mountain View, CA). Se añadió inhibidor de ARNasa protector (Roche, Indianapolis, IN) a una dilución 1:10 para todos los reguladores usados en el proceso de
35 tinción. Las láminas se colocaron en hielo seco hasta la microdissección, que ocurrió el mismo día que la inmunohistoquímica (IHC).

Microdissección por captura láser: La microdissección siguió inmediatamente a la preparación del tejido. La microdissección por captura láser se realizó en un Sistema de Microdissección Láser Leica. Los tejidos que se
40 microdisseccionaron se vieron a través de un microscopio de vídeo y la posición de la lámina se ajustó de tal manera que las células deseadas estaban bajo la luz de direccionamiento. La activación del láser UV corta el tejido alrededor de los grupos de células de interés. El tejido cortado se transportó entonces por gravedad a un tubo eppendorf que contenía 25 µl de regulador de extracción de ARN del Picopure ARN Extraction Kit™ (Arcturus, Mountain View, CA). Con el fin de mantener la integridad del ARN, las láminas se mantuvieron en hielo seco hasta la microdissección, y la
45 microdissección se realizó por no más de 15 minutos por lámina. Quince láminas fueron microdisseccionadas por muestra. El ARN se extrajo entonces con el Arcturus Picopure Extracción ARN Kit™ (Arcturus, Mountain View, CA) como se describe en las instrucciones del fabricante y seADN I tratado.

Amplificación de ARN: La amplificación de ARN se realizó utilizando un sistema de amplificación de dos rondas. En la primera ronda se utilizó el kit de amplificación de ARN RiboAmp® HS (Arcturus, Mountain View, CA). Quinientos
50 ng de la primera ronda de amplificación se pusieron en el Agilent Low-Input Fluorescente Linear ARN Amplification Kit™ (Palo Alto, CA). Esta segunda ronda empleó una amplificación de la polimerasa T7 que incorporó la sonda fluorescente en la preparación de análisis de microarreglos.

- 5 Análisis de la integridad del ARN: La integridad del ARN se verificó después de la primera ronda de amplificación antes de cada experimento de microarreglo usando detección RT-PCR de genes de diferentes niveles de abundancia y demostración de preparaciones de ADNc de longitud completa intactas con Kit de integridad de ADNc (KPL, Gaithersburg, Maryland)). Este último sistema utiliza conjuntos de cebadores y genes objetivo que permiten la evaluación de ADNc en proceso o de doble cadena para la presencia de transcritos de ADCc de longitud completa y extendida. Los conjuntos de cebadores amplifican regiones de los extremos 3' y 5' de los genes cuidadores GAPDH y el gen de factor I de ribosilación de ADP expresado bajo. La generación del producto usando los conjuntos de cebadores 3' indica que el gen se expresa en el sistema, y la producción de amplímeros utilizando los conjuntos de cebadores 5' indica el ADNc intacto de longitud completa.
- 10 Medición del sesgo de amplificación: Las células de cáncer de mama MDA-MB-435 se sembraron (2.5×10^6 células) en matraces de 75 cm² o placas de 100 mm en DMEM con suero bovino fetal al 10% y 100 U de penicilina-estreptomicina (Gibco). Después de 48 horas, el ARN total se extrajo utilizando el kit Qiagen RNeasy y se purificó con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA). Las muestras se sometieron solamente a una ronda de amplificación (Grupo A) o a dos rondas de amplificación (Grupo B). Los coeficientes de correlación entre arreglos se compararon con la correlación interclase (Hu et al., *Biotechniques* 38: 121 (2005)).
- 15 Experimentos de microarreglos: Se realizó la síntesis del ADNc marcado como se describió anteriormente con ADNc de referencia que es la Stratagene Human Universal Reference (Hu et al., *Biotechniques* 38: 121 (2005)) marcada con Cy3-dUTP y los ADNc de muestra marcados con Cy5-dUTP. Las hibridaciones de microarreglo se realizaron utilizando microarreglos de oligonucleótidos humanos de Agilent (basado en Agilent 1Av1 diseñado específicamente para líneas celulares y Agilent 44k para los especímenes diseccionados en vasos) como se describió previamente (Hu et al., *Biotechniques* 38: 121 (2005)). Se realizaron replicas técnicas (que se refieren a utilizar el mismo ARN de un tumor en dos microarreglos) para todos los especímenes de vasos diseccionados.
- 20 Normalización de datos, preprocesamiento y estadística: Se cuantificaron los valores de expresión génica utilizando la relación \log_2 de la intensidad del canal rojo normalizado de Lowess frente a la intensidad del canal verde (Yang et al., *Nucleic Acids Res.* 30: e15 (2002)). Se utilizó la base de datos UNC Microarray (genome.unc.edu) para realizar el filtrado y el preprocesamiento, y todos los datos están disponibles en el UMD y han sido depositados en el GEO bajo el número de acceso de GSE7413. Se realizó un SAM de dos clases (Significance Analysis of Microarrays, www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM) (Storey, *JR Stat. Soc. Series B:* 479 (2002), Tusher et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 98: 5116 (2001)) para identificar genes expresados significativamente de forma diferencial entre todas las 5 muestras vasculares tumorales frente a las 5 muestras vasculares normales. Cada muestra tenía un arreglo de replicación técnica, por lo tanto, había 10 arreglos en cada grupo que se utilizaron para el SAM. Con el fin de identificar los genes expresados diferencialmente que codifican membranas potenciales o proteínas secretadas, se realizó una búsqueda Gene Cards (www.genecards.org/index.shtml) para identificar la potencial localización subcelular de genes con una expresión incrementada de > 4 veces.
- 25 Con el fin de interpretar las listas de genes derivados de los resultados del SAM, y convertir la lista de genes en temas biológicos, se aplicó el análisis EASE (la Expression Analysis Systematic Explorer, david.abcc.ncifcrf.gov, david.abcc.ncifcrf.gov).
- 30 Identidad de tipos de células en células de vasos microdisseccionados: Se identificaron los tipos de células que comprenden los vasos microdisseccionados analizando la expresión de genes para genes que se sabe que se expresan selectivamente en poblaciones específicas de células (endoteliales, hematopoyéticas, pericitas y epiteliales) y comparando los perfiles de expresión génica de los especímenes de células vasculares a cultivos de células endoteliales in vitro y cultivos de células derivadas de tumores de mama in vitro. Los ARN totales de células endoteliales humanas se adquirieron de Cell Application Incorporation (San Diego, CA). El ARN total se purificó a partir de líneas celulares de cáncer de mama usando el kit Qiagen RNAeasy. Se determinó la integridad del ARN utilizando el kit ARN 6000 Nano LabChip y el bioanalizador Agilent 2100. Se analizaron los genes específicos para el endotelio, los TEM previamente caracterizados, los marcadores hematopoyéticos, los marcadores periciticos y el epitelio luminal y se mostraron los datos utilizando Java Treeview (Saldanha, *Bioinformatics* 20: 3246 (2004)).
- 35 Confirmación del origen vascular de los genes marcadores vasculares: Para validar el origen vascular de los genes asociados con el endotelio tumoral obtenido por inmuno-LCM, se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos para seleccionar transcritos génicos y se comparó con tinción en secciones subsiguientes teñidas con anticuerpos contra el antígeno relacionado con el factor VIII en tumores ER⁺, Her2/neu- de mama embebidos en parafina.
- 40
- 45
- 50

Anticuerpos comercialmente disponibles: Se utilizó anticuerpo policlonal de conejo a SFRP-2 (H-140) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, catálogo # sc-13940) a una dilución de 1:150; Se usó proteína de activación de conejo policlonal a FAP/fibroblastos, región alfa-Stalk (Abcam, Cambridge, MA, catálogo # Ab28244) a una dilución de 1:600; se usó anticuerpo monoclonal de ratón a JAK3 (Genetex Inc., San Antonio, TX, catálogo # GTX23301) a dilución 1:100; se utilizó anticuerpo anti-Hep27 (17) (DHRS2) de ratón, un regalo del Dr. Franco Gabrielli (Università di Pisa, Pisa, Italia), a dilución 1:1000; se usó anticuerpo antihumano de ratón contra el antígeno relacionado con el factor VIII (BioGenex, San Ramon, CA, catálogo # MU016-UC), a una dilución de 1:100; se usó CD-19 anti-humano monoclonal de ratón (AbD Serotec, Raleigh, NC, catálogo # MCA2454T) a 1:200).

Métodos de generación de anticuerpos: Los péptidos para las proteínas SLTRK6 (Cys-SRPRKVLVEQTKNEYFELKANLHAEPDYLEVLEQQT (SEQ ID NO: 8)) y SMPD3 (TSKSSGQKGRKELLKGNRRIDYMLHC (SEQ ID NO: 9)) se sintetizaron y se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH) para las inmunizaciones de los conejos. Los conejos blancos de Nueva Zelanda (5-6 lbs) se inmunizaron tres veces con 200 µg del conjugado de péptido mezclado con adyuvante completo de Freund para la inmunización primaria. El Adyuvante Incompleto de Freund se usó para todas las inmunizaciones de refuerzo. La vía de inyección fue subcutánea e intramuscular en múltiples sitios. Los sueros se recogieron del muestreo de sangre después de la tercera inmunización. Se utilizó anticuerpo SLITRK6 a una dilución de 1:5000 y se utilizó anticuerpo SMPD3 a una dilución de 1: 1000.

Inmunohistoquímica en tumor de mama embebido en parafina y muestras normales: El tejido se seccionó a 8 µm sobre Superfrost más láminas. Las láminas se desparafinaron sumergiéndolos en xileno durante 5 minutos dos veces. Las láminas se hidrataron en ETOH al 100%, ETOH al 95% durante 3 minutos cada uno. Las láminas se deuvieron en H₂O₂ al 3% (Kit DakoCytomation, LSAB2 HRP, Carpinteria, CA) durante 10 minutos, se enjuagaron con ETOH al 70% durante 3 minutos y luego con PBS durante 3 minutos. Se calentó el regulador Citra (BioGenex, San Ramon, CA) en un horno a 60°C y las láminas se sumergieron en regulador citra a 100°C en un vaporizador de arroz durante 30 minutos. Las láminas se enjuagaron en PBS durante 3 minutos y luego se marcaron con un lápiz PAP. Se aplicaron 100 µl-200 µl de anticuerpo primario y se colocaron las láminas en una caja sellada en una habitación fría a 4°C durante la noche. Las láminas se enjuagaron entonces en PBS durante 3 minutos y se añadieron 1-2 gotas de anticuerpo secundario biotinilado (DakoCytomation, Kit LSAB2 HRP) a cada lámina durante 20 minutos. Las láminas se enjuagaron en PBS durante 3 minutos y se aplicaron 1-2 gotas de estreptavidina-HRP (Kit Dako-Cytomation LSAB2 HRP) durante 20 minutos. Se aplicaron 1-2 gotas de complejo DAB y las láminas se colocaron en un cajón oscuro durante aproximadamente 10 minutos. Las láminas se enjuagaron en agua destilada durante 3 minutos y se contratiñeron con azul de tripano (Sigma, St Louis, MO) durante 30-45 segundos. Las láminas se enjuagaron en PBS, se deshidrataron a través de alcohol graduado y xileno, y Cytoseal XYL (Richard-Allan, Kalamazoo, MI) y se aplicaron láminas de cubierta. Se realizó un control negativo sin anticuerpo primario para todos los experimentos, y el control positivo fue antígeno relacionado con el factor VIII.

Evaluación de la expresión diferencial de proteínas de los genes vasculares entre el tumor de mama y el tejido mamario normal: Una vez confirmados los genes vasculares para localizar al endotelio, se evaluó si la expresión diferencial de mRNA se correlacionaba con la expresión diferencial de proteínas usando inmunohistoquímica en tumores de mama embebidos en parafina y tejido de mama normal.

Selección de tumores de mama: Se usaron tres grupos de tumores de mama embebidos en parafina fijados en formalina y designados como luminal A, basal o Her2/neu basado en sus inmunofenotipos (Livasy et al., Mod. Pathol. 19: 264 (2005)) ("Luminal A" ER positivo, Her2/neu negativo, "basal" ER negativo, PR negativo, HER2/neu negativo, ck5/6 positivo o EGFR positivo y "Her2/neu" ER negativo, PR negativo, Her2/neu positivo), así como el tejido mamario normal de mamoplastia de reducción. Los tejidos normales de mama se tiñeron primero con anticuerpos contra el antígeno relacionado con el factor VIII y sólo se utilizaron tejidos que tenían vasos en la muestra. ER negativo, PR negativos, tumores negativos de Her2/neu se tiñeron para anticuerpo CK5/6 (clon 05/16B4 dilución 1:10, Boehringer Mannheim, Indianapolis) como se describió anteriormente (Livasy et al., Mod. Pathol. 19: 264 2005)) y el anticuerpo EGFR (clon pharmDx, DakoCytomation Carpinteria, CA) según las instrucciones del fabricante para definir además el fenotipo basal.

Puntuación de Inmunohistoquímica: Un único patólogo certificado por la junta (CAL) certificó cada sección de tejido para la expresión FAP, SFRP2, JAK3, SMPD3, SLITRK6, DHRS2 y CD19 basándose en un sistema de calificación que midió la intensidad de tinción en el endotelio como: (Puntuación de intensidad del vaso) 0, ninguna; 1, frontera; 2, débil; 3, moderado/fuerte, y porcentaje de tinción de células endoteliales positivas como: 0, ninguno; 1, 1-24%; 2, 25-49%; 3, 50-74%; 4, 75-100%. Las diferencias en la puntuación de Intensidad del vaso entre los tumores y el tejido

normal se dicotomizaron y evaluaron, donde una puntuación "alta" fue 3 y una puntuación baja fue 0-2. Para definir adicionalmente la expresión de la angiogénesis, la expresión se dicotomizó como alta (3 + de intensidad y células positivas $\geq 75\%$) y no alta (0, 1, o 2 de intensidad y/o $< 75\%$ de células positivas), y se designó como Puntuación de Angiogénesis. La prueba exacta de Fisher se usó para probar posibles diferencias en las proporciones (o porcentajes) de expresión, clasificadas como "altas" o "bajas" tanto para la puntuación de angiogénesis como para la puntuación de intensidad de vaso entre luminal A vs. normal, Her2neu vs. Basal vs. tejido normal. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico SAS, versiones 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC.

Ejemplo 2

Identificación de genes expresados diferencialmente en vasos de tumores mamarios

10 Aislamiento de vasos y análisis de microarreglos: Con el fin de estudiar las diferencias en la expresión génica entre los vasos tumorales y normales, se realizó IHC rápida con anticuerpos contra el antígeno relacionado con factor VIII, seguido de microdissección por captura láser (LCM) de células vasculares de 5 tumores de mama luminal A y 5 especímenes normales de tejido mamario de mamoplastia de reducción. La inmunotinción según el protocolo IHC rápido requiere sólo 30-35 minutos de fijación a LCM. La calidad de la tinción fue excelente, las células vasculares se identificaron fácilmente y la LCM se realizó con éxito (Fig. 1).

15 La amplificación de ARN se realizaron usando un sistema de amplificación de dos rondas. La integridad del ARN se evaluó después de la primera ronda de amplificación. El ARN extraído mantuvo su integridad como lo demuestra la detección por RT-PCR de genes de diferentes niveles de abundancia (Figura 2). No se observaron señales después de la amplificación del control negativo (regulador de extracción de ARN sin la muestra microdisseccionada, datos no mostrados). La integridad del ARN se comprobó en todas las muestras antes de hibridación de microarreglo y sólo las muestras que mantenían la integridad de ARN se utilizaron para análisis de microarreglos.

20 Para estimar el sesgo de amplificación, se comparó una ronda de ARN amplificado con dos rondas de amplificación de ARN extraído de células de cáncer de mama MDA-MB-435 humanas cultivadas in vitro. Cuando tanto el ARN amplificado como el no amplificado se hibridaron a microarreglos de ADN de oligonucleótidos largos Agilent de 44,000 elementos, los coeficientes de correlación variaron entre 0,95-0,97 entre repeticiones técnicas.

Confirmación de la identidad y pureza de las células vasculares: Los genes específicos del endotelio se expresaron uniformemente y altamente en los especímenes de células vasculares y líneas celulares endoteliales con expresión significativamente menor en las líneas celulares tumorales de mama, que confirman que las muestras de células vasculares estaban altamente enriquecidas para endotelio (Figura 3).

30 Los marcadores endoteliales tumorales 1, 2, 4, 5, 6, 7, 7R, 8 (informados previamente por estar diferencialmente expresados entre tumor de colon y endotelio normal) (St. Croix, Science 289: 1197 (2000)) se expresaron altamente tanto en las células vasculares tumorales como en las células vasculares normales cuando se compararon en relación con la baja expresión observada en las líneas celulares tumorales de mama (Fig. 3). Los genes vasculares de tumores específicos de mama informados previamente HEY1, Col4A2, C4A, SPARCL1, SNAIL1 (Parker et al., Cancer Res. 64: 7857 (2004)) también se expresaron de forma similar en las muestras tanto de células tumorales como de células vasculares normales, con valores bajos de expresión en las líneas celulares tumorales de mama (figura 3). Estos resultados sugieren que estos son marcadores de endotelio de mama, pero su expresión no fue consistentemente mayor en células vasculares tumorales frente a las normales.

40 El receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGFR- β), un marcador de pericito, se expresó altamente en las muestras de células vasculares, lo que confirmó la presencia de pericitos (Figura 3). Hubo una alta expresión de genes específicos para el epitelio luminal del tumor mamario en las líneas celulares de cáncer de mama, con baja expresión en las muestras de células vasculares y las líneas celulares endoteliales (Figura 3). Esto confirmó el enriquecimiento de las células endoteliales y pericitos sin altos niveles de expresión de los genes asociados al epitelio.

45 La expresión de marcadores hematopoyéticos en las muestras de células vasculares fue similar a la expresión en las líneas celulares endoteliales in vitro (Figura 3). CD45 (leucocitos) y CD22 (células B) tenían baja expresión en vasos LCM y líneas celulares endoteliales. CD14 (macrófagos) y CD5 (células T) se incrementaron tanto en las muestras de células vasculares como en las líneas celulares endoteliales. Esto podría explicarse por la presencia de ARN de macrófagos y células T en las muestras de células vasculares. Alternativamente, es posible que CD14 y CD5 se expresen en células endoteliales, ya que hay evidencia previa de origen de monocitos de precursores de

células vasculares (Coukos et al., Br. J. Cancer 92: 1182 (2005)) y expresión de CD14 en células endoteliales (Jersmann, Immunol. Cell Biol. 83: 462 (2005)); CD14 también se elevó en un informe previo de endotelio de tumor ovárico microdisecionado (Buckanovich et al., Cancer Biol. Ther. 5: 635 (2006)), y se ha informado previamente que CD5 está presente en el endotelio vascular (Gogolin-Ewens et al., Eur. J. Immunol., 19: 935 (1989)).

5 Análisis supervisado de los vasos tumorales versus los normales: Utilizando el Análisis de Significancia de Microarreglo (SAM), se identificaron los genes expresados diferencialmente entre el tumor y las células vasculares normales. Se encontraron 1176 genes expresados diferencialmente con un número mediano de falso significado = 7,76, de los cuales 368 se incrementaron. Con el fin de interpretar la lista de genes derivados de SAM y convertir la lista de genes en temas biológicos, se aplicó el Explorador Sistemático de Análisis de Expresión (EASE). Al examinar
10 los resultados ajustados de Bonferonni, se encontró que la categoría de ontología de la matriz extracelular se incrementó en las células vasculares tumorales, mientras que la categoría de ontología ribosómica se redujo, demostrando una respuesta biológica separada.

Confirmación del origen vascular de los genes marcadores vasculares: Para validar el origen vascular de los genes asociados con el endotelio tumoral obtenido por inmuno-LCM, se realizó IHC en tumores de mama humano luminal A embebidos en parafina. Dado que el objetivo era identificar los genes altamente expresados diferencialmente, el primer foco se centró en los 55 genes que tenían l expresión incrementada > 4 veces en las células del vaso tumoral (Tabla 1). A partir de esta lista, se realizó una búsqueda de Gene Cards (www.genecards.org/index.shtml) para
15 identificar la localización subcelular potencial de los genes con expresión incrementada > 4 veces, y se centró en algunos de los genes que potencialmente codifican proteínas de membrana (FAP, JAK3, SMPD3, SLITRK6, CD 19), y una proteína secretada (SFRP2). Estas ofrecerían objetivos de fármacos particularmente buenos debido a su accesibilidad. También se eligió un gen que se ha descrito recientemente que se expresa en endotelio in vitro (DHRS2) (Shafqat et al., Cell. Mol. Life Sci. 63: 1205 (2006)).

Se utilizaron anticuerpos contra el antígeno relacionado con el factor VIII para un control positivo para identificar el endotelio, y en las secciones subsiguientes se realizó el IHC con anticuerpos contra FAP (proteína de activación de fibroblastos, alfa), SFRP2 (proteína 2 secreta relacionada con frizzled), JAK3 (janus quinasa 3), SMPD3 (esfingomielinasa 2 neutra), SLITRK6, miembro 2 de DHRS2 (deshidrogenasa/reductasa (familia SDR), también conocido como Hep27) y CD19.

Los anticuerpos contra FAP, SFRP2, JAK3, SMPD3, SLITRK6 y DHRS2 mostraron tinción con localización celular en endotelio (Fig. 4), así como estroma tumoral y epitelio tumoral. CD19, un marcador de células B, no se localizó en el endotelio. Por lo tanto 6/7 genes marcadores vasculares identificados por inmuno-LCM que fueron estudiados
30 parecen estar validados de origen vascular.

Ejemplo 3

Evaluación de la expresión diferencial de proteínas de genes vasculares entre los vasos de tumores de mama y los vasos normales de mama

35 Para los seis genes validados por ser de origen vascular, se evaluó a continuación si la expresión diferencial de mRNA se correlacionó con la expresión diferencial de la proteína utilizando IHC en, Her2/neu, luminal A, normal y los tumores basales embebidos en parafina. La expresión de proteína diferencial significativa para SLITRK6 y DHRS2 no se detectó, posiblemente porque había muy alta tinción tanto en el endotelio del tumor como en el endotelio normal (datos no presentados). Para SMPD3 no hubo diferencias en la Puntuación de Angiogenesis para luminal A versus normal, pero hubo un incremento en la Puntuación de Intensidad del Vaso comparando luminal A versus normal (15/16 (94%) vs. 6/10 (60%) P = 0,05). JAK3 presentó una mayor tinción en los tumores luminal A y Her2/neu en comparación con la normal (p = 0,01 y p = 0,006 respectivamente, Fig. 5D) y fue casi estadísticamente significativa para el puntaje de Angiogénesis (p = 0,11, Fig. 5C). Los tumores basales tenían una expresión muy baja de JAK3 (Fig. 5C, 5D). Para FAP, las Puntuaciones de Angiogénesis fueron significativamente mayores en los
40 tumores luminal A, Her2/neu y basales comparados con los normales (p = 0,04, p = 0,03 y p = 0,03, respectivamente, véase Fig. 5A). Para SFRP2, la puntuación de Angiogénesis fue significativamente mayor en los tumores luminal A y tumores basales en comparación con los normales (p = 0,03 y p = 0,02 respectivamente) con significancia cercana en los tumores Her2/neu (***) p = 0,10). Esto parece validar el descubrimiento original de la expresión génica diferencial en el luminal A versus las células del vaso normal en una segunda muestra utilizando
50 una plataforma diferente (IHC).

Ejemplo 4

Función Angiogénica de SFRP2

Ensayo de membrana corioalantóica de pollo (CAM): Para determinar si SFRP2 induce angiogénesis in vivo, se incubaron óvulos de pollo fertilizados (NC State University Chicken Research Farm) a 100°F en un turner de óvulo durante 4 días. En el día 4, los óvulos se rompieron en placas de Petri estériles y se incubaron a 99°F en 3% de CO₂, 65% de humedad. Para la aplicación de fármaco en la CAM, se cortó el papel de filtro Whatman grado 1 en círculos con un punzón de papel de 6 mm de diámetro y se sometió a autoclave. Para disminuir los efectos inflamatorios del disco, los discos se empaparon en 1 ml de 3,0 mg/ml de acetato de cortisona en ETOH absoluto y se secaron al aire durante 60 minutos en una campana de flujo laminar. Al día 8, se colocaron 5 discos por óvulo en el tercio externo de la CAM, a 2-3 mm de un recipiente. Se añadieron 7 µl d PBS de control a los discos para las CAM de control y se añadió SFRP2 100 ng/7 µl de PBS a los discos para las CAM tratadas (n = 5 discos de control y 5 discos tratados con SFRP2). Las CAM se evaluaron bajo un estereomicroscopio al día 3 después de la colocación del disco. Las imágenes se tomaron con un Macrosistema Wild M-4 70, y la angiogénesis se cuantificó usando Software Metamorph con un módulo de angiogénesis. Para investigar si SFRP2 induce la angiogénesis in vivo, se implantaron pellas impregnados de SFRP2 en la CAM de desarrollo al día 8. Después de 3 días, SFRP2 indujo angiogénesis en la CAM con un incremento estadísticamente significativo en el número de puntos de ramificación (0,010), segmentos (0,013) área de porcentaje de tubo recubierta (0,004), área total de tubo (0,008) y longitud total de tubo (0,008) (Figura 6).

Ensayo de heridas por rasguño: Se evaluaron las propiedades de migración de SFRP2 en células de células endoteliales de ratón (MEC) usando un ensayo de herida por rasguño. Se sembraron células endoteliales de ratón a 10.000 células/pozo en una placa de 96 pozos y se dejó confluir en DMEM con FBS al 10%. Las células se suspendieron en DMEM sin suero durante 18 horas. La herida se formó usando una punta de pipeta de 1 ml y se añadió una curva de dosis de 0,7 pM-700 pM de SFRP2 recombinante de ratón (US Biologicals, Swampscott) a las células. Cada concentración se realizó por triplicado y el experimento se repitió tres veces con resultados similares. La migración se midió de 16 a 32 horas. La distancia de migración se midió en cada punto de tiempo. Las diferencias estadísticas entre SFRP2 y control se evaluaron con una prueba t de Student de dos colas no apareada, con p <0,05 siendo significativa. SFRP2 incrementó la migración de células endoteliales en la concentración picomolar (p <0,01 a las 16 horas, p <0,001 a las 19 horas) (Figura 7).

Ensayo de formación de tubos: Se evaluaron las propiedades de formación de tubos de SFRP2 en células de células endoteliales de ratón (MEC) utilizando un ensayo de formación de tubo de células endoteliales. ECMatrix (Chemicon) se descongeló, se diluyó y se solidificó en una placa de 96 pozos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron 1x10⁴ células/pozo en 150 µl de DMEM (cellgro) con FBS al 10% (HyClone) y un rango de concentración (7-7000 pM) de SFRP2 (US Biologicals) sobre la matriz y se devolvió a 37°C, CO₂ al 5% durante 8 horas. Las imágenes se adquirieron utilizando el microscopio Nikon Eclipse TS100 con una ampliación de 4x con una cámara digital Nikon CoolPix 995. Los resultados se cuantificaron contando el número de puntos de ramificación. La formación de tubo endotelial fue inducida por SFRP2 en una forma dependiente de la concentración a las 8 horas (p = 0,0006 a 7 nM) (Figura 8).

Ensayo de tapón de Matrigel: Se evaluó la capacidad de SFRP2 recombinante de ratón para estimular la angiogénesis en un ensayo de angiogénesis de tapón de Matrigel de ratón. Se inyectaron ratones C57BL/6 hembra (8 semanas de edad) s.c. con 0,5 ml de matriz de membrana basal reducida por factor de crecimiento (Matrigel) que contenía SFRP2 recombinante de ratón (800 ng/ml) con 30 U/ml de heparina o PBS con 30 U/ml de heparina para control negativo. Siete días más tarde los ratones se sacrificaron y se eliminaron los tapones de Matrigel y se evaluó la angiogénesis por concentración de hemoglobina con el reactivo de Drabkin. La evaluación de la respuesta angiogénica mediante la medición del contenido de hemoglobina mostró un aumento de 3.3 veces en los tapones de SFRP2 en comparación con el control del vehículo (n = 25 tapones de SFRP2, n = 26 tapones de control, p = 0,01, Figura 9).

Ensayo de apoptosis de células endoteliales: Se usaron células endoteliales de arterias coronarias humanas (HCAEC) para ensayos de apoptosis debido a que no se podía inducir apoptosis en las células MEC. Las HCAEC se cultivaron en placas de 10 cm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con medio Bulletkit de medio basal de células endoteliales 2 (EGM-2) (Clonetics, San Diego, CA) hasta 80% de confluencia. El medio se reemplazó entonces con medio óptimo de acuerdo con diferentes ensayos. La condición hipóxica se creó incubando HCAECs en medio EGM-2 sin factores de crecimiento BulletKit a 37°C en una cámara de hipoxia con una atmósfera de 5% de CO₂/95% de N₂. El nivel de oxígeno en la cámara se controló hasta el 1,0%. La apoptosis se determinó midiendo la actividad de la caspasa 3 escindida usando un sustrato fluorogénico específico de caspasa de acuerdo con el protocolo para

el Kit de Ensayo de Caspasa 3 (Sigma). Las HCAEC se sometieron a lisis después del tratamiento con concentraciones de SFRP2 (70 pM y 700 pM) durante 36 h bajo hipoxia. A continuación, se incubaron 5 µl de extracto celular en regulador de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. La liberación catalizada por enzima de 7-amino-4-metil cumarina (AMC) se midió mediante un lector de microplacas de fluorescencia. Se encontró que SFRP2 protegido contra la hipoxia inducida apoptosis de células endoteliales ($p < 0,02$) (Figura 10).

Análisis de expresión génica: Se evaluaron los efectos corriente abajo de SFRP2 en perfiles de expresión génica utilizando microarreglos de oligonucleótidos. Las células MEC se cultivaron con y sin SFRP2 700 pM durante 16 horas. El ARN se extrajo y se purificó usando el Qiagen RNeasy Kit (Qiagen). La concentración y pureza del ARN total se determinó espectrofotométricamente, y la integridad se verificó utilizando el ARN 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies) y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Las repeticiones biológicas fueron ($n = 3$) para cada grupo para mejorar la confianza para la relación de intensidad experimental promedio a control para cada gen. El ARN de células se marcó con Cy5-CTP usando el Sistema de Amplificación de ARN Linear de Baja Entrada (Agilent), y se hibridó con concentraciones equimolares de ARN de referencia común de ratón marcado con Cy3. Las hibridaciones de microarreglo se realizaron utilizando microarreglos de oligonucleótidos Agilent Mouse Whole Genoma 44 K. Después de la hibridación, los arreglos se escanearon en un escáner Axon Gene Pix 4000b (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Feature Extraction V 9.1 (Agilent). Los valores de expresión génica se cuantificaron por la relación Log_2 de la intensidad del canal rojo versus la intensidad del canal verde (muestra vs. referencia), seguida de la normalización del loess para eliminar el sesgo y variación del colorante dependiente de la intensidad. El filtrado de datos y el preprocesamiento se realizaron utilizando scripts Perl personalizados. Los datos asociados con este estudio están disponibles en el genoma. unc.edu/pubsup/breastTumor. Se identificaron genes significativamente diferencialmente expresados utilizando una prueba T heteroscedástica (de dos colas, tipo 3) ($p < 0,01$), y selección subsiguiente para un cambio de repeticiones de media absoluta de $> 1,3$. Para interpretar las listas de genes y convertirlos en temas biológicos, se utilizó la interfaz web GATHER (Gene Annotation Tool to Help Explain Relationships; gather.genome.duke.edu) para el análisis. Utilizando esta técnica, se encontraron 33 mARN expresados diferencialmente (Figura 11).

Efecto de SFRP2 en rutas Wnt: SFRP2 ha sido descrito como un antagonista y agonista de de Wnt, pero sus efectos sobre señalización de Wnt en las células endoteliales no se han dilucidado. Para determinar si SFRP2 medía la señalización de Wnt canónica en las células endoteliales, los niveles citoplasmáticos y nucleares de β -catenina se midieron en células endoteliales tratadas con SFRP2. Las células endoteliales de ratón se sembraron en placas de 12 pozos y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambió y se añadió a los pozos con y sin SFRP2 (700 pM). Las células se incubaron durante 16 horas, y las proteínas nucleares y citoplásmicas se extrajeron utilizando reactivo de extracción nuclear y citoplásmica NE-PER™ de PIERCE (Pierce Biotechnology) como se describe en el manual del fabricante. El análisis de transferencia de Western se realizó utilizando métodos estándar, con anticuerpo primario al anticuerpo de β -catenina desfosforilada (activa) (Santa Cruz, Clon BDI480, catálogo # sc-59893). No hubo cambios en la β -catenina nuclear en las células estimuladas con SFRP2, lo que sugiere que la propiedad angiogénica de SFRP2 no está mediada a través de la ruta de señalización de Wnt canónica (Figura 12).

Para evaluar el papel de la ruta no-canónica de Wnt/Ca en SFRP2 inducida por la angiogénesis, se compararon los niveles de la proteína NFATc3 nuclear desfosforilada en el control y células endoteliales tratadas con SFRP2. Las células MEC se sembraron en placas de 12 pozos y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambió y se añadió a los pozos con y sin SFRP2 (700 pM). Las células se incubaron durante 1, 2, 4, 8 y 16 horas, y las proteínas nucleares se extrajeron mediante el uso de reactivo de extracción nuclear y citoplásmica NE-PER™ de PIERCE (Pierce Biotechnology) como se describe en el manual del fabricante. El análisis de transferencia Western se realizó utilizando métodos estándar, con anticuerpo primario para anticuerpo de β -catenina desfosforilada (activa) o NFATc3. Como más arriba, no hubo cambios en la β -catenina nuclear en las células endoteliales estimuladas con SFRP2 ($p = 0,4$, Fig. 13), lo que sugiere que la propiedad angiogénica de SFRP2 no está mediada a través de la ruta de señalización de Wnt canónica. Se encontró que NFATc3 se incrementó a los 30 minutos en la fracción nuclear de células endoteliales tratadas con SFRP2 (Figura 13).

Para evaluar si el tacrolimus inhibe la formación de tubo inducido por SFRP2, las células MEC se trataron como más arriba con SFRP2 7 nM con y sin tacrolimus 100 µM durante 8 horas y se determinaron los puntos de ramificación como se ha descrito anteriormente. Para evaluar si el tacrolimus invirtió tubos establecidos, las células se incubaron con SFRP2 7 nM durante 8 horas y luego se añadieron BSA o tacrolimus 100 µM a células tratadas con SFRP2 durante 4 horas adicionales y luego se contó el número de puntos de ramificación. El tacrolimus inhibió la formación de tubo inducido por SFRP2 en células MEC (figura 14). El tacrolimus no fue citotóxico para las células MEC, ya que sólo el 5% de las células tratadas con tacrolimus tomaron colorante azul tripano (datos no mostrados). Además,

después de que se formaron tubos con tratamiento con SFRP2, el tacrolimus invirtió la formación de tubo inducida por SFRP2 (figura 15).

Un modelo de ratón de angiosarcoma sobreexpresa la proteína SFRP2: Con el fin de estudiar si la inhibición de SFRP2 inhibirá el crecimiento tumoral, se propuso identificar un modelo tumoral que sobreexpresa SFRP2. Para ello, se estudió una línea de células endoteliales de ratón transformadas. Las células Ms1 se generaron inmortalizando células endoteliales murínicas expresando el antígeno T grande sensible a la temperatura (regalo del Dr. Jack Arbiser, Universidad Emory). Tras la implantación en ratones, estas células forman hemangiomas latentes. Las células Ms1 fueron transfectadas con Ras (línea celular SVR), y esta línea celular forma angiosarcomas cuando se inyecta en ratones lampiños. Los lisados de proteínas se recogieron a partir de líneas celulares MS1 y SVR y, utilizando análisis de transferencia Western sondeando para SFRP2, se encontró que SFRP2 se incrementó en células SVR (figura 16). Dado que esta línea celular forma angiosarcomas agresivos, es un modelo de ratón ideal para estudiar la inhibición del crecimiento tumoral por los inhibidores de SFRP2.

Ensayo de formación de tubos Las propiedades de formación de tubos de SFRP2 en células MEC se evaluaron utilizando un ensayo de formación de tubo de células endoteliales. ECMatrix (Chemicon) se descongeló, se diluyó y se solidificó en una placa de 96 pozos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron 1×10^4 células/pozo en 150 μ l de DMEM (cellgro) con FBS al 10% (HyClone) y un rango de concentración (3-3000 μ M) de SFRP2 (US Biologicals) sobre la matriz y se devolvió a 37°C, CO₂ al 5% durante 8 horas. Las imágenes se adquirieron utilizando el microscopio Nikon Eclipse TS100 con una ampliación de 4x con una cámara digital Nikon CoolPix 995. Los resultados se cuantificaron contando el número de puntos de ramificación. Para evaluar si el tacrolimus inhibe la formación de tubos inducidos por SFRP2, las células MEC se trataron como más arriba con SFRP2 30 nM con y sin tacrolimus (1 μ M - 100 μ M) durante 8 horas y se determinaron los puntos de ramificación como se ha descrito más arriba. Para evaluar si los inhibidores de la angiogénesis mediada por SFRP2 inhibirían el crecimiento de células tumorales de SVR, las células SVR se trataron con tacrolimus (1 μ M - 100 μ M) o con un anticuerpo policlonal de conejo para SFRP - 2 (H - 140) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, catálogo # sc - 13940) en el ensayo de formación de tubos.

Como se muestra más arriba, la formación de tubo endotelial MEC se indujo por SFRP2 de una manera dependiente de la concentración a las 8 horas ($p = 0,0006$ a 7 nM) (Figura 17A). Para evaluar adicionalmente si los efectos angiogénicos de SFRP2 fueron mediados a través de NFAT, las células endoteliales se trataron en un ensayo de formación de tubos con SFRP2 (30 nM) con y sin el inhibidor de la calcineurina tacrolimus. Tacrolimus (1 μ M) inhibió la formación de tubo inducido por SFRP2 en $64\% \pm (0,002)$ (Figura 17B). El tacrolimus no fue citotóxico para las células MEC, ya que sólo el 5% de las células tratadas con tacrolimus tomaron colorante azul tripano (datos no mostrados). La formación de tubos en las células del angiosarcoma SVR también fue inhibida por tacrolimus (Figura 17C), y la formación de tubo SVR fue inhibida por un anticuerpo policlonal para SFRP2, lo que sugiere que SFRP2 es necesaria para la formación de tubos en esta línea de células tumorales de angiosarcoma.

La capacidad de tacrolimus para inhibir SFRP2 y formación de tubo endotelial 2H11 estimulado por VEGF in vitro se estudió en un ensayo de formación de tubo de Matrigel. El tacrolimus inhibió la formación de tubo endotelial tanto en las células endoteliales estimuladas con SFRP2 (Figura 18) como con VEGF (Figura 19).

Como una prueba adicional de la contribución de SFRP2 a la formación de tubo endotelial, se evaluó si la pérdida de función de SFRP2 inhibiría la formación de tubo de angiosarcoma SVR. Esto se estudió de dos maneras diferentes, primero con un anticuerpo de bloqueo a SFRP2, y luego utilizando ARNsi a SFRP2. Las células SVR se sembraron en matrigel en un ensayo de formación de tubos y se trataron con un anticuerpo policlonal para SFRP2. La formación de tubo SVR se inhibió con el anticuerpo policlonal para SFRP2 de una manera dependiente de la concentración (Figuras 20A-B). A continuación, se transfectaron células SVR con ARNsi a SFRP2 de Santa Cruz y control simulado. Las células SVR fueron transfectadas con ARNsi 72 μ M para SFRP2 (FRP-2 ARNsi (sc-40001, Santa Cruz Biotechnology) es un grupo de 3 ARNsi específicas de destino de 20-25 nt diseñado para anular la expresión génica de SFRP2). Las tres secuencias son 5'-GAGAUACGUACAUCAACA-3' (SEQ ID NO: 10), 5'-CAAGCUGCAAUGCUAGUUU-3' (SEQ ID NO: 11), 5'-CCAUGUCAGGCGAAUUGUU-3' (SEQ ID NO: 12). El ARNsi de control (sc-36869, Santa Cruz Biotechnology) que se usó contiene una secuencia codificada que no conduce a la degradación específica de cualquier mRNA celular conocido. Las células SVR se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Después de 72 h de transfección usando el reactivo de transfección de Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, las células se recolectaron y se prepararon para análisis de transferencia Western y ensayo de formación de tubos. Las células se sembraron para un ensayo de formación de tubo de 4 horas. Células transfectadas ARNsi a SFRP2

tuvieron una reducción del 70% en la formación de tubos en comparación con las células simuladas transfectadas (Figura 21]. Estos estudios demuestran que SFRP2 es necesario para la formación de tubos de angiosarcoma.

SFRP2 pertenece a una gran familia de proteínas relacionadas con frizzles secretada (SFRPs) que están relacionados con la cascada de señalización de Wnt. Esta proteína contiene un dominio rico en cisteína que es homólogo al dominio putativo de enlazamiento a Wnt. La red de señalización de Wnt influye en procesos biológicos que van desde el destino celular de desarrollo hasta la adhesión celular y la apoptosis. Datos recientes sugieren que la ruta de señalización Wnt está involucrada en la formación y remodelación de los vasos sanguíneos.

Las proteínas Wnt se han agrupado en dos clases: canónica y no canónica. Las Wnts canónicas estabilizan la β -catenina, activando de este modo la transcripción de los genes objetivo de Tcf/LEF. Se ha informado que SFRP2 es un antagonista de la ruta de señalización Wnt canónica al unirse directamente a Wnts, alterando así su capacidad para unirse al complejo receptor de Wnt. Sin embargo, en este estudio no se encontró ningún cambio en los niveles citoplasmáticos o nucleares de β -catenina en células endoteliales tratadas con SFRP2 en la concentración y los puntos de tiempo que indujeron la formación de tubo y la migración, lo que indica que SFRP2 no está mediando angiogénesis a través de la ruta de señalización de Wnt canónica.

Las Wnts no canónicas activan otras rutas de señalización, tal como la ruta Wnt/ Ca^{2+} que regulan NFATc. La familia NFAT consta de cuatro miembros (NFATc1-c4), que existen como fosfoproteínas citosólicas transcripcionalmente inactivas. La localización nuclear NFAT depende de un balance dinámico de importación-exportación entre la actividad de la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, la calcineurina y la actividad de serina/treonina quinasas. Los mutantes de pérdida de función han demostrado que la señalización de NFAT es crucial para las válvulas cardíacas normales y el desarrollo vascular durante la embriogénesis. Postnatalmente, esta ruta contribuye a la regulación del crecimiento celular, la diferenciación y la progresión del ciclo celular en diversos tipos de células, y hay cada vez más datos que apoyan un papel crítico de NFAT en la mediación de respuestas angiogénicas.

Wnt5a ha demostrado ser un mediador de la ruta no canónica de Wnt, y se ha demostrado que SFRP2 se une a Wnt5a en el rango nanomolar. Basándose en esto, se evaluó si SFRP2 activó la ruta no canónica de Wnt en las células endoteliales. Tacrolimus, un inhibidor de la calcineurina, inhibió la formación de tubo inducido por SFRP2, lo que sugiere que SFRP2 induce la formación de tubo a través de la ruta de señalización no canónica de Wnt- Ca^{2+} , dando como resultado a la translocación nuclear de NFATc.

Ejemplo 5

Anticuerpos para SFRP2

Se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de SFRP2 humana para determinar epítopes candidatos para fabricar péptidos sintéticos para inyección en animales para desarrollar anticuerpos monoclonales para SFRP2 humano. Se identificaron siete secuencias candidatas basadas en su inmunogenicidad predicha: AA29-40 : GQPDFSYSRNC (SEQ ID NO: 1); AA85-96 : KQCHPDTKKELC (SEQ ID NO:2); AA119-125 : VQVKDRC (SEQ ID NO:3); AA138-152 : DMLECDRFPQDNDLC (SEQ ID NO:4); AA173-190 : EACKNKNDNDNDIMETLC (SEQ ID NO:5); AA202-220 EITYINRDTKIILETKSKT- Cys (SEQ ID NO:6); AA270-295: ITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQC (SEQ ID NO:7). Los ratones se inmunizaron contra las cinco primeras de las secuencias peptídicas anteriores con una segunda ronda de inmunización un mes después y se realizaron hemorragias dos semanas más tarde. Se realizó un ELISA para determinar el título de los ratones a los péptidos, lo que demostró que los ratones respondían a los diversos inmunógenos. Los sueros de ratón inmunizados contra el inmunógeno utilizado como el epítipo correspondiente a los aminoácidos AA202-AA220 (que se denominó AbB) y AA270-AA295 (que se denominó AbC) inhibieron la formación de tubos SVR en comparación con los sueros de ratón de control (Figura 22), lo que indica que estas secuencias peptídicas son funcionalmente activas. Estos dos péptidos se seleccionaron para la producción de un anticuerpo monoclonal.

Se prepararon anticuerpos monoclonales para el epítipo que corresponde a AbB (AA202-AA220). Se realizó una inyección terciaria de antígeno y los ratones se estimularon mediante una sola inyección intraperitoneal. Los títulos del inmunógeno en los ratones inyectados se elevaron, y se seleccionaron dos ratones para la recolección del bazo. Los ratones seleccionados fueron sometidos a una inmunización i.p. tres semanas después de la última inmunización. Estos ratones se sacrificaron 3 días después del refuerzo final y se recogió sangre. El bazo se retiró y se fusionó con células de mieloma para la formación de hibridomas. La fusión de las células del bazo se realizó con células P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL-1580) utilizando una solución de PEG al 50%. La fusión se sembró en placas de 96 pozos a una concentración de células totales de $\sim 1,5 \times 10^5$ células por pocillo en el medio de selección de

HAT. Las placas de fusión se alimentaron después de 7 días con medio HAT. Las placas de fusión se cribaron 14 días después de que se realizó la fusión. El cribado se realizó sembrando células de angiosarcoma SVR en un ensayo de formación de tubo de matrigel en placas de 96 pozos. Las células de angiosarcoma se suspendieron en 150 µl de anticuerpo que contenía medios de crecimiento para 90 muestras diferentes y medios de control. Después de 6 horas, se tomaron fotografías y se contó el número de puntos de ramificación para cada pozo. Los controles formaron 39 puntos de ramificación. Hubo 61 muestras que tuvieron una inhibición > 50% de la formación de tubo. Se seleccionaron ocho muestras que cada una tenía menos de 4 puntos de ramificación (Figura 23) para utilizar subclonación adicional, y 32 muestras que tienen inhibición > 50% se congelaron de nuevo.

Ejemplo 6

10 SFRP2 como biomarcador para cáncer de mama

Para investigar si SFRP2 es un biomarcador para el cáncer de mama, se probó la presencia de la proteína SFRP2 en suero de pacientes con cáncer de mama en comparación con el control normal. El suero se obtuvo de la instalación de adquisición de tejidos de UNC, donde el suero se recogió bajo un protocolo aprobado por IRB. El suero del paciente se diluyó 1:14 y se filtró. El nivel de proteína total se midió usando el ensayo Bio-Rad Protein. Se cargó cantidad igual de proteína y se realizó inmunoprecipitación Western de acuerdo con el método estándar. La inmunoprecipitación se probó con el anticuerpo SFRP2. Se encontró que SFRP2 está presente en el control y en el suero del paciente de cáncer de mama, pero más altamente expresado en el último ($p < 0,0001$, figura 24).

Ejemplo 7

SFRP2 es un objetivo vascular de amplio espectro

20 Se evaluó la expresión vascular de SFRP2 en angiosarcoma, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales y cáncer de páncreas utilizando IHC con anticuerpos contra SFRP2 en tumores humanos embebidos en parafina. Se encontró que SFRP2 se expresa fuertemente en todos los tumores, haciendo SFRP2 un objetivo vascular de amplio espectro (Fig. 25).

Ejemplo 8

25 Tacrolimus inhibe la angiogénesis in vivo

Para probar la capacidad del tacrolimus para inhibir la angiogénesis in vivo, se inyectaron células de angiosarcoma de ratón SVR ($0,5 \times 10^6$) en el flanco de ratones machos lampiños de 6 semanas de edad obtenidos de Charles River Breeding Laboratories. El tratamiento se inició el día después de la inoculación. Los ratones recibieron tacrolimus 3 mg/kg/día o control de vehículo suspendido en Intralipid al 20% (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) en un volumen total de 0,3 ml intraperitonealmente (i.p.), y se trataron diariamente durante 19 días. Para calcular el volumen del tumor se utilizaron mediciones de calibre en serie de diámetros perpendiculares utilizando la siguiente fórmula: $(\text{diámetro más corto})^2 \times (\text{diámetro más largo}) \times 0,52$. Las diferencias en el volumen tumoral a lo largo del tiempo se analizaron con un ANOVA de dos vías. Un valor de P de $\leq 0,05$ indicó una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento del tumor del grupo tratado en comparación con el grupo de control. El tratamiento con tacrolimus ($n = 14$) durante 19 días fue efectivo en suprimir el crecimiento del tumor de angiosarcoma de SVR en ratones lampiños en comparación con el control ($n = 14$). El tratamiento con tacrolimus redujo el volumen tumoral medio en un 46% al día 19 ($589 \pm 129 \text{ mm}^3$ vs. $315 \pm 93 \text{ mm}^3$, ANOVA de dos vías, $p = 0,04$, figura 26). No hubo signos de toxicidad (es decir, diarrea, infección, letargia o pérdida de peso) después de 19 días de tratamiento.

40 En un segundo estudio, ratones transgénicos MMTV-neu fueron tratados con tacrolimus 3 mg/kg/día o ningún tratamiento. El tratamiento comenzó cuando los tumores fueron palpables y continuó durante 21 días. El volumen de los tumores se monitorizó con ultrasonidos en serie. Se usó una prueba T de dos colas para determinar la diferencia entre las tasas de crecimiento de los tumores entre los tumores tratados y los no tratados. Los grupos fueron significativamente diferentes ($P = 0,04$, prueba t de dos colas) al final del estudio el día 21, con una reducción del 59% en la tasa de crecimiento (Figura 27). No hubo signos de toxicidad (es decir, diarrea, infección, letargia o pérdida de peso) después del tratamiento.

Ejemplo 9

Función Angiogénica de Jak3

Cultivo celular: Se cultivaron células de las arterias coronarias humanas (HCAEC) en el medio basal de células endoteliales-2 (EGM-2) con suplementos de crecimiento BulletKit (Clonetics, San Diego, CA). Las células se pasaron a 80-90% de confluencia usando tripsina sin EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los pasajes 3-9 se utilizaron en experimentos.

5 Ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM): Los óvulos de pollos fertilizados (NC State University Chicken Research Farm) se incubaron a 100,4°F en un dispositivo para hacer rotar óvulod (Modelo # 1588 Genesis Hova-Bator, GQF Mfg Co., Inc.) durante 3 días. El día 3, los óvulos se agrietaron en placas estériles de 100 x 25 mm y se incubaron a 99°F, CO₂ al 5%, 65% de humedad durante 5 días. Para la aplicación de fármaco en la CAM, se cortó el papel de filtro Whatman grado 1 en círculos con un punzón de papel de 6 mm de diámetro y se sometió a autoclave.
 10 Para disminuir los efectos inflamatorios del disco, se remojaron en 1 ml de acetato de cortisona 3,0 mg/ml en ETOH absoluta y se secaron al aire durante 60 min en una campana de flujo laminar bajo luz ultravioleta. El día 8, se inocularon los discos con 7 µl de BSA al 0,1% en PBS para CAM de control o 100 ng de Jak3/7 µl, BSA al 0,1% en PBS para CAMs tratados con Jak3 (n = 16 discos de control y n = 16 discos tratados con Jak3). Los discos se colocaron entonces en el tercio externo de la CAM, a 2-3 mm de un vaso principal. Las CAM se evaluaron bajo un estereomicroscopio al día 3 después de la colocación del disco. Las imágenes se tomaron con un Macrosistema Wild M-4 70 y se cuantificó la angiogénesis usando el Software Metamorph con un módulo de angiogénesis. Después de 3 días, Jak3 indujo la angiogénesis en la CAM con un aumento estadísticamente significativo en el número de puntos de ramificación (0,0001), segmentos (0,0001), porcentaje de área del tubo cubierto (0,0001) y longitud total del tubo (0,0001) (figura 28).

20 Ensayo de heridas por rasguño: Se sembraron HCAEC a 10.000 células/pozo en una placa de 96 pozos y se dejó confluir en EGM-2 con suplementos de crecimiento BulletKit. Las células se suspendieron en EGM-2 con FBS al 0,1% sin suplementos de crecimiento BulletKit durante 18 horas. La herida se formó usando una punta de pipeta de 1 ml. Se añadió a las células una curva de dosis de 20 nM - 200 pM de Jak3 humano recombinante (Millipore, Temecula, CA). Cada concentración se realizó por triplicado y el experimento se repitió tres veces con resultados similares. La distancia de migración se midió a las 12 horas y luego cada 4 horas hasta el cierre de la herida en todos los pozos. Los datos se registraron como porcentaje de la herida cerrada en cada punto de tiempo. Jak3 incrementó la migración de células endoteliales en la concentración nanomolar (p <0,03 a las 20 horas, p <0,001 a las 28 horas) (Figura 29).

30 Ensayo de formación de tubos: Se descongeló ECMatrix (Chemicon, Temecula, CA), se diluyó y se solidificó en una placa de 96 pozos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron HCAEC sobre la matriz a 2.000 células/pozo en 150 µl de EGM-2 con FBS al 5% sin suplementos de crecimiento BulletKit. Se añadió una curva de dosis de 20 nM - 200 pM de Jak3 humana recombinante a las células y las placas se devolvieron a 37°C, CO₂ al 5% durante 8 horas. Cada concentración se realizó por triplicado y el experimento se repitió tres veces con resultados similares. Los pozos se evaluaron bajo un microscopio Nikon Eclipse TS100 con una ampliación de 4x y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon CoolPix 995. La angiogénesis se cuantificó mediante el conteo de puntos de ramificación en la imagen resultante. La formación de tubo endotelial fue inducida por Jak3 de una manera dependiente de la concentración a las 8 horas (p = 0,04 a 200 pM, p = 0,0001 a 20 nM) (Figura 30).

40 Ensayo de apoptosis de células endoteliales: Se sembraron HCAEC en una placa de 96 pozos a 2.000 células/pocillo en EGM-2 con suplementos de crecimiento BulletKit. Las células se cultivaron durante 18 horas y se reemplazó el medio con EGM-2 sin suplementos de crecimiento BulletKit y se añadió una curva de dosis de 20 nM - 200 pM de Jak3 humano recombinante a las células. La placa se incubó en condiciones hipóxicas (37°C en una cámara de hipoxia con una atmósfera de 5% de CO₂/95 N₂ con un nivel de oxígeno de 1,0%) durante 36 horas. La apoptosis se determinó midiendo la actividad de la caspasa 3 escindida usando un sustrato fluorogénico específico para caspasa de acuerdo con el protocolo para el Ensayo Homogéneo Caspase-3/7 de Apo-ONE® (Promega, Madison, WI). En resumen, el control y la HCAEC tratada se sometieron a lisis en 100 µl de reactivo Caspasa-3/7 de Apo-ONE® y se incubaron en ese reactivo a temperatura ambiente durante 1 h. La activación de la caspasa 3 del sustrato profluorante rodamina 110, amida de ácido bis-(N-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartico (Z-DEVD-R110) se midió mediante un lector de microplacas de fluorescencia. Se encontró que Jak3 protegido contra la hipoxia infujo apoptosis de células endoteliales (p <0,05) (Figura 31).

50 Ensayo de proliferación de células endoteliales: Se sembraron HCAEC en una placa de 96 pozos a una concentración de 2000 células/pozo y se dejó proliferar durante 24 horas en EGM-2 con suplementos de crecimiento BulletKit. Las células se suspendieron entonces en EGM-2 con FBS al 0,1% sin suplementos de crecimiento BulletKit durante 18 horas. El medio se reemplazó con EGM-2 fresco con suplementos de crecimiento BulletKit y las

- 5 células se trataron por triplicado con: PBS solo; VEGF murínico recombinante (60 ng/ml); o Jak3 (a una concentración de 200 nM - 200 pM). Después de 48 h, se añadieron a cada pozo 10 µl del compuesto colorimétrico bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (5 mg/ml) y se dejaron incubar durante 4 h a 37°C. Se eliminó todo menos 25 µl de medio en cada pozo y se añadieron 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Después de una incubación de 10 min a 37°C, se midió el A540 usando un lector de microplacas. A540 se convirtió en el número de células sobre la base de una curva estándar creado mediante la siembra de una placa de 96 pozos con concentraciones conocidas de células, según lo determinado por hemocitometría, y la medición de su A540 después de 4 horas de incubación con MTT. Jak3 incrementó de la proliferación celular a las 48 horas ($p = 0,007$ a 20 nM) (Figura 32).
- 10 Efecto de STAT3 sobre la formación de tubos: Se evaluó el papel de la activación de STAT3 en la formación de tubos mediada por Jak3 usando un pequeño inhibidor peptídico de STAT3 fosforilado (P-STAT3). Se solidificó ECMatrix en pozos de una placa de 96 pozos. Se sembraron HCAEC sobre la matriz a 2.000 células/pozo en 150 µl de EGM-2 con FBS al 5% sin suplementos adicionales de crecimiento BulletKit. Los pozos se trataron por triplicado con: PBS solo, PBS + inhibidor P-STAT3 100 µM, Jak3 20 nM, o Jak3 20 nM + inhibidor P-STAT3 100 µM. Los pozos se fotografiaron a las 8 horas y la formación de tubos se cuantificó mediante conteo de puntos de ramificación en la imagen resultante. La adición de inhibidor STAT3 previno la formación de tubos mediada por Jak3, lo que indica que la señal Jak3 está mediada a través de la ruta STAT3 (Figura 33).
- 15

Listado de secuencias

20 <110> University of North Carolina at Chapel Hill DeMore, Nancy Patterson, Cam Bhati, Rajendra

<120> OBJETIVOS NOVEDOSOS PARA LA REGULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

<130> 5470-487WO

<150> US 61/053,397

<151> 2008-05-15

25 <160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Gln Pro Asp Phe Ser Tyr Arg Ser Asn Cys
1 5 10

<210> 2

<211> 12

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 607 851 T3

Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Glu Leu Cys
1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Val Gln Val Lys Asp Arg Cys
1 5

<210> 4

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys
1 5 10 15

<210> 5

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Ala Cys Lys Asn Lys Asn Asp Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr
1 5 10 15

Leu Cys

20 <210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 607 851 T3

Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys
1 5 10 15

Ser Lys Thr Cys
20

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Thr Ser Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ile Ser Arg Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
20 25

<210> 8

<211> 37

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico sintético

<400> 8

Cys Ser Arg Pro Arg Lys Val Leu Val Glu Gln Thr Lys Asn Glu Tyr
1 5 10 15

Phe Glu Leu Lys Ala Asn Leu His Ala Glu Pro Asp Tyr Leu Glu Val
20 25 30

Leu Glu Gln Gln Thr
35

15

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 607 851 T3

<220>

<223> Péptido antigénico sintético

<400> 9

Thr Ser Lys Ser Ser Gly Gln Lys Gly Arg Lys Glu Leu Leu Lys Gly
1 5 10 15

Asn Gly Arg Arg Ile Asp Tyr Met Leu His Cys
20 25

5 <210> 10

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ARNsi

<400> 10

gagauaacgu acaucaaca 19

<210> 11

<211> 19

15 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ARNsi

<400> 11

20 caagcugcaa ugcuauguu 19

<210> 12

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia de ARNsi

<400> 12

ccaugucagg cgaauuguu 19

Reivindicaciones

1. Uso de un inhibidor de la expresión y/o actividad de SFRP2 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cáncer o metástasis, o para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada en un sujeto, en donde dicho inhibidor se enlaza o se direcciona a SFRP2 y es (i) un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o aptámero direccionado a SFRP2; o (ii) un oligonucleótido antisentido, oligonucleótido de triple hélice, ARN, miARN o ribozima direccionado a un ácido nucleico que codifica SFRP2.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento es para tratar o prevenir cáncer o metástasis.
3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho sujeto ha sido diagnosticado con cáncer.
4. El uso de la reivindicación 3, en donde dicho cáncer es cáncer de mama.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el inhibidor disminuye el nivel de un ácido nucleico que codifica SFRP2 o disminuye la actividad de SFRP2.
6. El uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el medicamento es para tratar o prevenir angiosarcoma o metástasis de angiosarcoma, o para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada.
7. Un método para identificar un compuesto que regula la angiogénesis o es útil para la inhibición del crecimiento tumoral o metástasis, que comprende determinar la expresión y/o actividad de SFRP2 en una muestra en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, y seleccionar un compuesto que incremente o disminuya el nivel de expresión y/o actividad de SFRP2 en relación con el nivel en ausencia del compuesto, tal como un compuesto que regula la angiogénesis o es útil para la inhibición del crecimiento tumoral o metástasis.
8. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a SFRP2 humano en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste de aminoácidos
 - a. 202-220 (EITYINRDTKIILETKSKT-Cys (SEQ ID NO:6)), and
 - b. 270-295 (ITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQC (SEQ ID NO:7)); y
- en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es para tratar o prevenir cáncer o metástasis, o para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada.
9. Un inhibidor de la expresión y/o actividad de SFRP2 para uso en el tratamiento o prevención de cáncer o metástasis, o para tratar trastornos relacionados con angiogénesis excesiva o no deseada en un sujeto, en donde dicho inhibidor se enlaza o se direcciona a SFRP2 y es (i) un fragmento de anticuerpo o aptámero direccionado a SFRP2; o (ii) un oligonucleótido antisentido, oligonucleótido de triple hélice, ARNsi, miARN o ribozima direccionados a un ácido nucleico que codifica SFRP2.
10. Un inhibidor para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el cáncer o la metástasis es angiosarcoma o metástasis de angiosarcoma.

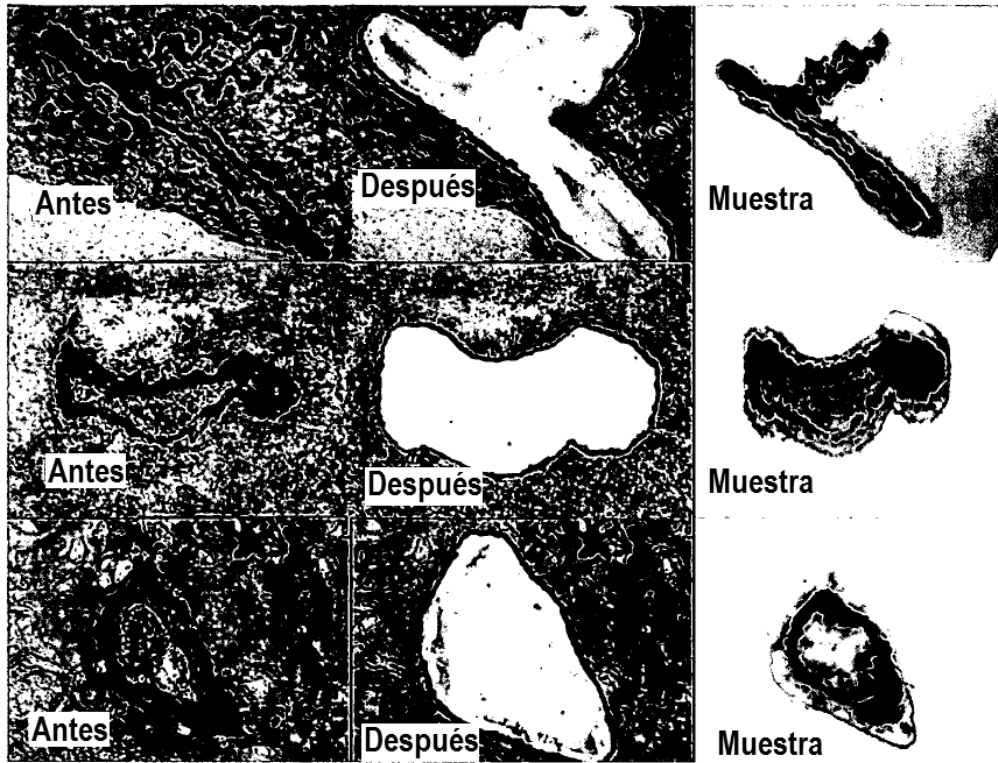


FIG. 1

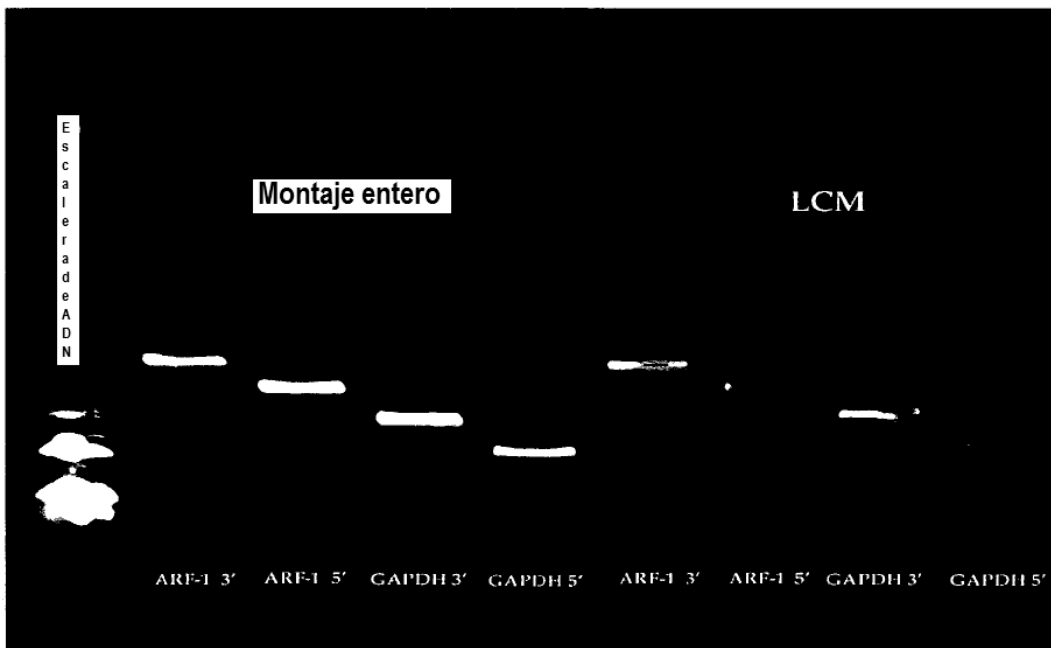


FIG. 2

F

Identidad y Pureza de Vasos

Vasos LCM	EC	Tumor
-----------	----	-------

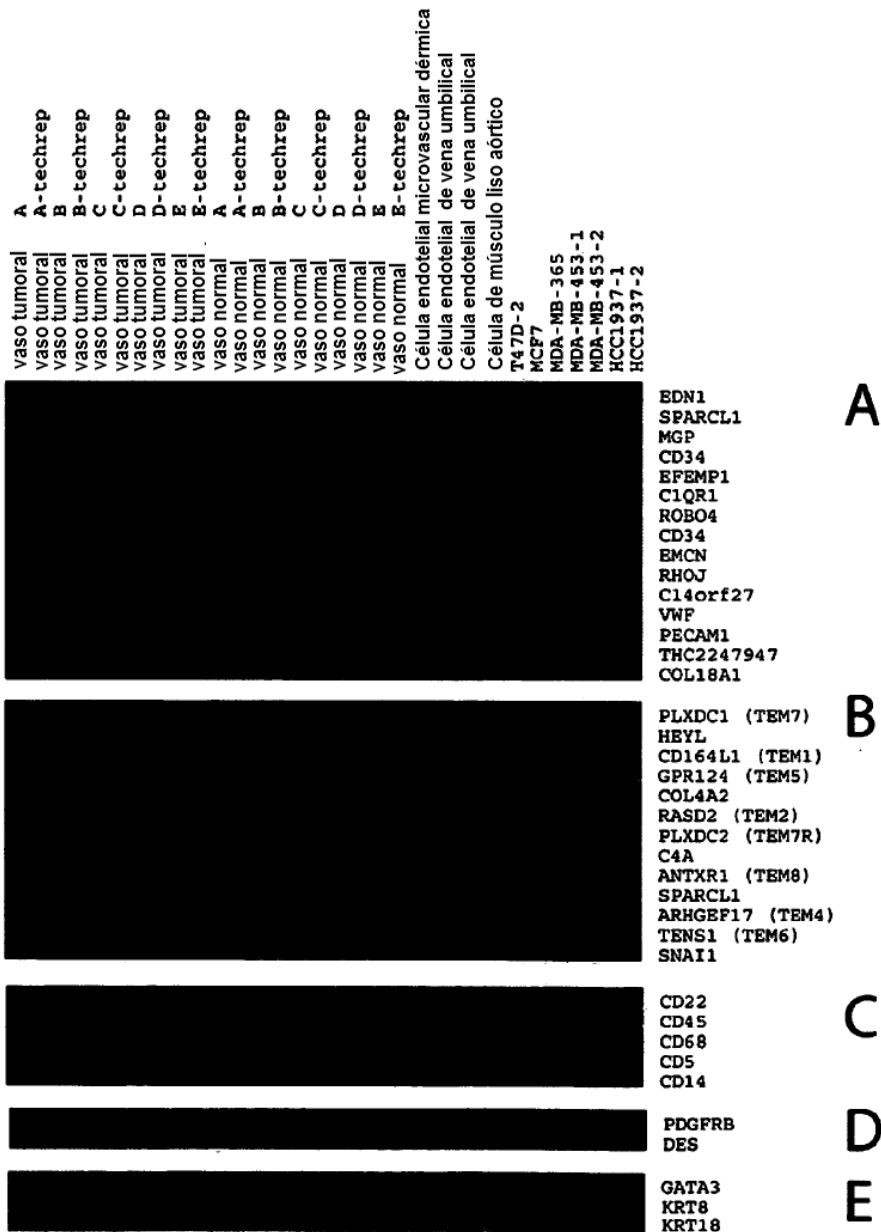


FIG. 3

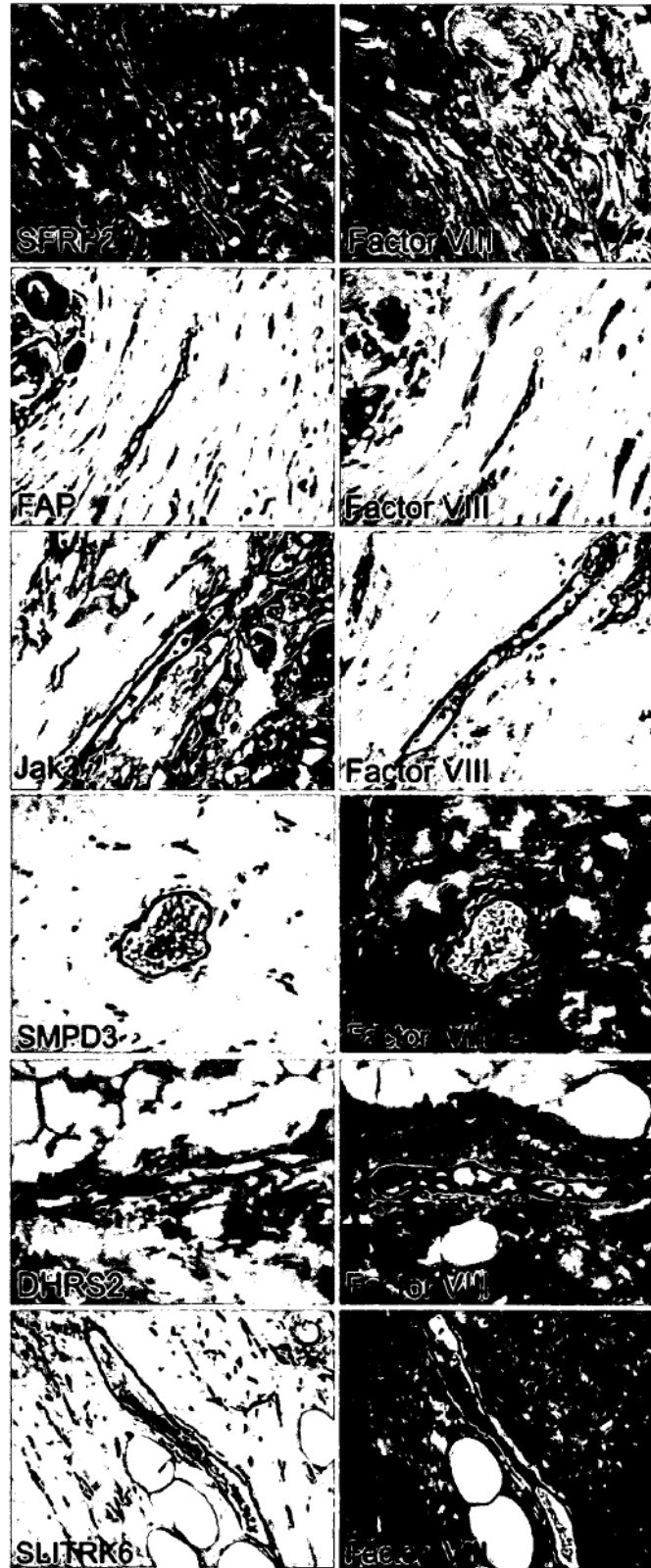


FIG. 4

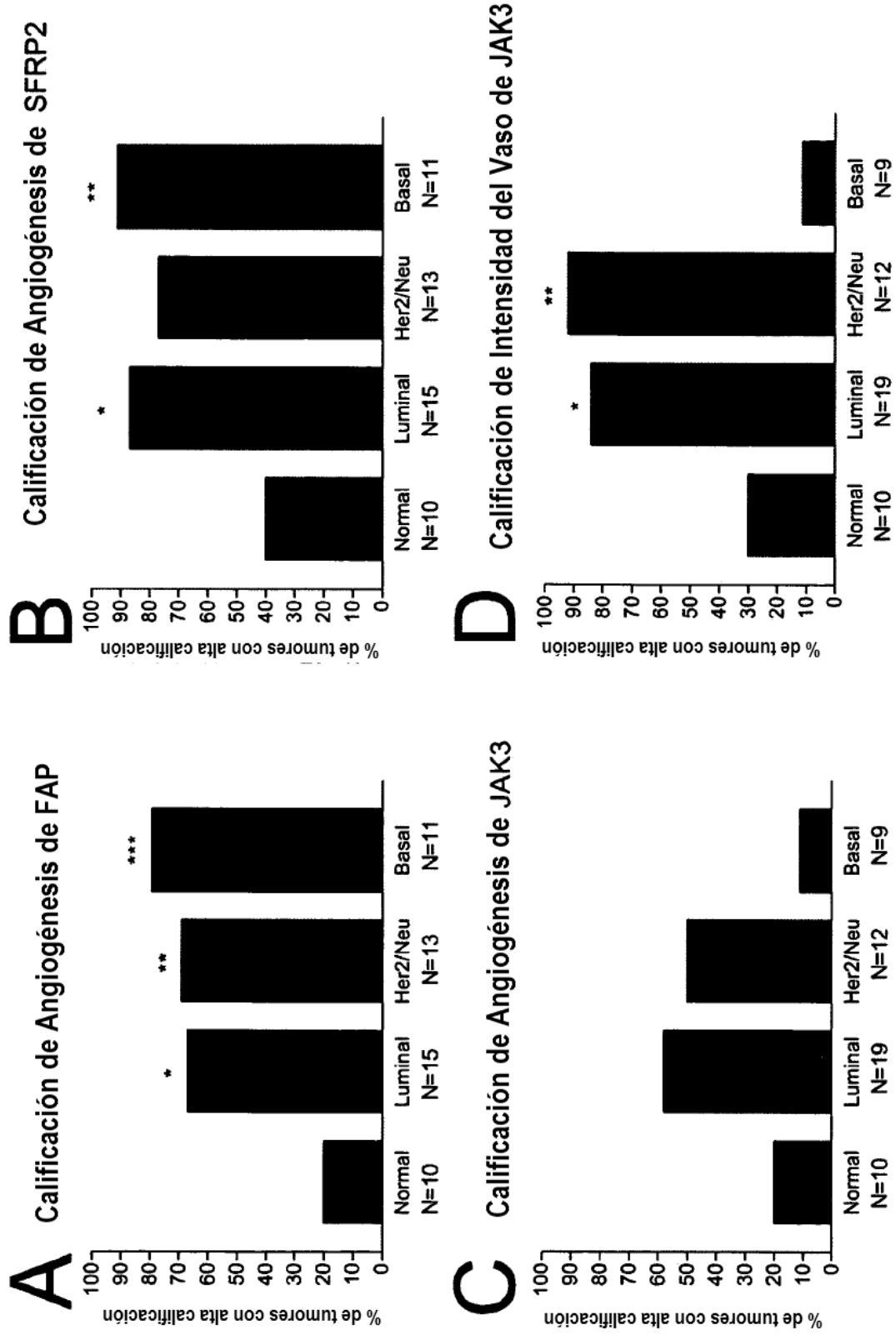


FIG. 5

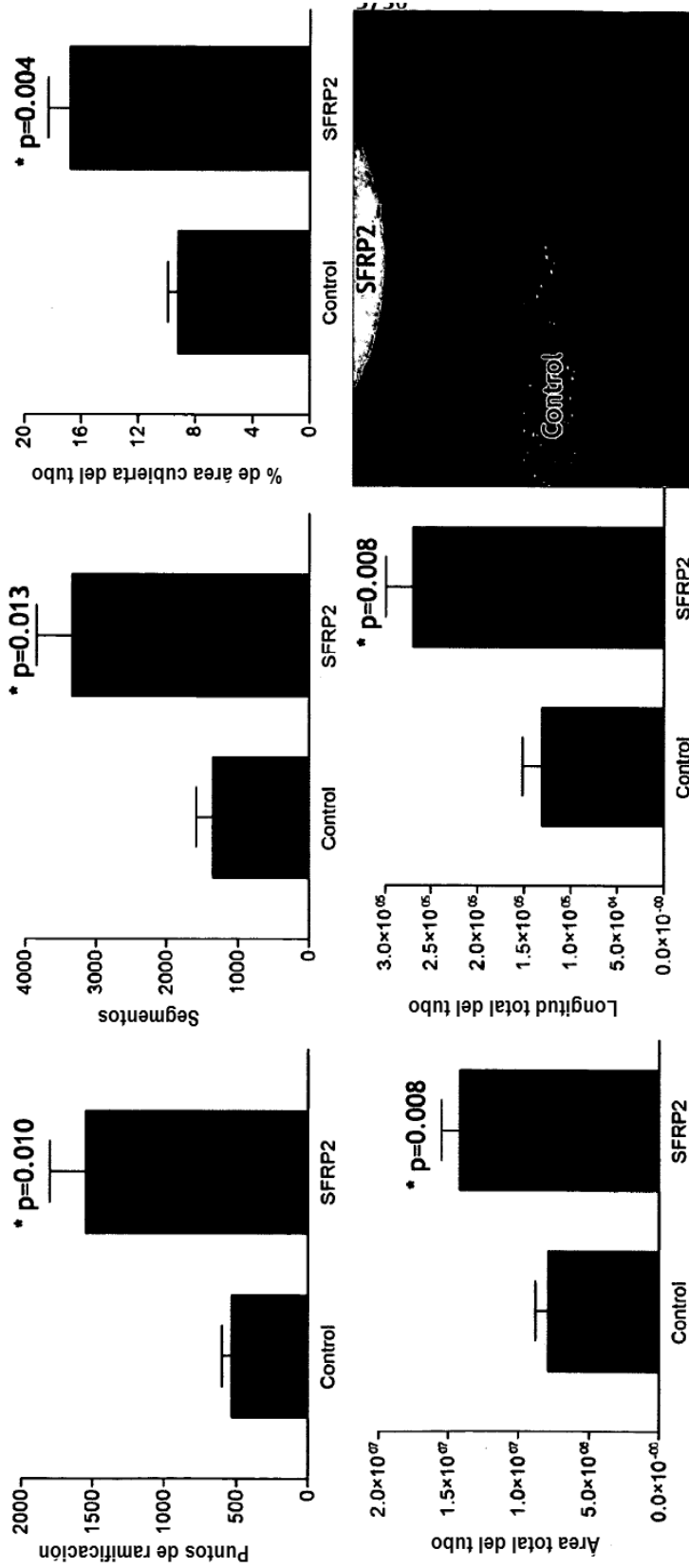


FIG. 6

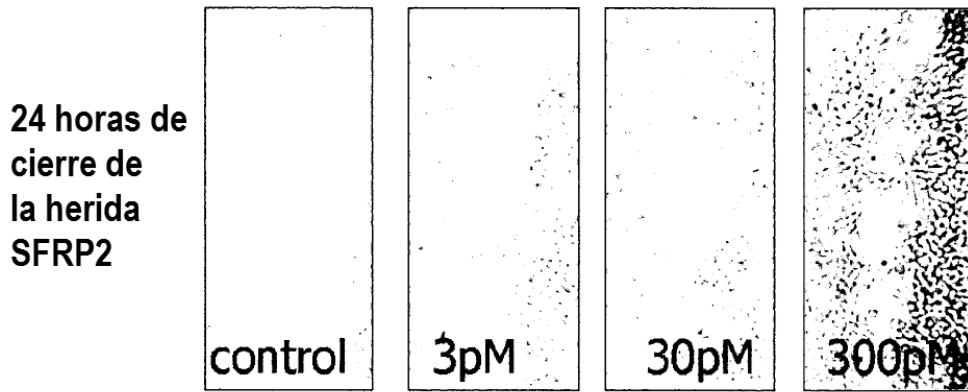
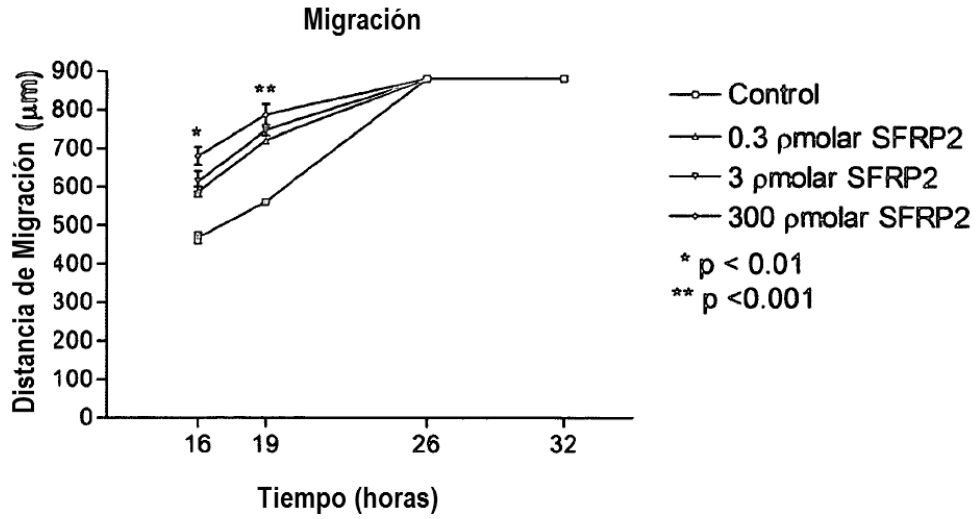


FIG. 7

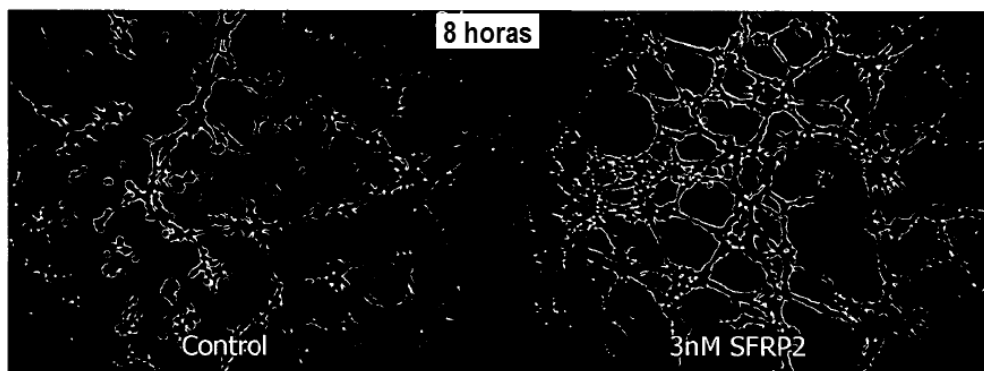
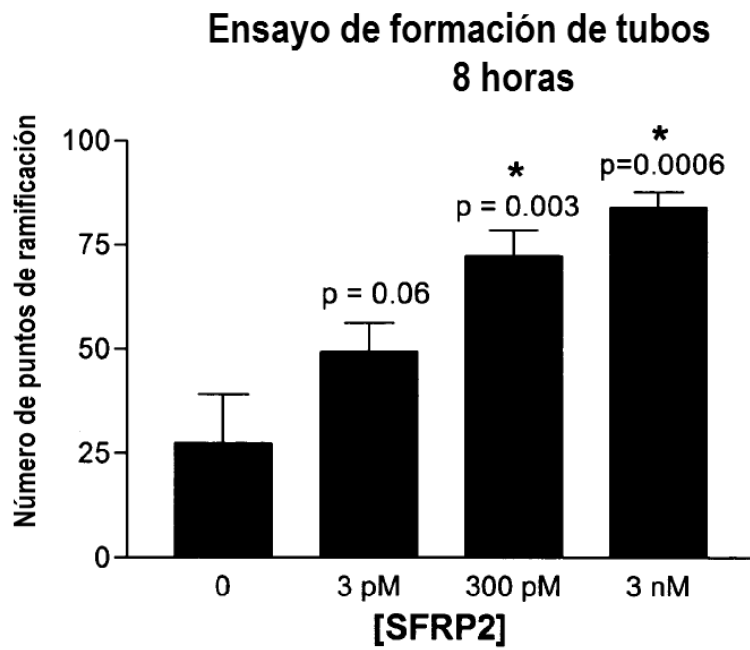


FIG. 8

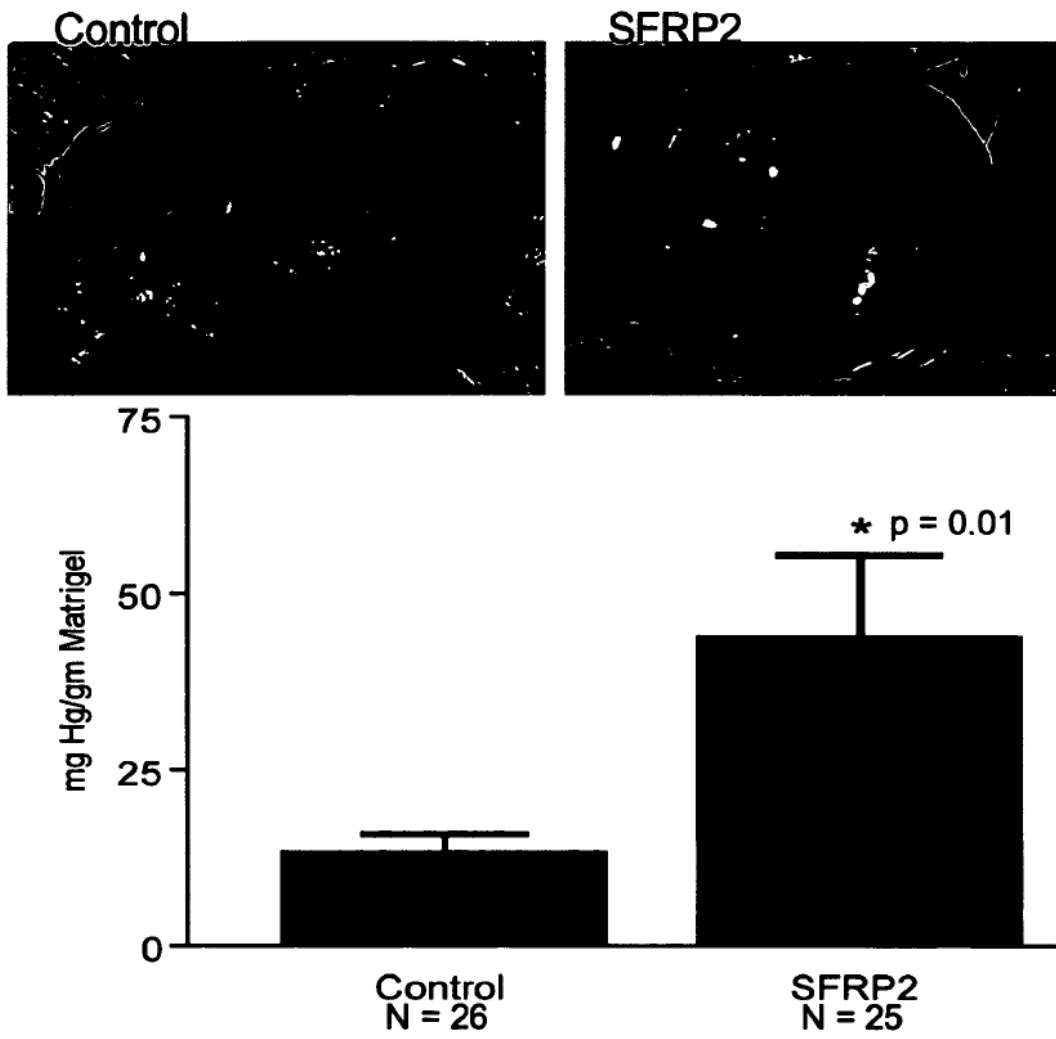


FIG. 9

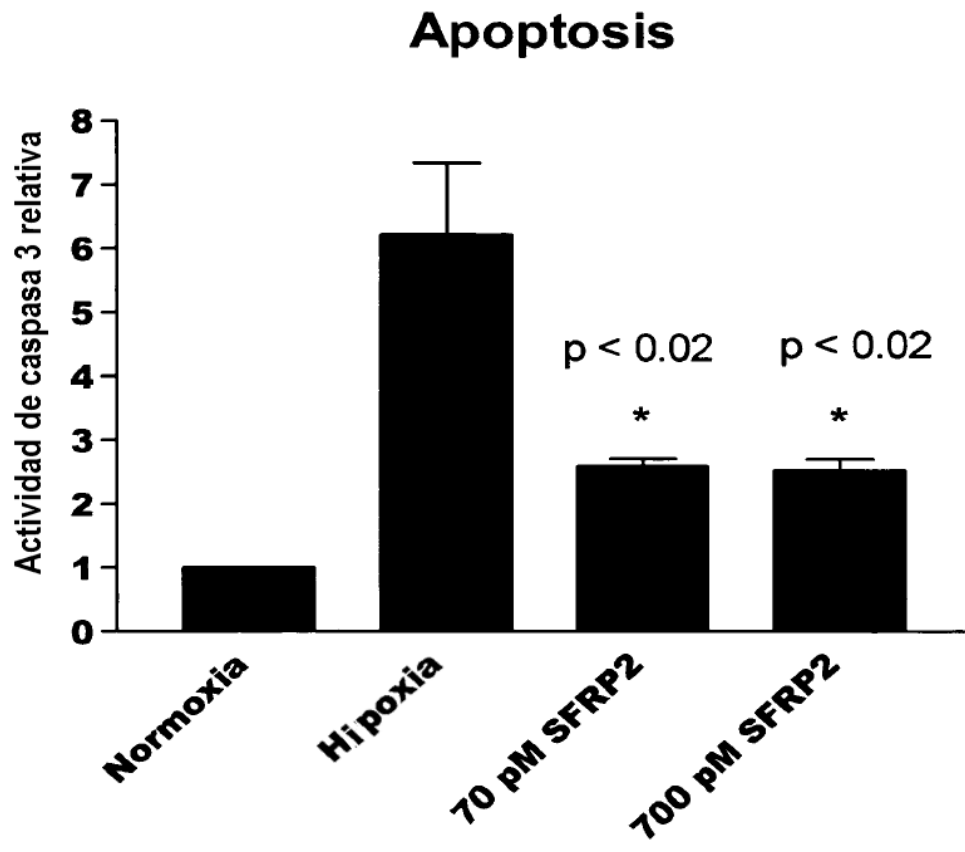


FIG. 10

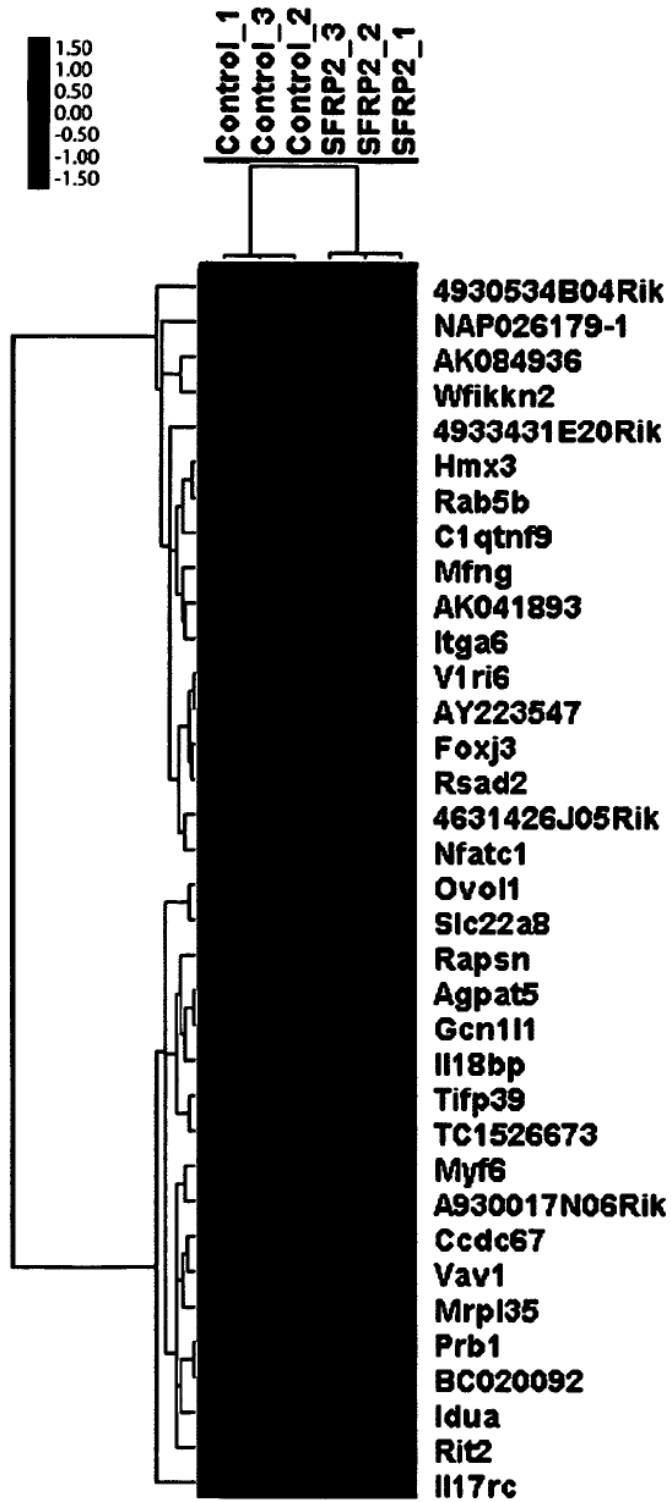


FIG. 11

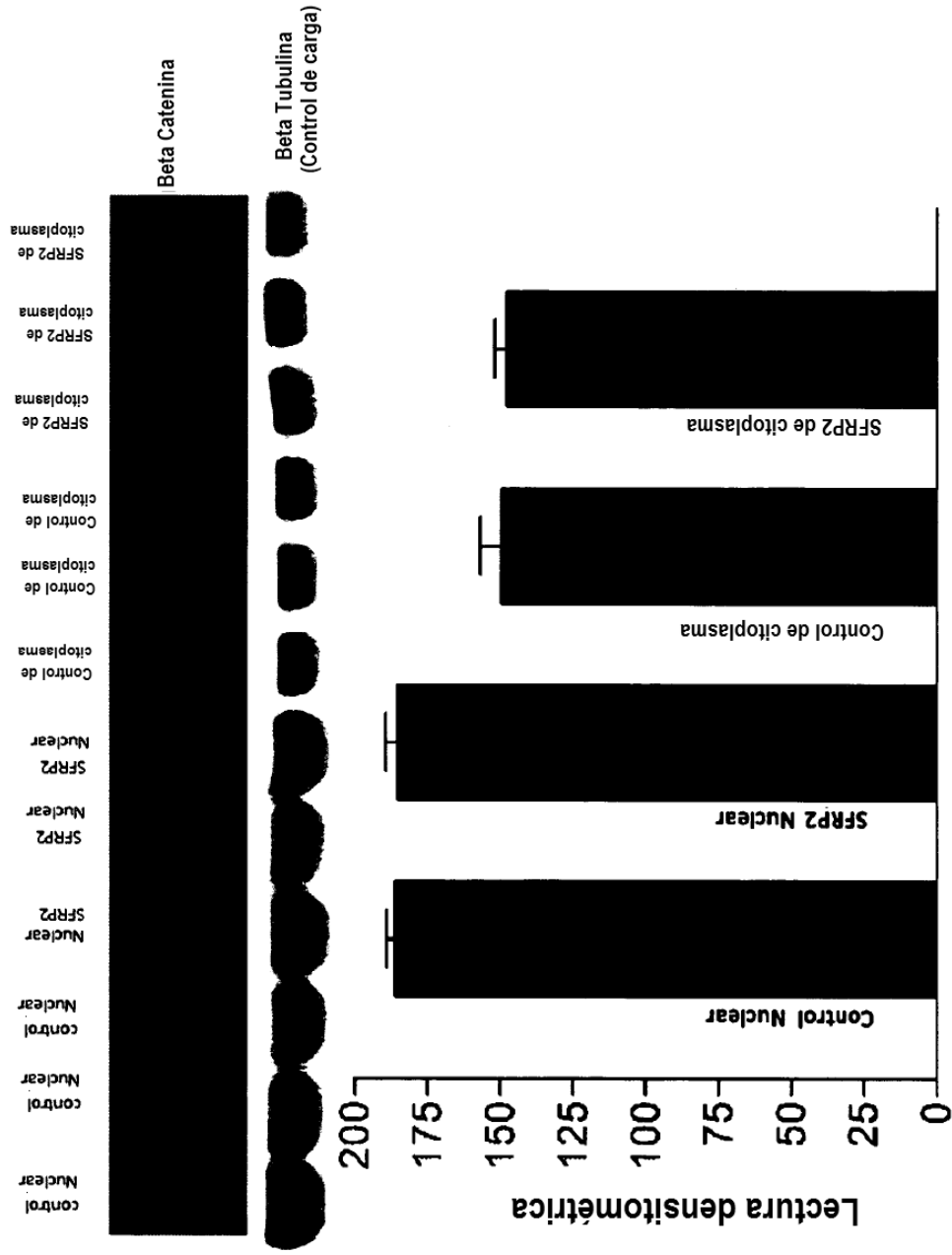


FIG. 12

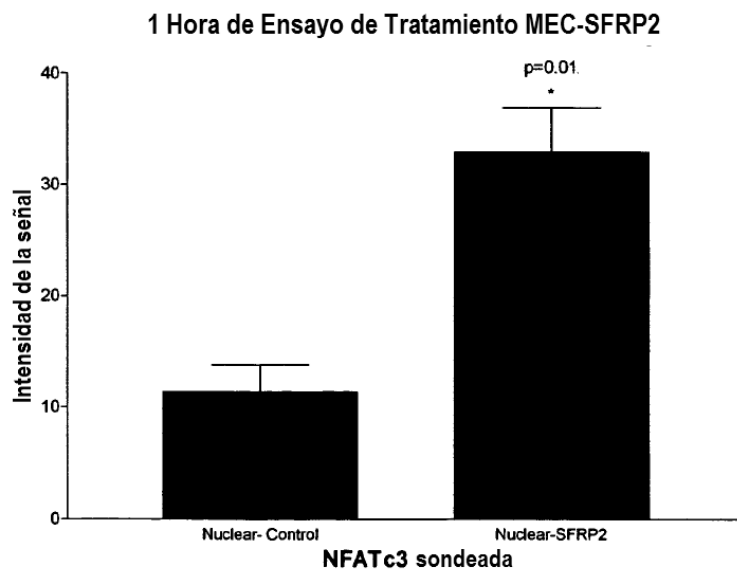
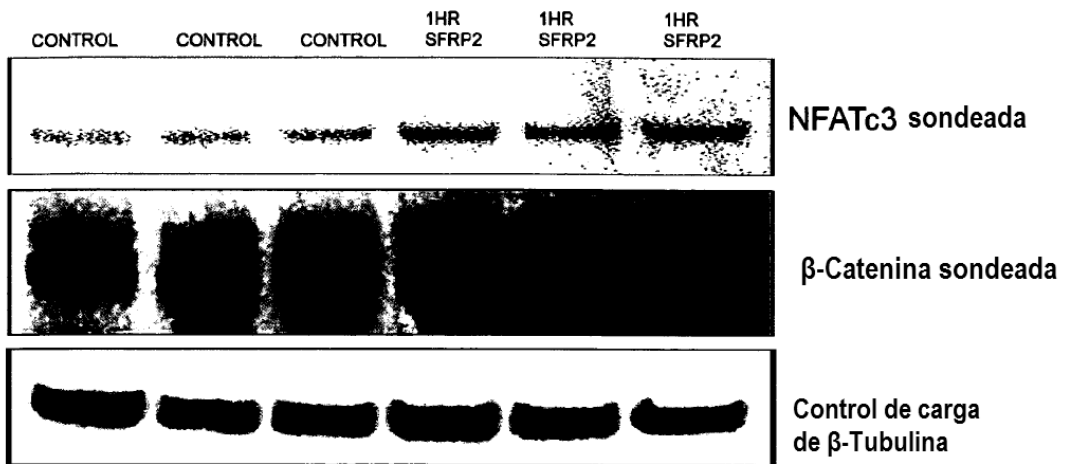


FIG. 13

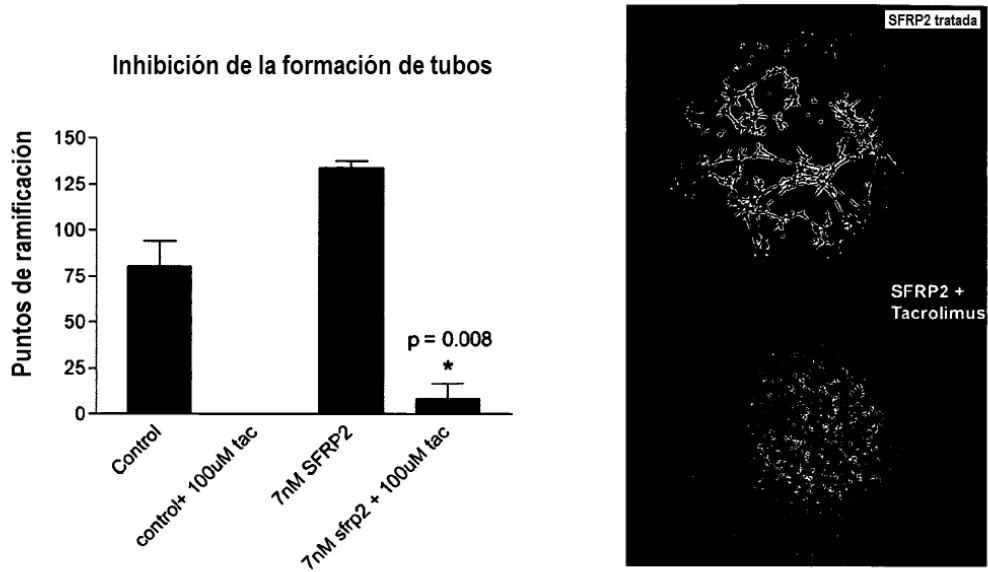


FIG. 14

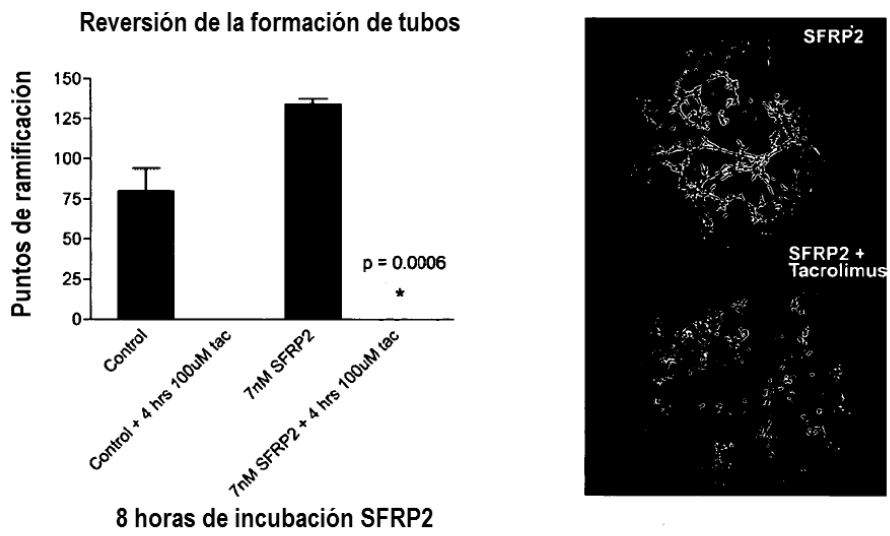


FIG. 15

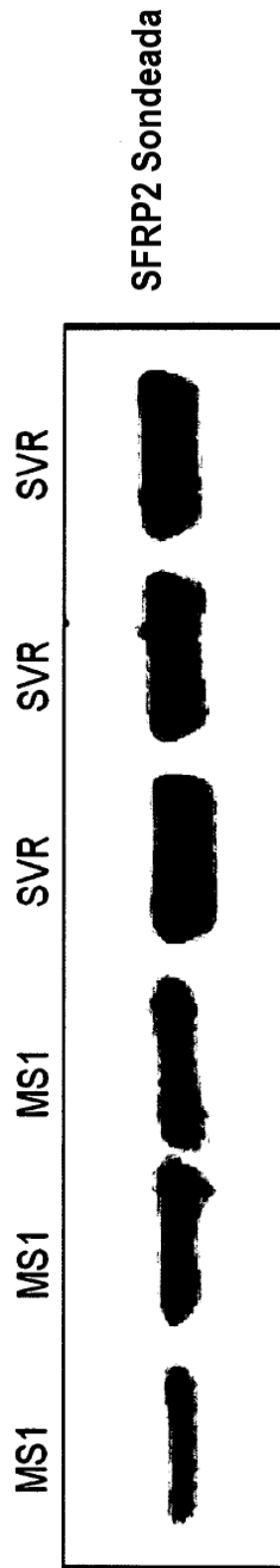


FIG. 16

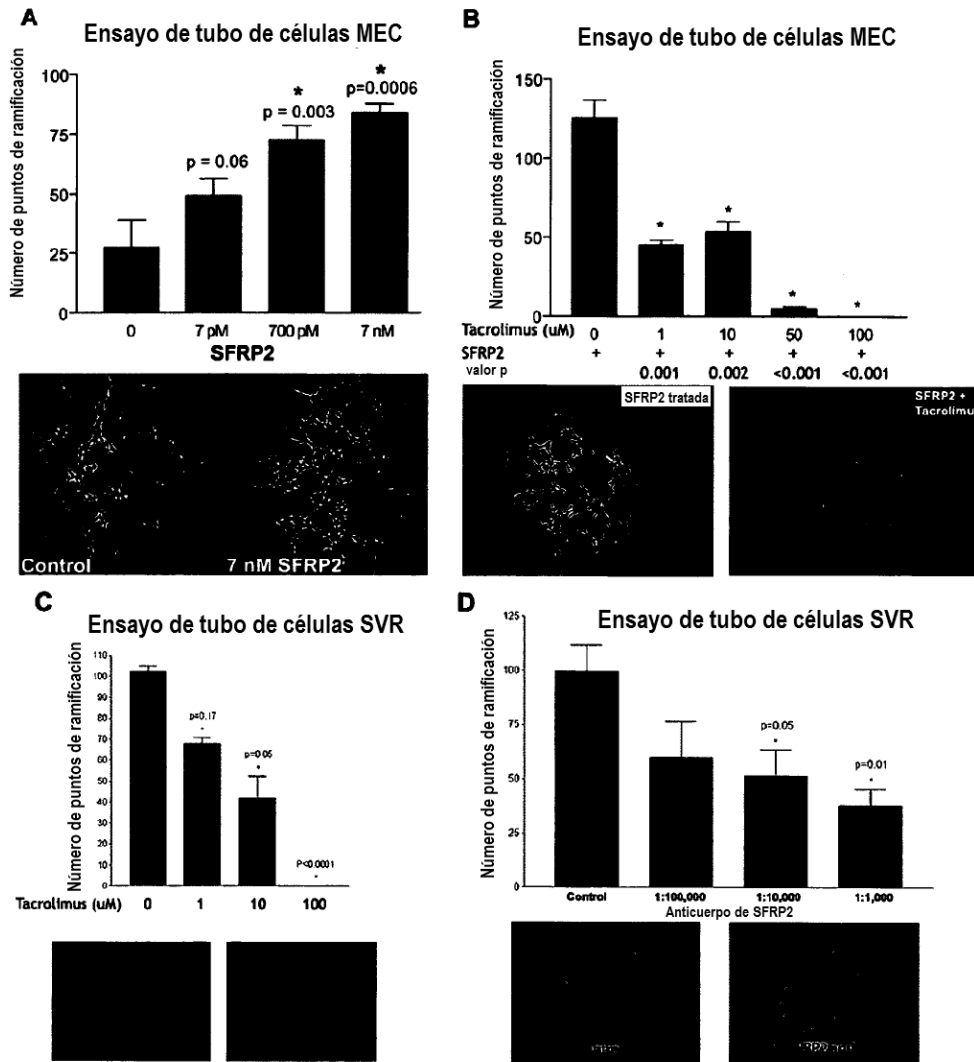


FIG. 17

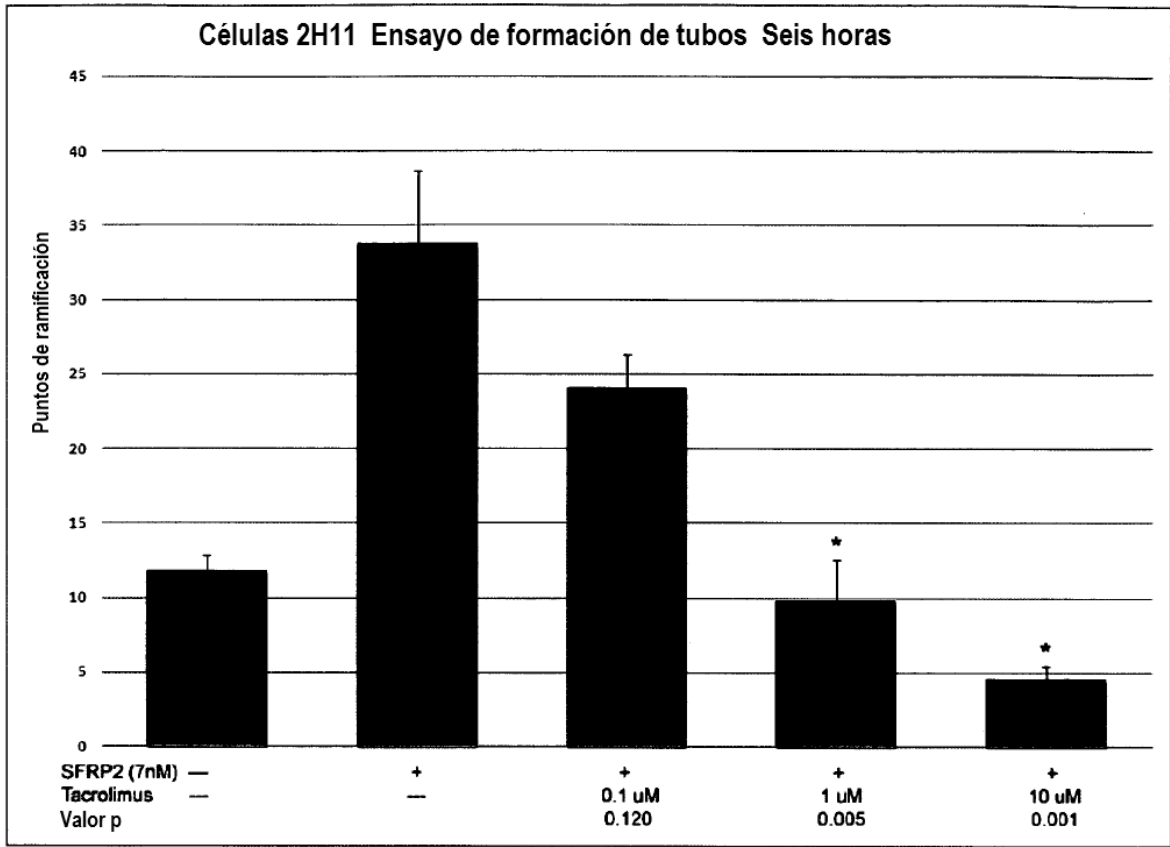


FIG. 18

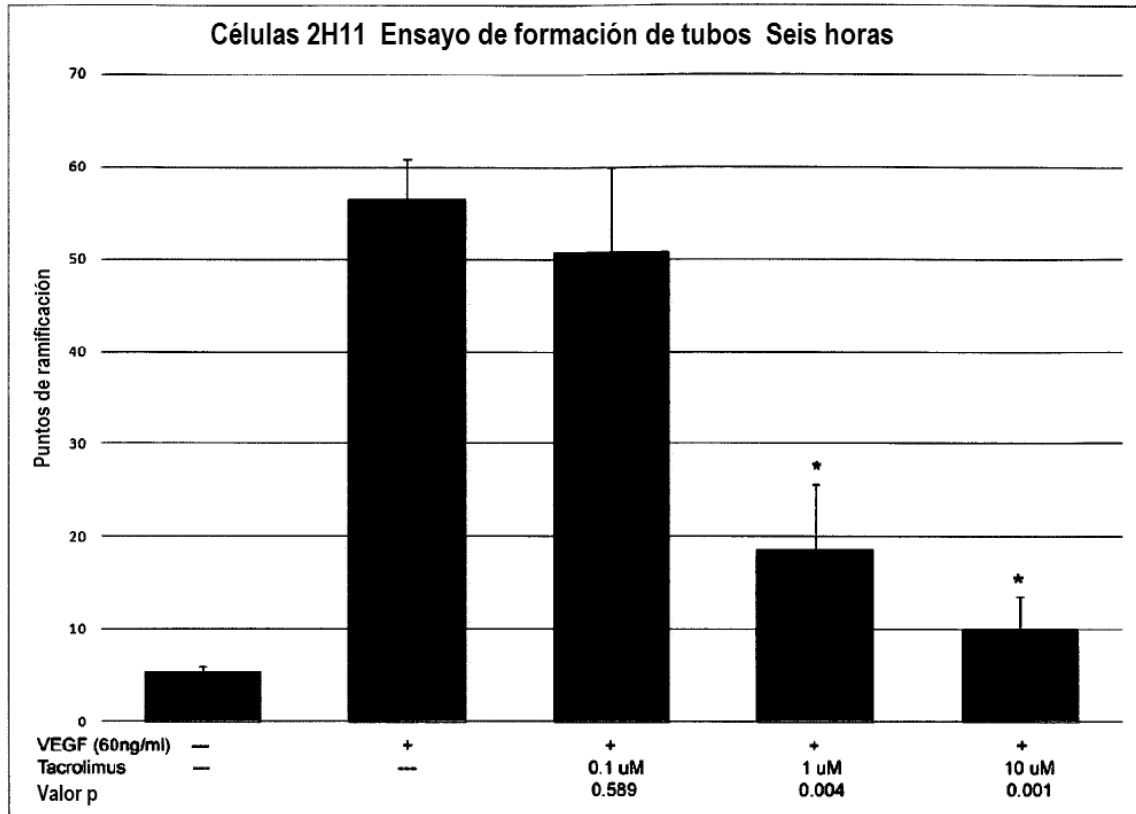


FIG. 19

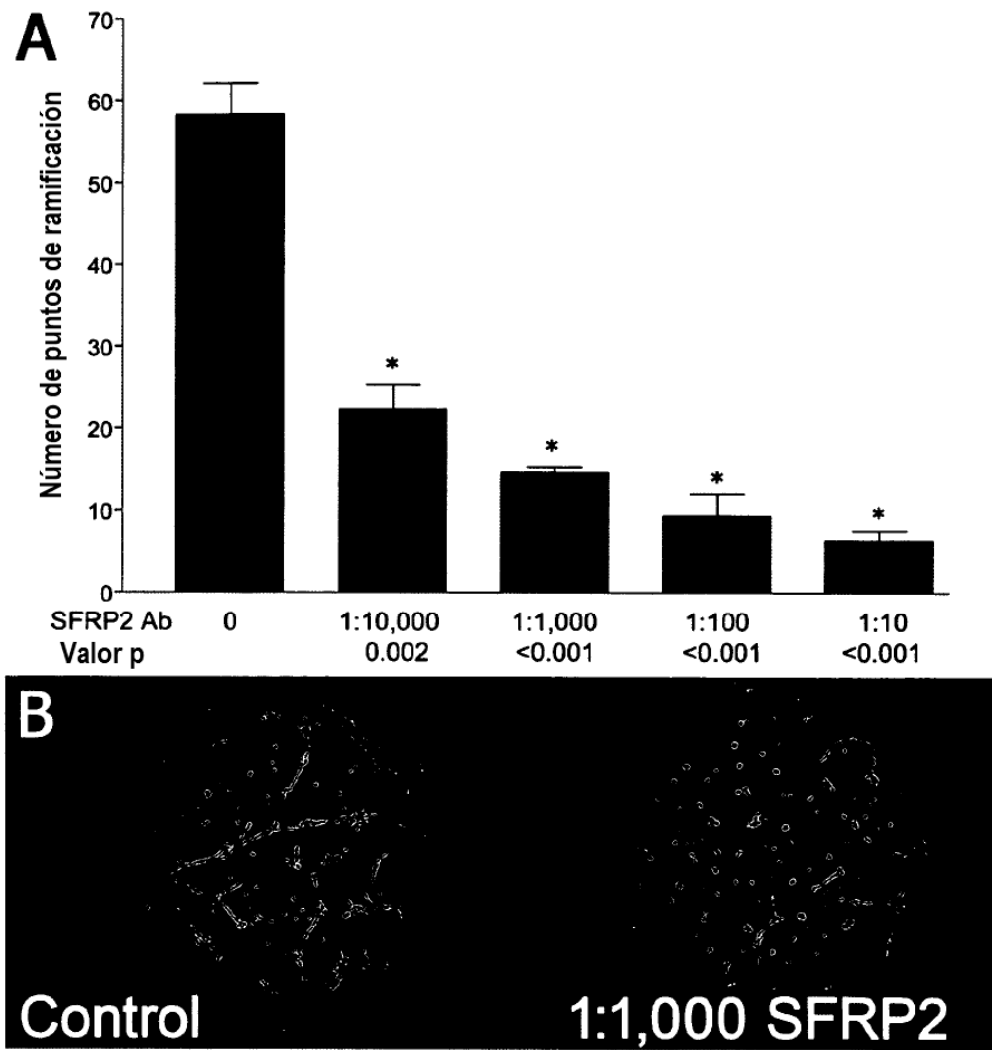


FIG. 20

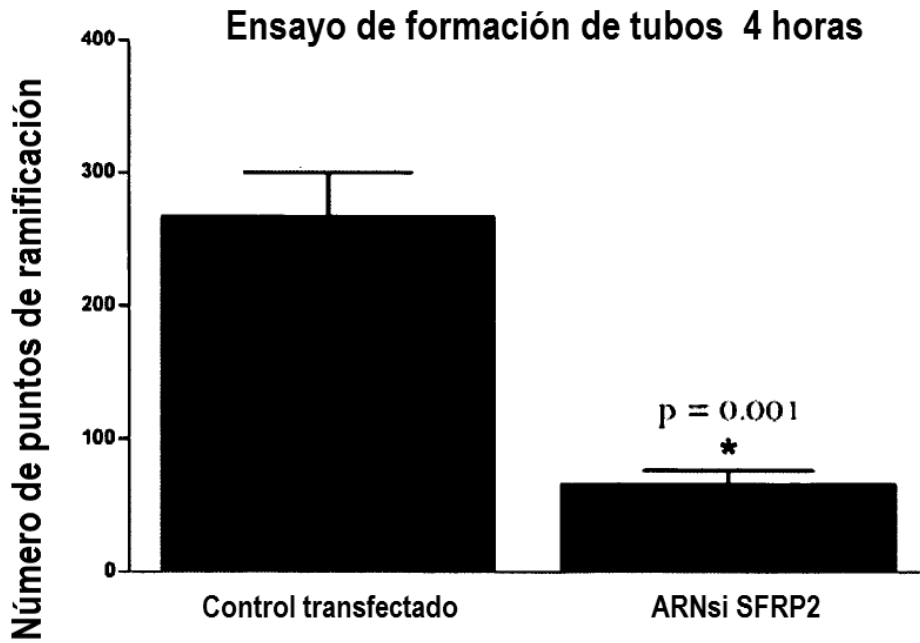
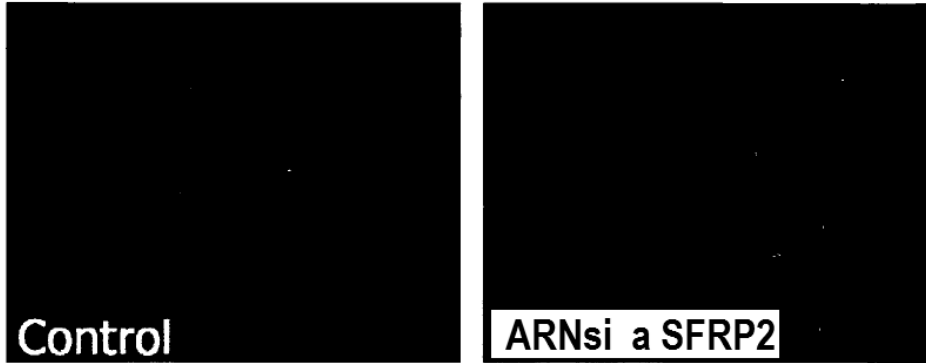
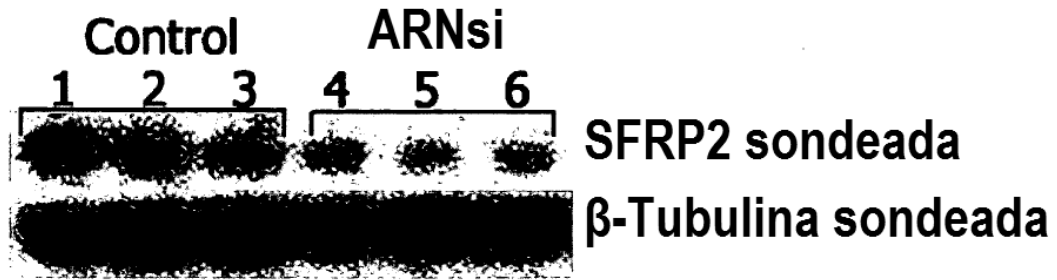


FIG. 21

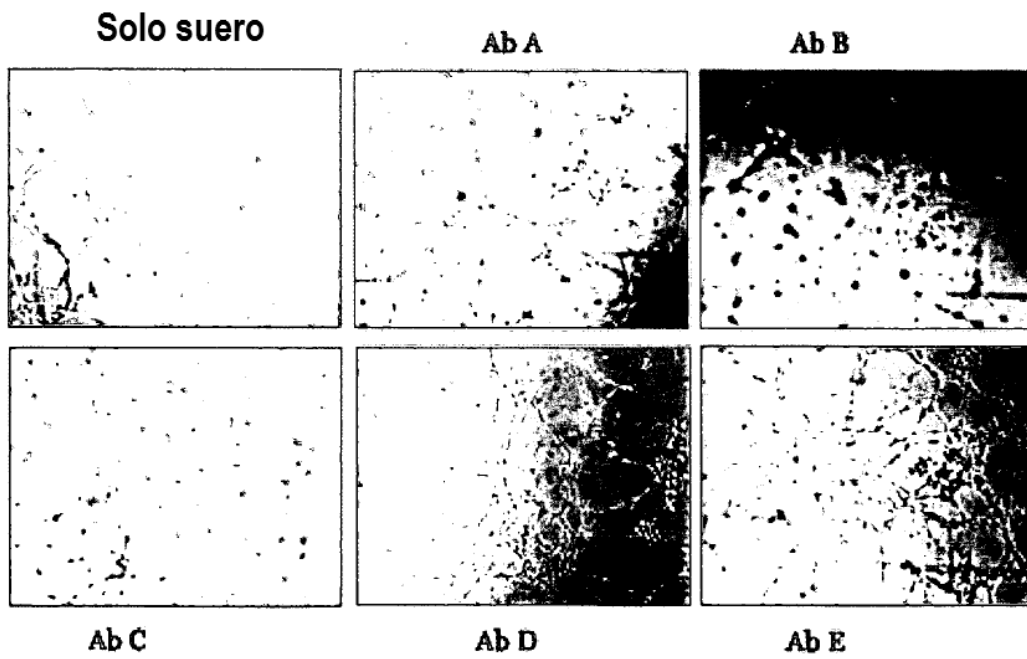
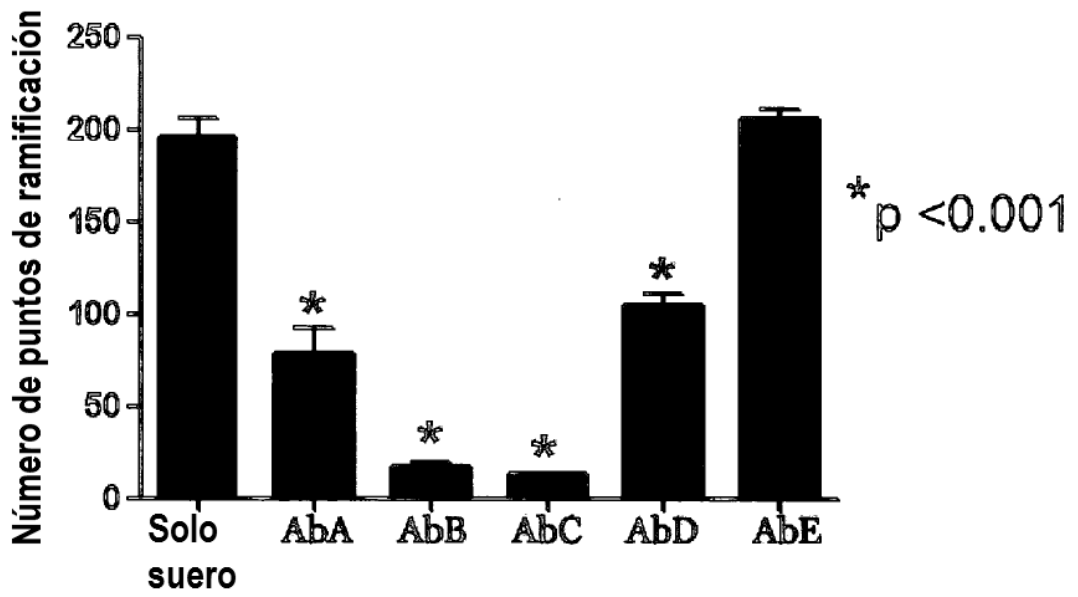


FIG. 22

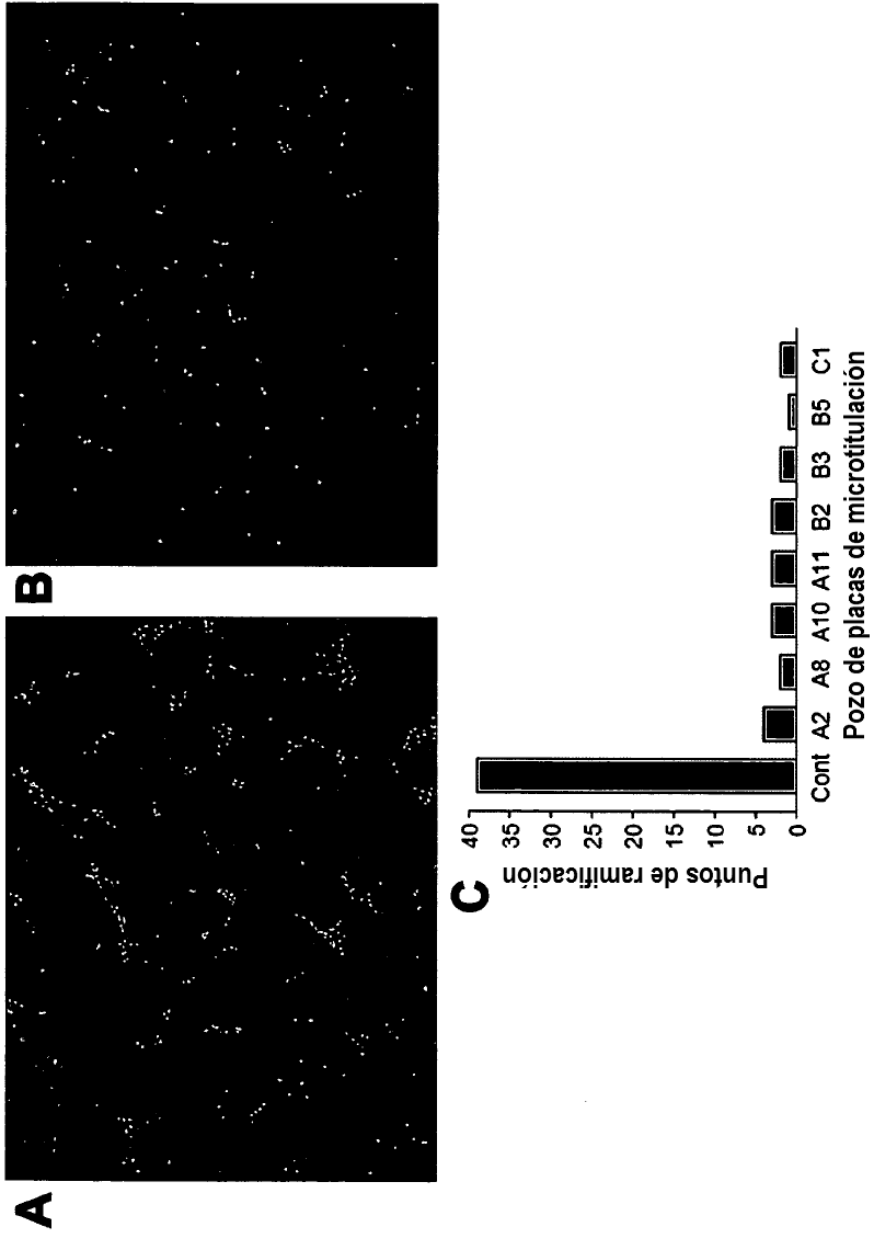


FIG. 23

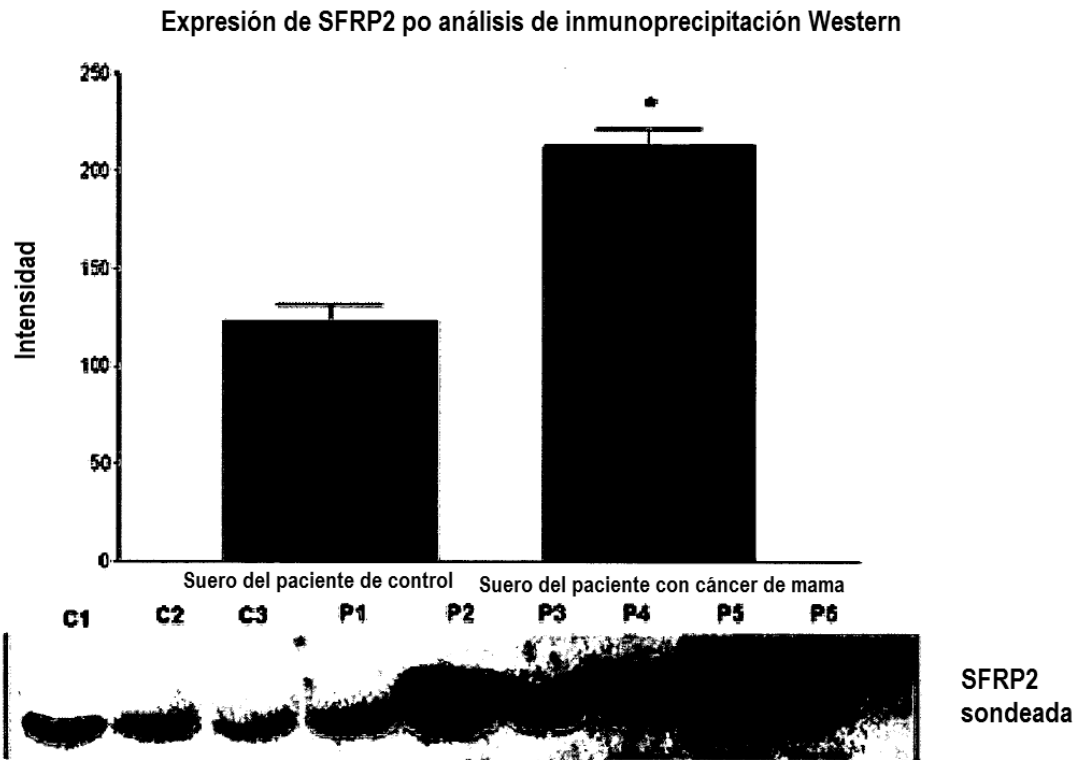


FIG. 24

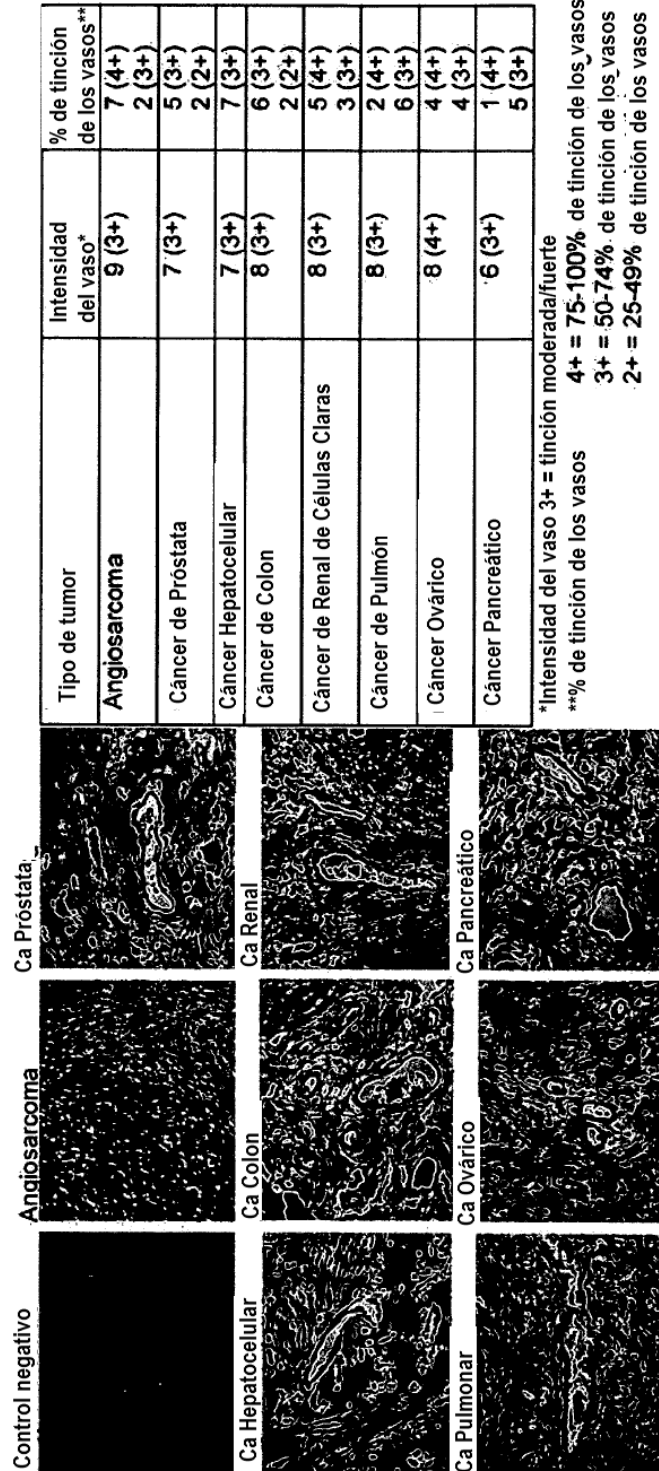


FIG. 25

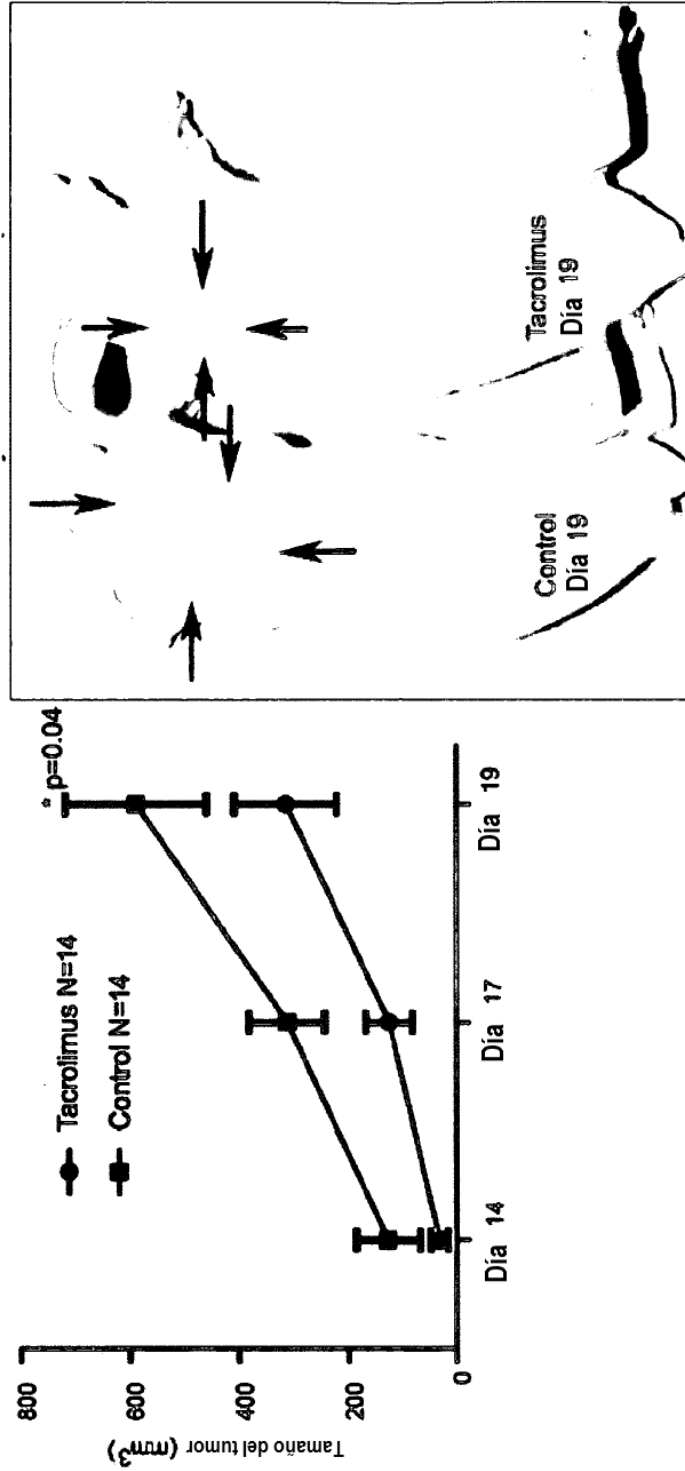


FIG. 26

Efecto de Tacrolimus en crecimiento de tumor de ratón MMTV-Neu

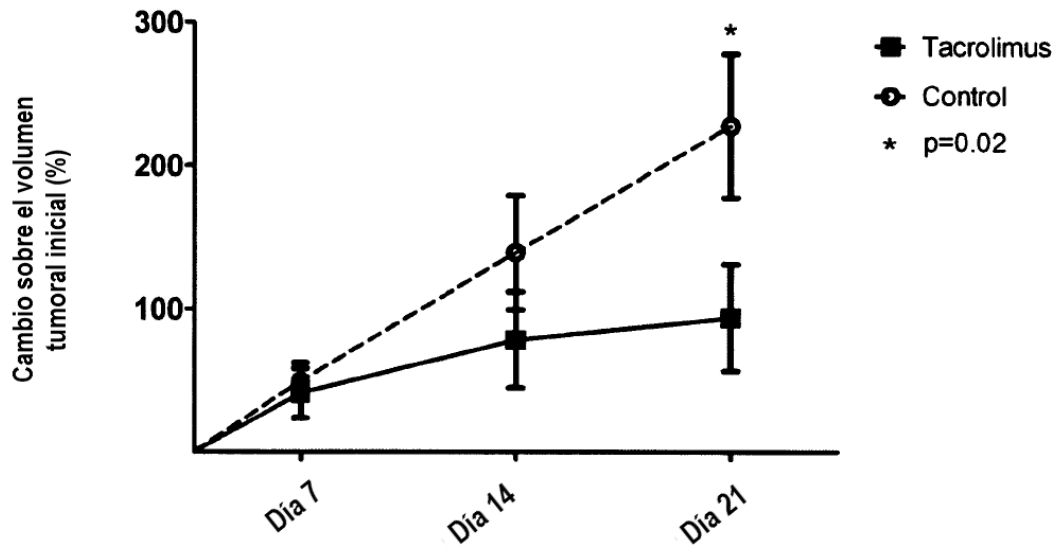


FIG. 27

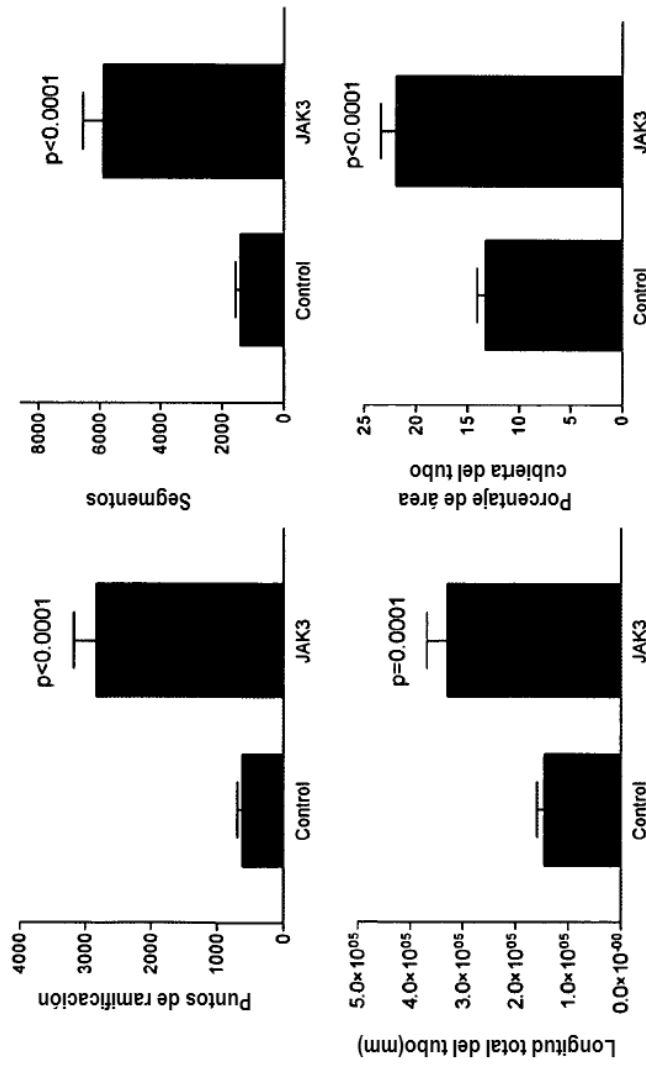
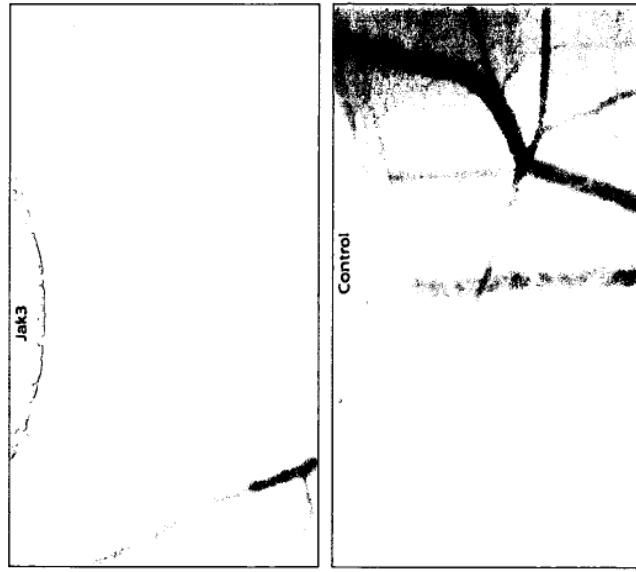


FIG. 28

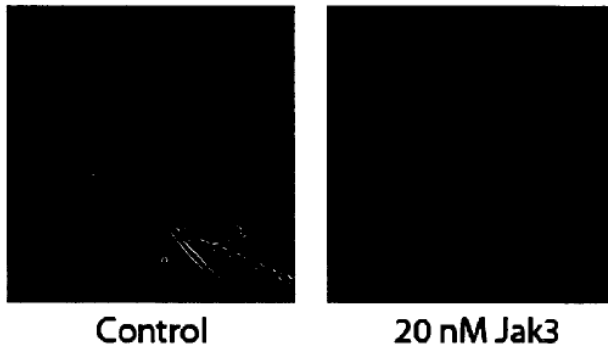
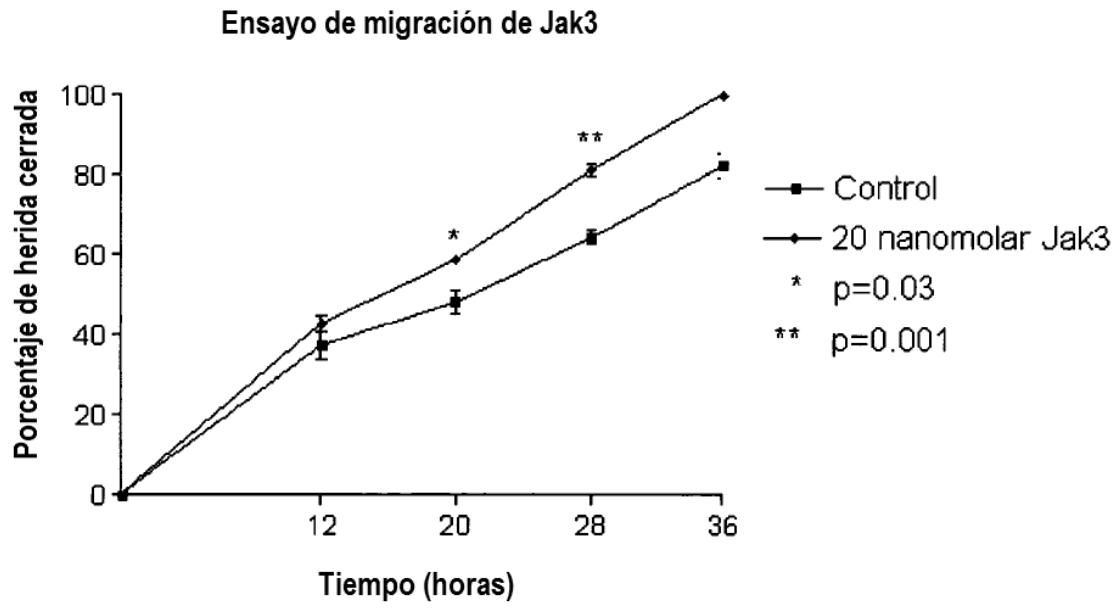


FIG. 29

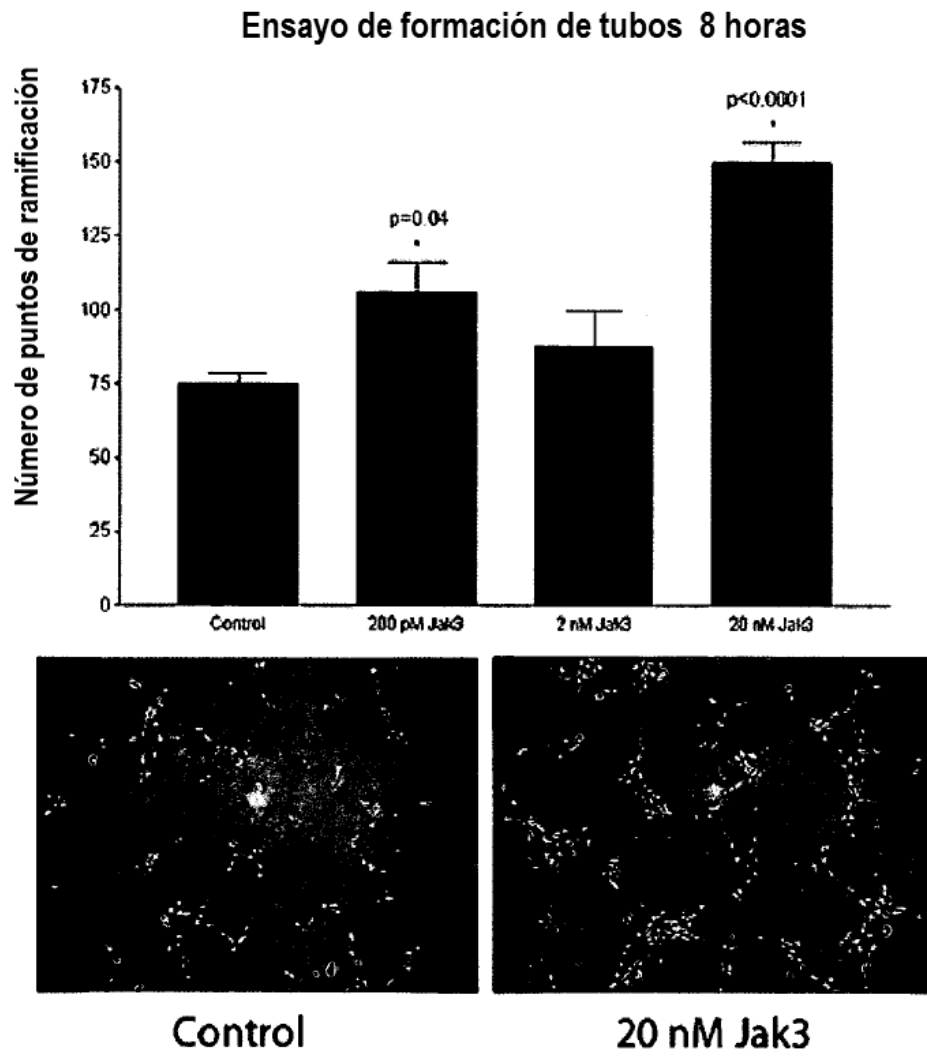


FIG. 30

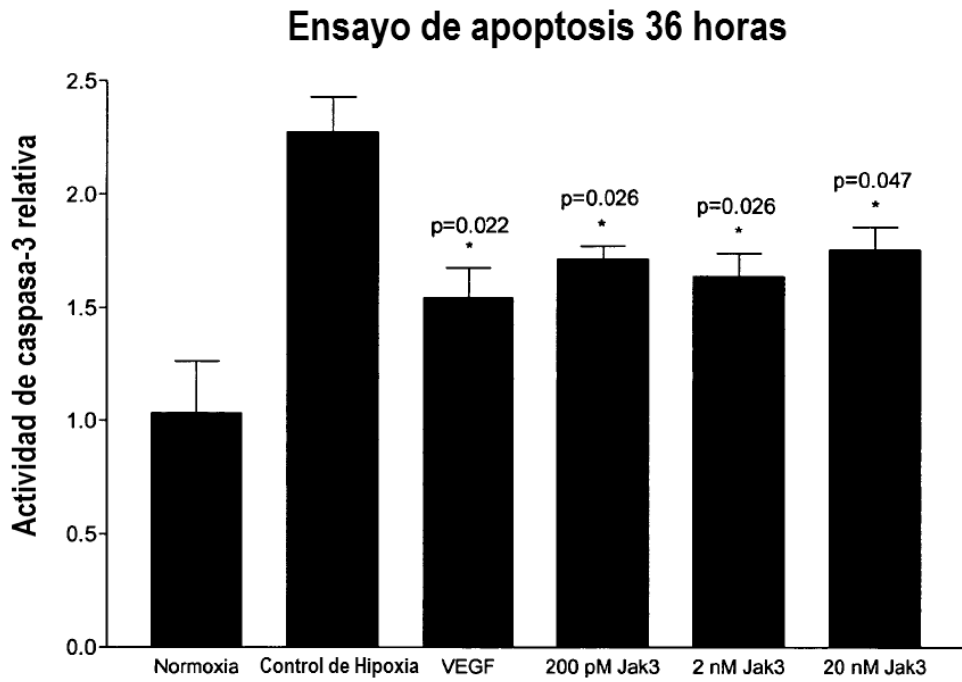


FIG. 31

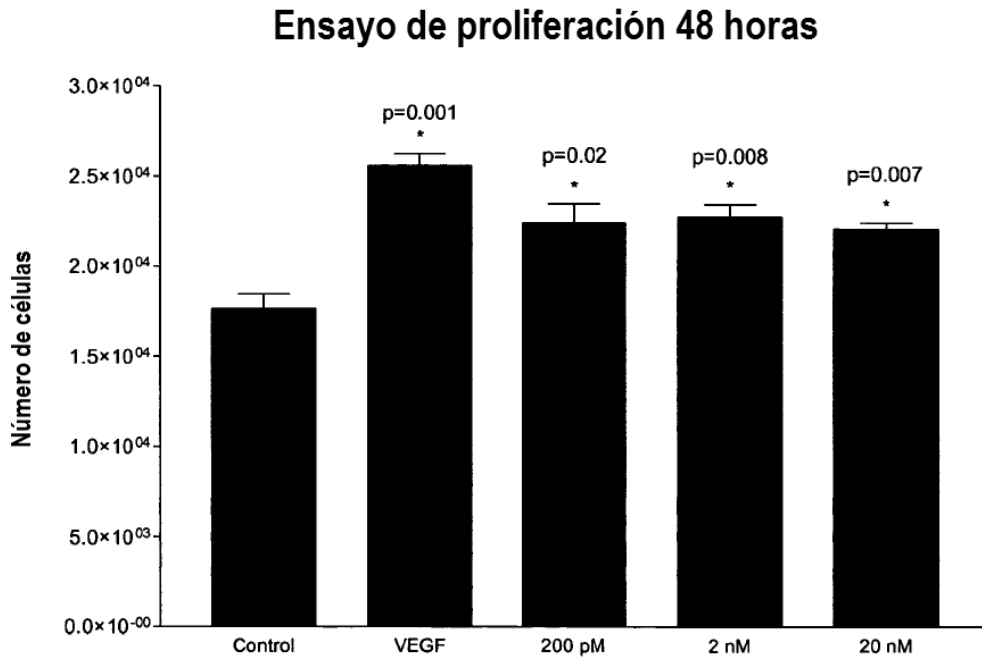


FIG. 32

7 horas de Ensayo de formación de tubos

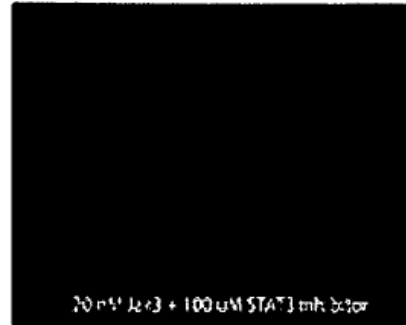
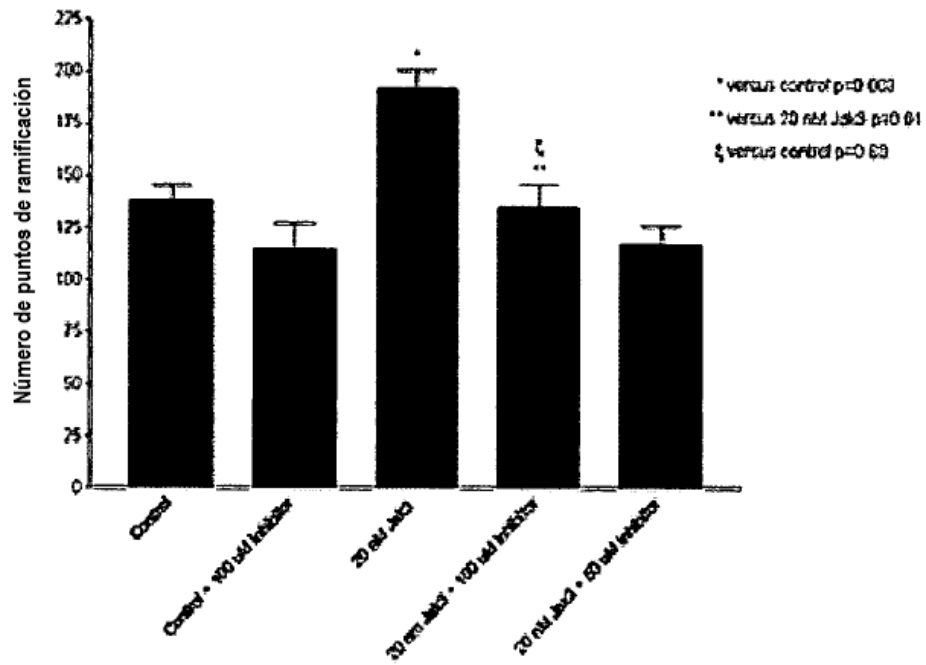


FIG. 33