

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 699**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2017 PCT/NL2017/050526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18026283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2017 E 17754837 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3494128**

54 Título: **Marcadores de angiogénesis embrionaria y estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en los mismos**

30 Prioridad:

04.08.2016 EP 16182827

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2024

73 Titular/es:

**STICHTING AMSTERDAM UMC (100.0%)
De Boelelaan 1117
1081 HV Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**GRIFFIOEN, ARJAN WILLEM;
HUIJBERS, ELISABETH JOHANNA MARIA y
NOWAK-SLIWINSKA, PATRYCJA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 966 699 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

Marcadores de angiogénesis embrionaria y estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en los mismos

Campo de la invención

La invención está en el campo de la medicina. Más específicamente, está en el campo del tratamiento médico relacionado con la inmunoterapia basada en anticuerpos anti-propios, tal como los produce el sistema inmunológico de un sujeto ante fusiones de proteínas extrañas-propias. La invención se refiere a fusiones de proteínas extrañas-propias, a composiciones que comprenden fusiones tales como inmunógenos y vacunas basadas en las mismas. La divulgación (que no forma parte de la invención) se refiere además a métodos para producir anticuerpos antipropios.

En particular, la invención se refiere a fusiones de proteínas extrañas-propias como antígenos terapéuticos, y a composiciones que comprenden tales fusiones.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos anti-propios humanos son de particular valor para fines terapéuticos y de diagnóstico *in vivo*, ya que evitan los problemas que surgen de la antigenicidad de anticuerpos extraños, por ejemplo, de ratón. Los anticuerpos humanos más útiles para la terapia son los dirigidos contra moléculas de la superficie celular, como receptores, adhesinas e integrinas, y los dirigidos contra moléculas efectoras biológicas circulantes, como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Ha sido extremadamente difícil obtener anticuerpos humanos contra tales antígenos propios (anticuerpos anti-propios) y generar mA b humanos dirigidos contra antígenos humanos, por ejemplo, para tratar o prevenir la aterosclerosis o el asma, para tratar el cáncer o para bloquear el choque séptico. Esta dificultad resulta de mecanismos de tolerancia inmunológica que previenen la expansión impulsada por antígenos de clones de células B con especificidades propias. Esta invención proporciona una poderosa manera de obtener dichos anticuerpos.

En los métodos de tratamiento del cáncer mediante inmunoterapia, es esencial dirigir antígenos propios específicos del tumor. Como la angiogénesis es un proceso que ocurre en los tumores, y dado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los principales factores de crecimiento que promueven la angiogénesis tumoral, existen varios fármacos en el mercado que se dirigen específicamente a la vía de señalización del VEGF para inhibir y detener crecimiento tumoral. Estos incluyen anticuerpos neutralizantes de VEGF como bevacizumab (Avastin®) o inhibidores de la tirosina quinasa de los receptores del factor de crecimiento (p. ej., sunitinib, Sutent®).

Estos fármacos, sin embargo, sólo muestran un efecto modesto sobre la supervivencia de los pacientes. Por ejemplo, bevacizumab prolonga la supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal en promedio sólo 3-4 meses. Parte de este efecto terapéutico limitado se debe a la inducción de resistencia a los medicamentos que se desarrolla tras la inhibición del crecimiento derivado del tumor. Además de su actividad limitada, los inhibidores de la angiogénesis actuales muestran graves efectos secundarios en los pacientes.

Por lo tanto, se necesitan fármacos antiangiogénicos contra el cáncer con mayor especificidad. Se observa en el presente documento que especialmente el desarrollo de composiciones terapéuticas de vacunas antiangiogénicas contra el cáncer, que comprenden antígenos vasculares tumorales "propios" del cuerpo humano que están implicados en la angiogénesis, es una tarea ardua. La respuesta inmune a los antígenos propios está estrechamente regulada para evitar el reconocimiento de las propias moléculas y, por lo tanto, la destrucción de los tejidos "propios". Al inicio del cáncer, las células T ocasionalmente pueden reconocer antígenos propios en las células cancerosas y provocar una respuesta inmune contra el cáncer. Sin embargo, cuando el cáncer progresa, la vigilancia inmunitaria de la enfermedad se ve afectada debido a que el cáncer emplea varios mecanismos para alterar la respuesta inmunitaria. Estos mecanismos incluyen, entre otros, la subregulación del MHC-I, la secreción de TGF beta, que suprime el sistema inmunológico y la inducción de células T reguladoras. Por estos motivos, la vacunación contra el cáncer es un desafío.

El arte describe entre otros composiciones de vacunas contra el cáncer antiangiogénicas que comprenden una proteína de fusión que consiste en una parte extraña (por ejemplo, tiorredoxina bacteriana, TRX), unida a un antígeno "propio" (por ejemplo, dominio B adicional (EDB) de fibronectina). Un problema relacionado con el uso de tales proteínas de fusión es que, aunque el inmunógeno extraño es un requisito para inducir la respuesta inmune contra el propio antígeno, una antigenicidad manifiesta de la parte extraña de la proteína de fusión puede suprimir la respuesta inmune humoral contra el antígeno propio. Actualmente no existen polipéptidos de fusión en las composiciones de vacunas que permitan la inducción de una cantidad adecuada de inmunogenicidad contra la propia parte. Esto se debe a la fuerte respuesta del título de anticuerpos contra el inmunógeno extraño. En otras palabras, en la técnica, no se describen polipéptidos de fusión que proporcionen una respuesta inmune humoral reducida contra un antígeno extraño, no propio, maximizando así la respuesta al antígeno propio.

Además, está claro que existe una necesidad en la técnica de herramientas de diagnóstico que se basen en marcadores de angiogénesis tumoral altamente específicos y una necesidad de modalidades terapéuticas, basadas en marcadores de angiogénesis tumoral tan altamente específicos, tales como composiciones de vacunas capaces de provocar una respuesta inmune contra los antígenos de angiogénesis tumoral "propios" del cuerpo humano y, por lo tanto, rompiendo la tolerancia propia al antígeno propio. Un objetivo de la presente invención es proporcionar dichos marcadores de angiogénesis tumoral altamente específicos y proporcionar modalidades terapéuticas basadas en

estos marcadores. Más específicamente, un objetivo de la invención es proporcionar composiciones de vacunas contra el cáncer antiangiogénicas que presenten una mejor provocación de una respuesta inmune mediante la modificación de la parte extraña de la proteína de fusión. Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar composiciones de vacunas contra el cáncer antiangiogénicas que induzcan una respuesta inmunitaria clínicamente relevante.

- 5 Saupe et al., divulgan vacunas dirigidas a antígenos propios: mecanismos y parámetros que determinan la eficacia (Saupe et al., THE FASEB JOURNAL, EE. UU., (20150413), vol. 29, n.º 8, páginas 3253 - 3262).

Huijbers et al., divulgan la vacunación contra el dominio B adicional de la fibronectina como una nueva terapia tumoral (Huijbers et al., THE FASEB JOURNAL, (20100715), vol. 24, n.º 11, páginas 4535-4544).

- 10 Griffioen et al., divulgan la detección genómica del embrión en busca de nuevos objetivos en el endotelio tumoral (Griffioen et al., Informe final del proyecto, acuerdo de subvención número 328695", GENE, (20150618), <http://cordis.europa.eu/docs/results/328/328695/final-final-report-gene-20150618.pdf>).

El documento WO2011/151721 divulga un proceso para la producción de proteínas de fusión utilizando tiorredoxina truncada de *E. coli*.

Sumario de la invención

- 15 La invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se descubrió que diseñando cuidadosamente la parte del polipéptido extraño o no propio para que contenga un truncamiento en comparación con un polipéptido original inmunogénico y/o un porcentaje específico de residuos de aminoácidos voluminosos e hidrofílicos, era posible proporcionar un polipéptido de fusión que es capaz de inducir una respuesta inmune contra el polipéptido propio redirigiendo la respuesta inmune para reducir la respuesta de anticuerpos al antígeno extraño. De tal manera, se proporciona una composición inmunogénica que se mejora porque exhibe una respuesta inmune humoral reducida contra un antígeno extraño, no propio, mientras que tiene una respuesta inmune humoral aumentada contra un antígeno de interés, tal como un antígeno propio, en comparación con, entre otros, una molécula original no truncada de la que se deriva el antígeno no propio. Se descubrió además que dicha vacuna contra tumores, cuando se administra a un sujeto, provoca una respuesta inmune relevante contra un antígeno tal como un antígeno propio.

Los inventores resolvieron el problema antes mencionado proporcionando un polipéptido de fusión como se define en las reivindicaciones.

- 30 En una realización preferida de un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, dicho polipéptido de fusión provoca un nivel en suero de inmunoglobulinas contra dicho antígeno propio de al menos el 0.5 %, preferiblemente al menos el 1 %, del nivel total de inmunoglobulinas séricas en un sujeto mamífero al que se administra dicho polipéptido de fusión.

En un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, dicho antígeno extraño comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 3, 4, 6 o 7.

- 35 De acuerdo con la invención, dicho antígeno propio es un polipéptido de mamífero, preferiblemente humano, cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral seleccionada del grupo que consiste en inhibidor tisular de la metaloproteinasas 1 (Timp1), apelina (Apln), amiloide en suero A3 (Saa3), antígeno CD93 (Cd93), proteína de desarrollo cardíaco con dominios similares a EGF 1 (Heg1), Notch 4, receptor de apelina (Aplnr), nestina (Nes), tenascina C (Tnc), gen relacionado con pentraxina (Ptx3), vimentina (Vim), receptor 2 del EGF humano (erbb2, HER2), erbb3 (HER3), proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (Tnfaip6), carboxipeptidasa Z (Cpz), dedo de zinc 1 de la familia del caracol (Snai1), proteína del premelanosoma (Pmel), arilsulfatasa I (Arsi), proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 (Wisp1), glutatión peroxidasa 7 (Gpx7), una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa (tipo reprotisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 (Adamts4), molécula 1 específica de células endoteliales (Esm1), integrina alfa 5 (receptor alfa de fibronectina) (Itga5), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo reprotisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 (Adamts2), trombospondina 2 (Thbs2), metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) (Mmp14), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Igfbp3), trombospondina 1 (Thbs1), fibrilina 1 (Fbn1), periostina, factor específico de osteoblastos (Postn), repetición rica en leucina que contiene 17 (Lrrc17), fibrilina 2 (Fbn2), molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (Cercam), proteína 4 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp4), C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral (C1qtnf6), similar a lisil oxidasa 3 (Loxl3), superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 (Igslf10), proteína 2 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp2), proteína 10 de unión a FK506 (Fkbp10), glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (Gfpt2), carboxipeptidasa X1 (Cpxm1), proteína 5 asociada a microfibrillas (Mfap5), Proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico (Efemp2), gen sobreexpresado por el nefroblastoma (Nov), versican (Vcan), elastina (Eln), proteína rica en cisteína 61 (Cyr61), sulfatasa 1 (Sulf1), nidógeno 2 (Nid2), antígeno CD248, endosialina (Cd248), similar a lisil oxidasa 2 (Loxl2), proteína 1 similar a folistatina (Fstl1), sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina (Svep1), laminina, alfa 4 (Lama4), homólogo de hendidura 3 (Slit3), receptor de manosa, C tipo 2 (Mrc2), proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4), receptor 133 acoplado a proteína G (Gpr133), homólogo 1 de fascina, proteína

- agrupadora de actina (Fscn1), interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), receptor eliminador de clase A, miembro 3 (Scara3), inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2 (Serpnb2), ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (Ccl2), receptor de insulina (Insr), folato hidrolasa 1 (Folh1), antígeno CD99 (CD99), caseína kappa (Csn3), receptor similar a la calcitonina (Calcr), receptor 1 de activina A, similar al tipo II (Acvr1), receptor del factor estimulante de colonias 3 (Csf3r), canal 2 de cloruro activado por calcio (Clca2), familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec14a), proteína transmembrana 100 (Tmem100), proteína 1 rica en cisteína y tirosina (Cyrr1), ceramidasa alcalina 2 (Acer2), síndrome tricorniofalángico I (Trps1), ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH (Arap3), integrina alfa 8 (Itga8), dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G (Sema3g), proteína transmembrana 2 (Tmem2), superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 (Tnfsf10), homeobox HOP (Hopx), lactoalbúmina, alfa (Lalba), factor 2 del intercambio de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Prex2), mucina 15 (Muc15), rotequina 2 (Rtn2), caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) (Sox4), tetraspanina 18 (Tspan18), receptor 126 acoplado a proteína G (Gpr126), familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec1a), dominio B adicional de fibronectina (ED-B), piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 (Hey1) y sulfatasa 2 (Sulf2).
- 15 En aún otra realización preferida de un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, dicha región inmunogénica de la proteína de la SEQ ID NO: 1 está en la región de Ala-30 a Ala-109, preferiblemente la región de Gln-52 a Ala-109, de la proteína de la SEQ ID NO: 1; y/o en la que dicha región de residuos de aminoácidos inmunogénicos de la proteína de la SEQ ID NO: 2 es la región de Ala-24 a Ile-154 de la proteína de la SEQ ID NO: 2.
- 20 En aún otra realización preferida de un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, dicho antígeno extraño consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 3, 4, 6 o 7.
- En otra realización preferida adicional de un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, dicha proteína de fusión comprende un péptido enlazador que une dicho antígeno extraño y propio, preferiblemente un péptido enlazador GS.
- 25 En otro aspecto, la presente invención proporciona el polipéptido de fusión de acuerdo con la invención como se describió anteriormente para su uso como medicamento, preferiblemente para su uso como antígeno de vacuna para provocar una respuesta inmune contra dicho antígeno propio, más preferiblemente para su uso en el tratamiento o prevención de la artritis, aterosclerosis, reestenosis, arteriopatía de trasplante, verrugas, queloides cicatriciales, sinovitis, osteomielitis, asma, pólipos nasales, vasculopatía coroidea polipoidea, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, SIDA, IBD, enfermedad de Crohn, endometriosis, sangrado uterino, psoriasis, miomas, cáncer o combinaciones de los mismos.
- 30 En otro aspecto, la presente invención proporciona el polipéptido de fusión de acuerdo con la invención para su uso en inhibir, contrarrestar o bloquear la angiogénesis tumoral y/o eliminar la vasculatura tumoral en un sujeto.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, opcionalmente comprendido en un vector de expresión.
- 35 En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de fusión de acuerdo con la invención o el ácido nucleico de acuerdo con la invención, comprendiendo además dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un líquido acuoso, y opcionalmente un adyuvante.
- 40 En una realización preferida de la composición de la invención, la composición es una composición de vacuna, preferiblemente para usar en el tratamiento o prevención de artritis, aterosclerosis, reestenosis, arteriopatía de trasplante, verrugas, queloides cicatriciales, sinovitis, osteomielitis, asma, pólipos nasales, vasculopatía coroidal polipoide, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, SIDA, IBD, enfermedad de Crohn, endometriosis, hemorragia uterina, psoriasis, miomas, cáncer o combinaciones de los mismos.
- 45 En otra realización preferida adicional de la composición de la invención, dicha composición comprende un adyuvante en un intervalo de relación porcentual en peso de polipéptido de fusión: adyuvante de 3:1 a 1:3, preferiblemente aproximadamente 1:1.
- En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación proporciona un anticuerpo antipropio aislado que se une específicamente al antígeno propio del polipéptido de fusión de acuerdo con la invención.
- 50 En un ejemplo preferido del anticuerpo antipropio aislado, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente del isotipo IgG, preferiblemente dicho anticuerpo monoclonal se aísla de una célula B de un mamífero que ha recibido la proteína de fusión y para el cual dicho antígeno propio es propio.
- En otro ejemplo preferido adicional del anticuerpo antipropio aislado, dicho anticuerpo está marcado con un marcador detectable.

En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación proporciona una línea de células B inmortalizadas que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno propio del polipéptido de fusión de acuerdo con la invención.

- 5 Una dosis terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión de acuerdo con la invención o la composición de acuerdo con la invención puede usarse para provocar una respuesta inmune contra un antígeno propio, en donde el polipéptido de fusión o la composición es para administración a un sujeto que necesita tratamiento.

- 10 Una dosis terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión de acuerdo con la invención o la composición de acuerdo con la invención puede usarse en el tratamiento o prevención de artritis, aterosclerosis, reestenosis, arteriopatía de trasplante, verrugas, queloides cicatriciales, sinovitis, osteomielitis, asma, pólipos nasales, vasculopatía coroidea polipoidea, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, SIDA, IBD, enfermedad de Crohn, endometriosis, hemorragia uterina, psoriasis, miomas, cáncer o combinaciones de los mismos, en los que el polipéptido de fusión de acuerdo con la invención o la composición de acuerdo con la invención es para administración a un sujeto que necesita tratamiento.

- 15 En una realización no reivindicada, la divulgación proporciona un método para tipificar a un sujeto, que comprende poner en contacto a dicho sujeto o una muestra corporal de dicho sujeto con el anticuerpo antipropio aislado descrito en el presente documento, permitiendo que dicho anticuerpo se una específicamente a su antígeno y evaluando el nivel de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno, preferiblemente midiendo la cantidad de anticuerpo específicamente unido en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo marcado con una etiqueta detectable, preferiblemente en donde dicho método de tipificación es un método de estratificación de pacientes.

- 20 En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación proporciona un método para tipificar un sujeto para un estado de angiogénesis tumoral, que comprende las etapas de a) medir un nivel de expresión génica de al menos un producto de expresión génica en una muestra de un sujeto que comprende, o se sospecha que comprenden células tumorales, preferiblemente células endoteliales tumorales, en las que dicho al menos un producto de expresión génica se selecciona del grupo formado por inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (Timp1), apelina (Apln), amiloide en suero A3 (Saa3), antígeno CD93 (Cd93), proteína de desarrollo cardíaco con dominios 1 similares a EGF (Heg1), Notch 4, receptor de apelina (Aplnr), nestina (Nes), tenascina C (Tnc), gen relacionado con pentraxina (Ptx3), vimentina (Vim), factor de necrosis tumoral proteína 6 inducida por factor alfa (Tnfaip6), carboxipeptidasa Z (Cpz), dedo de zinc 1 de la familia del caracol (Snai1), proteína premelanosoma (Pmel), arilsulfatasa I (Arsi), proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 (Wisp 1), glutatión peroxidasa 7 (Gpx7), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 (Adams4), molécula 1 específica de células endoteliales (Esm1), integrina alfa 5 (receptor alfa de fibronectina) (Itga5), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 (Adams2), trombospondina 2 (Thbs2), metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) (Mmp 14), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Igfbp3), trombospondina 1 (Thbs1), fibrilina 1 (Fbn1), periostina, factor específico de osteoblastos (Postn), repetición rica en leucina que contiene 17 (Lrrc17), fibrilina 2 (Fbn2), molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (Cercam), proteína 4 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp4), C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral (C1qtnf6), similar a lisil oxidasa 3 (Loxl3), superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 (Igslf10), proteína 2 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp2), proteína 10 de unión a FK506 (Fkbp10), glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (Gfpt2), carboxipeptidasa X1 (Cpxm1), proteína 5 asociada a microfibrillas (Mfap5), Proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico (Efemp2), gen sobreexpresado por el nefroblastoma (Nov), versican (Vcan), elastina (Eln), proteína rica en cisteína 61 (Cyr61), sulfatasa 1 (Sulf1), nidógeno 2 (Nid2), antígeno CD248, endosialina (Cd248), similar a lisil oxidasa 2 (Loxl2), proteína 1 similar a folistatina (Fstl1), sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina (Svep1), laminina, alfa 4 (Lama4), homólogo de hendidura 3 (Slit3), receptor de manosa, C tipo 2 (Mrc2), proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4), receptor 133 acoplado a proteína G (Gpr133), homólogo 1 de fascina, proteína agrupadora de actina (Fscn1), interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), receptor eliminador de clase A, miembro 3 (Scara3), inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2 (Serpnb2), ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (Ccl2), receptor de insulina (Insr), folato hidrolasa 1 (Folh1), antígeno CD99 (CD99), caseína kappa (Csn3), receptor similar a la calcitonina (Calcr), receptor 1 de activina A, similar al tipo II (Acvr11), receptor del factor estimulante de colonias 3 (Csf3r), canal 2 de cloruro activado por calcio (Clca2), familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec14a), proteína transmembrana 100 (Tmem100), proteína 1 rica en cisteína y tirosina (Cyrr1), ceramidasa alcalina 2 (Acer2), síndrome tricorinofalángico I (Trps1), ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH (Arap3), integrina alfa 8 (Itga8), dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G (Sema3g), proteína transmembrana 2 (Tmem2), superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 (Tnfsf10), homeobox HOP (Hopx), lactoalbúmina, alfa (Lalba), factor 2 del intercambio de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Prex2), mucina 15 (Muc15), rotequina 2 (Rtkn2), caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) (Sox4), tetraspanina 18 (Tspan18), receptor 126 acoplado a proteína G (Gpr126), familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec 1a), dominio B adicional de fibronectina (ED-B), piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 (Hey1) y sulfatasa 2 (Sulf2);
- 60 b) comparar dicho nivel de expresión génica con un valor de control de expresión génica; c) tipificar dicho sujeto de acuerdo con un estado de angiogénesis tumoral basándose en la diferencia entre dicho nivel de expresión génica y dicho valor de control de la expresión génica.

En un ejemplo preferido del método de tipificación de un sujeto para un estado de angiogénesis tumoral, dicha tipificación es la tipificación de dicha muestra de dicho sujeto.

En otro ejemplo preferido más del método de tipificación de un sujeto para un estado de angiogénesis tumoral, dicho valor de control de la expresión génica se obtiene midiendo el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica en una muestra de control que comprende células endoteliales no tumorales de un sujeto.

En otro ejemplo preferido más del método de tipificación de un sujeto para un estado de angiogénesis tumoral, dicho sujeto se tipifica como positivo para el estado de angiogénesis tumoral si el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica es al menos 5 veces, preferiblemente al menos 20 veces, mayor que dicho valor de control de la expresión génica, o en el que dicho sujeto tiene un tipo negativo para el estado de angiogénesis tumoral si el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica no es al menos 5 veces mayor, preferiblemente no al menos 20 veces mayor, que dicho valor de control de la expresión génica.

En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico que comprende el uso del anticuerpo descrito en el presente documento, en el que dicho método de diagnóstico comprende evaluar la eficacia citostática de un citostático o la predicción de la actividad del fármaco.

En general, los diversos métodos terapéuticos de la invención también se pueden usar para terapias antiangiogénicas, incluidos, entre otros, trastornos relacionados con la angiogénesis.

Descripción de los dibujos

La invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones. Cualquiera de las siguientes figuras que no entren dentro del alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención actualmente reivindicada y se proporcionan únicamente con fines comparativos.

La Figura 1 muestra diferentes construcciones de proteínas de fusión y el mecanismo de vacunación. El panel A muestra las diferentes construcciones de proteínas de fusión que se desarrollaron. Las proteínas de fusión TRX-EDB (20 kDa), TRXtr(sin clasificar)-EDB (17.5 kDa), TFP (proteína fimbrial tipo I)-EDB (23.9 kDa), TFPv (variante de proteína fimbrial tipo I)-EDB (24.1 kDa), USP (proteína no especificada)-EDB (16.8 kDa), TRX-Vim (vimentina de ratón) (67 kDa) y TRXtr-Vim (61 kDa) se utilizaron para la vacunación. Se usaron la proteína TRX (13.2 kDa) y la proteína TRXtr (7.6 kDa) para la vacunación de ratones de control. Se utilizaron la proteína EDB (10.9 kDa), la proteína vimentina de ratón (Vim) (54 kDa) y TRX-Gal1 (galectina-1 de ratón) (28 kDa) para la detección de anticuerpos en ELISA. El panel B muestra la apariencia de las proteínas utilizadas en SDS-PAGE o transferencia Western después de la purificación. TRXtr aparece a ~ 15 kDa, que es aproximadamente el doble de su tamaño esperado, probablemente debido a la dimerización. C) Después de la inyección de la proteína de fusión en combinación con un potente adyuvante, las células presentadoras de antígenos (APC) absorben la proteína de fusión y presentan péptidos extraños (no propios) y péptidos propios (EDB) en el MHC de clase II. Sólo los péptidos extraños serán reconocidos por el receptor de células T (TCR) en las células T colaboradoras (T colaboradoras) y provocarán la activación de las células T. No se observan péptidos propios, ya que las células T autorreactivas se eliminan en el timo durante el desarrollo. Por otro lado, en la circulación hay células B autorreactivas. Estos reconocerán la parte propia (EDB) de la proteína de fusión a través de su receptor de células B (BCR). Las células B autorreactivas internalizarán la proteína de fusión y también presentarán péptidos propios y extraños a través del MHC clase II. Ahora las células T colaboradoras previamente activadas activarán estas células B autorreactivas, ya que presentan los mismos péptidos extraños. Las células B autorreactivas activadas experimentan luego una expansión clonal y producen anticuerpos anti-EDB. La Figura 1D muestra un diagrama de Venn, que indica genes sobrerregulados en E11, E18 y TEC en comparación con el ratón adulto (como se explica en el Ejemplo 1).

La Figura 2 muestra los niveles de anticuerpos anti-EDB en ratones C57BL/6 de tipo silvestre vacunados con las proteínas de fusión indicadas. De la Figura 2, se deduce que las proteínas de fusión de la invención provocan mayores niveles de títulos de anticuerpos contra el antígeno propio EDB en comparación con la proteína de fusión TRX-EDB conocida en la técnica.

La Figura 3 muestra los títulos de anticuerpos anti-EDB por ratón individual para cada grupo de tratamiento en dos estudios individuales. El suero se diluyó 1:100 - 1:24300 y se midió la densidad óptica a 655 nm. La Figura 3 subraya nuevamente el hecho de que las proteínas de fusión de la invención provocan títulos de anticuerpos anti-EDB aumentados en comparación con la proteína de fusión TRX-EDB.

La Figura 4, paneles A y B, muestra que los niveles de anticuerpos anti-EDB aumentan tras el truncamiento de TRX, mientras que el panel B muestra que los anticuerpos contra TRX se reducen cuando se trunca TRX. El panel C muestra títulos de anticuerpos contra TRX en ratones C57BL/6 vacunados con TRX, TRX-EDB o TRXtr-EDB (estudio II).

La Figura 5 muestra en los paneles A)-D) los niveles de anticuerpos anti-vimentina en ratones vacunados con TRX, TRXtr, TRX-vimentina y TRXtr-vimentina. Los paneles A)-B) se refieren a un estudio en el que se vacunaron ratones con las proteínas de fusión indicadas y una semana después del último refuerzo se midieron los niveles de anticuerpos en los sueros. Posteriormente, a los ratones se les implantaron células de melanoma B16-F10. Los paneles C)-D) se refieren a un estudio en el que se vacunaron ratones con las proteínas de fusión indicadas y una semana después del

último refuerzo se midieron los niveles de anticuerpos en los sueros. Posteriormente, a los ratones se les implantaron células de carcinoma CT26. En los paneles E)-H), se muestran los niveles de anticuerpos anti-TRX para las diferentes proteínas de fusión vacunadas. Los paneles E)-F) se basan en resultados experimentales que se obtuvieron en el mismo estudio que los paneles A)-B) y los paneles G)-H) se basan en resultados experimentales obtenidos en el mismo estudio que los paneles C)-D). De estos paneles se deduce claramente que los niveles de anticuerpos anti-TRX disminuyen si TRXtr se emplea como compañero de fusión no propia en comparación con TRX.

La Figura 6 muestra en los paneles A)-D) títulos de anticuerpos anti-vimentina por ratón C57BL/6 individual. El suero se diluyó 1:100 - 1:24300 y se midió la densidad óptica a 655 nm.

Figura 7. Volúmenes tumorales de ratones vacunados con TRXtr-Vim, TRX-Vim, TRXtr o TRX. A) Volumen tumoral por grupo vacunado en días tras la inoculación con células de melanoma B16-F10. B) Volumen tumoral de ratones vacunados con las diferentes proteínas de fusión en días posteriores a la inoculación con células de carcinoma de colon CT26. En el modelo B16-F10, la proteína de fusión TRXtr-Vim tuvo un mejor rendimiento que TRX-Vim.

Figura 8. Validación de objetivos mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR). Niveles de expresión ($2^{-\Delta Ct}$) de genes diana en diferentes tejidos y líneas celulares. A) Expresión de *Apln*, *Arsi*, *Esm1*, *PTX3*, *Timp1* y *Tnfaip6* en células endoteliales tumorales (TEC) derivadas de melanoma B16-F10. B) Expresión de *Apln* en embrión (E11, E18) y ratón adulto. C) Expresión de *Arsi* en embrión (E11, E18) y ratón adulto. D) Expresión de *Esm1* en embrión (E11, E18) y ratón adulto. E) Expresión de *PTX3* en embrión (E11, E18) y ratón adulto. F) Expresión de *Timp1* en embrión (E11, E18) y ratón adulto. G) Expresión de *Tnfaip6* en embrión (E11, E18) y ratón adulto. H) Expresión de los diferentes genes diana identificados mediante secuenciación de ARN en la línea celular tumoral de melanoma B16-F10. I) Expresión de los diferentes genes diana en la línea celular endotelial Bend5 (células endoteliales microvasculares de cerebro de ratón primarias).

La Figura 9 enumera una realización preferida para el antígeno propio, en la que dicho antígeno propio tiene un efecto antitumoral.

La Figura 10 enumera una realización preferida para el antígeno propio, en la que dicho antígeno propio tiene un alto contenido de Mets.

La Figura 11 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios son antígenos de membrana.

La Figura 12 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios son antígenos secretados.

La Figura 13 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios son dianas citoplasmáticas.

La Figura 14 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios son dianas extracelulares.

La Figura 15 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios están implicados en diversos procesos relacionados con enfermedades.

La Figura 16 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios están implicados en el desarrollo de tumores.

La Figura 17 enumera una serie de realizaciones preferidas para los antígenos propios, en las que dichos antígenos propios están implicados en la metástasis.

Los identificadores proporcionados en las tablas del presente documento pertenecen a NCBI-GenBank Flat File Release 213.0 que incorpora datos procesados por las bases de datos del INSDC a partir del jueves 14 de abril de 2016. Las referencias de GenBank indicadas en el presente documento incluyen referencias a esas secuencias en su totalidad.

La Figura 18 muestra en el panel A) la secuencia de aminoácidos de tiorredoxina-S₂ de *E. coli* y sus elementos de estructura secundaria. Se usaron los residuos de aminoácidos 51-108 para generar una región inmunogénica troncada de 45-70 residuos de aminoácidos consecutivos de la proteína de la SEQ ID NO: 1 o de una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la proteína de la SEQ ID NO: 1 (TRX-trunc) (caja). En esta ilustración, falta el aminoácido inicial metionina (M). El panel B) muestra un dibujo esquemático de la estructura tridimensional de tiorredoxina-S₂ de *E. coli*. La línea (cerca de la subunidad α_1 marcada con una flecha) indica el sitio de escisión para generar TRX-trunc como se indica en la SEQ ID NO: 4.

La Figura 19 muestra la expresión del PSMA diana del antígeno propio en el endotelio tumoral en comparación con el endotelio normal. A) Comparación de la expresión de PSMA en el endotelio de diferentes tipos de tumores en comparación con el endotelio normal. Datos obtenidos del Human Protein Atlas y puntuados de la siguiente manera: 0, no se detectó tinción; 1, débil; 2, moderado; 3 alto; 4, extremadamente alto. Mama: tumor n = 21, normal n = 5;

Cuello uterino: tumor n = 24, normal n = 5; Colon: tumor n = 23, normal n = 5; Endometrio: tumor n = 22, normal n = 6; Cerebro: tumor n = 21, normal n = 5; Cavidad bucal: tumor n = 8, normal n = 5; Hígado: tumor n = 23, normal n = 6; Pulmón: tumor n = 22, normal n = 6; Piel: tumor n = 24, normal n = 5; Ovario: tumor n = 24, normal n = 6; Páncreas: tumor n = 24, normal n = 6; Riñón: tumor n = 24, normal n = 6; Estómago: tumor n = 23, normal n = 6; Testículo: tumor n = 24, normal n = 5; Tiroides: tumor n = 8, normal n = 6; Urotelial: tumor n = 24, normal n = 5. Se consideraron significativos los valores con $P < 0.05$. B) Carcinoma de células renales y secciones de riñón normal teñidas con anticuerpo anti-PSMA obtenido del Human Protein Atlas.

La Figura 20 muestra la expresión de las dianas de antígeno propio LAMA4, EMILIN2 y FBN2 en el endotelio tumoral en comparación con el endotelio normal. Paneles izquierdos: Comparación de la expresión de genes diana en el endotelio de diferentes tipos de tumores en comparación con el endotelio normal. Datos obtenidos del Human Protein Atlas y puntuados de la siguiente manera: 0, no se detectó tinción; 1, débil; 2, moderado; 3 alto. LAMA4: riñón: tumor n = 12; normal n = 5; colon: tumor n = 12; normal n = 5; pulmón: tumor n = 12; normal n = 5; hígado: tumor n = 12; normal n = 6; mama: tumor n = 12; EMILIN2: riñón: tumor n = 10; normal n = 3; colon: tumor n = 11; normal n = 3; pulmón: tumor n = 10; hígado: tumor n = 11; normal n = 3; mama: tumor n = 11; FBN2: riñón: tumor n = 11; normal n = 6; colon: tumor n = 11; normal n = 5; pulmón: tumor n = 12; hígado: tumor n = 12; normal n = 6; mama: tumor n = 12. Paneles derechos: Carcinoma de células renales (RCC) y secciones de riñón normal teñidas con anticuerpo anti-LAMA4 o EMILIN2 obtenidos del Human Protein Atlas. Secciones de cáncer colorrectal (CRC) o colon normal teñidas con anticuerpo anti-FBN2 obtenido del Human Protein Atlas.

La Figura 21 muestra la expresión del antígeno propio diana CD99 en el endotelio tumoral del sarcoma de Ewing (EWS). Los tejidos del sarcoma de Ewing humano se tiñeron con un anticuerpo anti-CD99 (ab27271, Abcam, Cambridge, RU). Las flechas en la tercera imagen desde la izquierda indican la expresión vascular de CD99. Ampliación 200x.

La Figura 22 muestra la expresión del antígeno propio diana VCAN en el endotelio tumoral del carcinoma de células renales. Se tiñeron tejidos de carcinoma de células renales humanos y riñón normal con un anticuerpo anti-Versican. Las flechas indican la expresión vascular de VCAN. Las puntas de flecha en el panel del extremo derecho muestran que no hay tinción vascular presente en los glomérulos del tejido renal normal. Ampliación 200x.

La Figura 23 muestra la expresión del antígeno propio diana CD93 en el endotelio tumoral. A) Se tiñeron tejidos de carcinoma de células renales humanos y riñón normal con un anticuerpo anti-CD93. Las flechas indican la expresión vascular de CD93. Las imágenes 1, 3 y 4 tienen un aumento de 200x y la imagen 2 tiene un aumento de 100x. El tejido renal normal carece de tinción con CD93. B) CD93 se expresa en la vasculatura del adenocarcinoma de páncreas (PDAC). Las flechas indican la expresión vascular de CD93. Ampliación 200x. C) Expresión de CD93 en la vasculatura del carcinoma colorrectal (CRC). Las flechas indican la expresión vascular de CD93. Ampliación 200x.

La Figura 24 muestra la expresión de ARNm (mediante RT-qPCR) de los genes diana de antígeno propio Sfrp2, Aplnr, Fbn2, Vcan, Lama4, Igslf10, Emilin2, Nid2 y Sulf2 en embrión E11, embrión E18 y ratón adulto. El ARNm de Sfrp2 está muy sobreexpresado en el endotelio tumoral (TEC). También en la línea celular endotelial de ratón se expresa Bend5 Sfrp2, mientras que las células de melanoma B16-F10 no expresan Sfrp2.

La Figura 25 muestra que la inducción de una respuesta inmune humoral contra CD99 con un polipéptido de fusión de la invención inhibe el crecimiento tumoral del Sarcoma de Ewing (EWS). A) Ilustración esquemática de la configuración experimental. Los ratones se vacunan 4 veces (flechas blancas). En momentos determinados se toman muestras de sangre para medir los anticuerpos anti-mCD99 en los sueros de los ratones (flechas grises). Cuando los niveles de anti-mCD99 son altos, las células tumorales se inyectan por vía subcutánea en el flanco izquierdo de los ratones (flecha negra). Se deja que los tumores crezcan de 3 a 5 semanas antes de sacrificar los ratones (cruz). B) + C) Niveles de anticuerpos anti-mCD99 en los sueros de los ratones C3H después de 4 vacunaciones, antes de la inyección de células tumorales y 10 días después de la inyección de células tumorales en el primer estudio (estudio I de CD99), todos menos uno de los ratones vacunados con TRXtr-mCD99 (n = 10, TRXtr-mCD99) respondieron con la producción de anticuerpos anti-mCD99, mientras que en los sueros de los ratones vacunados con TRXtr (n = 5, TRXtr, control) no había anticuerpos anti-mCD99 presentes en el segundo estudio (estudio II de CD99) todos los ratones vacunados con TRXtr-mCD99 (n = 5) respondieron con la producción de anticuerpos anti-mCD99 y los ratones vacunados de control (n = 5, TRXtr) no tenían ningún anticuerpo anti-mCD99. D) Curvas de crecimiento tumoral de CD99 Os-P0107 en ratones vacunados con TRXtr-mCD99 y vacunados con control (Ctrl). En ambos estudios (estudio I, II de CD99), el crecimiento tumoral se inhibió significativamente en ratones vacunados con TRXtr-mCD99 en comparación con ratones vacunados con control. Las curvas de crecimiento tumoral se compararon mediante ANOVA de dos vías (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

La Figura 26 muestra que la inducción de una respuesta inmune humoral contra CD99 con un polipéptido de fusión de la invención inhibe el crecimiento del tumor de colon CT26. A) Ilustración esquemática de la configuración experimental. Los ratones se vacunan 4 veces (flechas blancas). En momentos determinados se toman muestras de sangre para medir los anticuerpos anti-mCD99 en los sueros de los ratones (flechas grises). Cuando los niveles de anti-mCD99 son altos, las células tumorales se inyectan por vía subcutánea en el flanco izquierdo de los ratones (flecha negra). Se deja que los tumores crezcan 3-4 semanas antes de sacrificar los ratones (cruz). B) Niveles de anticuerpos anti-mCD99 en el suero de los ratones BALB/c después de 4 vacunaciones, antes de la inyección de

células tumorales y 10 días después de la inyección de células tumorales. Todos los ratones vacunados con TRXtr-mCD99 (n = 4, TRXtr-mCD99) respondieron con la producción de anticuerpos anti-mCD99, mientras que en los sueros de los ratones vacunados con TRXtr (n = 5, TRXtr, control) no estaban presentes anticuerpos anti-mCD99. C) Curvas de crecimiento tumoral de CT26 en ratones vacunados con TRXtr-mCD99 y vacunados con control (Ctrl). La vacunación contra CD99 no protege completamente del crecimiento tumoral en este modelo (**P<0.01).

La Figura 27 muestra que el receptor de insulina diana del antígeno propio (INSR) está sobreexpresado en células endoteliales tumorales. (A) Sobreexpresión de INSR en células endoteliales asociadas al cáncer colorrectal (qPCR; (8)) y al cáncer de células renales (proteómica; (49)). (B) Tinción inmunohistoquímica para INSR en secciones de diferentes tumores sólidos humanos incluidos en parafina (colon, riñón, estómago, mama, piel) y sus homólogos de tejido normal de INSR. Se observa una clara inducción de tinción vascular (marrón) en los tumores (T) en comparación con los tejidos normales (recuadros; N). Las barras de escala representan 50 µm. (C) Tinción inmunohistoquímica para INSR de tejido de carcinoma escamoso de cabeza y cuello humano con tejido normal adyacente. La sobreexpresión de INSR está relacionada con la malignidad, ya que se observa una fuerte tinción vascular en el tumor, una tinción menos pronunciada en el área intermedia y ausencia de tinción en el tejido normal adyacente. Las puntas de flecha resaltan los vasos sanguíneos. La barra de escala representa 200 µm. (D) Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de 226 casos de CRC basado en la expresión promedio de INSR (alta (n = 93) es el gráfico inferior y baja (n = 133) es el gráfico superior).

La Figura 28 muestra en el eje y los niveles de anticuerpos anti-antígeno propio (anticuerpos contra EDB) inducidos con diferentes construcciones de polipéptidos de fusión de la invención (TRXtr-EDB, TFP-EDB, TFPv-EDB y USP-EDB). Todos los antígenos extraños son superiores al TRX de longitud completa para inducir anticuerpos contra el antígeno propio EDB.

Descripción detallada de la invención

La invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones.

Definiciones y realizaciones

El término "inmunogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un compuesto, por ejemplo, formulado en una vacuna, para provocar una respuesta inmune, ya sea humoral o mediada por células, o ambas. Si un antígeno provoca dicha respuesta inmune, también se le denomina inmunógeno. Preferiblemente, la respuesta inmune es una respuesta inmune humoral mediada principalmente por células B y células T colaboradoras. El experto conoce bien las pruebas estándar para medir la inmunogenicidad. Está bien establecido que la respuesta de las células T se puede determinar con ELISPOT o ELISA, y que se puede determinar una respuesta inmune humoral con ELISA. Una composición inmunogénica a la que se hace referencia en el presente documento es una composición farmacéutica, preferiblemente en forma de suspensión, emulsión o solución. Las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento pueden ser inmunoprotectoras o terapéuticas o no. El término composición inmunogénica no pretende limitarse a vacunas. Preferiblemente, la composición inmunogénica es una vacuna tal como una vacuna contra tumores, también denominada vacuna de antígeno tumoral. En general, una composición inmunogénica se elabora en condiciones que permiten la administración a un sujeto, por ejemplo, se elabora en condiciones GMP. Una composición inmunogénica de la invención puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sin limitación, emulsionantes (tensioactivos), estabilizadores, agentes de carga, tampones, portadores, diluyentes, vehículos, solubilizantes y aglutinantes. El experto entiende que la selección de excipientes apropiados depende de la vía de administración y la forma de dosificación, así como del ingrediente activo et al. factores. Una composición inmunogénica de la invención que comprende fusiones de proteínas extrañas-propias está preferiblemente adaptada para administración mediante vacunación tal como intramuscular o intradérmica. Una composición inmunogénica de la invención que comprende fusiones de proteínas extrañas-propias preferiblemente no es para administración intravenosa u otras formas de administración parenteral. Una composición (no reivindicada actualmente) que comprende anticuerpos antipropios (tales como anticuerpos monoclonales) está preferiblemente adaptada para administración parenteral, tal como administración intravenosa y/o preferiblemente no está adaptada para administración parenteral. Una composición inmunogénica o vacuna que comprende fusiones de proteínas extrañas-propias puede comprender opcionalmente un adyuvante. Alternativamente, el adyuvante se proporciona en una formulación separada y se administra antes, después o esencialmente al mismo tiempo que la administración de una fusión de proteína extraña-propia-propia de la invención. La administración del adyuvante puede ocurrir a través de la misma vía de administración que la fusión de proteínas extrañas-propias, o mediante una vía de administración diferente.

El término "antígeno" generalmente se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido, lípido o conjugado que contiene al menos un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo afín; o en algunos casos a una sustancia inmunogénica, es decir, inmunógeno, que estimula la producción de anticuerpos o respuestas de células T, o ambas, en un sujeto. La respuesta inmune puede generarse contra la molécula completa, o contra una o más porciones diversas de la molécula (por ejemplo, un epítipo o hapteno). El término se refiere preferiblemente a una fracción polipeptídica. Un antígeno es reconocido por anticuerpos, receptores de células T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. El término "antígeno" incluye referencia a al menos uno, o todos, los epítopos antígenicos de fracciones polipeptídicas o proteínas descritas en el presente

documento. Por lo tanto, cuando el término "antígeno" se usa en el contexto de las fracciones polipeptídicas descritas en el presente documento, también se prevén partes funcionales, es decir, una parte de una fracción polipeptídica contra la cual se puede provocar una respuesta antigénica. En otras palabras, también se prevén partes antigénicas de las proteínas o fracciones polipeptídicas descritas en el presente documento en un polipéptido de fusión de la invención. Tales partes antigénicas tienen preferiblemente una conformación plegada correspondiente a la parte antigénica de la conformación plegada nativa de la fracción polipeptídica de longitud completa. Los epítomos de un antígeno determinado pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítomos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, NJ. Por ejemplo, los epítomos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el arte y se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715.

De manera similar, los epítomos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, citado más arriba. Además, para los fines de la presente invención, también se puede usar un "antígeno" para referirse a una fracción polipeptídica que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora, pero pueden ser no conservadoras), para la secuencia nativa, siempre que la fracción polipeptídica mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica en un sujeto. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o mediante procedimientos sintéticos particulares, o mediante un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, como mediante mutaciones de huéspedes que producen los antígenos. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítomos, epítomos flanqueantes et al. antígenos recombinantes o derivados sintéticamente (Bergman et al., (1993) Eur. J. Immunol. 23: 2777 2781; Bergman et al., (1996) J. Immunol. 157: 3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75: 402 408; Gardner et al., (1998) 12ª Conferencia Mundial sobre el SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio a julio 3, 1998). En un polipéptido de fusión de la invención, el antígeno denominado antígeno propio es preferiblemente de origen mamífero, más preferiblemente de ratón, perro o humano, más preferiblemente de origen humano. Un antígeno humano de este tipo, si se administra a un individuo humano como se prevé, también se denomina antígeno propio. El antígeno propio, en el contexto de la invención, puede ser un antígeno propio de cualquier mamífero, tal como un caballo, perro, mono, ratón, gato, rata, preferiblemente un ser humano. En general, un antígeno propio no es inmunogénico cuando se administra a un sujeto que es "propio" en relación con el antígeno. Un antígeno preferido es un antígeno específico para la angiogénesis, tal como la angiogénesis tumoral.

El término "inmunógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto tal como un polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune. En el contexto de la invención, un inmunógeno es también un antígeno. Como se indicó anteriormente, un antígeno no es necesariamente un inmunógeno. Un inmunógeno es preferiblemente de origen no mamífero - tal como bacteriano -, y/o sintético.

El término "polipéptido de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido compuesto por al menos dos fracciones polipeptídicas diferentes, que normalmente están en su conformación plegada nativa y generalmente están unidos por sus respectivos extremos terminales amino y carboxilo a través de un enlazador peptídico. Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos abarcan análogos de (poli)péptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, modificación del extremo terminal N, modificación del extremo terminal C, modificación del enlace peptídico, incluyendo, entre otras, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH o CF=CH y modificaciones de la cadena principal. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, CA Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin, Pergamon Press (1992).

El término "residuos de aminoácidos voluminosos, hidrofílicos", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de residuos de aminoácidos que consiste en histidina, ácido glutámico, arginina, glutamina, ácido aspártico y lisina. A modo de experimentación, los inventores descubrieron que las propiedades inmunogénicas de un inmunógeno podrían modularse variando el porcentaje de residuos de aminoácidos hidrofílicos y voluminosos en el inmunógeno denominado antígeno extraño. Cuando se hace referencia a un porcentaje de residuos de aminoácidos voluminosos, hidrofílicos, se quiere decir que la suma del número de residuos de aminoácidos voluminosos, hidrofílicos en dicha región inmunogénica de dicho antígeno extraño se divide por el número total de residuos de aminoácidos en dicha región inmunogénica, calculada así sobre toda la longitud de la región inmunogénica. Con respecto a las regiones inmunogénicas definidas con respecto a la SEQ ID NO: 1, el porcentaje de residuos de aminoácidos voluminosos, hidrofílicos es preferiblemente 20-24 %. Con respecto a las regiones inmunogénicas definidas con respecto a la SEQ ID NO: 2, el porcentaje de residuos de aminoácidos voluminosos hidrofílicos es preferiblemente de 14-22 %. Con respecto a las regiones inmunogénicas definidas con respecto a la SEQ ID NO: 3, el porcentaje de residuos de aminoácidos voluminosos hidrofílicos es preferiblemente de 13-17 %.

El término "respuesta inmune clínicamente relevante", como se usa en el presente documento, se refiere preferiblemente a un nivel en suero de inmunoglobulinas contra un antígeno propio como se menciona en el presente documento de al menos 0.5 %, preferiblemente al menos 1 %, del nivel de inmunoglobulina G (IgG) en suero en un sujeto.

- 5 El término "identidad de secuencia", como se usa en el presente documento, se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos (o ácidos nucleicos), expresada como un porcentaje de residuos de aminoácidos (o nucleótidos) que son idénticos tras la comparación de dos secuencias de aminoácidos (o ácidos nucleicos). Dicha comparación se realiza preferiblemente sobre la longitud total de las dos secuencias de aminoácidos (o ácidos nucleicos). A modo de ejemplo, de acuerdo con esta definición, un polipéptido que tiene 10 residuos de aminoácidos puede, por definición, tener como máximo un 50 % de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene 20 residuos de aminoácidos. Preferiblemente, la identidad de secuencia se expresa como porcentaje de similitud de secuencia (es decir, identidad) a lo largo de la longitud de la proteína completa.

- 15 El término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero tal como un caballo, perro, mono, ratón, gato, rata, cerdo, cobaya, hámster, más preferiblemente un ser humano. Preferiblemente, el sujeto necesita la administración de una fusión de proteína extraña-propia, un anticuerpo o una composición de la invención, para terapia o diagnóstico. Preferiblemente, el sujeto necesita la administración de una fusión de proteína extraña-propia, o una composición de la invención, para terapia.

El término "antígeno extraño", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero, tal como un antígeno bacteriano. El antígeno puede ser parte de una proteína de fusión.

- 20 El término "antígeno propio", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno que es "propio" para el sistema inmunológico de un mamífero, tal como una proteína humana normal. El antígeno propio puede ser parte de una proteína de fusión. En el contexto de esta divulgación, el término "antígeno propio" incluye referencia a polipéptidos de mamíferos cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral.

- 25 El término "truncamiento" o "truncada", tal como se usa en el contexto de los polipéptidos de fusión de la invención, se refiere a una secuencia de aminoácidos que no es idéntica a su secuencia de referencia, por la razón de que, en comparación con esa secuencia de referencia, hace falta al menos un residuo de aminoácido en el extremo terminal N y/o terminal C.

El término "suero", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a suero sanguíneo.

- 30 El término "péptido enlazador", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de aminoácidos que conectan o unen al menos dos fracciones polipeptídicas.

Los cánceres tratables utilizando las proteínas de fusión, las composiciones y las vacunas de la invención incluyen carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas y otros tipos de cáncer.

- 35 El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a una masa celular que muestra un crecimiento anormal en el tejido, que ocurre cuando la proliferación celular es más rápida que la proliferación del tejido normal y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que normalmente inician el crecimiento. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tumor" incluye células cancerosas, necrosis, así como estroma. Los tumores generalmente presentan una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal y sano, y normalmente forman una masa distinta de tejido que puede ser benigno o maligno. Preferiblemente, el tumor tratado o vacunado es un tumor maligno que requiere angiogénesis tumoral para continuar creciendo y eventualmente hacer metástasis. Más preferiblemente, dicho tumor es una leucemia o un tumor o cáncer sólidos, preferiblemente seleccionado del grupo formado por sarcomas, carcinomas y linfomas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen, entre otros, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

- 55 El término "leucemia" se refiere en sentido amplio a enfermedades malignas progresivas de los órganos hematopoyéticos y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo distorsionados de los leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. La leucemia generalmente se clasifica clínicamente de acuerdo con (1) la duración y el carácter de la enfermedad aguda o crónica; (2) el tipo de célula involucrada; mieloide (mielógena), linfoide (linfógena) o monocítica; y (3) el aumento o no aumento del número de células anormales en la sangre leucémica o aleucémica (subleucémica). Por consiguiente, la presente invención puede usarse en un método para

tratar la leucemia y, preferiblemente, un método para tratar la leucemia no linfocítica aguda, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia granulocítica aguda, la leucemia granulocítica crónica, la leucemia promielocítica aguda, la leucemia de células T en adultos, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de células blásticas, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfóide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmocítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas.

El término "angiogénesis", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere al proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos, preferiblemente formación de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. El término "angiogénesis tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a la angiogénesis inducida por un tumor, es decir, el proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos inducido por un tumor, preferiblemente a partir de vasos sanguíneos preexistentes, para asegurar el suministro de sangre al tumor. En general, los tumores que crecen más allá de un determinado diámetro, por ejemplo, aproximadamente 1-2 mm, requieren angiogénesis tumoral para continuar creciendo.

El término "antígeno como antígeno propio" o "antígeno propio", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a una fracción polipeptídica antigénica. Preferiblemente, dicha fracción polipeptídica es específica de la angiogénesis tumoral y no específica de la angiogénesis no relacionada con tumores, tal como la curación de heridas. Los presentes inventores han proporcionado una lista completa de dichas fracciones polipeptídicas, basada en un método de detección novedoso y altamente específico como se describe en el Ejemplo 1. Estas fracciones pueden conjugarse con un inmunógeno, como se describe en el presente documento, en toda su longitud o en una parte de la misma para presentar o mostrar al menos un epítipo o determinante antigénico. El antígeno propio puede ser un componente estructural de un vaso sanguíneo formado durante la angiogénesis tumoral, preferiblemente un componente estructural específico de un vaso sanguíneo formado en la angiogénesis tumoral y no específico de un vaso sanguíneo formado en una angiogénesis no relacionada con el tumor. El antígeno propio es como se define en las reivindicaciones y es preferiblemente una fracción polipeptídica, o una parte de la misma, seleccionada del grupo formado por, o que consiste en, inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (Timp1), apelina (Apln), amiloide en suero A3 (Saa3), antígeno CD93 (Cd93), proteína de desarrollo cardíaco con dominios similares a EGF 1 (Heg1), Notch 4, receptor de apelina (Aplnr), nestina (Nes), tenascina C (Tnc), gen relacionado con pentraxina (Ptx3), vimentina (Vim), receptor 2 del EGF humano (erbb2, HER2), erbb3 (HER3), proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (Tnfaip6), carboxipeptidasa Z (Cpz), dedo de zinc 1 de la familia del caracol (Snai1), proteína del premelanoma (Pmel), arilsulfatasa I (Arsi), proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 (Wisp1), glutatión peroxidasa 7 (Gpx7), una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 (Adamts4), molécula 1 específica de células endoteliales (Esm1), integrina alfa 5 (receptor alfa de fibronectina) (Itga5), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 (Adamts2), trombospondina 2 (Thbs2), metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) (Mmp14), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Igfbp3), trombospondina 1 (Thbs1), fibrilina 1 (Fbn1), periostina, factor específico de osteoblastos (Postn), repetición rica en leucina que contiene 17 (Lrrc17), fibrilina 2 (Fbn2), molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (Cercam), proteína 4 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp4), C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral (C1qtnf6), similar a lisil oxidasa 3 (Loxl3), superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 (Igslf10), proteína 2 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp2), proteína 10 de unión a FK506 (Fkbp10), glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (Gfpt2), carboxipeptidasa X1 (Cpxm1), proteína 5 asociada a microfibrillas (Mfap5), Proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico (Efemp2), gen sobreexpresado por el nefroblastoma (Nov), versican (Vcan), elastina (Eln), proteína rica en cisteína 61 (Cyr61), sulfatasa 1 (Sulf1), nidógeno 2 (Nid2), antígeno CD248, endosialina (Cd248), similar a lisil oxidasa 2 (Loxl2), proteína 1 similar a folistatina (Fstl1), sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina (Svep1), laminina, alfa 4 (Lama4), homólogo de hendidura 3 (Slit3), receptor de manosa, C tipo 2 (Mrc2), proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4), receptor 133 acoplado a proteína G (Gpr133), homólogo 1 de fascina, proteína agrupadora de actina (Fscn1), interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), receptor eliminador de clase A, miembro 3 (Scara3), inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2 (Serpinb2), ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (Ccl2), receptor de insulina (Insr), folato hidrolasa 1 (Folh1), antígeno CD99 (CD99), caseína kappa (Csn3), receptor similar a la calcitonina (Calcrl), receptor 1 de activina A, similar al tipo II (Acvr1), receptor del factor estimulante de colonias 3 (Csfr3), canal 2 de cloruro activado por calcio (Clca2), familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec14a), proteína transmembrana 100 (Tmem100), proteína 1 rica en cisteína y tirosina (Cyrr1), ceramidasa alcalina 2 (Acer2), síndrome tricorniofalángico I (Trps1), ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH (Arap3), integrina alfa 8 (Itga8), dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G (Sema3g), proteína transmembrana 2 (Tmem2), superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 (Tnfsf10), homeobox HOP (Hopx), lactoalbúmina, alfa (Lalba), factor 2 del intercambio de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Prex2), mucina 15 (Muc15), rotequina 2 (Rtnk2), caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) (Sox4), tetraspanina

18 (Tspan18), receptor 126 acoplado a proteína G (Gpr126), familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec 1a), dominio B adicional de fibronectina (ED-B), piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 (Hey1) como se indica en las Tablas 1 y 2. Más preferiblemente, los fracciones polipeptídicas son específicos de (i) tejido embrionario y (ii) vasos sanguíneos formados en la angiogénesis tumoral, o (iii) células tumorales. Aún más preferiblemente, el antígeno propio se selecciona del grupo formado por o que consiste en vimentina (Vim), CD93, CD99, HER2, HER3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). Basándose en el método de detección descrito en el presente documento, el experto puede identificar antígenos propios adicionales que cumplan los criterios antes mencionados.

El término "vaso sanguíneo", como se usa en el presente documento, puede referirse a parte del sistema vascular compuesto por células endoteliales, matriz extracelular y una membrana basal.

El término "vasculatura tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de vasos sanguíneos, reclutados durante la angiogénesis tumoral, que asegura un suministro de sangre al tumor. Un experto en la técnica puede identificar la vasculatura tumoral basándose en parámetros de la estructura de los vasos sanguíneos tales como la composición de la matriz extracelular y/o la permeabilidad vascular mediante el uso de microscopía (electrónica).

El término "adyuvante", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que mejora la respuesta inmune de un sujeto a un antígeno, por ejemplo, un polipéptido de la invención cuando se administra con ese polipéptido. El adyuvante es preferiblemente un adyuvante farmacéuticamente aceptable, tal como Montanide ISA 720 (Seppic SA, Francia), factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), adyuvante completo de Freund (F5881, Sigma-Aldrich), preferiblemente para vacunaciones con cebador, adyuvante incompleto de Freund (F5506, Sigma-Aldrich), preferiblemente para vacunas de refuerzo. Los adyuvantes pueden formularse conjuntamente en una composición inmunogénica de la invención o pueden proporcionarse en una formulación alternativa adicional.

El término "tipificación", como se usa en el presente documento, se refiere a diferenciar o estratificar entre sujetos de acuerdo con el estado de angiogénesis del tumor o el estado de la vasculatura del tumor. La tipificación se basa preferiblemente en una comparación de (i) un nivel de expresión génica de al menos un producto de expresión génica en una muestra de un sujeto y (ii) un valor de control de la expresión génica. Preferiblemente, la tipificación diferencia a los sujetos que padecen, o se sospecha que padecen, un tumor, preferiblemente un tumor maligno, en un grupo que tiene un mayor riesgo de metástasis tumoral y un grupo que no tiene dicho mayor riesgo.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra biológica que abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un organismo y se puede usar en un ensayo de diagnóstico o seguimiento. El término abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como una muestra de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de las mismas y su descendencia. El término abarca muestras que han sido manipuladas de cualquier forma después de su obtención, como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes. El término abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

El término "estado de angiogénesis tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a una estratificación en (i) un grupo que se encuentra positivo para el estado de angiogénesis tumoral -presencia de angiogénesis tumoral- basándose en el nivel de expresión génica de al menos un producto de expresión génica en dicha muestra de dicho sujeto en comparación con dicho valor de control de expresión génica, o (ii) un grupo que se encuentra negativo para el estado de angiogénesis tumoral - ausencia de angiogénesis tumoral - basándose en el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica en dicha muestra de dicho sujeto en comparación con dicho valor de control de expresión génica.

El término "producto de expresión génica", como se usa en el presente documento, incluye entre otros productos de ARN y productos proteicos, incluidos (poli)péptidos. El experto conoce métodos cuantitativos para medir los niveles de productos de expresión génica, tales como análisis de micromatrices, transferencia Northern, transferencia Western para proteínas, ELISA, RT-PCR cuantitativa y secuenciación de próxima generación. Preferiblemente, en el contexto de un método de tipificación de la invención, el nivel de expresión génica se mide mediante secuenciación de ARN y/o (RT-)PCR cuantitativa.

El término "valor de control de la expresión génica", como se utiliza en el presente documento, es un valor de corte que proporciona una demarcación entre un estado de angiogénesis tumoral o un estado de vasculatura tumoral positivo y uno negativo. Dicho valor de control es preferiblemente un valor umbral de similitud predeterminado establecido en un valor en el que un número aceptable de sujetos con un estado positivo obtendrían una puntuación como falsos negativos, y un número aceptable de pacientes con un estado que es negativo obtendrían una puntuación como falsos positivos. Preferiblemente, un valor umbral de similitud se muestra o se envía a un dispositivo de interfaz de usuario, un medio de almacenamiento legible por ordenador o un sistema informático local o remoto. El experto en la técnica conoce bien los métodos estadísticos para desarrollar dicho valor umbral de similitud. Alternativamente, dicho valor de control de la expresión génica se puede obtener midiendo el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica en una muestra que comprende células no tumorales, preferiblemente células endoteliales no tumorales, más preferiblemente células endoteliales vasculares no tumorales de un sujeto humano,

preferiblemente el mismo sujeto humano que se está tipificando. En el mismo contexto, dicha muestra de control se obtiene preferiblemente del mismo tejido u órgano donde se encuentra el tumor.

Descripción de las realizaciones preferidas

Composiciones inmunogénicas y polipéptidos de fusión de la invención

- 5 La presente invención se refiere entre otros a una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de fusión como se define en las reivindicaciones.

Preferiblemente, dicha composición inmunogénica provoca en un sujeto una respuesta inmune clínicamente relevante en el sentido de que se logra un nivel en suero de inmunoglobulinas contra dicho antígeno propio de al menos niveles detectables mediante ELISA de inmunoglobulinas dirigidas contra el antígeno propio. Los niveles detectables por
10 ELISA se refieren a una detección estadísticamente significativa por encima del fondo o por encima de un valor de control o umbral en un protocolo de ELISA. Preferiblemente, dicha respuesta inmune relevante implica un nivel en suero de inmunoglobulinas contra dicho antígeno propio de al menos 5 veces la señal medida en el suero de control de individuos no vacunados, detectada por ELISA, preferiblemente idéntica a al menos el 0.1 % del nivel de inmunoglobulina G sérica total (IgG).

- 15 El antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero como se describe en el presente documento consiste en un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 12-15 residuos de aminoácidos, 12-24 % de los cuales son residuos de aminoácidos voluminosos, hidrofílicos seleccionados del grupo que consiste en histidina, glutamato, arginina, glutamina, ácido aspártico y/o lisina.

- Se descubrió inesperadamente que ciertas regiones de residuos de aminoácidos inmunogénicos de una proteína que
20 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 o proteínas que muestran al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, se usan ventajosamente como compañeros de fusión con fracciones polipeptídicas antigénicas, como se describe en el presente documento, porque, cuando se fusionan a dicha fracción polipeptídica y se administran como una composición inmunogénica, facilitan la obtención de una respuesta inmune relevante (o eficaz) contra dichas fracciones polipeptídicas antigénicas (Figuras 2-6). Se
25 estableció así que la obtención de niveles de autoanticuerpos depende de las características del compañero de fusión.

Además, se diseñó y produjo en bacterias un polipéptido artificial (USP) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Se encontró el mismo efecto para este polipéptido.

- La secuencia de aminoácidos de tiorredoxina-1 (TRX) se proporciona en la SEQ ID NO: 1. TRX es una proteína bacteriana que participa en diversas reacciones redox a través de la oxidación reversible de su centro activo ditiol a un disulfuro y cataliza reacciones de intercambio ditiol-disulfuro.
30

La secuencia de aminoácidos de la proteína fimbrial tipo 1, cadena A (TFP), se proporciona en la SEQ ID NO: 2. La TFP es un constituyente de las fimbrias, es decir, filamentos polares que irradian desde la superficie de una bacteria, generalmente con una longitud de 0.5-1.5 micrómetros, que permiten a las bacterias colonizar huéspedes extraños.

El antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero es tal como se define en las reivindicaciones.

- 35 En realizaciones preferidas de la invención, una región inmunogénica truncada de la proteína de la SEQ ID NO: 1 o de una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la proteína de la SEQ ID NO: 1 (TRX-trunc o TRXtr) se genera escindiendo la molécula entre el aminoácido 51 (Gln, Q) y 52 (Gly, G) y eliminando así la parte del extremo terminal N. TRXtr, en realizaciones preferidas de la invención, preferiblemente comprende o contiene los 58 aminoácidos del extremo terminal C de la molécula de TRX de la SEQ ID NO: 1. El sitio de escisión se elige
40 preferiblemente de modo que la molécula se divida entre los dos dominios globulares de TRX. El dominio del extremo terminal C se selecciona entonces preferiblemente como una molécula de TRX truncada (TRXtr). Preferiblemente, la molécula de TRXtr en aspectos de esta invención comprende (i) 3 dominios de lámina beta restantes de la molécula de TRX original, en combinación con (ii) la parte del extremo terminal C de la molécula que comprende una hélice alfa. Preferiblemente, el número de epítomos de células B en TRXtr se reduce, mientras que la antigenicidad se mantiene mediante la inclusión tanto de los dominios de lámina beta como de un dominio de hélice alfa terminal libre, que
45 probablemente contenga epítomos de células B.

- Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se considera que una proteína TRXtr más corta al escindir la proteína en las posiciones 53-60 (i) induce demasiada reducción de la antigenicidad (pérdida del dominio 3 de la lámina beta) y (ii) impide el plegamiento adecuado de la molécula, lo que se considera que da lugar a una pérdida de antigenicidad. Sin
50 desear estar ligado a ninguna teoría, se considera que una TRXtr más larga mediante escisión en los aminoácidos 40-49 no cumple con el objetivo de antigenicidad reducida, porque de ese modo se mantiene un dominio de hélice alfa (extremo terminal N) adicional.

- En el diseño de partes no propias alternativas de las vacunas de la presente invención, se seleccionan preferiblemente moléculas con un gran porcentaje de aminoácidos voluminosos y cargados. Esto puede hacer que la proteína conjugada de la invención sea tanto inmunogénica como soluble, respectivamente. Como puede verse en la Figura
55

28, todas las construcciones alternativas dan como resultado títulos elevados de anticuerpos contra el antígeno propio EDB. La relevancia de estos aminoácidos voluminosos y cargados se demuestra por el hecho de que la construcción USP, que muestra un porcentaje más bajo de estos aminoácidos (véase la Tabla A, a continuación), induce títulos de anticuerpos más bajos contra el antígeno propio. Los aminoácidos voluminosos y cargados a los que se hace referencia en el presente documento se seleccionan preferiblemente de glutamina (Q), arginina (R), histidina (H), lisina (K), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E).

Tabla A. Características moleculares de los diferentes compañeros de fusión no propios.

	aa voluminosos hidrofílicos/cargados	Total ¹	Relación ²	Porcentaje ³
TRX	31	109	0.40	28 %
TRXtr	14	58+M ⁴	0.31	24 %
PTF	23	132	0.21	17 %
PTF v	27	132	0.26	20 %
CDP	10	61	0.20	16 %

¹Número total de aminoácidos en la proteína.
²Relación de aminoácidos voluminosos hidrofílicos/cargados y aminoácidos restantes
³Porcentaje de voluminosos hidrofílicos/cargados en la proteína total
⁴Total 59 aa (58 aa metionina; codón del sitio de inicio)

La región inmunogénica es como se define en las reivindicaciones.

- 10 La región inmunogénica es como se define en las reivindicaciones y es preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o 7.

Lo más preferiblemente, el antígeno extraño consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 3, 4, 6 o 7.

- 15 Un antígeno extraño del polipéptido de fusión de la invención preferiblemente comprende además un residuo de metionina del extremo terminal N. En una realización preferida, el antígeno extraño como se describe en el presente documento está unido en su extremo terminal N del antígeno propio. Así, por ejemplo, se prevé en el presente documento que las SEQ ID NOs: 4, 6 o 7 están unidos al antígeno propio a través de un residuo de metionina del extremo terminal N. En otra realización preferida, el antígeno extraño como se describe en el presente documento está unido en su extremo terminal C del antígeno propio. Así, por ejemplo, se prevé en el presente documento que las SEQ ID NO: 4, 6 o 7 están unidos a un residuo de metionina del extremo terminal N.

- 20 Un polipéptido de la invención puede comprender además una o más secuencias de aminoácidos adicionales, además de los antígenos propios y extraños, tales como por ejemplo una secuencia de aminoácidos que constituye una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta FLAG como se describe en el documento EP0150126 y/o uno o más péptidos de identificación diferentes, tales como una etiqueta His. Además, un polipéptido de fusión de la invención puede comprender un antígeno adicional como un antígeno propio "adicional" y/o "extra" como se describe en el presente documento, y/o un antígeno extraño "adicional" y/o "extra" como se describe en el presente documento.

Un polipéptido de fusión de la invención comprende además preferiblemente un péptido enlazador tal como un péptido enlazador de glicina-serina (GS), preferiblemente repetitivo.

- 30 Preferiblemente, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico o se expresa específicamente durante la enfermedad, incluyendo la angiogénesis de la enfermedad, tal como en cáncer, aterosclerosis, psoriasis, artritis, endometriosis o adiposidad, o se expresa en células tumorales, reuma). El antígeno propio es como se define en las reivindicaciones y se selecciona preferiblemente del grupo formado por, o que consiste en, inhibidor tisular de metaloproteína 1 (Timp1), apelina (Apln), amiloide en suero A3 (Saa3), antígeno CD93 (Cd93), proteína de desarrollo cardíaco con dominios 1 similares a EGF (Heg1), Notch 4, receptor de apelina (Aplnr), nestina (Nes), tenascina C (Tnc), gen relacionado con pentraxina (Ptx3), vimentina (Vim), proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (Tnfaip6), carboxipeptidasa Z (Cpz), dedo de zinc 1 de la familia del caracol (Snai1), proteína del premelanoma (Pmel), arilsulfatasa I (Arsi), proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 (Wisp1), glutatión peroxidasa 7 (Gpx7), una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 (Adamts4), molécula 1 específica de células endoteliales (Esm1), integrina alfa 5 (receptor alfa de fibronectina) (Itga5), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 (Adamts2), trombospondina 2 (Thbs2), metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) (Mmp14), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Igfbp3), trombospondina 1 (Thbs1), fibrilina 1 (Fbn1), periostina, factor específico de osteoblastos (Postn), repetición rica en leucina que contiene 17 (Lrrc17), fibrilina 2 (Fbn2), molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (Cercam), proteína 4 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp4), C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral (C1qtnf6), similar a lisil oxidasa 3 (Loxl3), superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 (Igslf10), proteína 2 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp2), proteína 10 de unión a FK506 (Fkbp10), glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (Gfpt2), carboxipeptidasa

X1 (Cpxm1), proteína 5 asociada a microfibrillas (Mfap5), Proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico (Efemp2), gen sobreexpresado por el nefroblastoma (Nov), versican (Vcan), elastina (Eln), proteína rica en cisteína 61 (Cyr61), sulfatasa 1 (Sulf1), nidógeno 2 (Nid2), antígeno CD248, endosialina (Cd248), proteína 2 similar a lisil oxidasa (Loxl2), proteína 1 similar a folistatina (Fstl1), sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina (Svep1), laminina, alfa 4 (Lama4), homólogo de hendidura 3 (Slit3), receptor de manosa, C tipo 2 (Mrc2), proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4), receptor 133 acoplado a proteína G (Gpr133), homólogo 1 de fascina, proteína agrupadora de actina (Fscn1), interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), receptor eliminador de clase A, miembro 3 (Scara3), inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2 (Serpnb2), ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (Ccl2), receptor de insulina (Insr), folato hidrolasa 1 (Folh1), antígeno CD99 (CD99), caseína kappa (Csn3), receptor similar a la calcitonina (Calcrl), receptor 1 de activina A, similar al tipo II (Acvr11), receptor del factor estimulante de colonias 3 (Csf3r), canal 2 de cloruro activado por calcio (Clca2), familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec14a), proteína transmembrana 100 (Tmem100), proteína 1 rica en cisteína y tirosina (Cyrr1), ceramidasa alcalina 2 (Acer2), síndrome tricorinofalángico I (Trps1), ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH (Arap3), integrina alfa 8 (Itga8), dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G (Sema3g), proteína transmembrana 2 (Tmem2), superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 (Tnfsf10), homeobox HOP (Hopx), lactoalbúmina, alfa (Lalba), factor 2 del intercambio de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Prex2), mucina 15 (Muc15), rotequina 2 (Rtkn2), caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) (Sox4), tetraspanina 18 (Tspan18), receptor 126 acoplado a proteína G (Gpr126), familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec1a), dominio B adicional de fibronectina (ED-B), piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 (Hey1) como se indica en las Tablas 1 y 2.

En una realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado entre Vim y CD99. Estos antígenos propios tienen un efecto antitumoral.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es el antígeno CD93. Este antígeno propio tiene un alto contenido de MET y es especialmente beneficioso en aspectos de esta invención.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Mmp14, Cercam, Sulf1, Gpr133, Scara3, Insr, Folh1, CD99, Acvr11, Itga8, Muc15. Estos antígenos propios son antígenos de membrana.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Timp1, Apln, Saa3, Ptx3, Tnfaip6, Cpz, Pmel, Arsi, Adamts4, Thbs2, Mmp14, Igfbp3, Thbs1, Fbn1, Postn, Loxl3, Mfap5, Efemp2, Nov, Vcan, Eln, Cyr61, Sulf1, Nid2, Lama4, Slit3, Mrc2, Serpinb2, Ccl2, CD99, Tnfsf10, Lalba. Estos antígenos propios son antígenos secretados.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Apln, Saa3, Vim, Pmel, Arsi, Wisp1, Fkbp10. Estos antígenos propios son objetivos citoplasmáticos.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Timp1, Apln, Saa3, Ptx3, Vim, Tnfaip6, Cpz, Arsi, Esm1, Itga5, Adamts2, Thbs2, Mmp14, Thbs1, Fbn1, Postn, Fbn2, Cercam, Loxl3, Mfap5, Efemp2, Nov, Vcan, Eln, Cyr61, Sulf1, Nid2, Lama4, Slit3, Mrc2, Gpr133, Scara3, Insr, Folh1, CD99, Acvr11, Eln, Itga8, Tnfsf10, Lalba, Muc15. Estos antígenos propios son objetivos extracelulares.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Cd93, Heg1, Notch4, Aplnr, Nes, Tnc, Snail, Gpx7, Lrrc17, Sfrp4, C1qtnf6, Igsf10, Sfrp2, Gfpt2, Cpxm1, Cd248, Loxl2, Fstl1, Svep1, Ckap4, Emilin2, Csn3, Calcrl, Csf3r, Clca2, Clec14a, Tmem100, Cyrr1, Acer2, Trps1, Arap3, Sema3g, Tmem2, Hopx, Prex2, Rtkn2, Sox4, Tspan18, Gpr126, Clec1a, Hey1. Estos antígenos propios están involucrados en diversos procesos relacionados con enfermedades.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Timp1, Apln, Saa3, Cd93, Heg1, Notch4, Aplnr, Nes, Tnc, Ptx3, Vim, Tnfaip6, Cpz, Caracol, Pmel, Arsi, Wisp1, Gpx7, Adamts4, Esm1, Itga5, Adamts2, Thbs2, Mmp14, Igfbp3, Thbs1, Fbn1, Postn, Lrrc17, Fbn2, Cercam, Sfrp4, C1qtnf6, Loxl3, Igsf10, Sfrp2, Fkbp10, Gfpt2, Cpxm1, Mfap5, Efemp2, Nov, Vcan, Eln, Cyr61, Sulf1, Nid2, Cd248, Loxl2, Fstl1, Svep1, Lama4, Slit3, Mrc2, Ckap4, Gpr133, Fscn1, Emilin2, Scara3, Serpinb2, Ccl2, Insr, Folh1, CD99. Estos antígenos propios están implicados en el desarrollo de tumores.

En otra realización alternativa preferida de aspectos de esta invención, el antígeno propio es un antígeno de enfermedad específico seleccionado del grupo que consiste en Csn3, Calcrl, Acvr11, Csf3r, Clca2, Clec14a, Tmem100, Cyrr1, Eln, Acer2, Trps1, Arap3, Itga8, Sema3g, Tmem2, Tnfsf10, Hopx, Lalba, Prex2, Muc15, Rtkn2, Sox4, Tspan18, Gpr126, Clec1a, Hey1. Estos antígenos propios están implicados en la metástasis.

Las realizaciones preferidas de este et al. aspectos de esta invención incluyen realizaciones en las que el antígeno propio es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos propios seleccionados de las agrupaciones de antígenos propios indicados en las Figuras 9-17.

5 Preferiblemente, el antígeno propio es el dominio B adicional de fibronectina o vimentina. Más preferiblemente, el antígeno propio es el dominio B adicional humano de fibronectina o vimentina humana.

10 El dominio B adicional humano de fibronectina es un dominio de 91 residuos de aminoácidos insertado en fibronectina mediante empalme alternativo y se expresa durante la vasculogénesis en el embrión, pero es esencialmente indetectable en condiciones normales en el cuerpo humano. Sin embargo, el dominio B adicional se expresa altamente durante la angiogénesis tumoral. El gen de la fibronectina 1 humana se proporciona en el GenBank con el número de acceso del GenBank NG_012196.1.

15 Un antígeno propio como se describe en el presente documento es preferiblemente la parte del extremo terminal N o del extremo terminal C del polipéptido de fusión, más preferiblemente la parte del extremo terminal C, en un polipéptido de fusión de la invención. Dicho antígeno propio se conjuga preferiblemente con un antígeno extraño uniendo la parte del extremo terminal N de dicho antígeno propio a la parte del extremo terminal C del antígeno extraño. El experto conoce métodos y medios para producir polipéptidos de fusión que comprenden fracciones polipeptídicas en su conformación espacial nativa plegada (Druzinec et al., *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 136: 65-100 (2013); Kollwe, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9(3): 255-271 (2013); Coco-Martin, Capítulo cuatro: Una revisión de la expresión de proteínas terapéuticas por células de mamíferos. En *BioProcess International* [[Internet]]. 2008. págs. suplementarias 28-32; Weber et al., Capítulo 6: Producción de proteínas recombinantes a partir de células de insectos. En: Eibl R., editor *Cell and tissue reaction engineering: principles and practice*. Berlín Heidelberg: Springer-Verlag; págs. 263-273 (2009).; Jayaraj et al., *Open Veterinary Science Journal*, Bentham Open; 3: 28-34 (2009); Swiech et al., *Protein Expr Purif.*, 84(1): 147-53 (2012)).

25 El polipéptido de fusión puede producirse, por ejemplo, en la cepa de *E. coli* Rosetta gami DE3 (Novagen), que está optimizada para la expresión de proteínas eucariotas, es decir, que está equipada con ARNt eucariota y es capaz de formar puentes disulfuro para el plegamiento adecuado de la proteína (células competentes de Novagen, protocolo de usuario TB009 Rev. F 0104). Además, el polipéptido se puede producir en células de insecto, levadura o células de mamífero. La expresión en un sistema eucariota, por ejemplo, células de insecto, es ventajoso ya que el polipéptido estará glicosilado. La expresión preferida es en células de mamíferos, tales como células de rata, ratón, hámster o humanas.

30 Una composición inmunogénica de la invención preferiblemente comprende además un adyuvante. La relación porcentual en peso de polipéptido de fusión: adyuvante está preferiblemente en el intervalo de polipéptido de fusión: adyuvante de 3:1 - 1:3, preferiblemente aproximadamente 1:1. Una composición o polipéptido de acuerdo con la invención se formula en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune contra dicho polipéptido de fusión, preferiblemente la inducción de una respuesta inmune contra dicho inmunógeno y una respuesta inmune humoral contra dicho antígeno propio. Una composición o polipéptido inmunogénico de la invención se administra preferiblemente mediante administración mediante vacunación, tal como (i) administración mediante inyección, preferiblemente en forma de un líquido tal como agua o una emulsión, y preferiblemente se administra por vía intramuscular o subcutánea, (ii) administración transdérmica, preferiblemente mediante administración tópica, por ejemplo en forma de crema, gelatina, polvo o parche, preferiblemente en combinación con un adyuvante; (iii) inhalación, por ejemplo en forma de polvos para inhalación, aerosoles, suspensiones y similares. Un adyuvante puede formularse conjuntamente con el polipéptido de fusión o la composición de la invención o estar en una formulación separada. La administración del adyuvante puede ocurrir por la misma vía de administración o por una diferente, dependiendo también del tipo de adyuvante utilizado. Por ejemplo, si se emplea GM-CSF como adyuvante, se administra preferiblemente por vía intravenosa o subcutánea. En general, un adyuvante como se describe en el presente documento se administra preferiblemente mediante administración enteral o administración parenteral. Una composición o polipéptido de la invención se administra preferiblemente por vía intramuscular, subcutánea o transdérmica, por ejemplo, en un líquido acuoso tal como una suspensión, emulsión o solución en agua. Preferiblemente, una composición o polipéptido (de fusión) de acuerdo con la invención está en una forma farmacéuticamente aceptable adaptada para administración subcutánea intramuscular. Un aspecto no reivindicado de la presente divulgación se refiere a un kit de piezas que comprende (i) un primer recipiente para contener una composición o polipéptido de la invención, comprendiendo dicho recipiente una composición o polipéptido de fusión de la invención y (ii) un segundo recipiente para contener un adyuvante, comprendiendo dicho segundo recipiente un adyuvante. También se prevé en el presente documento que dicho kit de piezas sea para uso en medicina, más preferiblemente para uso en provocar una respuesta inmune en un sujeto contra dicho antígeno propio o para uso en inhibición o bloqueo de la angiogénesis o crecimiento tumorales y/o eliminación de la vasculatura tumoral en un sujeto. Dicho kit de partes comprende opcionalmente instrucciones con respecto a los parámetros de administración de dicho polipéptido de fusión, composición y/o adyuvante. Los componentes en el primer y segundo recipiente del kit de piezas son preferiblemente para administración simultánea o secuencial. Es posible mezclar la proteína de fusión y el adyuvante, por ejemplo, para obtener una emulsión, antes de la inyección intramuscular. GM-CSF se puede administrar i.v. antes de la inyección intramuscular con la proteína de fusión, o mezclado con la proteína de fusión y luego la solución puede inyectarse por vía intramuscular.

Una composición o polipéptido de acuerdo con la invención se utiliza preferiblemente como medicamento, más preferiblemente para provocar una respuesta inmune en un sujeto contra dicho antígeno propio, o para inhibir o bloquear la angiogénesis tumoral y/o eliminar la vasculatura tumoral en un sujeto. El sujeto es preferiblemente un perro o un ser humano, más preferiblemente un ser humano.

- 5 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), el polipéptido de fusión se utiliza para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; cáncer de colon, más preferiblemente cáncer colorrectal; cáncer endometrial; cáncer de cerebro; cáncer bucal; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; cáncer de piel; 10 cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de riñón; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer de tiroides y cáncer urotelial, más preferiblemente dicho tumor o cáncer es carcinoma de células renales.

- 15 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es laminina, alfa 4 (Lama4) o interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), el polipéptido de fusión es para uso para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer renal, más preferiblemente carcinoma de células renales; cáncer de colon, más preferiblemente cáncer colorrectal; cáncer de hígado; cáncer de pulmón y cáncer de mama.

- 20 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es fibrilina 2 (Fbn2), el polipéptido de fusión se utiliza para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer es cáncer de colon, más preferiblemente cáncer colorrectal.

- 25 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es el antígeno CD99 (CD99), el polipéptido de fusión se utiliza para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer es sarcoma de Ewing.

- 30 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es versican (Vcan), el polipéptido de fusión se utiliza para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer es cáncer renal, más preferiblemente carcinoma de células renales.

- 35 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es el antígeno CD93 (CD93), el polipéptido de fusión se utiliza para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer es cáncer renal, más preferiblemente carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, más preferiblemente adenocarcinoma de páncreas (PDAC), y cáncer de colon, más preferiblemente cáncer colorrectal.

- 40 Preferiblemente, cuando el antígeno propio como se describe en el presente documento, o el polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral como se describe en el presente documento, es el receptor de insulina (Insr), el polipéptido de fusión se utiliza para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar un tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, en el que dicho tumor o cáncer es preferiblemente un tumor sólido, más preferiblemente un cáncer preferiblemente seleccionado entre cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer renal, 45 carcinoma de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de piel, y carcinoma escamoso de cabeza y cuello, más preferiblemente carcinoma de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de piel y carcinoma escamoso de cabeza y cuello. La composición o polipéptido de fusión de la invención se puede usar en un método para vacunar o tratar a un sujeto, preferiblemente un sujeto que padece, o se sospecha que padece, un tumor, en donde la composición o polipéptido de fusión de la invención es para administración a dicho sujeto. Preferiblemente, 50 la vacunación o el tratamiento provoca una respuesta inmune en un sujeto contra dicho antígeno propio y/o proporciona la inhibición o bloqueo del crecimiento tumoral, la angiogénesis tumoral y/o proporciona la eliminación de la vasculatura tumoral en un sujeto.

Preferiblemente, una composición o polipéptido de la invención se asigna como terapia, o para administración, cuando dicho sujeto padece, por ejemplo, cáncer, aterosclerosis, psoriasis, endometriosis o adiposidad.

- 55 Se puede usar una composición o polipéptido de fusión de la invención para provocar una respuesta inmune en un sujeto contra un antígeno propio, o para inhibir o bloquear el crecimiento tumoral, la angiogénesis tumoral y/o para eliminar la vasculatura tumoral en dicho sujeto humano. Alternativamente, una composición o polipéptido de fusión de

la invención es para tratar y/o prevenir enfermedades objeto de los métodos terapéuticos de esta invención, incluido el cáncer.

La invención se refiere además a polipéptidos de fusión. Para fines de claridad y una descripción concisa, las características se describen en este documento y anteriormente como parte de la misma o realizaciones separadas; sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir realizaciones que tengan combinaciones de todas o algunas de las características descritas. Más específicamente, los polipéptidos de fusión como se describe en el contexto de las composiciones inmunogénicas son como tales, es decir, como polipéptidos de fusión, descritos en el presente documento incluyendo cualquiera de las limitaciones como se describe en esta u otra sección.

La invención se refiere a un polipéptido inmunogénico como se define en las reivindicaciones.

Por razones de claridad y concisión de la descripción, las características de los antígenos extraños como se describen en el contexto de las composiciones inmunogénicas o polipéptidos de fusión de la invención también se prevén expresamente en el contexto de un polipéptido inmunogénico de la invención.

Cabe señalar que un polipéptido inmunogénico de la invención puede comprender un péptido enlazador como se describe en el presente documento y/o que la fracción polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 3, 4, 6 o 7.

El polipéptido inmunogénico de la invención es como se define en las reivindicaciones.

El término "% de identidad de secuencia", en el contexto de esta invención, se refiere al porcentaje de identidad de secuencia en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos del gen, proteína o polipéptido. Los términos "proteína" y "polipéptido" son, a menos que se indique expresamente lo contrario en el contexto de esta descripción, intercambiables en el presente documento. Los marcadores tumorales o antígenos asociados a tumores como se identifican en el presente documento son objetivos adecuados para la terapia, incluida la terapia del cáncer y la terapia de la vasculatura tumoral. Dicha terapia incluye inmunoterapia contra el cáncer, así como terapia antisentido, incluido el uso de oligonucleótidos antisentido, ARNip o miARN contra los genes indicados en las Tablas 1 y 2.

La invención proporciona además un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, preferiblemente una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de fusión o un polipéptido inmunogénico de la invención. El experto en la técnica comprenderá cómo generar una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención y cómo fabricar y aislar una molécula de ácido nucleico con dicha secuencia de ADN usando técnicas de ADN recombinante generalmente conocidas. La secuencia de la molécula de ácido nucleico preferiblemente está optimizada con codones para la expresión de proteínas en una célula huésped de la invención. De esta manera se utilizan codones que se favorecen para la expresión de proteínas de alto nivel en una célula huésped específica.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la invención. Las moléculas de ácido nucleico se insertan preferiblemente en un vector de expresión utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas por el experto en la técnica. Los vectores de expresión en el contexto de la invención dirigen la expresión de un polipéptido de la invención en una célula huésped. Estos vectores de expresión son preferiblemente replicables en una célula huésped, ya sea como un plásmido o como parte del ADN cromosómico. Además, el vector de expresión comprende preferiblemente (i) un promotor/potenciador fuerte, tal como el promotor CMV, SV40 o T7, (ii) una secuencia de iniciación de traducción óptima, tal como un sitio de unión ribosomal y un codón de inicio, preferiblemente una secuencia consenso KOZAK y (iii) una secuencia de terminación de la transcripción, que incluye una señal poli(A) cuando la proteína se expresa en células eucariotas. Los vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos y vectores virales tales como adenovirus, virus adenoasociados y retrovirus. El experto en la técnica entenderá que el vector de expresión a utilizar depende de la célula huésped que se utiliza para la expresión de una proteína recombinante. Un vector de expresión de la invención es preferiblemente adecuado para la inserción de una molécula de ácido nucleico de la invención en una célula procariótica que incluye una célula bacteriana o, más preferiblemente, en una célula huésped eucariota, tal como una célula de levadura y una célula de mamífero. Es particularmente preferido el vector de expresión pET-21a o pCMV4. Otros vectores de expresión compatibles con la presente invención son TOPO, CMV o pcDNA 3.1.

Como alternativa, se puede insertar una molécula de ácido nucleico de la invención en el genoma de una célula huésped. Dicha inserción se realiza preferiblemente en un locus o dentro de una región que asegura la transcripción y traducción de una molécula de ácido nucleico de la invención en la célula huésped.

En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la invención. La divulgación proporciona preferiblemente una célula huésped que porta una molécula de ácido nucleico de la invención, produciendo así un polipéptido de la invención. Dicho polipéptido se produce dentro de la célula huésped o, preferiblemente, se secreta a partir de la célula huésped.

Las células huésped adecuadas para su uso en la presente invención incluyen células procarióticas y eucariotas, tales como células bacterianas, células de levadura, células de insectos, células animales, células de mamíferos; incluyendo células murinas, células de rata, células de oveja, células de simio y células humanas. Ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas incluyen, entre otras, células HEK 293, la línea celular de hámster CHO y BHK-21; las células huésped murinas NIH3T3, NSO y C127; las células huésped de simio COS y Vero; y las células huésped humanas HeLa, PER.C6, U-937 y Hep G2. Las células adecuadas están disponibles en fuentes públicas tales como la ATCC y Life Technologies. En la técnica se conocen varias técnicas de transfección, véase, por ejemplo, Graham et al., 1973. Virology 52: 456; Green et al., 2012. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", CSHL Press; Davis et al., "Basic Methods in Molecular Biology", 1986, Elsevier; y Chu et al., 1981. Gene 13: 197. El experto en la técnica preferiblemente emplea técnicas como las descritas en estas referencias para introducir una o más moléculas de ácido nucleico exógenas en células huésped adecuadas.

Método de tipificación (actualmente no reivindicado)

La divulgación se refiere además a un método actualmente no reivindicado para tipificar un sujeto para un estado de angiogénesis tumoral, que comprende las etapas de a) medir un nivel de expresión génica de al menos un producto de expresión génica en una muestra de un sujeto que comprende, o se sospecha que comprende, células tumorales, preferiblemente células endoteliales tumorales; en el que dicho al menos un producto de expresión génica se selecciona del grupo formado por inhibidor tisular de metaloproteínasa 1 (Timp1), apelina (Apln), amiloide en suero A3 (Saa3), antígeno CD93 (Cd93), proteína de desarrollo cardíaco con dominios similares a EGF 1 (Heg1), Notch 4, receptor de apelina (Aplnr), nestina (Nes), tenascina C (Tnc), gen relacionado con pentraxina (Ptx3), vimentina (Vim), proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (Tnfaip6), carboxipeptidasa Z (Cpz), dedo de zinc 1 de la familia del caracol (Snai1), proteína del premelanosoma (Pmel), arilsulfatasa I (Arsi), proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 (Wisp1), glutatión peroxidasa 7 (Gpx7), una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 (Adamts4), molécula 1 específica de células endoteliales (Esm1), integrina alfa 5 (receptor alfa de fibronectina) (Itga5), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 (Adamts2), trombospondina 2 (Thbs2), metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) (Mmp14), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Igfbp3), trombospondina 1 (Thbs1), fibrilina 1 (Fbn1), periostina, factor específico de osteoblastos (Postn), repetición rica en leucina que contiene 17 (Lrrc17), fibrilina 2 (Fbn2), molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (Cercam), proteína 4 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp4), C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral (C1qtnf6), similar a lisil oxidasa 3 (Loxl3), superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 (Igslf10), proteína 2 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp2), proteína 10 de unión a FK506 (Fkbp10), glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (Gfpt2), carboxipeptidasa X1 (Cpxm1), proteína 5 asociada a microfibrillas (Mfap5), Proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico (Efemp2), gen sobreexpresado por el nefroblastoma (Nov), versican (Vcan), elastina (Eln), proteína rica en cisteína 61 (Cyr61), sulfatasa 1 (Sulf1), nidógeno 2 (Nid2), antígeno CD248, endosialina (Cd248), proteína 2 similar a lisil oxidasa (Loxl2), proteína 1 similar a folistatina (Fstl1), sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina (Svep1), laminina, alfa 4 (Lama4), homólogo de hendidura 3 (Slit3), receptor de manosa, C tipo 2 (Mrc2), proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4), receptor 133 acoplado a proteína G (Gpr133), homólogo 1 de fascina, proteína agrupadora de actina (Fscn1), interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), receptor eliminador de clase A, miembro 3 (Scara3), inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2 (Serpinb2), ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (Ccl2), receptor de insulina (Insr), folato hidrolasa 1 (Folh1), antígeno CD99 (CD99), caseína kappa (Csn3), receptor similar a la calcitonina (Calcrl), receptor 1 de activina A, similar al tipo II (Acvr1), receptor del factor estimulante de colonias 3 (Csf3r), canal 2 de cloruro activado por calcio (Clca2), familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec14a), proteína transmembrana 100 (Tmem100), proteína 1 rica en cisteína y tirosina (Cyrr1), ceramidasa alcalina 2 (Acer2), síndrome tricorniofalangico I (Trps1), ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH (Arap3), integrina alfa 8 (Itga8), dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G (Sema3g), proteína transmembrana 2 (Tmem2), superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 (Tnfsf10), homeobox HOP (Hopx), lactoalbúmina, alfa (Lalba), factor 2 del intercambio de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Prex2), mucina 15 (Muc15), rotequina 2 (Rtn2), caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) (Sox4), tetraspanina 18 (Tspan18), receptor 126 acoplado a proteína G (Gpr126), familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec1a), dominio B adicional de fibronectina (ED-B), piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 (Hey1) como se indica en las Tablas 1 y 2; b) comparar dicho nivel de expresión génica con un valor de control de expresión génica; c) tipificar dicho sujeto de acuerdo con un estado de angiogénesis tumoral basándose en la diferencia entre dicho nivel de expresión génica y dicho valor de control de la expresión génica.

Un método de tipificación permite la identificación de (i) sujetos en los que ocurre, o ha ocurrido, angiogénesis tumoral, o (ii) sujetos en los que está presente vasculatura tumoral. El experto apreciará que, con un método de tipificación, también es posible identificar sujetos que padecen, o se sospecha que padecen, un tumor.

Preferiblemente, el nivel de expresión génica de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o todos, los productos de expresión génica se miden como se menciona en las Tablas 1 y 2.

El nivel de expresión génica de al menos uno de los productos de expresión génica enumerados en las Tablas 1 y 2 se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un experto conoce métodos para

determinar los niveles de ARN de genes e incluyen, entre otros, transferencia Northern, PCR cuantitativa y análisis de micromatrices.

La transferencia Northern comprende la cuantificación del producto de expresión génica de un gen específico mediante la hibridación de una sonda marcada que interactúa específicamente con dichos productos de expresión génica, después de la separación del producto de expresión génica mediante electroforesis en gel. La cuantificación de la sonda marcada que ha interactuado con dicho producto de expresión génica sirve como medida para determinar el nivel de expresión. El nivel de expresión determinado se puede normalizar para diferencias en las cantidades totales de productos de expresión génica entre dos muestras separadas comparando el nivel de expresión de un gen que se sabe que no difiere en el nivel de expresión entre muestras.

La reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) proporciona un método alternativo para cuantificar el nivel de expresión de ácidos nucleicos. La qPCR se puede realizar mediante PCR en tiempo real (rtPCR), en la que se controla la cantidad de producto durante la reacción, o mediante mediciones de punto final, en las que se determina la cantidad de producto final. Como sabe un experto, la rtPCR se puede realizar mediante el uso de agentes de tinción de ácido nucleico, tales como, por ejemplo, bromuro de etidio o el colorante SYBR® Green I, que interactúa con todos los productos bicatenarios generados, lo que da como resultado un aumento de la fluorescencia durante la amplificación, o mediante el uso de sondas marcadas que reaccionan específicamente con el producto bicatenario generado del gen de interés. Los métodos de detección alternativos que se pueden utilizar son la amplificación de la señal de dendrímero, la amplificación de la señal de hibridación y las balizas moleculares. Se pueden emplear diferentes métodos de amplificación, conocidos por un experto en la técnica, para qPCR, que incluyen, entre otros, PCR, amplificación por círculo rodante, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos, amplificación mediada por transcripción y amplificación lineal de ARN.

Para la detección simultánea de múltiples productos de expresión génica, se puede emplear métodos de qPCR tal como la amplificación dependiente de ligadura múltiple de transcriptasa inversa (rtMLPA), que cuantifica con precisión hasta 45 transcripciones de interés en un ensayo de un solo tubo (Eldering et al., *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e 153).

Los análisis basados en micromatrices implican el uso de biomoléculas seleccionadas que se inmovilizan en una superficie. Una micromatriz suele comprender moléculas de ácido nucleico, denominadas sondas, que pueden hibridarse con productos de expresión génica. Las sondas se exponen a una muestra de ácido nucleico marcada, se hibridan y se determina la abundancia de productos de expresión génica en la muestra complementaria a una sonda. Las sondas en una micromatriz pueden comprender secuencias de ADN, secuencias de ARN o secuencias de copolímeros de ADN y ARN. Las sondas también pueden comprender análogos de ADN y/o ARN tales como, por ejemplo, análogos de nucleótidos o moléculas de ácido nucleico peptídico (PNA), o combinaciones de los mismos. Las secuencias de las sondas pueden ser fragmentos completos o parciales de ADN genómico. Las secuencias también pueden ser secuencias de nucleótidos sintetizadas *in vitro*, tales como secuencias de oligonucleótidos sintéticos.

Se prefiere que dichos niveles de expresión génica de múltiples productos de expresión génica se determinen simultáneamente. Se pueden realizar análisis simultáneos, por ejemplo, mediante qPCR múltiple, procedimientos de secuenciación de ARN y análisis de micromatrices. Los análisis de micromatrices permiten la determinación simultánea de los niveles de expresión génica de una gran cantidad de genes, como por ejemplo más de 50 genes, más de 100 genes, más de 1000 genes o incluso más de 10.000 genes, permitiendo el uso de una gran cantidad de datos de expresión génica para la normalización de los genes que comprenden el conjunto de productos de expresión génica como se indica en las Tablas 1 y 2.

Por lo tanto, en un ejemplo preferido, dicho nivel de expresión génica se determina mediante análisis de micromatrices.

Una sonda es específica para un producto de expresión génica o gen como se indica en las Tablas 1 y 2. Una sonda es específica cuando comprende un tramo continuo de nucleótidos que son completamente complementarios a una secuencia de nucleótidos de un producto de ARN de dicho gen, o un producto de ADNc del mismo. Una sonda también puede ser específica cuando comprende un tramo continuo de nucleótidos que son parcialmente complementarios a una secuencia de nucleótidos de un producto de ARN de dicho gen, o un producto de ADNc del mismo. Parcialmente significa que un máximo del 5 % de los nucleótidos en un tramo continuo de al menos 20 nucleótidos difiere de la secuencia de nucleótidos correspondiente de un producto de ARN de dicho gen. El término complementario se conoce en la técnica y se refiere a una secuencia que está relacionada mediante reglas de emparejamiento de bases con la secuencia que se va a detectar. Se prefiere que la secuencia de la sonda se diseñe cuidadosamente para minimizar la hibridación no específica con dicha sonda. Se prefiere que la sonda sea, o imite, una molécula de ácido nucleico monocatenaria. La longitud de dicho tramo continuo complementario de nucleótidos puede variar entre 15 bases y varias kilobases, y está preferiblemente entre 20 bases y 1 kilobase, más preferiblemente entre 40 y 100 bases, y lo más preferido es aproximadamente 60 nucleótidos. Una sonda más preferida comprende un tramo continuo de 60 nucleótidos que son idénticos a una secuencia de nucleótidos de un producto de ARN de un gen, o un producto de ADNc del mismo.

Para determinar un nivel de expresión génica de al menos uno de los genes enumerados en las Tablas 1 y 2, la muestra de ARN se marca preferiblemente, ya sea directa o indirectamente, y se pone en contacto con sondas en la

matriz en condiciones que favorezcan la formación de dúplex entre una sonda y una molécula complementaria en la muestra de ARN marcada. La cantidad de marcador que permanece asociado con una sonda después del lavado de la micromatriz se puede determinar y se usa como medida para el nivel de ARN de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a dicha sonda.

- 5 Preferiblemente, la tipificación en un método de tipificación es la tipificación de dicha muestra de dicho sujeto.

- 10 Se prefiere además que el valor de control de la expresión génica se obtenga midiendo el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica en una muestra de control que comprende células endoteliales no tumorales de un sujeto. Preferiblemente, dicho sujeto es tipificado como positivo para el estado de angiogénesis tumoral si el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica es al menos 5 veces, preferiblemente al menos 20 veces, mayor que dicho valor de control de expresión génica, o en donde dicho sujeto está tipificado negativo para el estado de angiogénesis tumoral si el nivel de expresión génica de dicho al menos un producto de expresión génica no es al menos 5 veces mayor, preferiblemente no al menos 20 veces mayor, que dicho valor de control de la expresión génica.

Tabla 1: Listado de marcadores específicos de angiogénesis tumoral

#	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre del gen	Identificación del gen
1	21857	7076	Timp1	inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1
2	30878	8862	Apln	apelin
3	20210		Saa3	amiloide A3 en suero
4	17064	22918	Cd93	antígeno CD93
5	77446	57493	Heg1	proteína de desarrollo cardíaco con dominios similares a EGF 1
6	18132	4855	Notch4	notch 4 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 107471]
7	23796	187	Aplnr	receptor de apelin [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1346086]
8	18008	10763	Nes	nestina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 101784]
9	21923	3371	Tnc	tenascina C [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 101922]
10	19288	5806	Ptx3	gen relacionado con la pentaxina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 104641]
11	22352	7431	Vin	vimentina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 98932]
12	21930	7130	Tnfrsf6	proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1195266]
13	242939	8532	Cpz	carboxipeptidasa Z [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 884B7] i
14	20613	6615	Snai1	dedo de zinc 1 de la familia del caracol
15	20431	6490	Pmel	proteína del premelanosoma [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 98301]
16	545260	340075	Arsi	arilsulfatasa i [Fuente: MGI Symbol; Acc: MGI: 2670959]
17	22402	8840	Wisp1	proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1197008]
18	67305	2882	Gpx7	glutación peroxidasa 7 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1914555]
19	240913	9507	Adamts4	una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1339949]
20	71690	11082	Esm1	molécula 1 específica de células endoteliales [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1918940]
21	16402	3678	Itga5	integrina alfa 5 (receptor de fibronectina alfa) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 96604]
22	216725	9509	Adamts2	una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1347356]
23	21826	7058	Thbs2	trombospondina 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 98738]
24	17387	4323	Mmp14	metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 101900]
25	16009	3486	Igfbp3	proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 96438]

#	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre del gen	Identificación del gen
26	21825	7057	Thbs1	triospondina 1 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 98737] i
27	14118	2200	Fbn1	fibrilina 1 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 95489]
28	50706	10631	Postn	periosina, factor específico de osteoblastos [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1926321] ...
29	74511	10234	Lrrc17	repetición rica en leucina que contiene 17 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1921761]
30	14119	2201	Fbn2	fibrilina 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 95490] i
31	99151	51148	Cercam	molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2139134]
32	20379	6424	Sfrp4	proteína 4 secretada relacionada con la encrespada [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 892010]
33	72709	114904	C1qtnf6	C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1919959]
34	16950	84695	lox13	similar a lisil oxidasa 3 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1337004], también conocido como Lox12
	35 242050	285313	Igsf10	superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1923481]
36	20319	6423	Sfrp2	proteína 2 secretada relacionada con la encrespada [Fuente: MGI: 108078] detdpr [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 108078]
37	14230	60681	Fkbp10	proteína 10 de unión a FKS06 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 104769]
38	14584	9945	Gfp12	glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1338883]
39	56264	5626	Cpxm1	carboxipeptidasa X 1 (familia M14) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1934569]
40	50530	8076	Mfap5	proteína 5 asociada a microfibrillas [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1354337]
41	58859	30008	Efemp2	proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1891209]
42	18133	4856	Nov	gen sobreexpresado del nefroblastoma [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 109185]
43	13003	1462	Vcan	versican [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 102889]
44	13717	2006	Eln	elastina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 95317]
45	16007	3491	Cyr61	proteína 61 rica en cisteína [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 88613]
46	240725	23213	Sulf1	sulfatasa 1 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2138563]
47	18074	22795	Nid2	nidógeno 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1298229]
48	70445	57124	Cd248	antígeno CD248, endosialina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1917695]
49	94352		lox12	similar a lisil oxidasa 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2137913]
50	14314	11167	Fstl1	similar a folistatina 1 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 102793]

#	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre del gen	Identificación del gen
51	64817	79987	Svep1	sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1928849]
52	16775	3910	lama4	laminina, alfa 4 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 109321]
53	20564	6586	Slt13	homólogo de hendidura 3 (Drosophila) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1315202]
54	17534	9902	Mrc2	receptor de manosa, C tipo 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 107818]
55	216197	10970	Ckap4	proteína 4 asociada al citoesqueleto [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2444926]
56	243277	283383	Gpr133	receptor 133 acoplado a proteína G [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 3041203]
57	14086	6624	Fscn1	homólogo 1 de fascina, proteína agrupadora de actina (Strongylocentrotus purpuratus) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1352745]
58	246707	84034	Emilin2	interfaz 2 de microfibrillas de elastina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2389136]
59	219151	51435	Scara3	receptor eliminador de clase A, miembro 3 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2444418]
60	18788	5055	Serpinb2	Inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa: clado B, miembro 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 97609]
61	20296	6347	CC12	ligando 2 de quimocina (motivo C-C) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 98259]
62	16337	3643	Insr	receptor de insulina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 96575]; D630014A15Rik, CD220, IR-B, 4932439J01Rik, IR-A, IR
63	53320	219595	Hfolh1	folato hidrolasa 1 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1858193]; antígeno de membrana específico de la próstata, glutamato carboxipeptidasa II
64	673094	4267	CD99	antígeno CD99
65	12994	1448C	Sn3	caseína kappa [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 107461]
66	54598	10203	Catcl	similar al receptor de calcitonina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1926944]
67	11482	94	Acvrl1	receptor 1 de activina A, similar al tipo II [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1338946], ALK1
68	12986	1441	Csf3r	colonia; receptor del factor 3 estimulante de colonias (granulocitos) [Fuente: Símbolo MGI; Acc: MGI: 1339755]
69	80797		C1ca2	canal 2 de cloruro activado por calcio [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1931471]
70	66864	161198	Clec14a	familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1914114]
71	67888	55273	Tmem100	proteína 100 transmembrana [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1915138]
72	224405	116159	Cyyr1	proteína 1 rica en cisteína y tirosina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2152187]
73	13717	2006	Acer2	elastina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 95317]

#	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre del gen	Identificación del gen
74	230379	340485	Acer2	ceramidasa 2 alcalina [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1920932]
75	83925	7227	Ttps1	síndrome 1 tricorriñofalángico (humano) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1927616]
75	106952	84411	Arap3	ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2147274]
77	241226	8516	Itga8	integrina alfa 8 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 109442]
78	218877	55920	Sema3g	dominio de sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 3041242]
79	83921	2367	Tmem2	proteína 2 transmembrana [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1890373]
80	22035	8743	Tnfrsf10	superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 107414]
81	74318	84525	Hopx	homeobox HOP [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1916782]
82	16770	3906	Lalba	lactalbumina alfa [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 96742]
83	109294	80243	Prex2	factor de intercambio Rac dependiente de fosfatidilinositol-3 4,5-trisfostato [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1923385]
84	269328	143662	Muc15	mucina 15 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2442110]
85	170799	219790	Rtkn2	rotequina 2 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2158417]
86	20677	6659	Sox4	caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 98366]
87	241556	90139	Tspan18	tetraspanina 18 [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1917186]
88	215798	57211	Gpr126	receptor 126 acoplado a proteína G [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 1916151]
89	243653	51267	Clec1a	familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a [Fuente: Símbolo de MGI; Acc: MGI: 2444151]
90	15213	23462	Hey1	piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 [Fuente: Símbolo MGI; Acc: MGI: 1341800]

Tabla 2. Marcadores específicos de angiogénesis tumoral acoplados a ARNm/proteína, GenBank acceso No.

#	ARNm/proteína de ratón, GenBank acceso No.	ARNm/proteína humana, GenBank acceso No.
1	NM_001044384.1	NM_003254.2
2	NM_013912.3	NM_017413.4
3	NM_011315.3	S73444.1
4	NP_034870.1, NM_010740.3	NP_036204.2, NM_012072.3
5	NP_780465.4, NM_175256.5	NP_065784.1, NM_020733.1
6	NP_035059.2, NM_010929.2	NP_004548.3, NM_004557.3
7	NP_035914.1, NM_011784.3	NP_005152.1, NM_005161.4, NR_027991.1
8	NP_057910.3, NM_016701.3	NP_006608.1, NM_006617.1
9	NP_035737.2, NM_011607.3	NP_002151.2, NM_002160.3
10	NP_033013.3, NM_008987.3	NP_002843.2, NM_002852.3
11	NP_035831.2, NM_011701.4	NP_003371.2, NM_007115.3, NM_003380.3
12	NP_033424.1, NM_009398.2	NP_009046.2, NM_007115.3
13	NP_694747.2, NM_153107.2	NP_003643.2, NM_003652.3, NM_001014447.2, NP_001014448.1, NM_001014448.2
14	NP_033555.1, NM_11427.2	NP_005976.2, NM_005985.3
15	NP_068682.2, NM_021882.4, XP_006513468.1, XM_006513405.2	NP_001186983.1, NM_001200054.1, NP_001186982.1, NM_001200053.1
16	NP_001033588.1, NM_001038499.1	NP_001012301.1, NM_001012301.2
17	NP_061353.1, NM_018865.2	NP_001191799.1, NM_001204870.1
18	NP_077160.1, NM_024198.3	NM_015696.4
19	NM_172845.2	NP_015696.4, NP_005090.3, NM_005099.4
20	NP_076101.1, NM_023612.3	NP_008967.1, NM_007036.4, NP_001129076.1, NM_001135604.1
21	NP_034707.3, NM_010577.3	NP_002196.2, NM_002205.2
22	NP_001264234.1, NM_001277305.1, NP_783574.1, NM_175643.3	NP_067610.1, NM_021599.2, NP_055059.2, NM_014244.4
23	NP_335711.2, NM_011581.3	NP_003238.2, NM_003247.3
24	NP_032634.3, NM_008608.3	NP_004986.1, NM_004995.3
25	NP_032369.2, NM_008343.2	NP_001013416.1, NM_001013398.1, NP_000589.2, NM_000598.4
26	NP_035710.2, NM_011580.3	NP_003237.2, NM_003246.2
27	NP_032019.2, NM_007993.2	NP_000129.3, NM_000138.4

#	ARNm/proteína de ratón, GenBank acceso No.	ARNm/proteína humana, GenBank acceso No.
28	NP_001185695.1, NM_001198766.1	NP_001273596.1, NM_001286667.1
29	NP_083253.1, NM_028977.1	NP_005815.2, NM_005824.2
30	NP_034311.2, NM_010181.2	NP_001990.2, NM_001999.3
31	XP_006498539.1, XM_006498476.2	XP_011517064.1, XM_011518762.1
32	NP_057896.1, NM_016687.3	NP_003005.2, NM_003014.3
33	XP_006521518.1, XM_006521455.2	XP_011528159.1, XM_011529857.1
34	NP_038614.2, NM_013586.4	NP_001276093.1, NM_001289164.1
35	NP_001156356.1, NM_001162884.1	XP_011511011.1, XM_011512709.1
36	XP_006501246.1, XM_006501183.2	NP_003004.1, NM_003013.2
37	NP_035557.1, NM_013529.3	XP_011523401.1, XM_011525099.1
38	NP_038557.1, NM_013529.3	NP_005101.1, NM_005110.2
39	NP_062670.2, NM_019696.2	NP_001171628.1, NM_001184699.1
40	XP_006506427.1, XM_006506364.2	NP_001284639.1, NM_001297710.1
41	XP_006531870.1, XM_006531807.1	NP_58634.4, NM_016938.4
42	NP_035060.1, NM_010930.4	NP_002505.1, NM_002514.3
43	NP_001127947.1, NM_001134475.1	NP_004376.2, NM_004385.4
44	NP_031951.2, NM_007925.3, NP_001075223.1,	NP_001075223.1, NM_001081754.2
45	NP_034646.1, NM_010516.2	NP_001545.2, NM_001554.4
46	NP_001185494.1, NM_001198565.1	NP_055985.2, NM_015170.2
47	NP_032721.2, NM_008695.2	NP_031387.3, NM_007361.3
48	NP_473383.1, NM_054042.2	NP_065137.1, NM_020404.2
49	NP_201582.2, NM_033325.2	
50	NP_032073.2, NM_008047.5	NP_009016.1, NM_007085.4
51	NP_073725.2, NM_022814.2	NP_699197.3, NM_153366.3
52	NP_034811.2, NM_010681.4	NP_002281.3, NM_002290.4
53	NP_035542.2, NM_011412.3	NP_003053.1, NM_003062.3
54	NP_032652.3, NM_008626.3	NP_006030.2, NM_006039.4
55	NP_780660.1, NM_175451.1	NP_006816.2, NM_006825.3

#	ARNm/proteína de ratón, GenBank acceso No.	ARNm/proteína humana, GenBank acceso No.
56	NP_001074811.1, NM_001081342.1	NP_942122.2, NM_198827.3
57	NP_032010.2, NM_007984.2	NP_003079.1, NM_003088.3
58	NP_660140.1, NM_145158.3	NP_114437.2, NM_032048.2
59	NP_766192.1, NM_172604.3	NP_878185.1, NM_182826.1
60	XP_011246244.1, XM_011247942.1	NP_001137290.1, NM_001143818.1
61	NP_335463.1, NM_011333.3	NP_002973.1, NM_002982.3
62	NP_034698.2, NM_010568.2	NP_001073285.1, NM_001079817.1
63	NP_001153178.1, NM_001159706.1	NP_710163.1, NM_153696.2
64	NP_079860.2, NM_025584.2	NP_001264639.1, NM_001277710.1
65	NP_031812.2, NM_007786.4	NP_005203.2, NM_005212.2
66	NP_061252.2, NM_018782.2	NP_001258680.1, NM_001271751.1
67	NP_001264188.1, NM_00277259.1	NP_000011.2, NM_000020.2
68	NP_031808.2, NM_007782.3	NP_758519.1, NM_172313.2
69	NP_085104.1, NM_030601.3	
70	NP_080085.3, NM_025809.5	NP_778230.1, NM_175060.2
71	NP_080709.1, NM_026433.2	NP_001093110.1, NM_001099640.1
72	NP_659102.1, NM_144853.3	NP_443186.1, NM_052954.2
73	NP_031951.2, NM_007925.3	NP_001075223.1, NM_001081754.2
74	NP_001277472.1, NM_001290543.1	NP_001010887.2, NM_001010887.2
75	NP_114389.2, NM_032000.2	NP_054831.2, NM_014112.4
76	NP_001192265.1, NM_001205336.1	NP_071926.4, NM_022481.5
77	NP_001001309.1, NM_001001309.2	NP_001278423.1, NM_001291494.1
78	NP_001020550.1, NM_001025379.1	NP_064548.1, NM_020163.1
79	NP_001028931.1, NM_001033759.2	NP_001129292.1, NM_001135820.1
80	NP_033451.1, NM_009425.2	NP_001177871.1, NM_001190942.1
81	NP_783199.1, NM_175606.3	NP_001138932.1, NM_001145460.1

#	ARNm/proteína de ratón, GenBank acceso No.	ARNm/proteína humana, GenBank acceso No.
82	NP_034809.1, NM_010679.1	NP_002289.2
83	NP_083801.1, NM_029525.1	NP_079146.2, NM_024870.2
84	NP_766567.2, NM_172979.3	NP_001128554.1, NM_001135092.1
85	NP_001074815.1, NM_001081346.1	NP_660350.2, NM_145307.3
86	NP_033264.2, NM_009238.2	NP_003098.1, NM_003107.2
87	NP_899003.1, NM_183180.2	NP_570139.3, NM_130783.4
88	NP_001002268.1, NM_001002268.3	NP_065188.4, NM_020455.5
89	NP_780735.2, NM_175526.3	NP_001284678.1, NM_001297749.1
90	NP_034553.2, NM_010423.2	NP_036390.3, NM_012258.3

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 (Tioredoxina-1, *E. coli* K12, UniProtKB. Acc. No.: P0AA25, última modificación: 23 de enero de 2007 - v2)

msdkiihltd dsfddvika dgailvdfwa ewcgpckmia pildeiadey
qgkltvakln idqnpgtapk ygirgiptll lfkngevaak kvgalskgql
kefldanla

5 SEQ ID NO: 2 (Proteína fimbrial tipo 1, cadena A, *E. coli* K12, UniProtKB Acc. No.: P04128)

mkiktlaivv lsalslssta alaaattvng gtvhfkgevv naacavdags
vdqtvqlgqv rtaslaqega tssavgfniq lndcdtnvas kaavaflgta
idaghtnvlq lqssaagsat nvgvqildrt gaaltldgat fssettlng
tntipfqary fatgaatpga anadatfkvq yq

SEQ ID NO: 3 (Proteína mezclada desconocida)

mdnnslsqev qngsnhlenn qsqsnnggsd salslsskta alaaattvnd
gsdgatssav g

SEQ ID NO: 4 (tioredoxina-1 truncada)

gkltvaklni dqnpgtapky girgiptlll fkngevaatk vgalskgqlk
efldanla

10

SEQ ID NO: 5 (M-tioredoxina-1 truncada + enlazador GS + etiqueta His)

mgkltvakln idqnpgtapk ygirgiptll lfkngevaak kvgalskgql
kefldanlag sgsgsgshhh hhh

SEQ ID NO: 6 (Proteína fimbrial tipo 1 truncada)

aattvnggtv hfkgevvnaa cavdagsvdq tvqlgqvrtas laqegatss
avgfniqlnd cdtnvaskaa vaflgtatida ghtnvlalqs saagsatnvg
vgildrtgaa ltldgatfss ettlngtnt i

15 SEQ ID NO: 7 (variante truncada de proteína fimbrial tipo 1)

kattvnggtv hfkgevvnaa cavdagsvdq tvqlgqvrtas laqegatss
kvgfniqlnd cdtnvaskaa vaflgtkida ghtnvlalqs saagsatnvg
vgildrtgaa ltldgatfss ettlndtnt i

Ejemplos

Ejemplo 1: Método de cribado para identificar marcadores específicos de angiogénesis de tumores embrionarios

Material y método

20 Material/estudios con animales

Se utilizaron embriones de ratón de tipo silvestre C57BL/6 en el día embrionario E11 (n = 4) y en el día embrionario E18 (n = 4). Se utilizaron dos ratones macho adultos sanos para la preparación del transcriptoma completo. Se utilizaron órganos (corazón, pulmón, hígado, riñón) de dos ratones hembra adultos sanos para el aislamiento de células endoteliales normales (NEC). Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de ética de investigación animal de la Universidad VU (DEC, AngL 13-01) (comité de experimentación con animales).

25 Los tumores de melanoma B16-F10 (n = 2) se obtuvieron en la Universidad de Uppsala. Allí, el trabajo con animales fue aprobado por el comité de ética animal de Uppsala y se realizó de acuerdo con las directrices del Comité Coordinador de Investigación del Cáncer del Reino Unido (UKCCCR) para el bienestar de los animales en neoplasias

experimentales (Woekman P, Lab Anin 1988). Los animales fueron inoculados por vía subcutánea en el flanco izquierdo con 0.5×10^6 B16-F10 células de melanoma en un volumen total de 100 µl en PBS. Se permitió que los tumores crecieran durante unos 21 días, hasta alcanzar el tamaño máximo permitido.

Aislamiento de células endoteliales de tejido fresco (tumoral)

- 5 Las células endoteliales se aislaron de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Van Beijnum, Blood 109:7 (2006)). Brevemente, el tejido se picó con bisturíes quirúrgicos y se digirió durante aproximadamente 20 min (B16-F10) y 1 h 50 min (órganos sanos normales) con 2 mg/ml de colagenasa tipo I (Sigma, C0130), 0.125 U de dispasa (Life Technologies, Bethesda, MD), suero fetal de ternero/bovino al 2 % (FCS/FBS) (Biowest, Nuaille, Francia, n.º de cat. S1810-500), 74 µg/ml de actinomicina D (Sigma, 01815), 0.05 mg/ml de DNasa (Qiagen, 79254), CaCl_2 dihidratado 5 mM (JT Baker, Deventer, Países Bajos) en DMEM (n.º de cat. BE12-604F, Lonza Benelux B.V.) y agitación suave a 37 °C. El tiempo de digestión depende del tipo de tejido, con un tiempo de digestión prolongado para tejido graso o normal.

- 15 Para obtener una suspensión de células individuales, las células se filtraron/colaron a través de un filtro de nailon (BD) de 100 µm. Para el aislamiento de células endoteliales tumorales (TEC), se centrifugaron suspensiones celulares (digestiones) a 400 g, 5 min, 4 °C y se resuspendieron en DMEM, se contaron y, después de la centrifugación, se resuspendieron en 10 % de DMSO/90 % de FCS y se congelaron instantáneamente. Las digestiones se almacenaron a -70°C hasta su uso (clasificación FACS). Los digestiones de órganos normales para el aislamiento de NEC se utilizaron inmediatamente para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Clasificación de células activadas por fluorescencia de células endoteliales tumorales y células endoteliales normales

- 20 Las suspensiones de células individuales congeladas se descongelaron y se resuspendieron en FCS/DMEM al 2 %. Las suspensiones celulares se lavaron en FCS/DMEM al 2 % seguido de un lavado en albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1 % fría (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en PBS (Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania) y resuspensión en BSA /DMEM PBS al 0.1 %. Las células endoteliales (EC) se tiñeron con anticuerpo anti-CD31 de ratón marcado con PE (553373, BD Pharmingen, dilución 1:50) y anticuerpo anti-CD34 de ratón marcado con PE (551387, BD Pharmingen, dilución 1:30). La suspensión de células individuales también se tiñó con el marcador panleucocitario CD 45 (anticuerpo anti-CD45 de ratón marcado con APC, 559864, BD Pharmingen, dilución 1:50) para poder separar la población de EC de los macrófagos positivos para CD31/CD45. Posteriormente, se separaron las células $\text{CD31}^+/\text{CD34}^+$ mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (BD FACSria). Las EC clasificadas se resuspendieron inmediatamente en Trizol (15596-026, Life Technologies) y se almacenaron a -70 °C hasta su uso/procesamiento posterior.

Aislamiento del transcriptoma completo - aislamiento del ARN

- 35 Para cada punto de tiempo (día embrionario) se utilizaron 4 embriones para el aislamiento de todo el transcriptoma; dos embriones por ratón hembra preñada. Esto se hizo para excluir la variación entre individuos. Los embriones (E11, E 18) se decapitaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se dislocó cervicalmente a ratones macho adultos (n = 2), se los cortó en pedazos y se los congeló directamente en nitrógeno líquido. Los ratones se pulverizaron aún más con un martillo helado en una tapa de acero inoxidable helada llena de nitrógeno líquido. Inmediatamente se pusieron pequeños trozos en Trizol, en total aprox. 100 ml por ratón. Se homogeneizaron muestras de embriones y ratones adultos (homogeneizador, homogeneizador de rotor-estator con mango, TissueRuptor (Qiagen)) para optimizar el aislamiento de ARN. Todo el ARN se aisló de acuerdo con el protocolo del reactivo Trizol proporcionado por Life Technologies. Se precipitaron conjuntamente pequeñas cantidades de ARN con glucógeno (361505, Calbiochem) para aumentar el rendimiento de ARN. La calidad del ARN se determinó con un Bioanalizador (Agilent Technologies).

Secuenciación de ARN

- 45 Se realizó una selección de poliA para seleccionar ARNm estable y eliminar pequeños microARN, ARNt y ARN bacteriano u otro ARN procariota. Para cada muestra, se preparó una biblioteca de secuenciación con lecturas finales de 50 pares de bases (protocolo de preparación de muestras TruSeq de Illumina) para permitir la detección de empalmes alternativos. Las muestras se secuenciaron en un Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) con el paquete de software HCS 2.2.68 (Illumina). Los experimentos de secuenciación de ARN y el análisis de los datos fueron realizados por las instalaciones centrales de genómica del Instituto del Cáncer de los Países Bajos. Las lecturas obtenidas (50 millones de lecturas de extremos emparejados de 50 pb por muestra) se mapearon con el genoma de referencia del ratón (GRCm38). El mapeo del genoma y el análisis de expresión diferencial se realizaron con el software Cufflinks (C Trapnell, Nat Biotechnol 2010; A Roberts, Genome Biology 2011; A Roberts, Bioinformatics 2011; C Trapnell, Nat Biotechnol 2012). Para la detección de variantes de empalme, las lecturas se mapearon con todo el genoma del ratón, incluido el ADN de exones e intrones. Se eligieron 30 lecturas por gen como valor de corte para poder estar seguros de la verdadera expresión. Se asumió la expresión genética diferencial si había al menos un log2 de las veces que cambia en el nivel de expresión entre los embriones y las células endoteliales tumorales en comparación con el ratón adulto/NEC. Para reducir el número de genes diana detectados en las células endoteliales del tumor, se eligieron genes 100 veces sobreexpresados (log7 de las veces que cambia) en el endotelio del tumor.

Esto también se hizo para corregir el hecho de que las células endoteliales comprenden sólo alrededor del 1 % de la población total de células del cuerpo.

Validación de objetivos mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

De cada muestra de ARN se sintetizó ADNc con el kit de ADNc iScript (Bio-Rad). La cantidad de ADNc presente en la muestra se determinó mediante ensayos con SYBR Green. Se utilizó aproximadamente 100 ng de plantilla de ADNc por reacción, 1x SYBR Green Master Mix (BioRad Laboratories) y 5 µM de cada cebador (Eurogentec, Seraing, Bélgica) (Tabla 1). Los cebadores se validaron para poder tener un rango de valores de Ct dentro del cual la expresión puede considerarse confiable. También utilizamos curvas de fusión de los cebadores para poder distinguir entre la formación de dímeros de cebador y la señal de amplicón/amplificación.

Las muestras se procesaron por triplicado y se analizaron en el termociclador CFX96 Real Time System C1000 (BioRad Laboratories). Los datos se analizaron con el software CFX Manager (BioRad Laboratories) y se procesaron posteriormente en MS Excel. Todas las muestras se normalizaron para la expresión de la transcripción de ciclofilina A, beta-actina y beta-2 microglobulina para tener en cuenta las variaciones en la entrada de la plantilla (Thijssen VL, Exp Cell Res 2004).

Resultados

Se aislaron con éxito transcriptomas completos de diferentes tejidos de ratón

El transcriptoma completo se aisló de embriones de ratón E11 (n = 4), E18 (n = 4), ratones macho adultos (n = 2) y órganos sanos normales (n = 2) y células endoteliales tumorales, derivadas de melanoma B16-F10 (n = 2). La pureza de las células endoteliales tumorales aisladas mediante clasificación FACS fue aproximadamente del 90 % (TEC 1 89.8 %; TEC2 86.7 %). El ARN TEC aislado era de calidad suficientemente buena (RIN_{TEC1} 8.20; RIN_{TEC2} 6.80) para la secuenciación de ARN. Dado que la digestión del tejido normal era difícil, se combinaron muestras digeridas de órganos sanos para el aislamiento de NEC. Podríamos obtener una cantidad de ARN para secuenciación de ARN de buena calidad. El Número de Integridad del ARN (RIN) fue superior a 8 para los ocho embriones y las dos muestras de adultos sanos (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de RIN de muestras de embriones y adultos

Identificación de la muestra	valor del RIN
E11 ratón 1 embrión 8	9.60
E11 ratón 1 embrión 9	9.90
E11 ratón 2 embrión 2	9.40
E11 ratón 2 embrión 3	9.60
E18 ratón 1 embrión 1	9.60
E18 ratón 1 embrión 2	9.60
E18 ratón 2 embrión 1	9.50
E18 ratón 2 embrión 2	9.40
ratón adulto 1	8.00
ratón adulto 2	8.30

Los genes embrionarios se reutilizan en la angiogénesis tumoral

Las muestras de ARN se secuenciaron con el equipo Illumina HiSeq 2000 y se encontró que un número total de 25077 genes estaban subregulados $\log_{2}FC \geq 2$ ($p < 0.05$) en el ratón adulto. El diagrama de Venn muestra la cantidad de genes encontrados en cada categoría (E11, E18 y TEC en comparación con el ratón adulto) (Figura 1d). 288 genes se expresan únicamente en el embrión y en la población superpuesta de TEC. Sólo aproximadamente el 1 % de la población celular total del cuerpo son células endoteliales y hemos enriquecido las células endoteliales (tumorales) mediante FACS, por lo que elegimos una sobreexpresión de 100 veces ($p < 0.05$) en TEC frente adulto/NEC como corte. Esto generó una lista de 29 genes diana potenciales. Se observó cierta discrepancia entre el número de lecturas obtenidas para cada gen en el adulto frente a NEC, pero en general se encontró una expresión similar de los genes diana en ambas muestras. Lo que significa que puede que no importe si se comparan las células enriquecidas y las células totales. Ya que en la muestra de NEC los EC también están enriquecidos. Por lo tanto, es posible que no sea necesario un límite de 100 veces, pero otros genes con una sobreexpresión menor también podrían ser genes diana interesantes.

Validación de genes diana específicos endoteliales tumorales.

Encontramos varios genes que se sabe que están involucrados en la angiogénesis. Después de observar la localización celular de los objetivos, elegimos 6 genes para continuar con los experimentos de validación. Los posibles objetivos interesantes deberían estar presentes en la membrana plasmática o secretarse para facilitar la futura localización de fármacos. Validamos la expresión de los 6 genes diana en el material de origen (los aislados de ARN del embrión, el ratón adulto y el endotelio tumoral) mediante transcripción inversa (RT) -qPCR (PCR cuantitativa) (Figura 8). También validamos la expresión de los genes diana en células endoteliales Bend5 (Figura 8i) y células de melanoma B16-F10 (Figura 8h). Todos los genes mostraron una expresión muy baja o ausente en las células tumorales de melanoma, lo que indica que los genes encontrados eran específicos de las células endoteliales (tumorales). Para algunos de los genes diana se pudo detectar un nivel de expresión más alto en las células endoteliales Bend5 (Figura 8i). No se podría esperar la expresión de los genes diana en células endoteliales normales. Sin embargo, la línea de células endoteliales Bend5 se deriva de células endoteliales de cerebro de ratón inmortalizadas, lo que hace que estas células se parezcan más a las células endoteliales tumorales.

Ejemplo 2: Composiciones inmunogénicas

Material y método; Construcciones de polipéptidos de fusión.

15 TRX-EDB y TRX

El vector de expresión pET21a TRX-EDB se construyó como sigue.

Brevemente, la región que codifica el dominio ED-B y una etiqueta His del extremo terminal N (309 pb) se restringió con las endonucleasas BamH1 y Xho1 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) del plásmido TS-33-EDB humano que contiene el dominio EDB entre estos dos sitios de restricción. Un vector pET-21a (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, Nueva Jersey, EE. UU.) que contenía la secuencia bacteriana TRX (354 pb) (A Holmgren, Ann Rev Biochem 1985; número de acceso GenBank EDV64981.1; todos los accesos de GenBank a las que se hace referencia en este documento se refieren a GenBank al 31 de mayo de 2016) también estaba restringida con BamH1 y Xho1. A continuación, el inserto EDB se ligó en marco en el vector pET-21a, más adelante de la secuencia TRX bacteriana. El vector pET21-TRX fue un amable obsequio de la Dra. Anna-Karin Olsson (Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia).

25 TRXtr-EDB

La secuencia de TRX en el vector pET21a TRX-EDB se reemplazó con una secuencia de TRXtr amplificada por PCR (192 pb). La construcción del vector resultante se denominó pET21a TRXtr-EDB. Tanto TRX como TRXtr contienen una secuencia enlazadora de GS del extremo terminal C.

Cebador TRXtr directo

'5-TATCATATGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGA-3'

Imprimación TRXtr inverso

'3-AGCGGATCCGCTACCAGAACCAGAACCGGCCAG-3'

Para construir el plásmido pET21a-TRXtr, la secuencia de TRX-EDB se restringió del plásmido mediante escisión con enzimas de restricción Nde1 y Xho1 (Thermo Scientific) y se reemplazó por la secuencia de TRXtr.

35 TFP-EDB, TFPv-EDB y USP-EDB

Las secuencias de ADN que codifican la proteína fimbrial tipo 1 truncada, la cadena A (TFPtr; 393 pb), la variante TFP (TFPv; 393 pb) o la proteína no especificada (USP; 183 pb) se ordenaron a Genscript (Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.) y se insertaron en el marco secuencia arriba del dominio ED-B, en el vector de expresión pET21a.

TRX-Vimentina, TRXtr-Vimentina y vimentina

El plásmido pET21a-TRX-Vimentina se construyó restringiendo el pET21a-TRX-EDB con las enzimas de restricción BamH1 y Xho1, para eliminar la secuencia de EDB. Luego, la secuencia EDB se reemplazó con la secuencia de vimentina de ratón (NCBI Gene ID 22352). Para la construcción del vector pET21-TRXtr-Vimentina, se eliminó TRX y se reemplazó por TRXtr. Para obtener el plásmido pET21a-Vimentin, se cortó la secuencia de vimentina de ratón de un vector pUC57-Vimentina (Genscript, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se insertó en un vector de expresión pET21a.

45 Expresión y purificación de las diferentes proteínas de fusión.

Los diferentes vectores se transformaron en Rosetta gami (DE3) de *Escherichia coli* (Novagen; EMD Chemicals) para la expresión de las proteínas de fusión. Rosetta gami (DE3) es una cepa de *E. coli* optimizada para la expresión de proteínas eucariotas. Los cultivos nocturnos se diluyeron 1:2 o 1:3 y se cultivaron hasta OD₆₀₀ (densidad óptica) 0.5. La expresión de proteínas se indujo con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM (Invitrogen, Life Technologies, CA, EE. UU.) durante 4 horas a 37 °C. Para las proteínas recombinantes, los sedimentos bacterianos TRXtr, TRXtr-EDB, TFP-EDB y TFPv-EDB se disolvieron en urea 8 M/PBS (Acros Organic-Thermo Fisher Scientific, Geel, Bélgica). El sedimento bacteriano de la proteína USP-EDB se disolvió en PBS. Las proteínas se liberaron de los sedimentos bacterianos mediante sonicación en hielo durante 12 ciclos (30 segundos encendida y 30 segundos

apagada) (Soniprep 150 MSE, amplitud 18-26 micrones). Los restos bacterianos se sedimentaron mediante centrifugación a 4500 rpm (3584 g) (Hettich Rotina 420R, Geldermalsen, Países Bajos) y se recogió el sobrenadante. Se mezclaron treinta mililitros de sobrenadante (procedente de 1 litro de cultivo bacteriano) con 2.5 ml de suspensión de agarosa Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania) y se incubaron "de un extremo a otro" durante 3 h a 4 °C. La agarosa Ni-NTA se sedimentó mediante centrifugación a 4500 rpm, 10 minutos a 4 °C y se lavó 5 veces con PBS pH 7.0/NaCl 1 M/Tween-20 al 0.1 %. Para deshacerse del Tween-20 (P1379, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), se realizó una etapa de lavado adicional con PBS antes de transferir la agarosa Ni-NTA a una jeringa de 2 ml con un filtro de vidrio (Satorius Stedim Biotech GmbH, Gotinga, Alemania). La columna se lavó de nuevo con PBS y se lavó con 4 fracciones de 1250 µl de imidazol 10 mM (J.T. Baker, Avantor Performance Materials BV, Deventer, Países Bajos) en Tris 20 mM (pH 8.0)/NaCl 0.1 M para eliminar la unión a proteínas de fondo/no específica. La proteína final se eluyó en cuatro fracciones de 1250 µl de imidazol 200 mM.

La purificación de la proteína TRX se realizó como se describió anteriormente, con la excepción de que el sedimento bacteriano se disolvió en 50 ml de urea 5 M/PBS antes de la sonicación. Se añadió 1 ml de suspensión de agarosa Ni-NTA al sobrenadante (procedente de 1 litro de cultivo bacteriano). Durante la incubación del sobrenadante con agarosa Ni-NTA, se añadió imidazol 10 mM para reducir el fondo. Antes de la elución de la proteína TRX con 200 mM (fracciones de 4 x 500 µl), la columna se lavó con 10 x fracciones de 500 µl de imidazol 20 mM.

Para la producción de proteína TRX-EDB, TRX-Vimentina, TRXtr-Vimentina y Vimentina, la expresión de proteínas se indujo a 22 °C durante 16 h. La temperatura de inducción más baja se utilizó para aumentar la fracción de proteína soluble. Para liberar la proteína TRX-Vimentina o la proteína vimentina del sedimento bacteriano, se disolvió 1 litro de cultivo sedimentado en urea 8 M/PBS y se sonicó 15 x 20 segundos y 30 segundos en hielo (amplitud 22-26 micrones). Los restos bacterianos se sedimentaron a 4500 rpm, 10 min, 4°C y el sobrenadante se dializó contra urea 4 M/PBS en tubos de diálisis Visking 27/32 (corte de peso molecular 12-14000 Da; n.º de cat. 44114, Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Alemania) a 4°C durante varias horas hasta una etapa final de diálisis en urea 0.5 M/PBS. Para la purificación del sedimento bacteriano inducido por proteína TRXtr-Vimentina, se disolvió urea 9.5 M/Tris HCl 30 mM/cloruro de metilamonio 10 mM/EDTA 2 mM/DTT 2 mM (pH 8.0) y se sonicó como se describe para TRX-Vimentina. El sobrenadante se dializó paso a paso con urea 0.5 M /PBS en un tubo de diálisis Visking 27/32 (corte de peso molecular 12-14000 Da). Para la purificación de TRX-EDB, se mezclaron treinta mililitros de sobrenadante bacteriano (procedente de 1 litro de cultivo bacteriano) con 1 ml de suspensión de agarosa Ni-NTA. Después de una etapa de incubación y varias etapas de lavado, la proteína TRX-EDB se eluyó con imidazol 100 mM en cuatro fracciones de 500 µl.

Se combinaron fracciones que contenían proteínas de TRX-EDB, TRXtr-EDB, TFP-EDB y TFPv-EDB y se dializaron frente a PBS (pH 7.0) en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer con corte de peso molecular de 7 kDa (Fisher Scientific, Landsmeer, Países Bajos). Para diálisis de TRX y TRXtr, se usó un tubo de diálisis recubierto de piel de serpiente con corte de peso molecular de 3.5 kDa, (n.º de catálogo 68035, Thermo Scientific). La concentración final de proteína se estimó comparándola con el estándar de la fracción V de BSA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en SDS-PAGE y mediante un ensayo de cuantificación de proteínas (Micro BCA Protein Assay, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE. UU.). La identidad de la proteína se confirmó mediante transferencia Western cuando fue posible.

Tanto la proteína EDB como la proteína TRX-galectina1 (TRX-Gal1, que contenía galectina1 de ratón) fueron un amable obsequio de la Dra. Anna-Karin Olsson (Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia).

Transferencia Western

Para confirmar la identidad de la proteína TRX-Vimentina, TRXtr-Vimentina y Vimentina, se procesó un gel de gradiente de SDS-PAGE (gel Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, Países Bajos) durante 1 h a 100 V. Las proteínas se transfirieron en húmedo sobre una membrana de PVDF (polivinilideno) Immobilon® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) durante 2.5 h a 100 V. Luego se bloqueó la membrana con tampón Rockland (Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, EE. UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La vimentina se visualizó mediante incubación de la membrana con anticuerpo anti-vimentina RV202 (sc-32322, Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) durante la noche a 4°C. Después de varias etapas de lavado en PBS/Tween-20 al 0.1 % (P1379, Sigma-Aldrich), la membrana se incubó con colorante IR anti-ratón de burro 680 RD (LLCOR Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.) diluido 1: 10 000 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se lavó nuevamente y se tomaron imágenes con un Odyssey (LLCOR Biosciences).

Preparación de la vacuna

Para la preparación de la vacuna, las proteínas de fusión se mezclaron 50:50 con adyuvante completo de Freund (F5881, Sigma-Aldrich), para vacunaciones de cebador, o con adyuvante incompleto de Freund (F5506, Sigma-Aldrich), para vacunaciones de refuerzo. La cantidad de proteína administrada/inyectada se determinó por el tamaño/Pm de la proteína (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Cantidad de proteína de fusión utilizada para la vacunación contra EDB.

Proteína	Tamaño (kDa)	Cantidad utilizada para la vacunación (µg/ratón)
TRX	13.0	50
TRX-EDB	20	100
TRXtr-EDB	17,5	75
TFP-EDB	23.9	100
TFPv-EDB	24.1	100
USP-EDB	16.8	75

Tabla 4. Cantidad de proteína de fusión utilizada para la vacunación contra Vimentina.

Proteína	Tamaño (kDa)	Cantidad utilizada para la vacunación (µg/ratón)
TRX	13.0	20
TRXtr	7.6	10
TRX-Vimentina	67.0	100
TRXtr-Vimentina	61.0	90

Cultivo de células

- 5 Se cultivaron células de fibrosarcoma T241 y células de melanoma B16-F10 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (n.º de catálogo BE12-604F, Lonza Benelux BV, Breda, Países Bajos) + L-glutamina 2 mM (n.º de cat. 17-605C, Lonza Benelux BV) 100 U/ml de penicilina/estreptomina (n.º de cat. DE17-602E Lonza Benelux BV) suplementada con suero fetal bovino (FCS) al 10 % (n.º de cat. S1810-500, Biowest, Nuaille, Francia). Se cultivaron células de carcinoma de colon CT26 (American Type Culture Collection) en el Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con FCS al 10 %.

Experimentos con animales

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por la junta de ética local del Centro Médico Universitario VU (n.º de registro AngL 13-02; AngL 14-01) y se realizaron de acuerdo con las directrices holandesas y la ley sobre experimentación con animales.

- 15 Se vacunaron ratones hembra C57BL/6 o BALB/c de aproximadamente 8 semanas de edad (n = 5 por grupo) 4 veces en intervalos de 2 semanas con 50 µl de vacuna en cada ingle (volumen total de inyección 100 µl). Una semana después de cada vacunación, se extrajeron aproximadamente 50 µl de sangre de la vena de la cola después de calentar a los ratones bajo una lámpara roja (de calentamiento) durante 5 minutos. Los niveles de anticuerpos en los sueros de los ratones se midieron mediante ELISA. Dos semanas después de la cuarta vacunación se inocularon ratones C57BL/6 en su flanco derecho con 0.5×10^6 células de fibrosarcoma T241; una línea celular tumoral de ratón singénica que expresa EDB o 0.1×10^6 células de melanoma B16-F10. Se inocularon ratones BALB/c en su flanco derecho con 0.2×10^6 células de carcinoma de colon CT26. El volumen del tumor se midió con un calibrador y se calculó de acuerdo con la fórmula $\text{ancho}^2 \times \text{largo} \times \pi/6$. Los ratones se sacrificaron aproximadamente 2-3 semanas después de la inoculación de células tumorales. Se realizaron dos estudios independientes con 5 ratones por grupo. La mitad del tumor fue criopreservada y la otra mitad fue incluida en parafina. Los órganos normales fueron criopreservados. El tejido se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

ELISA de anticuerpo anti-EDB y anticuerpo anti-vimentina

- Los anticuerpos contra EDB se midieron en los sueros de ratones vacunados recubriendo la placa de ELISA (Nunc, Maxisorp, n.º de cat. 44-2404-21, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con 8 µg/ml de proteína EDB recombinante durante 1 hora a 37 °C. Para la detección de anticuerpos anti-vimentina, las placas se recubrieron con 4 µg/ml de vimentina recombinante diluida en urea 0.5 M (Acros Organics, Geel, Bélgica). Consecutivamente, las placas se bloquearon con suero de caballo al 100 % en PBS (H1138, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) durante 1 hora a 37 °C. Después de la etapa de bloqueo, la placa se lavó durante 5 minutos en PBS. El suero de ratón se diluyó con suero de caballo al 10 % /PBS antes de la dilución adicional en extracto de proteína de Rosetta Gami al 10 % /PBS, para evitar la unión inespecífica, hasta una dilución final de 1:150. Para la dilución seriada se realizaron las siguientes diluciones 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100 y 1:24300. El suero se incubó durante 45 min a 37 °C y las placas se lavaron 4 veces con PBS durante 1 min, 5 min, 1 min y 5 min para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la detección, las placas se incubaron con un anticuerpo anti-ratón de cabra biotinilado (n.º de catálogo E0433, DAKO, Heverlee, Bélgica), diluido 1:2000 en PBS-T al 0.01 %, 45 min a 37 °C, seguido de una etapa de lavado como se describió anteriormente e incubación con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (n.º de catálogo P0397, DAKO, Heverlee, Bélgica), dilución 1:2000 (concentración 0.4 µg/ml) en PBS-T al 0.01 %, 30 min a 37 °C. Después de una

etapa de lavado final, las placas se revelaron con TMB (T8665, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) y se leyó la absorbancia a 655 nm con un lector de microplacas BioTek, Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall, Alemania).

ELISA de anticuerpo anti-TRX

- 5 Para este ELISA se utilizó la proteína TRX-Gal1 (un amable obsequio del Dr. AK Olsson, Universidad de Uppsala, Suecia). Las placas se recubrieron con 8 µg/ml de TRX-Gal1 y se analizaron con una dilución de suero de 1:1000 o se realizó una serie de diluciones (1:1000, 1:3000, 1:9000, 1:27000, 1:81000). Los sueros de ratón se diluyeron 1: 10 en suero de caballo y diluido adicionalmente en extracto de Rosetta gami al 10 %/PBS.

Resultados

- 10 Para investigar si la respuesta inmune contra un antígeno propio se puede mejorar acortando el compañero de fusión extraño/reduciendo el tamaño del compañero de fusión, diseñamos una forma truncada de la proteína bacteriana tiorredoxina, denominada TRXtrunc (SEQ ID NO: 4). (TRXtr). La proteína TRXtr consta sólo de la mitad de la secuencia de TRX (TRX₅₁₋₁₀₈), un enlazador GS y una etiqueta His del extremo terminal C. Además, elegimos otra proteína fimbrial tipo 1 (TFP) de proteína bacteriana (SEQ ID NO: 6). Además, desarrollamos una variante de dicha TFP (SEQ ID NO: 7). Junto con el experto en proteínas, el Dr. Kevin Mayo, también diseñamos una proteína artificial que consta de varios tramos de péptidos altamente solubles previstos derivados de diferentes proteínas bacterianas. Esta proteína recién construida la llamamos proteína no especificada (USP) (SEQ ID NO: 3). Todas las secuencias de ADN de las proteínas extrañas se clonaron en el extremo terminal N del marco de la secuencia de ADN del antígeno propio EDB. Se utilizó EDB como compañero de fusión para poder comparar el efecto de las diferentes proteínas de fusión sobre la producción de anticuerpos contra EDB y la respuesta antitumoral con el "estándar dorado"/proteína de fusión TRX-EDB utilizada anteriormente. En la Figura 1A se muestra una representación esquemática de las construcciones utilizadas en este estudio. Se utilizó la proteína TRX-Gal1 para la detección de anticuerpos TRX y la proteína EDB para la detección de anticuerpos contra el antígeno propio EDB en ELISA. Los geles de proteínas SDS-PAGE muestran que todas las proteínas podrían producirse razonablemente puras (Figura 1b).

Los niveles/títulos de autoanticuerpo propio dependen del compañero de fusión

- 25 Los niveles de anticuerpos anti-EDB de ratones C57BL/6 de tipo silvestre vacunados se evaluaron una semana después de la cuarta vacunación. Pudimos observar que los niveles de anticuerpos contra EDB en ambos estudios fueron de modestos a bajos (OD_{650nm} media = 0.3410 (estudio I); 0.5732 (estudio II)) en los ratones vacunados con TRX-EDB, mientras que los ratones en la TRXtr-EDB, TFP-EDB y TFPv-EDB (OD media = 0.8775-1.212 para ambos estudios) respondieron bien a la vacunación (Figura 2, estudio I y estudio II). Para USP-EDB hubo una respuesta mixta para los ratones en el primer estudio (OD media = 0.2743, estudio I, Figura 2), mientras que todos los ratones en el estudio II respondieron bien a la vacunación (OD media = 1.192, estudio II). Dado que hubo una gran variación entre los diferentes grupos de estudio en los niveles de anticuerpos anti-EDB observados, realizamos una serie de diluciones para abordar los títulos de anticuerpos anti-EDB. Se debe observar una curva sigmoidea para cada serie de diluciones. Los títulos más altos estuvieron presentes en el grupo TRXtr-EDB, TFP-EDB y USP-EDB en el segundo estudio (Figura 3). El grupo de referencia TRX-EDB tuvo los títulos de anticuerpos anti-EDB más bajos de todos los grupos analizados (Figura 3). En el grupo de control vacunado con TRX no debería haber anti-EDB presente y, por lo tanto, no se pudieron medir títulos de anticuerpos anti-EDB (Figura 3, estudio II).

- Los niveles de anticuerpos contra vimentina en ratones C57BL/6 y BALB/c se analizaron una semana después de la cuarta vacunación. En ambos estudios, los niveles de anticuerpos anti-vimentina fueron comparables entre los grupos TRX-Vimentina (TRX-Vim) (OD_{650nm} media = 0.7341 (estudio I) (Figura 5a); 0.4914 (estudio II) (Figura 5c)) y TRXtr-Vimentina (TRXtr-Vim) (OD_{650nm} media = 0.6943 (estudio I) (Figura 5a); 0.6445 (Figura 5c)). En los grupos de control, vacunados con TRX o TRXtr, no deben estar presentes anticuerpos anti-Vimentina y, por lo tanto, los valores de OD_{650nm} media estaban por debajo de 0.2000 (estudio I: 0.0072 (TRX); 0.0312 (TRXtr); estudio II: 0.0088 (TRX); 0.0383 (TRXtr)). También determinamos los títulos de anticuerpos anti-Vimentina por grupo en el estudio I (Figura 6a,d). Los títulos de anticuerpos anti-vimentina (curvas de dilución) fueron comparables entre los ratones vacunados con TRX-Vim (Figura 6c) y TRXtr-Vim (Figura 6d). No se observaron títulos de anticuerpos anti-vimentina en los ratones vacunados de control con TRX (Figura 6a) y TRXtr (Figura 6b).

La respuesta de anticuerpos al antígeno propio se puede mejorar reduciendo el tamaño de la parte extraña/no propia TRX.

- 50 En la Figura 4A se muestran los niveles promedio de anticuerpos anti-EDB. Se puede observar que en ambos estudios los niveles de anticuerpos anti-EDB aumentan significativamente ($p = 0.0357$) en el grupo TRXtr-EDB en comparación con el grupo TRX-EDB. También comparamos los niveles de anticuerpos anti-TRX entre los grupos y descubrimos que el grupo TRXtr-EDB de hecho muestra un nivel de anticuerpos anti-TRX significativamente reducido ($p = 0.0317$ (estudio I); $p = 0.0159$ (estudio II)) (Figura 4b). De hecho, los títulos de anticuerpos contra TRX (el antígeno extraño/no propio) se redujeron en ratones vacunados con TRXtr-EDB ($p < 0.001$; en dilución 1:1000) en comparación con TRX o TRX-EDB (Figura 4c).

Se hizo la misma observación después de la vacunación con TRXtr-Vimentina. Los niveles promedio de anticuerpos anti-vimentina fueron iguales entre los grupos TRX-Vim y TRXtr-Vim (Figura 5b, d), mientras que los niveles de

anticuerpos anti-TRX se redujeron significativamente en ratones vacunados con TRXtr-Vim ($p = 0.0079$ (estudio I y II) Figura 5e-h). Además, los niveles de anticuerpos anti-TRX disminuyeron significativamente en los ratones de control TRXtr vacunados en comparación con TRX ($p = 0.0317$ (estudio I); $p = 0.0079$ (estudio II) Figura 5f, h).

5 El nuevo compañero de fusión TRXtr es superior a TRX en la producción de anticuerpos anti-propios y en la inhibición del crecimiento tumoral.

Dado que observamos títulos altos de anticuerpos anti-vimentina en el grupo vacunado con TRXtr-Vim, pero menos anticuerpos contra TRX, queríamos abordar si esto diera como resultado una mejor respuesta antitumoral. Además, queríamos investigar si los anticuerpos anti-vimentina generados con la nueva construcción de proteína de fusión TRXtr-Vimentina eran funcionales y podrían reconocer la vimentina *in vivo* y así inhibir el crecimiento tumoral. Por lo tanto, inoculamos a todos los ratones por vía subcutánea con células tumorales de melanoma B16-F10 (estudio I) o carcinoma de colon CT26 (estudio II), dos semanas después del último refuerzo. En ambos estudios, la construcción TRXtr-Vimentina se desempeñó igual que la construcción TRX-Vimentina (Figura 5a, c), y se indujeron altos niveles de anticuerpos contra la vimentina. Observamos una inhibición significativa del crecimiento tumoral en los ratones vacunados con TRXtr-Vimentina (TRXtr-Vim) en ambos estudios ($p < 0.001$ (estudios I y II), Figura 7a,b), mientras que para la construcción TRX-Vimentina (TRX- Vim) solo se pudo observar una inhibición significativa del crecimiento tumoral en el modelo CT26 ($p < 0.001$; Figura 7b). Estos resultados indican que al reducir el número de anticuerpos contra la parte bacteriana extraña se puede mejorar la cantidad de anticuerpos contra la parte propia y, por lo tanto, la respuesta antitumoral. Lo que indica que una menor supresión de epítomos se correlaciona con una respuesta antitumoral mejorada.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión que comprende:

(a) un antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero, en el que dicho antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero consiste en un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 12-15 residuos de aminoácidos, 12-24 %, preferiblemente 20-24 %, cuyos residuos son residuos de aminoácidos voluminosos hidrofílicos seleccionados del grupo que consiste en histidina, ácido glutámico, arginina, glutamina, ácido aspártico y/o lisina;

en el que dicho antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero consiste en:

(i) una región inmunogénica de 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 residuos de aminoácidos consecutivos de la proteína de la SEQ ID NO: 1 o de una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la proteína de la SEQ ID NO: 1; en la que la región inmunogénica comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4; o
(ii) una región inmunogénica de 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, o 150 residuos de aminoácidos consecutivos de la proteína de la SEQ ID NO: 2 o de una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la proteína de la SEQ ID NO: 2; en la que la región inmunogénica comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7; o
(iii) la secuencia de la SEQ ID NO: 3;

el polipéptido de fusión comprende, además

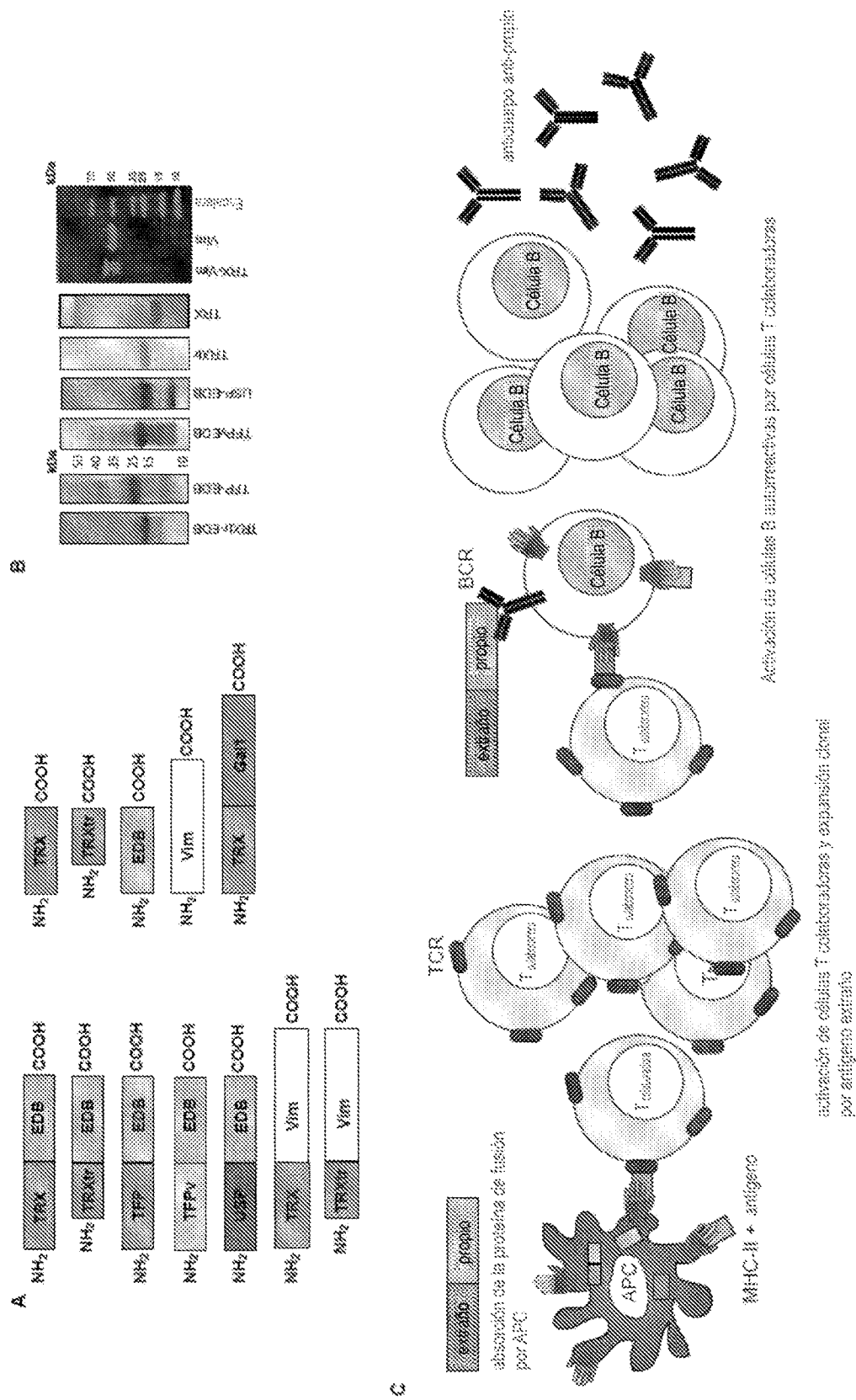
(b) un polipéptido de mamífero cuya expresión está asociada con la angiogénesis tumoral seleccionada del grupo que consiste en inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (Timp1), apelina (Apln), amiloide en suero A3 (Saa3), antígeno CD93 (Cd93), proteína de desarrollo cardíaco con dominios 1 similares a EGF (Heg1), Notch 4, receptor de apelina (Aplnr), nestina (Nes), tenascina C (Tnc), gen relacionado con pentraxina (Ptx3), vimentina (Vim), receptor 2 del EGF humano (erbb2, HER2), erbb3 (HER3), proteína 6 inducida por el factor alfa de necrosis tumoral (Tnfaip6), carboxipeptidasa Z (Cpz), dedo de zinc 1 de la familia del caracol (Snai1), proteína premelanosoma (Pmel), arilsulfatasa I (Arsi), proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1 (Wisp 1), glutatión peroxidasa 7 (Gpx7), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 4 (Adamts4), molécula 1 específica de células endoteliales (Esm1), integrina alfa 5 (receptor alfa de fibronectina) (Itga5), una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa (tipo repolisina) con motivo de trombospondina tipo 1, 2 (Adamts2), trombospondina 2 (Thbs2), metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en membrana) (Mmp 14), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Igfbp3), trombospondina 1 (Thbs1), fibrilina 1 (Fbn1), periostina, factor específico de osteoblastos (Postn), repetición rica en leucina que contiene 17 (Lrrc17), fibrilina 2 (Fbn2), molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (Cercam), proteína 4 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp4), C1q y proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral y C1q (C1qtnf6), similar a lisil oxidasa 3 (Loxl3), superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 10 (Igsf10), proteína 2 secretada relacionada con la encrespada (Sfrp2), proteína 10 de unión a FK506 (Fkbp10), glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (Gfpt2), carboxipeptidasa X1 (Cpxm1), proteína 5 asociada a microfibrillas (Mfap5), Proteína 2 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene factor de crecimiento epidérmico (Efemp2), gen sobreexpresado por el nefroblastoma (Nov), versicano (Vcan), elastina (Eln), proteína rica en cisteína 61 (Cyr61), sulfatasa 1 (Sulf1), nidógeno 2 (Nid2), antígeno CD248, endosialina (Cd248), similar a lisil oxidasa 2 (Loxl2), similar a folistatina 1 (Fstl1), sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y dominio 1 que contiene pentraxina (Svep1), laminina, alfa 4 (Lama4), homólogo de hendidura 3 (Slit3), receptor de manosa, C tipo 2 (Mrc2), proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4), receptor 133 acoplado a proteína G (Gpr133), homólogo 1 de fascina, proteína agrupadora de actina (Fscn1), interfaz 2 de microfibrillas de elastina (Emilin2), receptor eliminador de clase A, miembro 3 (Scara3), inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2 (Serpinb2), ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (Ccl2), receptor de insulina (Insr), folato hidrolasa 1 (Folh1), antígeno CD99 (CD99), caseína kappa (Csn3), receptor similar a la calcitonina (Calcrl), similar al receptor 1 de activina A, tipo II (Acvr11), receptor del factor estimulante de colonias 3 (Csf3r), canal 2 de cloruro activado por calcio (Clca2), familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec14a), proteína transmembrana 100 (Tmem100), proteína 1 rica en cisteína y tirosina (Cyrr1), ceramidasa alcalina 2 (Acer2), síndrome tricorinofalángico I (Trps1), dominio ArfGAP y RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3 de PH (Arap3), integrina alfa 8 (Itga8), dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3G (Sema3g), proteína transmembrana 2 (Tmem2), superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10 (Tnfsf10), homeobox HOP (Hopx), lactoalbúmina, alfa (Lalba), factor 2 del intercambio de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Prex2), mucina 15 (Muc15), rotequina 2 (Rtkn2), caja 4 de SRY (región Y determinante del sexo) (Sox4), tetraspanina 18 (Tspan18), receptor 126 acoplado a proteína G (Gpr126), familia 1 del dominio de lectina tipo C, miembro a (Clec 1a), dominio B adicional de fibronectina (ED-B), piloso/potenciador de división relacionado con el motivo YRPW 1 (Hey1) y sulfatasa 2 (Sulf2).

2. El polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 4, 6 o 7.

3. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido de fusión provoca un nivel en suero de inmunoglobulinas contra dicho polipéptido de mamífero de al menos el 0.1 %, de

preferiblemente al menos el 0.5 %, del nivel en suero total de inmunoglobulina G (IgG) en un sujeto mamífero al que se administra dicho polipéptido de fusión.

4. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido de mamífero es un polipéptido humano.
- 5 5. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido de mamífero se selecciona del grupo que consiste en dominio B adicional de fibronectina (ED-B), vimentina (Vim) y antígeno CD99 (CD99).
6. El polipéptido de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el antígeno extraño al sistema inmunológico de un mamífero consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de
10 mamífero es vimentina (Vim).
7. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso como medicamento.
8. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en provocar una respuesta inmune contra dicho polipéptido de mamífero.
9. El polipéptido de fusión para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polipéptido de fusión es para uso
15 en el tratamiento o prevención de artritis, aterosclerosis, reestenosis, arteriopatía de trasplante, verrugas, queloides cicatriciales, sinovitis, osteomielitis, asma, pólipos nasales, vasculopatía coroidea polipoidea, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, SIDA, IBD, enfermedad de Crohn, endometriosis, hemorragia uterina, psoriasis, miomas, cáncer o combinaciones de los mismos.
10. El polipéptido de fusión para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polipéptido de fusión se utiliza
20 para inhibir, contrarrestar, bloquear, prevenir o tratar la angiogénesis tumoral y/o eliminar la vasculatura tumoral en un sujeto.
11. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, opcionalmente comprendido en un vector de expresión.
12. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones
25 1-6 o el ácido nucleico de la reivindicación 11, comprendiendo además dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un líquido acuoso, y opcionalmente un adyuvante, comprendiendo preferiblemente además dicha composición un adyuvante en una relación de porcentaje en peso de polipéptido de fusión: adyuvante de 3:1 a 1:3, más preferiblemente en una relación de porcentaje en peso de aproximadamente 1:1.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la composición es una composición de vacuna.
- 30 14. La composición de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 para uso como medicamento.
15. La composición de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 para su uso en el tratamiento o prevención de artritis, aterosclerosis, reestenosis, arteriopatía de trasplante, verrugas, queloides cicatriciales, sinovitis, osteomielitis, asma, pólipos nasales, vasculopatía coroidea polipoidea, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, SIDA, IBD, enfermedad de Crohn, endometriosis, hemorragia uterina, psoriasis,
35 miomas, cáncer o combinaciones de los mismos.



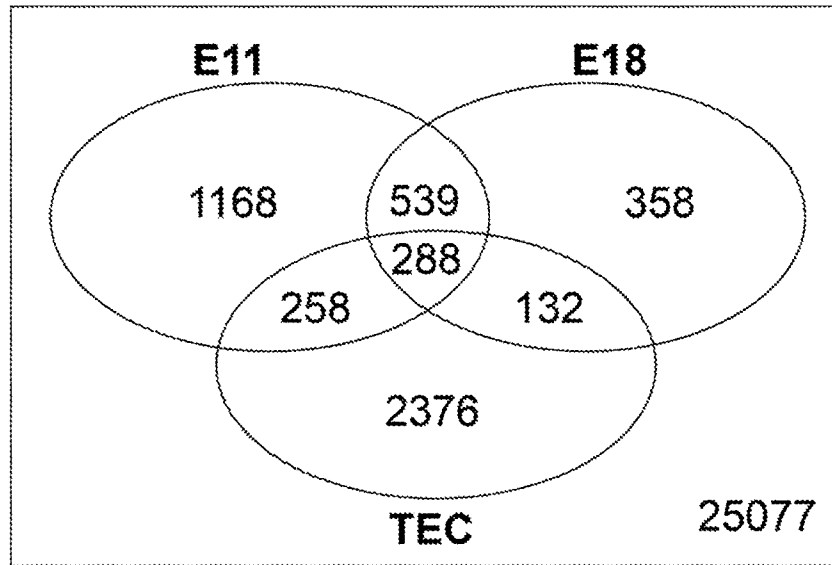


Figura 1 D

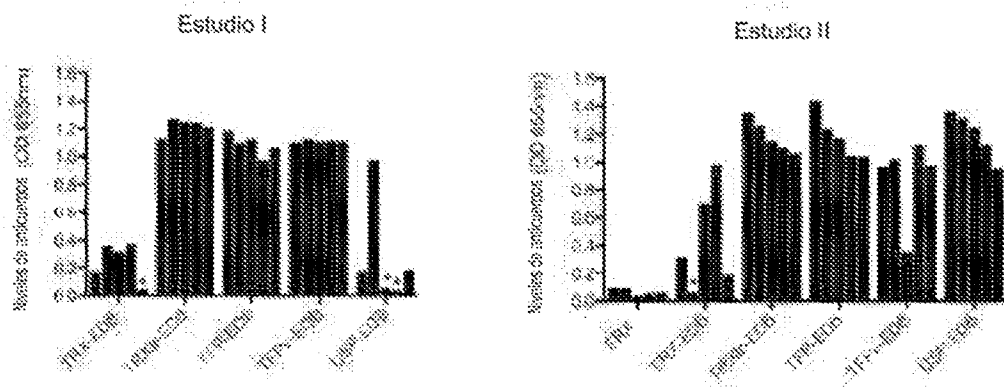
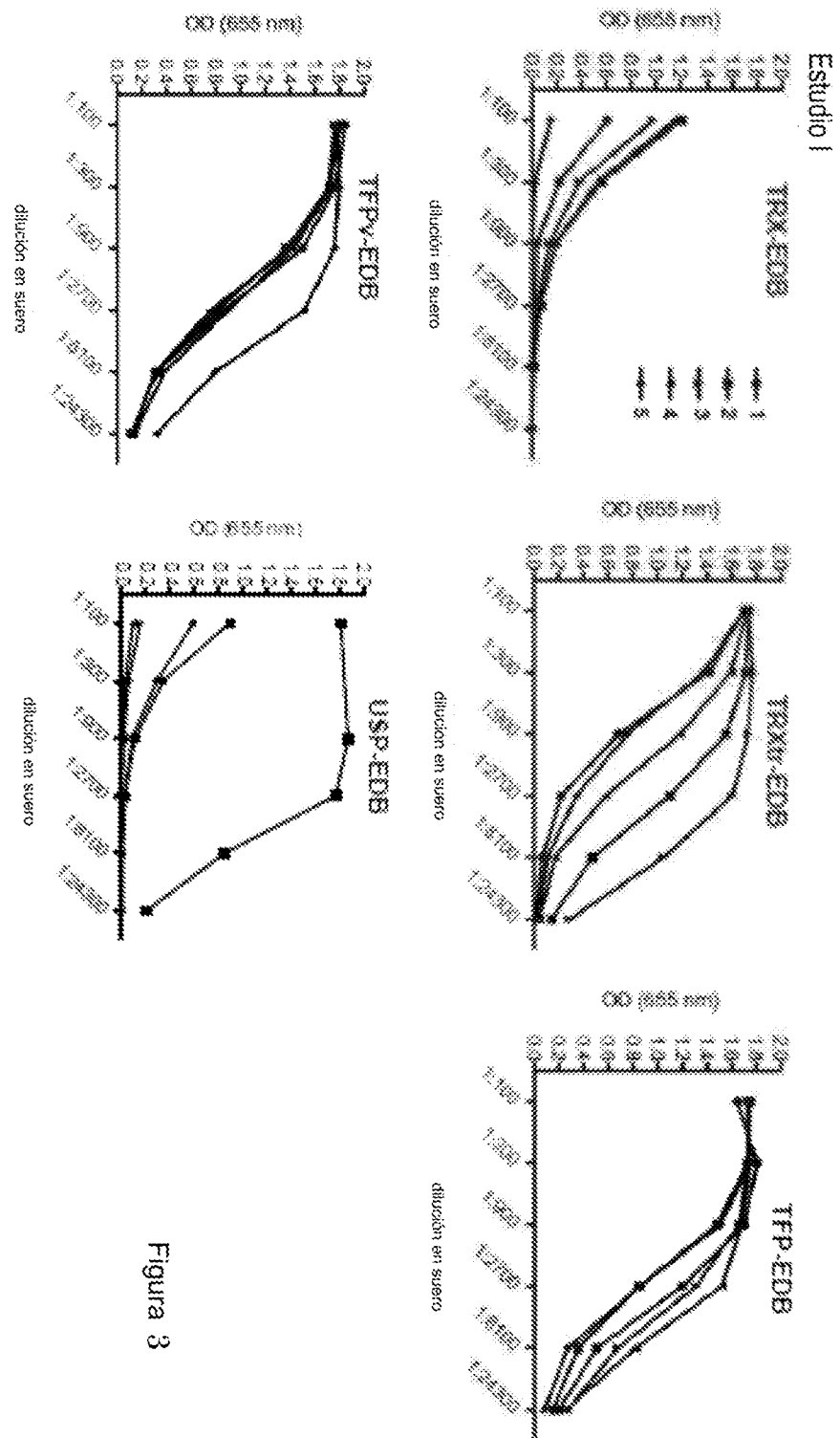


Figura 2



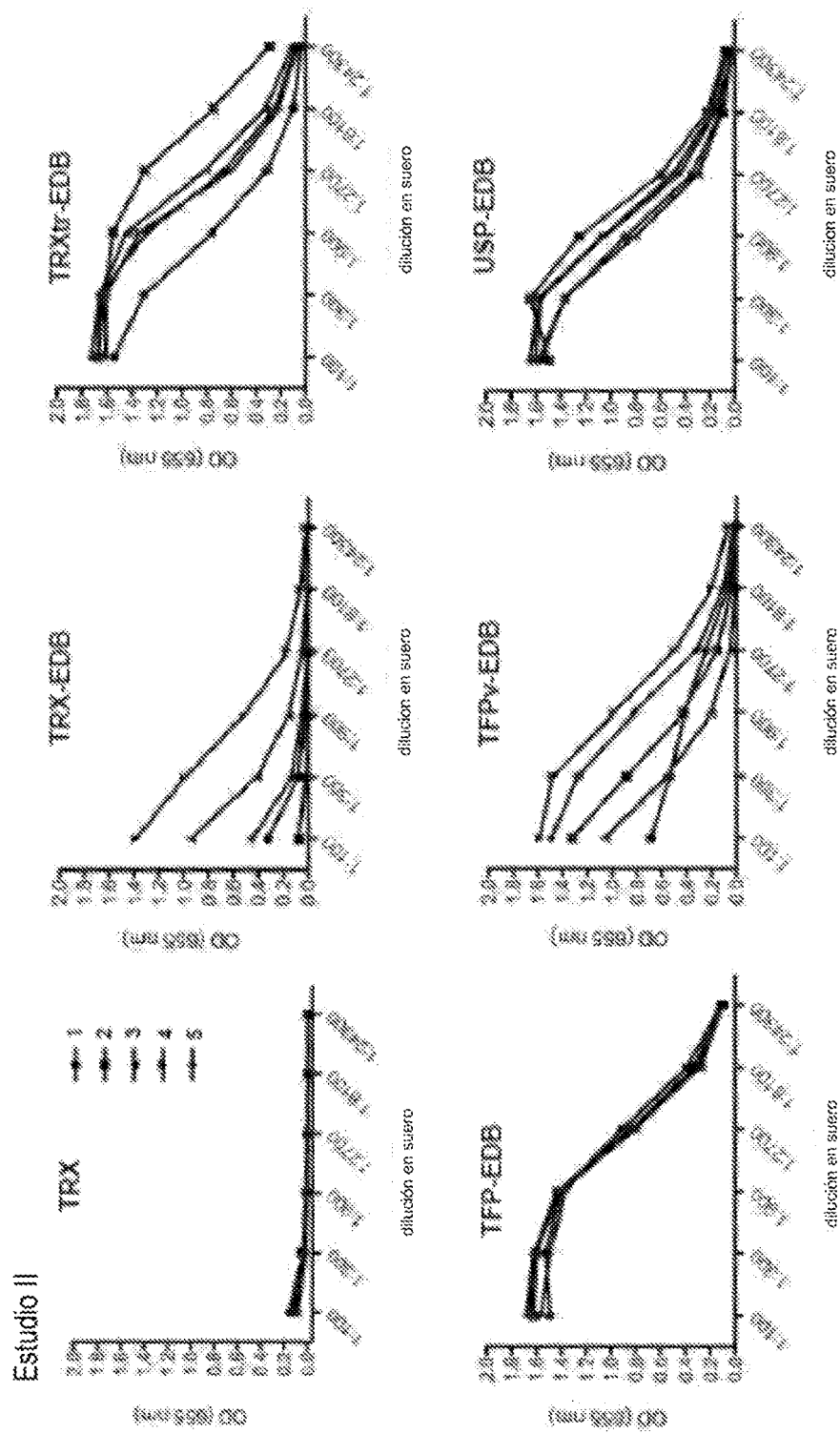


Figura 3 (continuación)

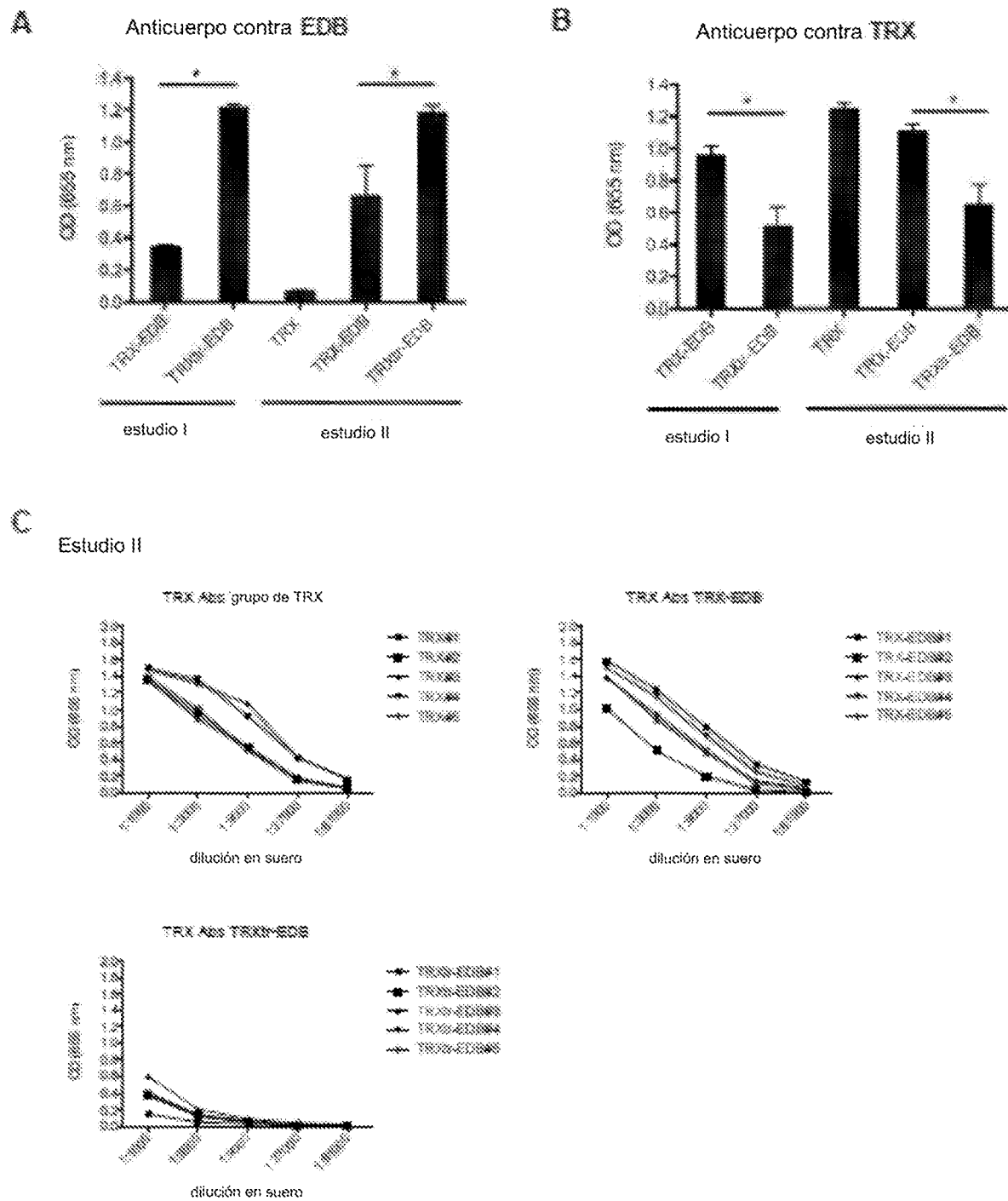
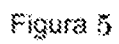


Figura 4



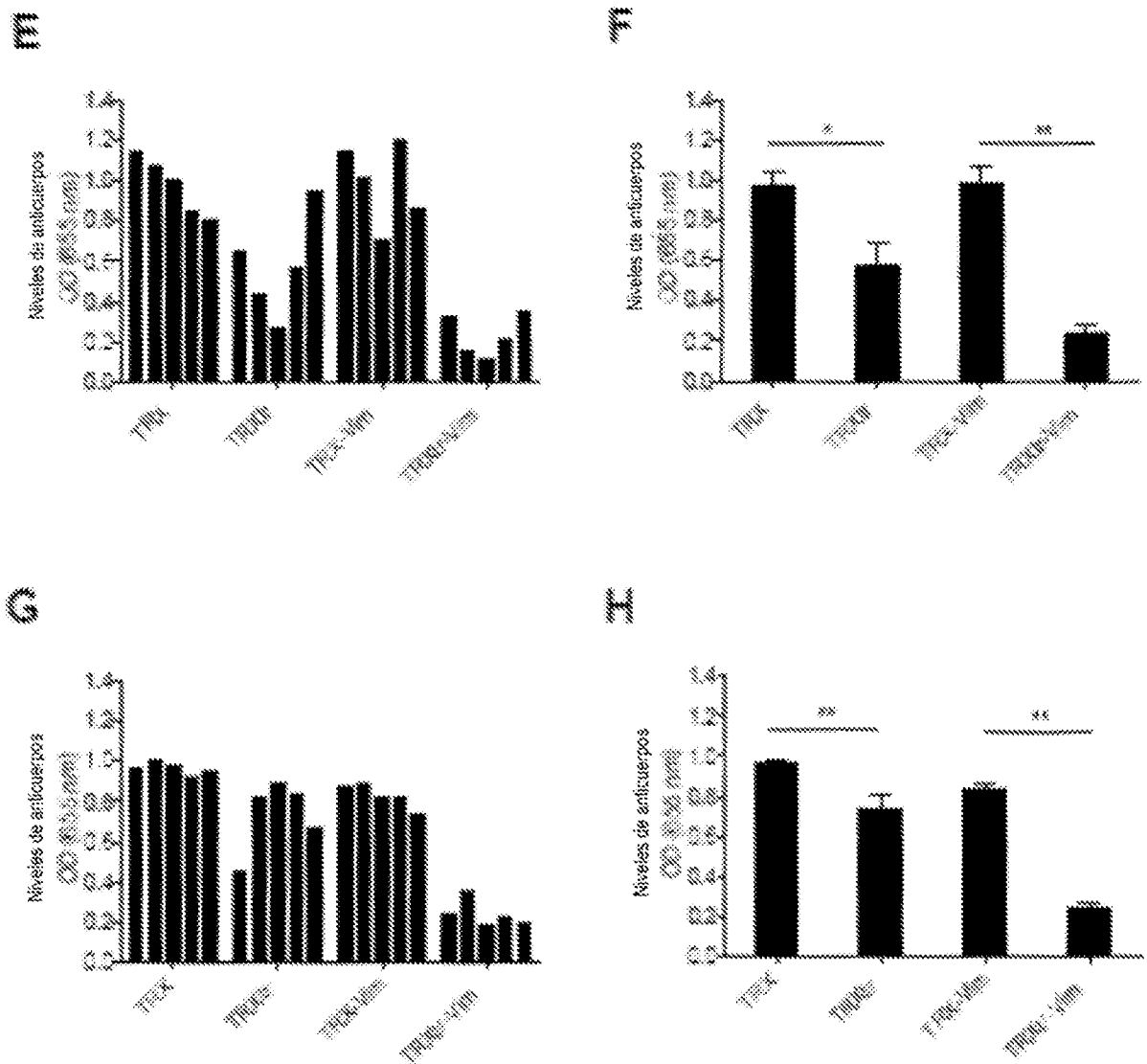


Figura 5 (continuación)

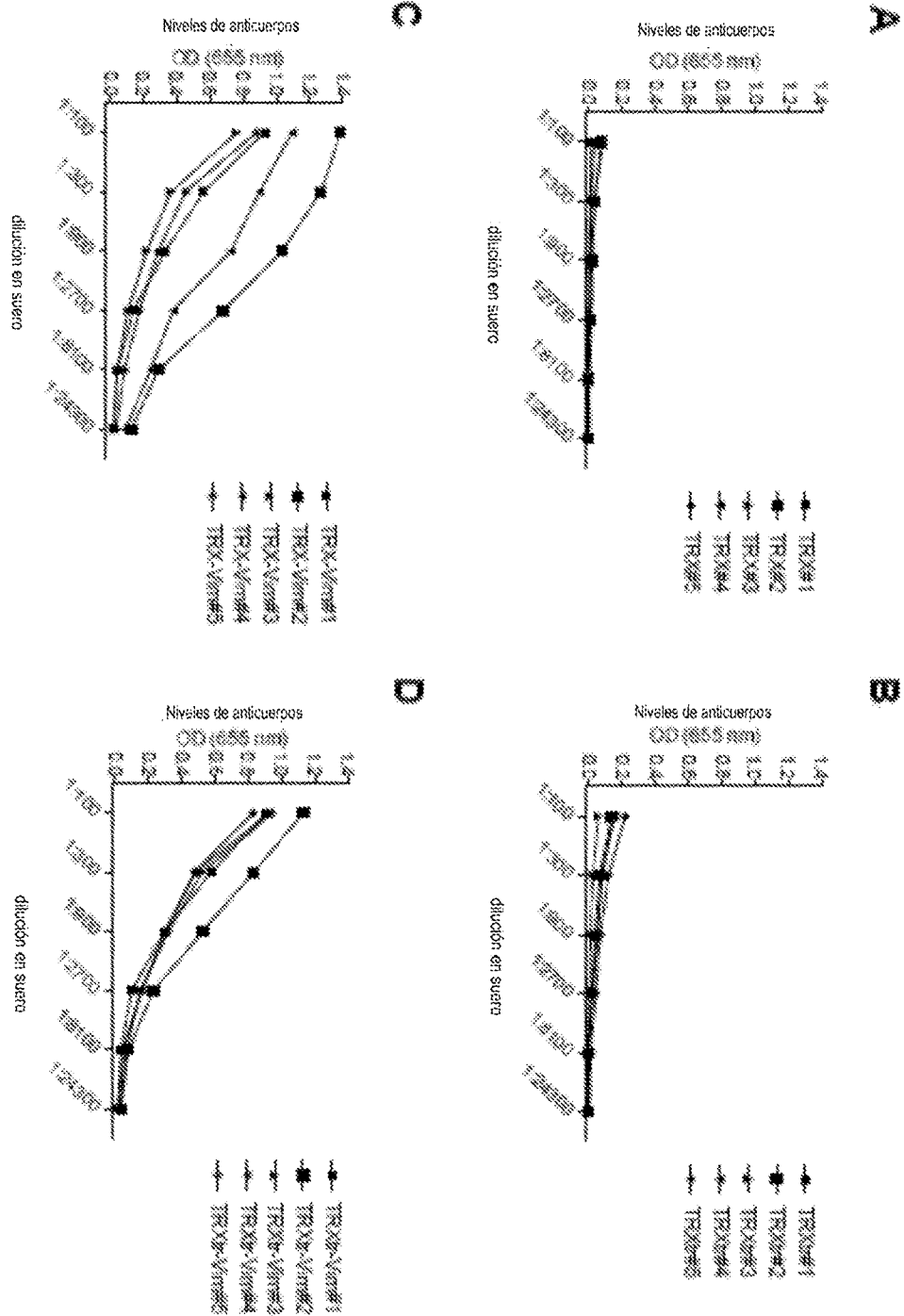
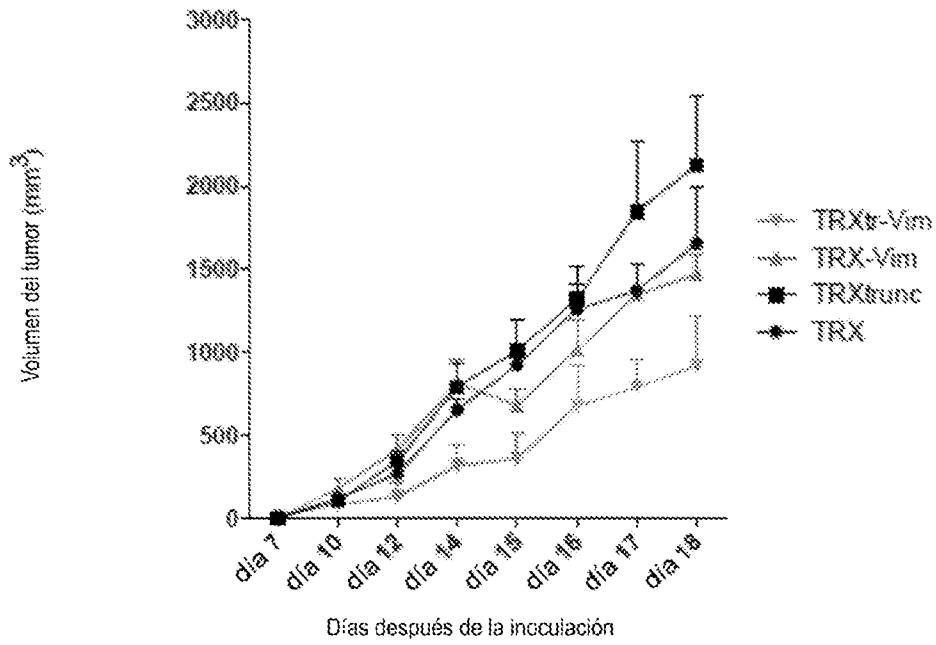


Figura 6

A



B

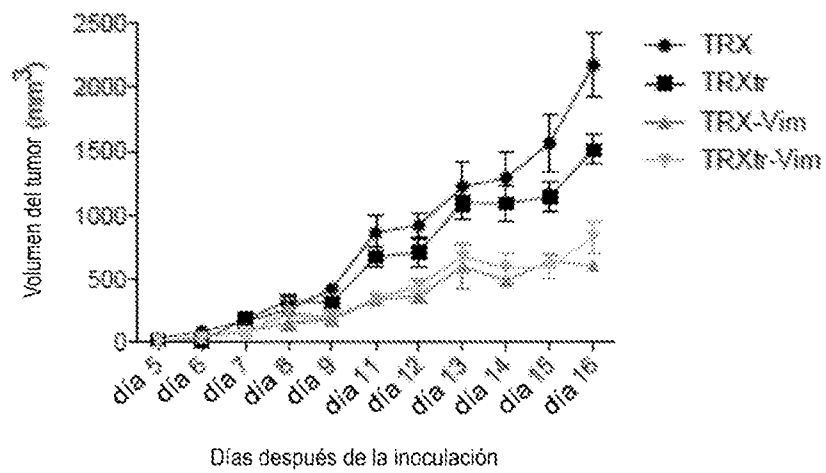


Figura 7

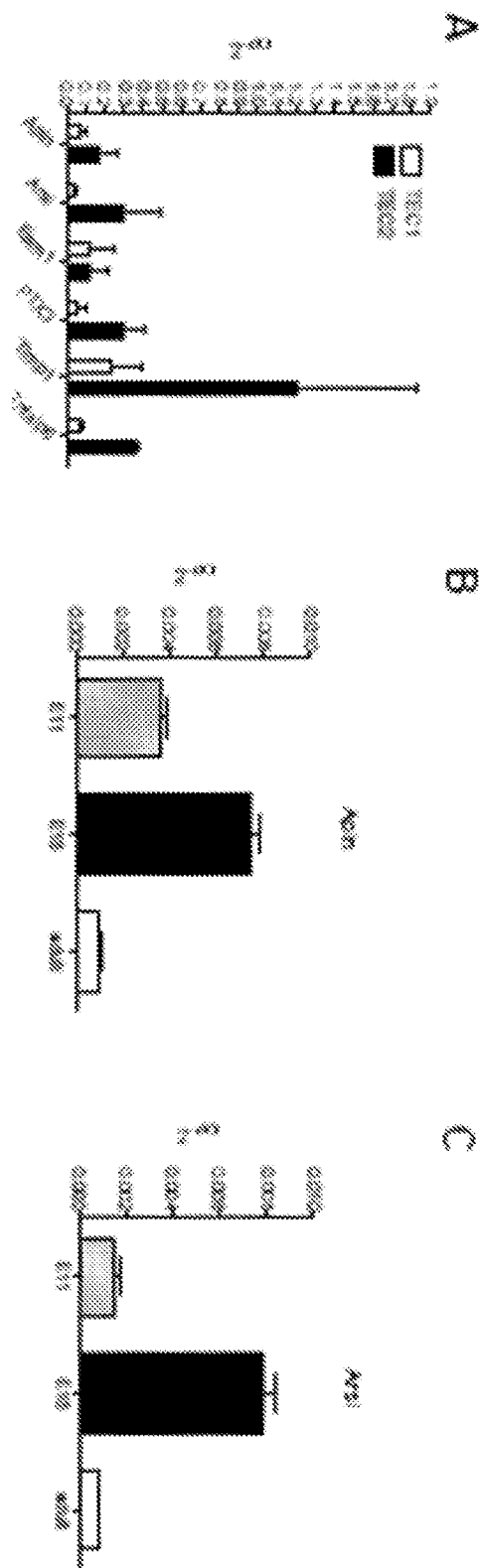


Figura 8

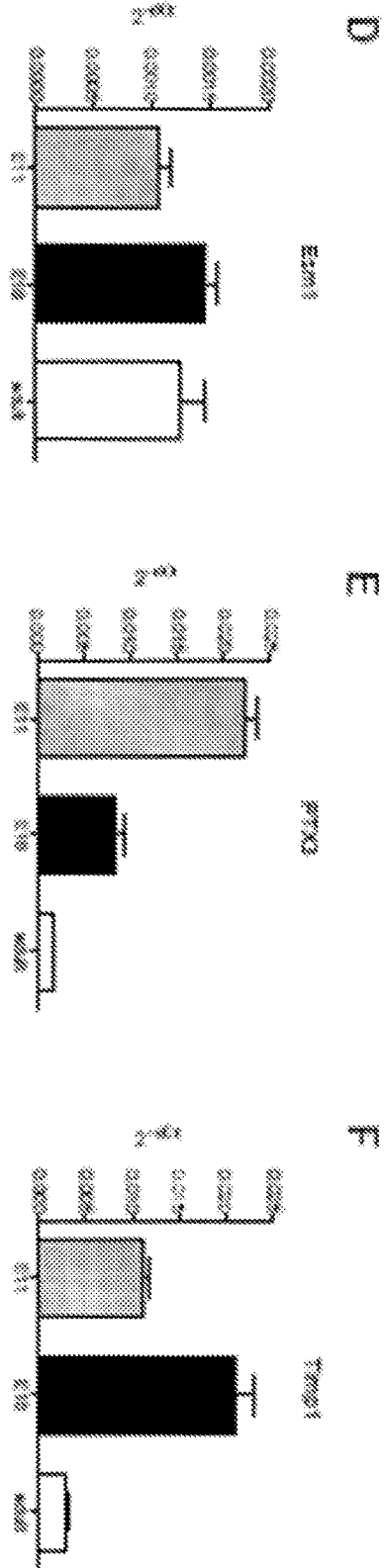


Figura 8 (continuación)

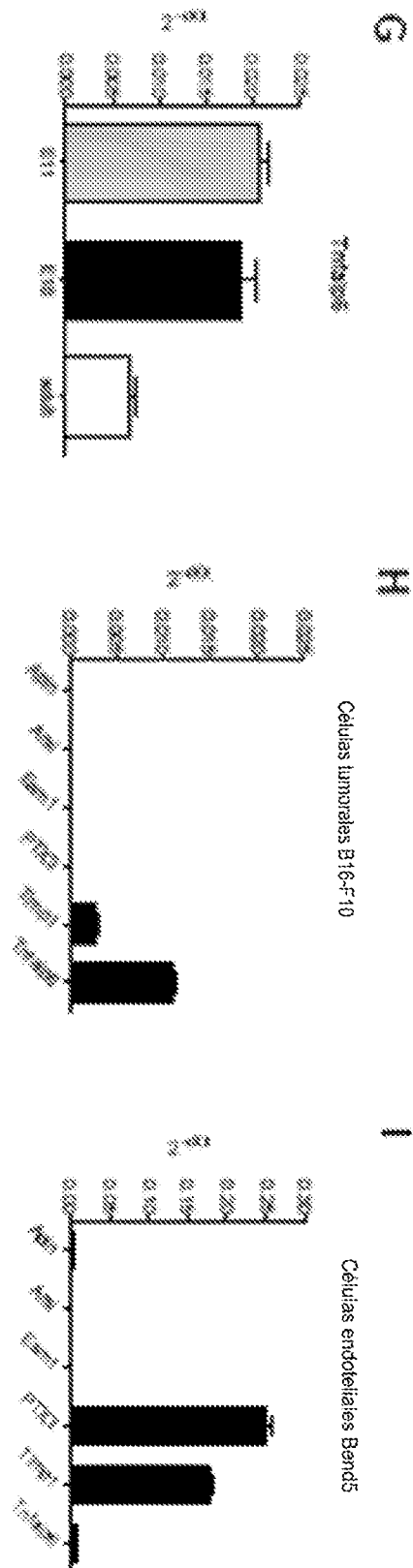


Figura 8 (continuación)

Figura 9

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000026728	22352	7431	Vim	NP_035831.2, NM_011701.4	NP_003371.2, NM_003380.3
	673094	4267	CD99	NP_079860.2, NM_025584.2	NP_001264639.1, NM_001277710.1

Figura 10

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000027435	17064	22918	Cd93	NP_034870.1, NM_010740.3	NP_036204.2, NM_012072.3

Figura 11

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000000957	17387	4323	Mmp14	NP_032634.3, NM_008608.3	NP_004966.1, NM_004965.3
ENSMUSG000000009787	99151	51148	Cercam	NP_997181.1, NM_207298.2	NM_001266760.1, NP_001273689.1
ENSMUSG000000016918	240725	23213	Sulf1	NP_001185494.1, NM_001198565.1	NP_055965.2, NM_015170.2
ENSMUSG000000044017	243277	283363	Gpr133	NP_001074811.1, NM_001061342.1	NP_942122.2, NM_198827.3
ENSMUSG000000034463	219151	51435	Scara3	NP_766192.1, NM_172604.3	NP_878185.1, NM_182926.1
ENSMUSG000000005534	16337	3643	Insr	NP_034698.2, NM_010568.2	NP_001073265.1, NM_001079817.1
ENSMUSG000000001773	53320	219595	Folh1	NP_001153178.1, NM_001159706.1	NP_710163.1, NM_153690.2
	673094	4267	CD99	NP_079860.2, NM_025584.2	NP_001264639.1, NM_001277710.1
ENSMUSG000000000530	11482	94	Acvrl1	NP_001264186.1, NM_001277259.1	NP_000011.2, NM_000020.2
ENSMUSG000000026768	241226	8516	Iiga8	NP_001001309.1, NM_001001309.2	NP_001278423.1, NM_001291494.1
ENSMUSG000000050808	269328	143662	Muc15	NP_766567.1, NM_172979.3	NP_001128564.1, NM_001135092.1
ENSMUSG000000018166	13867	2065	ErbB3	NP_034283.1, NM_010153.1	NP_001973.2 y NM_001982.3

Figura 11 (continuación)

ENSMUSG00000062312	13866	2064	ErbB2	NP_001003817.1, NM_001003817.1	NP_001276865.1, NM_001289936.1, NP_001005862.1, NM_001005862.2, NP_001276867.1, NM_001289938.1
--------------------	-------	------	-------	-----------------------------------	---

Figura 12

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000001131	21857	7076	Timp1	NM_001044384.1	NM_003254.2
ENSMUSG000000037010	30878	8862	Apln	NM_013912.3	NM_017413.4
ENSMUSG000000040026	20210		Saa3	NM_011315.3	S73444.1
ENSMUSG000000027832	19288	5806	Ptx3	NP_033013.3, NM_008987.3	NP_002843.2, NM_002852.3
ENSMUSG000000053475	21930	7130	Tnfrsf10	NP_033424.1, NM_009398.2	NP_009046.2, NM_007115.3
ENSMUSG000000036596	242939	8532	Cpz	NP_694747.2, NM_153107.2	NP_003643.2, NM_003652.3, NP_001014447.1, NM_001014447.2, NP_001014448.1, NM_001014448.2
ENSMUSG000000025359	20431	6490	Pmel	NP_068682.2, NM_021882.4, XP_006513468.1, XM_006513405.2	NP_001186983.1, NM_001200054.1, NP_001186982.1, NM_001200053.1
ENSMUSG000000036412	545260	340075	Arsi	NP_001033588.1, NM_001038499.1	NP_001012301.1, NM_001012301.2
ENSMUSG000000006403	240913	9507	Adamts4	NM_172845.2	NP_005090.3, NM_005099.4
ENSMUSG000000023885	21826	7058	Thbs2	NP_035711.2, NM_011581.3	NP_003238.2, NM_003247.3
ENSMUSG000000000957	17387	4323	Mmp14	NP_032634.3, NM_008608.3	NP_004986.1, NM_004995.3
ENSMUSG000000020427	16009	3486	Igfbp3	NP_032369.2, NM_008343.2	NP_001013416.1, NM_001013398.1, NP_000589.2, NM_000598.4

Figura 12 (continuación)

ENSMUSG00000040152	21825	7057	Thbs1	NP_035710.2, NM_011580.3	NP_003237.2, NM_003246.2
ENSMUSG00000027204	14118	2200	Fbn1	NP_032019.2, NM_007993.2	NP_000129.3, NM_000138.4
ENSMUSG00000027750	50706	10631	Postn	NP_001185695.1, NM_001198766.1	NP_001273596.1, NM_001286667.1
ENSMUSG00000000693	16950	84695	Loxl3	NP_038614.2, NM_013586.4	NP_001276093.1, NM_001289164.1
ENSMUSG00000030116	50530	8076	Mfap5	NM_015776.2, NP_056591.1	NP_001284639.1, NM_001297710.1
ENSMUSG00000024909	58859	30008	Efemp2	NM_001164352.1, NP_001157824.1	NP_058634.4, NM_016938.4
ENSMUSG00000037362	18133	4856	Nov	NP_035060.1, NM_010930.4	NP_002505.1, NM_002514.3
ENSMUSG00000021614	13003	1462	Vcan	NP_001127947.1, NM_001134475.1	NP_004376.2, NM_004385.4
ENSMUSG00000029675	13717	2006	Eln	NP_031951.2, NM_007925.3	NP_001075223.1, NM_001081754.2
ENSMUSG00000028195	16007	3491	Cyr61	NP_034646.1, NM_010516.2	NP_001545.2, NM_001554.4
ENSMUSG00000016918	240725	23213	Sulf1	NP_001185494.1, NM_001198565.1	NP_055985.2, NM_015170.2
ENSMUSG00000021806	18074	22795	Nid2	NP_032721.2, NM_008695.2	NP_031387.3, NM_007361.3
ENSMUSG00000019846	16775	3910	Lama4	NP_034811.2, NM_010681.4	NP_002281.3, NM_002290.4
ENSMUSG00000056427	20564	6586	Slit3	NP_035542.2, NM_011412.3	NP_003053.1, NM_003062.3

Figura 12 (continuación)

ENSMUSG00000020695	17534	9902	Mrc2	NP__032652.3, NM__008626.3	NP__006030.2, NM__006039.4
ENSMUSG00000062345	18788	5055	Serpinb 2	NM__001174170.1, NP__001167641.1	NP__001137290.1, NM__001143818.1
ENSMUSG00000035385	20296	6347	Ccl2	NP__035463.1, NM__011333.3	NP__002973.1, NM__002982.3
	673094	4267	CD99	NP__079860.2, NM__025584.2	NP__001264639.1, NM__001277710.1
ENSMUSG00000039304	22035	8743	Tnfsf10	NP__033451.1, NM__009425.2	NP__001177871.1, NM__001190942.1
ENSMUSG00000022991	16770	3906	Lalba	NP__034809.1, NM__010679.1	NP__002280.1, NM__002289.2

Figura 13

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG000000037010	30878	8862	Apln	NM_013912.3	NM_017413.4
ENSMUSG000000040026	20210		Saa3	NM_011315.3	S73444.1
ENSMUSG000000026728	22352	7431	Vim	NP_035831.2, NM_011701.4	NP_003371.2, NM_003380.3
ENSMUSG000000025359	20431	6490	Pmel	NP_068682.2, NM_021882.4, XP_006513468.1, XM_006513405.2	NP_001186983.1, NM_001200054.1, NP_001186982.1, NM_001200053.1
ENSMUSG000000036412	545260	340075	Arsi	NP_001033588.1, NM_001038499.1	NP_001012301.1, NM_001012301.2
ENSMUSG000000005124	22402	8840	Wisp1	NP_061353.1, NM_018865.2	NP_001191799.1, NM_001204870.1
ENSMUSG000000001555	14230	60681	Fkbp10	NP_038557.1, NM_013529.3	NM_021939.3, NP_068758.3

Figura 14

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000001131	21857	7076	Timp1	NM_001044384.1	NM_003254.2
ENSMUSG000000037010	30878	8862	Apln	NM_013912.3	NM_017413.4
ENSMUSG000000040026	20210		Saa3	NM_011315.3	S73444.1
ENSMUSG000000027832	19288	5806	Ptx3	NP_033013.3, NM_008987.3	NP_002843.2, NM_002852.3
ENSMUSG000000026728	22352	7431	Vim	NP_035831.2, NM_011701.4	NP_003371.2, NM_003380.3
ENSMUSG000000053475	21930	7130	Tnfrsf10b	NP_033424.1, NM_009398.2	NP_009046.2, NM_007115.3
ENSMUSG000000036596	242939	8532	Cpz	NP_694747.2, NM_153107.2	NP_003643.2, NM_003652.3, NP_001014447.1, NM_001014447.2, NP_001014448.1, NM_001014448.2
ENSMUSG000000036412	545260	340075	Arsi	NP_001033588.1, NM_001038499.1	NP_001012301.1, NM_001012301.2
ENSMUSG000000042379	71690	11082	Esm1	NP_076101.1, NM_023612.3	NP_008967.1, NM_007036.4, NP_001129076.1, NM_001135604.1
ENSMUSG000000000555	16402	3678	Itga5	NP_034707.3, NM_010577.3	NP_002196.2, NM_002205.2
ENSMUSG000000036545	216725	9509	Adamts 2	NP_001264234.1, NM_001277305.1, NP_783574.1, NM_175643.3	NP_067610.1, NM_021599.2, NP_055059.2, NM_014244.4
ENSMUSG000000023885	21826	7058	Thbs2	NP_035711.2, NM_011581.3	NP_003238.2, NM_003247.3

Figura 14 (continuación)

ENSMUSG00000000957	17387	4323	Mmp14	NP_032634.3, NM_008608.3	NP_004986.1, NM_004995.3
ENSMUSG00000040152	21825	7057	Thbs1	NP_035710.2, NM_011580.3	NP_003237.2, NM_003246.2
ENSMUSG00000027204	14118	2200	Fbn1	NP_032019.2, NM_007993.2	NP_000129.3, NM_000138.4
ENSMUSG00000027750	50706	10631	Postn	NP_001185695.1, NM_001198766.1	NP_001273596.1, NM_001286667.1
ENSMUSG00000024598	14119	2201	Fbn2	NP_034311.2, NM_010181.2	NP_001990.2, NM_001999.3
ENSMUSG00000039787	99151	51148	Cercam	NP_997181.1, NM_207298.2	NM_001286760.1, NP_001273689.1
ENSMUSG00000000693	16950	84695	Loxl3	NP_038614.2, NM_013586.4	NP_001276093.1, NM_001289164.1
ENSMUSG00000030116	50530	8076	Mfap5	NM_015776.2, NP_056591.1	NP_001284639.1, NM_001297710.1
ENSMUSG00000024909	58859	30008	Efemp2	NM_001164352.1, NP_001157824.1	NP_058634.4, NM_016938.4
ENSMUSG00000037362	18133	4856	Nov	NP_035060.1, NM_010930.4	NP_002505.1, NM_002514.3
ENSMUSG00000021614	13003	1462	Vcan	NP_001127947.1, NM_001134475.1	NP_004376.2, NM_004385.4
ENSMUSG00000029675	13717	2006	Eln	NP_031951.2, NM_007925.3	NP_001075223.1, NM_001081754.2
ENSMUSG00000028195	16007	3491	Cyr61	NP_034646.1, NM_010516.2	NP_001545.2, NM_001554.4
ENSMUSG00000016918	240725	23213	Sulf1	NP_001185494.1, NM_001198565.1	NP_055985.2, NM_015170.2

Figura 14 (continuación)

ENSMUSG00000021806	18074	22795	Nid2	NP_032721.2, NM_008695.2	NP_031387.3, NM_007361.3
ENSMUSG00000019846	16775	3910	Lama4	NP_034811.2, NM_010681.4	NP_002281.3, NM_002290.4
ENSMUSG00000056427	20564	6586	Slit3	NP_035542.2, NM_011412.3	NP_003053.1, NM_003062.3
ENSMUSG00000020695	17534	9902	Mrc2	NP_032652.3, NM_008626.3	NP_006030.2, NM_006039.4
ENSMUSG00000044017	243277	283383	Gpr133	NP_001074811.1, NM_001081342.1	NP_942122.2, NM_198827.3
ENSMUSG00000034463	219151	51435	Scara3	NP_766192.1, NM_172604.3	NP_878185.1, NM_182826.1
ENSMUSG00000005534	16337	3643	Insr	NP_034698.2, NM_010568.2	NP_001073285.1, NM_001079817.1
ENSMUSG00000001773	53320	219595	Folh1	NP_001153178.1, NM_001159706.1	NP_710163.1, NM_153696.2
	673094	4267	CD99	NP_079860.2, NM_025584.2	NP_001264639.1, NM_001277710.1
ENSMUSG00000000530	11482	94	Acvrl1	NP_001264188.1, NM_001277259.1	NP_000011.2, NM_000020.2
ENSMUSG00000029675	13717	2006	Ein	NP_031951.2, NM_007925.3	NP_001075223.1, NM_001081754.2
ENSMUSG00000026768	241226	8516	Itga8	NP_001001309.1, NM_001001309.2	NP_001278423.1, NM_001291494.1
ENSMUSG00000039304	22035	8743	Tnfrsf10	NP_033451.1, NM_009425.2	NP_001177871.1, NM_001190942.1
ENSMUSG00000022991	16770	3906	Lalba	NP_034809.1, NM_010679.1	NP_002280.1, NM_002289.2

Figura 14 (continuación)

ENSMUSG00000050808	269328	143662	Muc15	NP_766567.1, NM_172979.3	NP_001128564.1, NM_001135092.1
ENSMUSG00000018166	13867	2065	ErbB3	NP_034283.1, NM_010153.1	NP_001973.2 y NM_001982.3
ENSMUSG00000062312	13866	2064	ErbB2	NP_001003817.1, NM_001003817.1	NP_001276865.1, NM_001289936.1, NP_001005862.1, NM_001005862.2, NP_001276867.1, NM_001289938.1

Figura 15

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG000000027435	17064	22918	Cd93	NP_034870.1, NM_010740.3	NP_036204.2, NM_012072.3
ENSMUSG000000075254	77446	57493	Heg1	NP_780465.4, NM_175256.5	NP_065784.1, NM_020733.1
ENSMUSG000000015468	18132	4855	Notch4	NP_035059.2, NM_010929.2	NP_004548.3, NM_004557.3
ENSMUSG000000044338	23796	187	Ap1nr	NP_035914.1, NM_011784.3	NP_005152.1, NM_005161.4, NR_027991.1
ENSMUSG000000004891	18008	10763	Nes	NP_057910.3, NM_016701.3	NP_006608.1, NM_006617.1
ENSMUSG000000028364	21923	3371	Tnc	NP_035737.2, NM_011607.3	NP_002151.2, NM_002160.3
ENSMUSG000000042821	20613	6615	Snai1	NP_035557.1, NM_011427.2	NP_005976.2, NM_005985.3
ENSMUSG000000028597	67305	2882	Gpx7	NP_077160.1, NM_024198.3	NM_015696.4
ENSMUSG000000039883	74511	10234	Lrrc17	NP_083253.1, NM_028977.1	NP_005815.2, NM_005824.2
ENSMUSG000000021319	20379	6424	Sfrp4	NP_057896.1, NM_016687.3	NP_003005.2, NM_003014.3
ENSMUSG000000022440	72709	114904	C1qtnf6	NM_001204153.1, NP_001191082.1	NM_031910.3, NP_114116.3
ENSMUSG000000036334	242050	285313	Igsf10	NP_001156356.1, NM_001162884.1	NM_001178145.1, NP_001171616.1

Figura 15 (continuación)

ENSMUSG00000027996	20319	6423	Sfrp2	NP_033170.1, NM_009144.2	NP_003004.1, NM_003013.2
ENSMUSG00000020363	14584	9945	Gfpt2	NP_038557.1, NM_013529.3	NP_005101.1, NM_005110.2
ENSMUSG00000027408	56264	56265	Cpxm1	NP_062670.2, NM_019696.2	NP_001171628.1, NM_001184699.1
ENSMUSG00000056481	70445	57124	Cd248	NP_473383.1, NM_054042.2	NP_065137.1, NM_020404.2
ENSMUSG00000034205	94352		Loxl2	NP_201582.2, NM_033325.2	
ENSMUSG00000022816	14314	11167	Fstl1	NP_032073.2, NM_008047.5	NP_009016.1, NM_007085.4
ENSMUSG00000028369	64817	79987	Svep1	NP_073725.2, NM_022814.2	NP_699197.3, NM_153366.3
ENSMUSG00000046841	216197	10970	Ckap4	NP_780660.1, NM_175451.1	NP_006816.2, NM_006825.3
ENSMUSG00000024053	246707	84034	Emilin2	NP_660140.1, NM_145158.3	NP_114437.2, NM_032048.2
ENSMUSG00000001622	12994	1448	Csn3	NP_031812.2, NM_007786.4	NP_005203.2, NM_005212.2
ENSMUSG00000059588	54598	10203	Calcr1	NP_061252.2, NM_018782.2	NP_001258680.1, NM_001271751.1
ENSMUSG00000028859	12986	1441	Csf3r	NP_031808.2, NM_007782.3	NP_758519.1, NM_172313.2
ENSMUSG00000028262	80797		Clca2	NP_085104.1, NM_030601.3	
ENSMUSG00000045930	66864	161198	Clec14 a	NP_080085.3, NM_025809.5	NP_778230.1, NM_175060.2

Figura 15 (continuación)

ENSMUSG00000069763	67888	55273	Tmem1 00	NP_080709.1, NM_026433.2	NP_001093110.1, NM_001099640.1
ENSMUSG00000041134	224405	116159	Cypr1	NP_659102.1, NM_144853.3	NP_443186.1, NM_052954.2
ENSMUSG00000038007	230379	340485	Acer2	NP_001277472.1, NM_001290543.1	NP_001010887.2, NM_001010887.2
ENSMUSG00000038679	83925	7227	Trps1	NP_114389.2, NM_032000.2	NP_054831.2, NM_014112.4
ENSMUSG00000024451	106952	64411	Arap3	NP_001192265.1, NM_001205336.1	NP_071926.4, NM_022481.5
ENSMUSG00000021904	218877	56920	Sema3 g	NP_001020550.1, NM_001025379.1	NP_064548.1, NM_020163.1
ENSMUSG00000024754	83921	23670	Tmem2	NP_001028931.1, NM_001033759.2	NP_001129292.1, NM_001135820.1
ENSMUSG00000059325	74318	84525	Hopx	NP_783199.1, NM_175606.3	NP_001138932.1, NM_001145460.1
ENSMUSG00000048960	109294	80243	Prex2	NP_083801.1, NM_029525.1	NP_079146.2, NM_024870.2
ENSMUSG00000037846	170799	219790	Rtkn2	NP_001074815.1, NM_001081346.1	NP_660350.2, NM_145307.3
ENSMUSG00000076431	20677	6659	Sox4	NP_033264.2, NM_009238.2	NP_003098.1, NM_003107.2
ENSMUSG00000027217	241556	90139	Tspan1 8	NP_899003.1, NM_183180.2	NP_570139.3, NM_130783.4
ENSMUSG00000039116	215798	57211	Gpr126	NP_001002268.1, NM_001002268.3	NP_065188.4, NM_020455.5
ENSMUSG00000033082	243653	51267	Clec1a	NP_780735.2, NM_175526.3	NP_001284678.1, NM_001297749.1

Figura 15 (continuación)

ENSMUSG00000040289	15213	23462	Hey1	NP_034553.2, NM_010423.2	NP_036390.3, NM_012258.3
--------------------	-------	-------	------	--------------------------	-----------------------------

Figura 16

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000001131	21857	7076	Timp1	NM_001044384.1	NM_003254.2
ENSMUSG000000037010	30878	8862	Apln	NM_013912.3	NM_017413.4
ENSMUSG000000040026	20210		Saa3	NM_011315.3	S73444.1
ENSMUSG000000027435	17064	22918	Cd93	NP_034870.1, NM_010740.3	NP_036204.2, NM_012072.3
ENSMUSG000000075254	77446	57493	Heg1	NP_780465.4, NM_175256.5	NP_065784.1, NM_020733.1
ENSMUSG000000015468	18132	4855	Notch4	NP_035059.2, NM_010929.2	NP_004548.3, NM_004557.3
ENSMUSG000000044338	23796	187	Aplnr	NP_035914.1, NM_011784.3	NP_005152.1, NM_005161.4, NR_027991.1
ENSMUSG000000004891	18008	10763	Nes	NP_057910.3, NM_016701.3	NP_006608.1, NM_006617.1
ENSMUSG000000028364	21923	3371	Tnc	NP_035737.2, NM_011607.3	NP_002151.2, NM_002160.3
ENSMUSG000000027832	19288	5806	Ptx3	NP_033013.3, NM_008987.3	NP_002843.2, NM_002852.3
ENSMUSG000000026728	22352	7431	Vim	NP_035831.2, NM_011701.4	NP_003371.2, NM_003380.3
ENSMUSG000000053475	21930	7130	Tnfaip6	NP_033424.1, NM_009398.2	NP_009046.2, NM_007115.3

Figura 16 (continuación)

ENSMUSG00000036596	242939	8532	Cpz	NP_694747.2, NM_153107.2	NP_003643.2, NM_003652.3, NP_001 014447.1, NM_001014447.2, NP_ 001014448.1, NM_001014448.2
ENSMUSG00000042821	20613	6615	Snai1	NP_035557.1, NM_011427.2	NP_005976.2, NM_005985.3
ENSMUSG00000025359	20431	6490	Pmel	NP_068682.2, NM_021882.4, XP_006513468.1, XM_006513405.2	NP_001186983.1, NM_001200054.1, NP_001186982.1, NM_001200053.1
ENSMUSG00000036412	545260	340075	Arsi	NP_001033588.1, NM_001038499.1	NP_001012301.1, NM_001012301.2
ENSMUSG00000005124	22402	8840	Wisp1	NP_061353.1, NM_018865.2	NP_001191799.1, NM_001204870.1
ENSMUSG00000028597	67305	2882	Gpx7	NP_077160.1, NM_024198.3	NM_015696.4
ENSMUSG00000006403	240913	9507	Adamts 4	NM_172845.2	NP_005090.3, NM_005099.4
ENSMUSG00000042379	71690	11082	Esm1	NP_076101.1, NM_023612.3	NP_008967.1, NM_007036.4, NP_001129076.1, NM_001135604.1
ENSMUSG00000000555	16402	3678	Itga5	NP_034707.3, NM_010577.3	NP_002196.2, NM_002205.2
ENSMUSG00000036545	216725	9509	Adamts 2	NP_001264234.1, NM_001277305.1, NP_783574.1, NM_175643.3	NP_067610.1, NM_021599.2, NP_055059.2, NM_014244.4
ENSMUSG00000023885	21826	7058	Thbs2	NP_035711.2, NM_011581.3	NP_003238.2, NM_003247.3
ENSMUSG00000000957	17387	4323	Mmp14	NP_032634.3, NM_008608.3	NP_004986.1, NM_004995.3
ENSMUSG00000020427	16009	3486	Igfbp3	NP_032369.2, NM_008343.2	NP_001013416.1, NM_001013398.1, NP_000589.2, NM_000598.4

Figura 16 (continuación)

ENSMUSG00000040152	21825	7057	Thbs1	NP_035710.2, NM_011580.3	NP_003237.2, NM_003246.2
ENSMUSG00000027204	14118	2200	Fbn1	NP_032019.2, NM_007993.2	NP_000129.3, NM_000138.4
ENSMUSG00000027750	50706	10631	Postn	NP_001185695.1, NM_001198766.1	NP_001273596.1, NM_001286667.1
ENSMUSG00000039883	74511	10234	Lrrc17	NP_083253.1, NM_028977.1	NP_005815.2, NM_005824.2
ENSMUSG00000024598	14119	2201	Fbn2	NP_034311.2, NM_010181.2	NP_001990.2, NM_001999.3
ENSMUSG00000039787	99151	51148	Cercam	NP_997181.1, NM_207298.2	NM_001286760.1, NP_001273689.1
ENSMUSG00000021319	20379	6424	Sfrp4	NP_057896.1, NM_016687.3	NP_003005.2, NM_003014.3
ENSMUSG00000022440	72709	114904	C1qtnf6	NM_001204153.1, NP_001191082.1	NM_031910.3, NP_114116.3
ENSMUSG00000000693	16950	84695	Loxl3	NP_038614.2, NM_013586.4	NP_001276093.1, NM_001289164.1
ENSMUSG00000036334	242050	285313	Igsf10	NP_001156356.1, NM_001162884.1	NM_001178145.1, NP_001171616.1
ENSMUSG00000027996	20319	6423	Sfrp2	NP_033170.1, NM_009144.2	NP_003004.1, NM_003013.2
ENSMUSG00000001555	14230	60681	Fkbp10	NP_038557.1, NM_013529.3	NM_021939.3, NP_068758.3
ENSMUSG00000020363	14584	9945	Gfpt2	NP_038557.1, NM_013529.3	NP_005101.1, NM_005110.2
ENSMUSG00000027408	56264	56265	Cpxm1	NP_062670.2, NM_019696.2	NP_001171628.1, NM_001184699.1

Figura 16 (continuación)

ENSMUSG00000030116	50530	8076	Mfap5	NM_015776.2, NP_056591.1	NP_001284639.1, NM_001297710.1
ENSMUSG00000024909	58859	30008	Efemp2	NM_001164352.1, NP_001157824.1	NP_058634.4, NM_016938.4
ENSMUSG00000037362	18133	4856	Nov	NP_035060.1, NM_010930.4	NP_002505.1, NM_002514.3
ENSMUSG00000021614	13003	1462	Vcan	NP_001127947.1, NM_001134475.1	NP_004376.2, NM_004385.4
ENSMUSG00000029675	13717	2006	Eln	NP_031951.2, NM_007925.3	NP_001075223.1, NM_001081754.2
ENSMUSG00000028195	16007	3491	Cyr61	NP_034646.1, NM_010516.2	NP_001545.2, NM_001554.4
ENSMUSG00000016918	240725	23213	Sulf1	NP_001185494.1, NM_001198565.1	NP_055985.2, NM_015170.2
ENSMUSG00000021806	18074	22795	Nid2	NP_032721.2, NM_008695.2	NP_031387.3, NM_007361.3
ENSMUSG00000056481	70445	57124	Cd248	NP_473383.1, NM_054042.2	NP_065137.1, NM_020404.2
ENSMUSG00000034205	94352		Loxl2	NP_201582.2, NM_033325.2	
ENSMUSG00000022816	14314	11167	Fstl1	NP_032073.2, NM_008047.5	NP_009016.1, NM_007085.4
ENSMUSG00000028369	64817	79987	Svep1	NP_073725.2, NM_022814.2	NP_699197.3, NM_153366.3
ENSMUSG00000019846	16775	3910	Lama4	NP_034811.2, NM_010681.4	NP_002281.3, NM_002290.4
ENSMUSG00000056427	20564	6586	Slit3	NP_035542.2, NM_011412.3	NP_003053.1, NM_003062.3

Figura 16 (continuación)

ENSMUSG00000020695	17534	9902	Mrc2	NP_032652.3, NM_008626.3	NP_006030.2, NM_006039.4
ENSMUSG00000046841	216197	10970	Ckap4	NP_780660.1, NM_175451.1	NP_006816.2, NM_006825.3
ENSMUSG00000044017	243277	283383	Gpr133	NP_001074811.1, NM_001081342.1	NP_942122.2, NM_198827.3
ENSMUSG00000029581	14086	6624	Fscn1	NP_032010.2, NM_007984.2	NP_003079.1, NM_003088.3
ENSMUSG00000024053	246707	84034	Emilin2	NP_660140.1, NM_145158.3	NP_114437.2, NM_032048.2
ENSMUSG00000034463	219151	51435	Scara3	NP_766192.1, NM_172604.3	NP_878185.1, NM_182826.1
ENSMUSG00000062345	18788	5055	Serpib 2	NM_001174170.1, NP_001167641.1	NP_001137290.1, NM_001143818.1
ENSMUSG00000035385	20296	6347	Ccl2	NP_035463.1, NM_011333.3	NP_002973.1, NM_002982.3
ENSMUSG00000005534	16337	3643	Insr	NP_034698.2, NM_010568.2	NP_001073285.1, NM_001079817.1
ENSMUSG00000001773	53320	219595	Folh1	NP_001153178.1, NM_001159706.1	NP_710163.1, NM_153696.2
	673094	4267	CD99	NP_079860.2, NM_025584.2	NP_001264639.1, NM_001277710.1
ENSMUSG00000018166	13867	2065	ErbB3	NP_034283.1, NM_010153.1	NP_001973.2 y NM_001982.3
ENSMUSG00000062312	13866	2064	ErbB2	NP_001003817.1, NM_001003817.1	NP_001276865.1, NM_001289936.1, NP_001005862.1, NM_001005862.2, NP_001276867.1, NM_001289938.1

Figura 17

ID del conjunto	ID del gen de ratón	ID del gen humano	Nombre	GenBank acceso n.º	Ortólogo humano
ENSMUSG00000001622	12994	1448	Csn3	NP_031812.2, NM_007786.4	NP_005203.2, NM_005212.2
ENSMUSG000000059588	54598	10203	Calcr1	NP_061252.2, NM_018782.2	NP_001258680.1, NM_001271751.1
ENSMUSG000000000530	11482	94	Acvr11	NP_001264188.1, NM_001277259.1	NP_000011.2, NM_000020.2
ENSMUSG000000028859	12986	1441	Csf3r	NP_031808.2, NM_007782.3	NP_758519.1, NM_172313.2
ENSMUSG000000028262	80797		Clca2	NP_085104.1, NM_030601.3	
ENSMUSG000000045930	66864	161198	Clec14a	NP_080085.3, NM_025809.5	NP_778230.1, NM_175060.2
ENSMUSG000000069763	67888	55273	Tmem100	NP_080709.1, NM_026433.2	NP_001093110.1, NM_001099640.1
ENSMUSG000000041134	224405	116159	Cypr1	NP_659102.1, NM_144853.3	NP_443186.1, NM_052954.2
ENSMUSG000000029675	13717	2006	Ein	NP_031951.2, NM_007925.3	NP_001075223.1, NM_001081754.2
ENSMUSG000000038007	230379	340485	Acer2	NP_001277472.1, NM_001290543.1	NP_001010887.2, NM_001010887.2
ENSMUSG000000038679	83925	7227	Trps1	NP_114389.2, NM_032000.2	NP_054831.2, NM_014112.4
ENSMUSG000000024451	106952	64411	Arap3	NP_001192265.1, NM_001205336.1	NP_071926.4, NM_022481.5

Figura 17 (continuación)

ENSMUSG00000026768	241226	8516	Itga8	NP_001001309.1, NM_001001309.2	NP_001278423.1, NM_001291494.1
ENSMUSG00000021904	218877	56920	Sema3 g	NP_001020550.1, NM_001025379.1	NP_064548.1, NM_020163.1
ENSMUSG00000024754	83921	23670	Tmem2	NP_001028931.1, NM_001033759.2	NP_001129292.1, NM_001135820.1
ENSMUSG00000039304	22035	8743	Tnfrsf10	NP_033451.1, NM_009425.2	NP_001177871.1, NM_001190942.1
ENSMUSG00000059325	74318	84525	Hopx	NP_783199.1, NM_175606.3	NP_001138932.1, NM_001145460.1
ENSMUSG00000022991	16770	3906	Lalba	NP_034809.1, NM_010679.1	NP_002280.1, NM_002289.2
ENSMUSG00000048960	109294	80243	Prex2	NP_083801.1, NM_029525.1	NP_079146.2, NM_024870.2
ENSMUSG00000050808	269328	143662	Muc15	NP_766567.1, NM_172979.3	NP_001128564.1, NM_001135092.1
ENSMUSG00000037846	170799	219790	Rtkn2	NP_001074815.1, NM_001081346.1	NP_660350.2, NM_145307.3
ENSMUSG00000076431	20677	6659	Sox4	NP_033264.2, NM_009238.2	NP_003098.1, NM_003107.2
ENSMUSG00000027217	241556	90139	Tspan1 8	NP_899003.1, NM_183180.2	NP_570139.3, NM_130783.4
ENSMUSG00000039116	215798	57211	Gpr126	NP_001002268.1, NM_001002268.3	NP_065188.4, NM_020455.5
ENSMUSG00000033082	243653	51267	Clec1a	NP_780735.2, NM_175526.3	NP_001284678.1, NM_001297749.1
ENSMUSG00000040289	15213	23462	Hey1	NP_034553.2, NM_010423.2	NP_036390.3, NM_012258.3

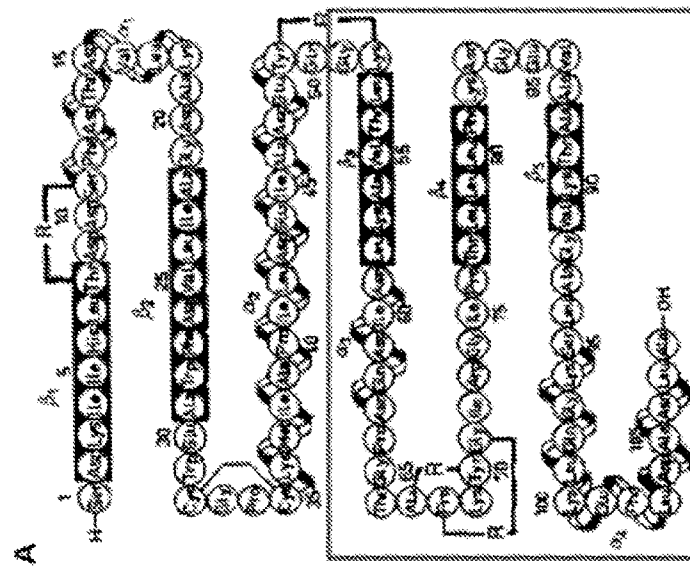
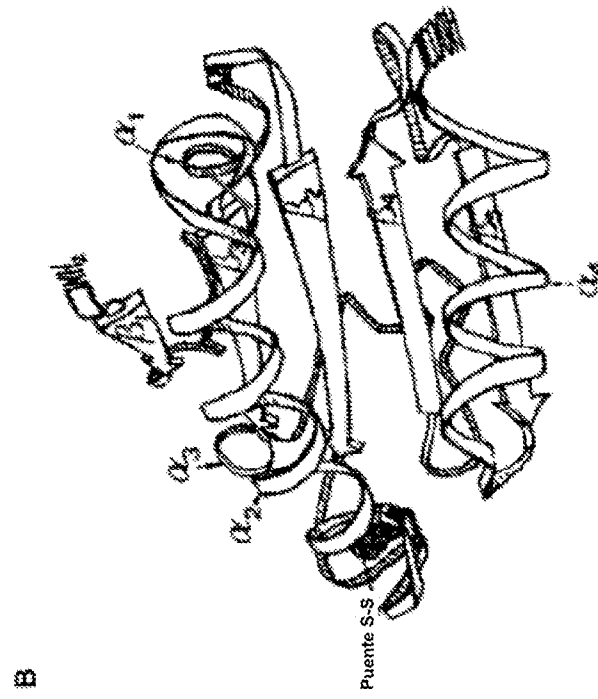


Figura 18

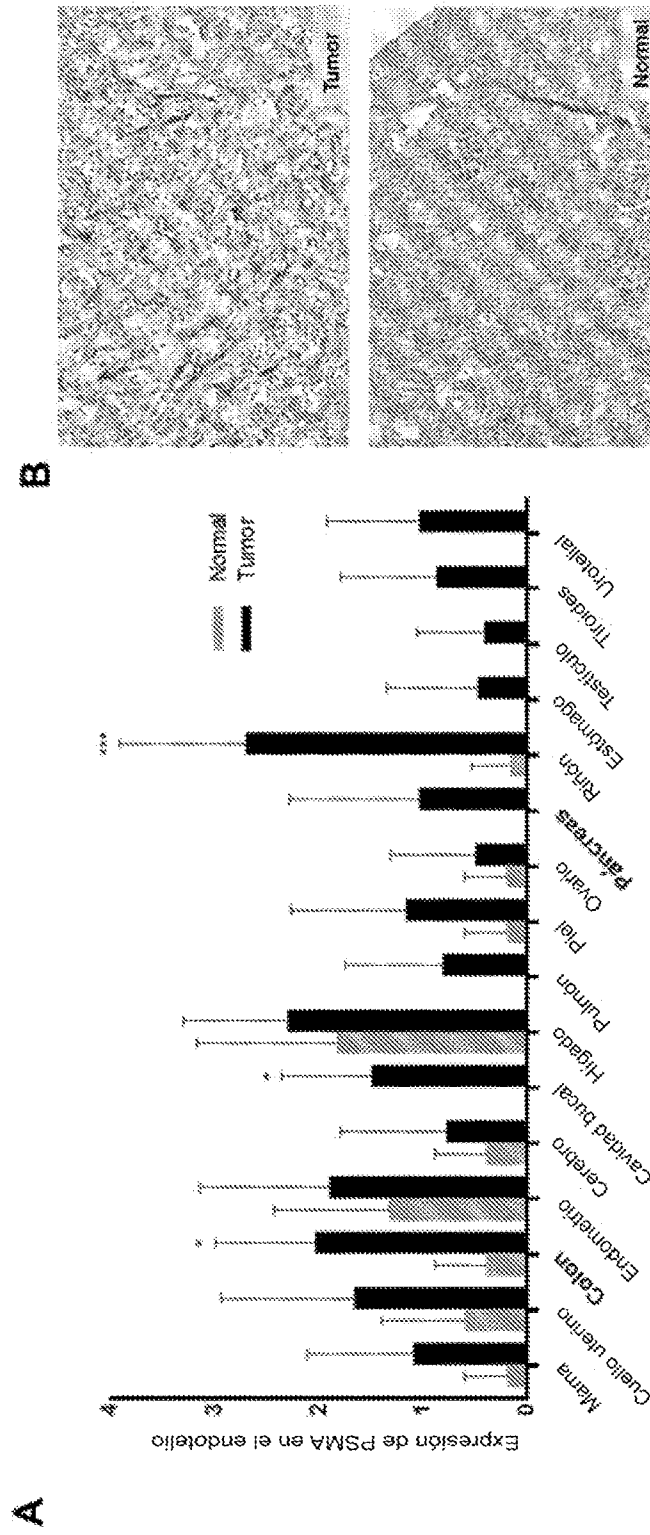


Figura 19

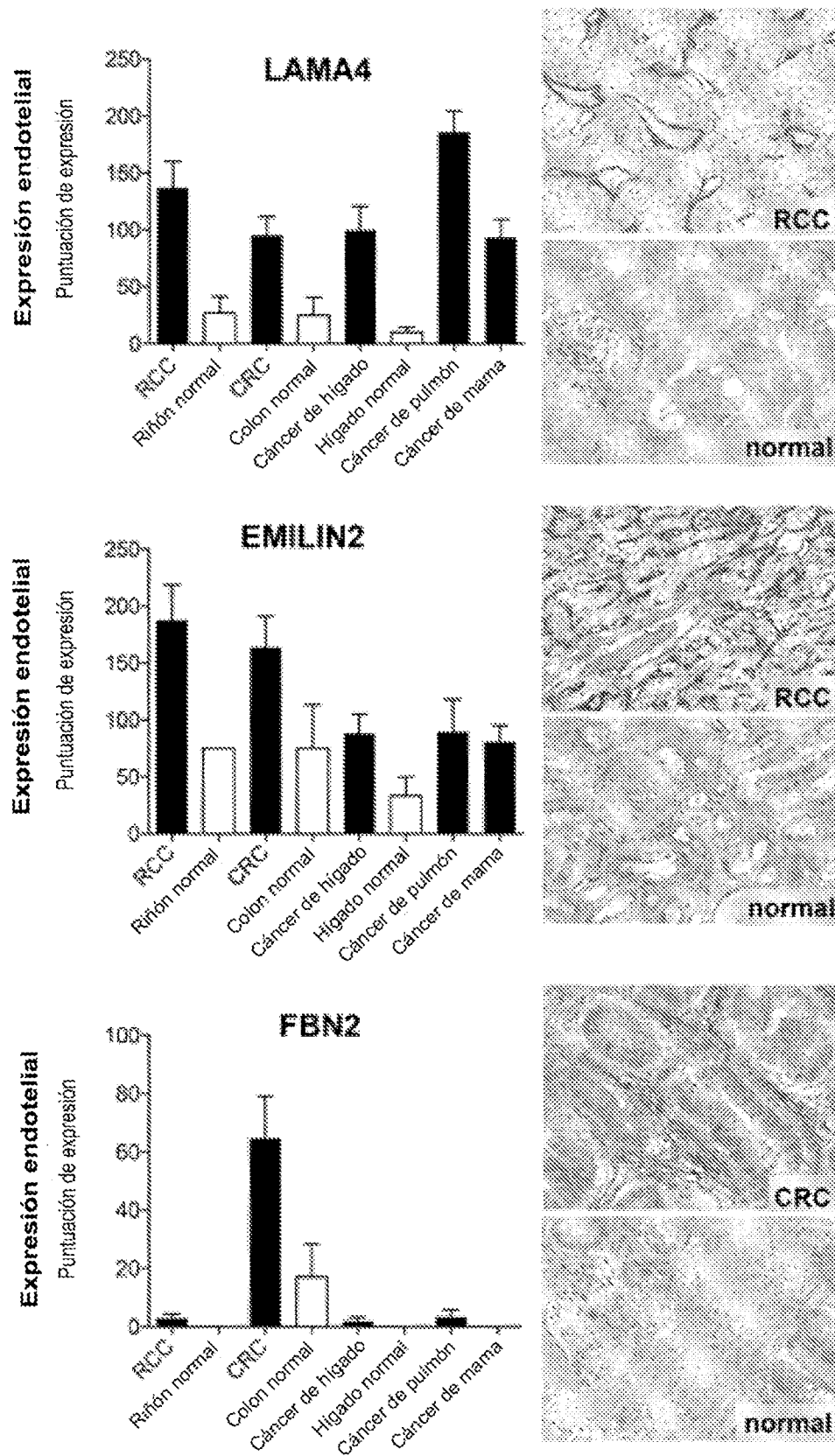


Figura 20



Figura 21

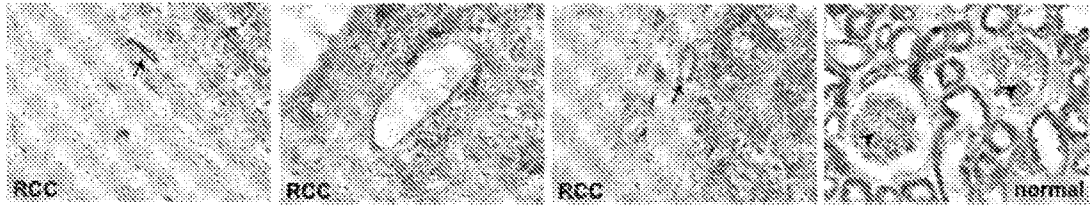


Figura 22

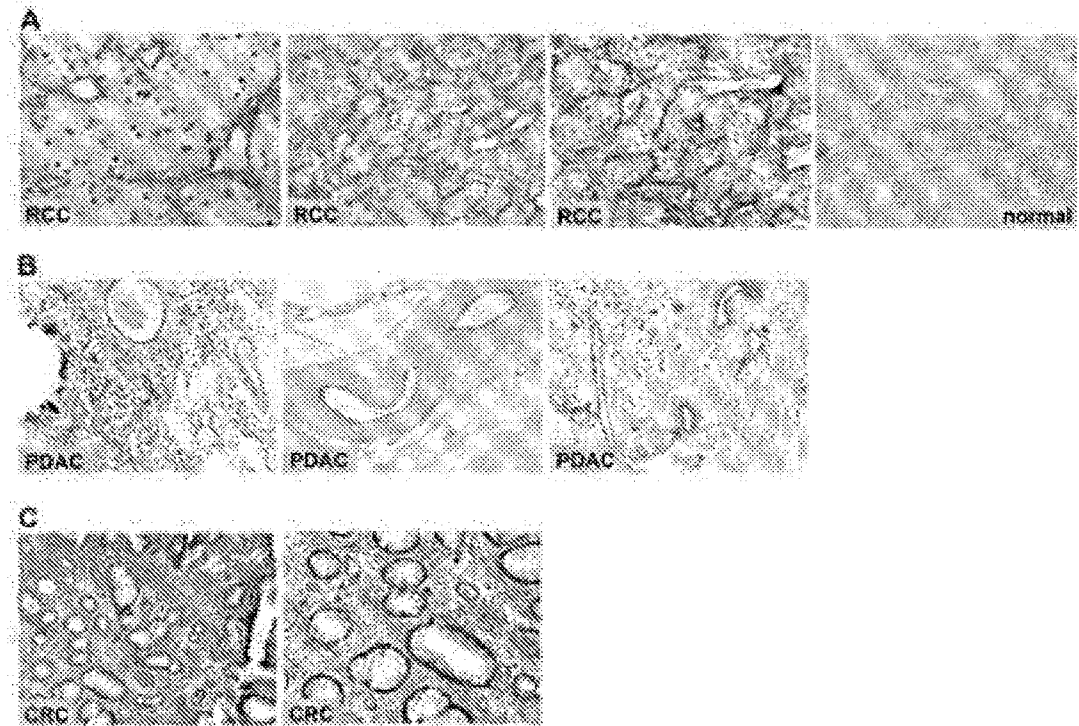


Figura 23

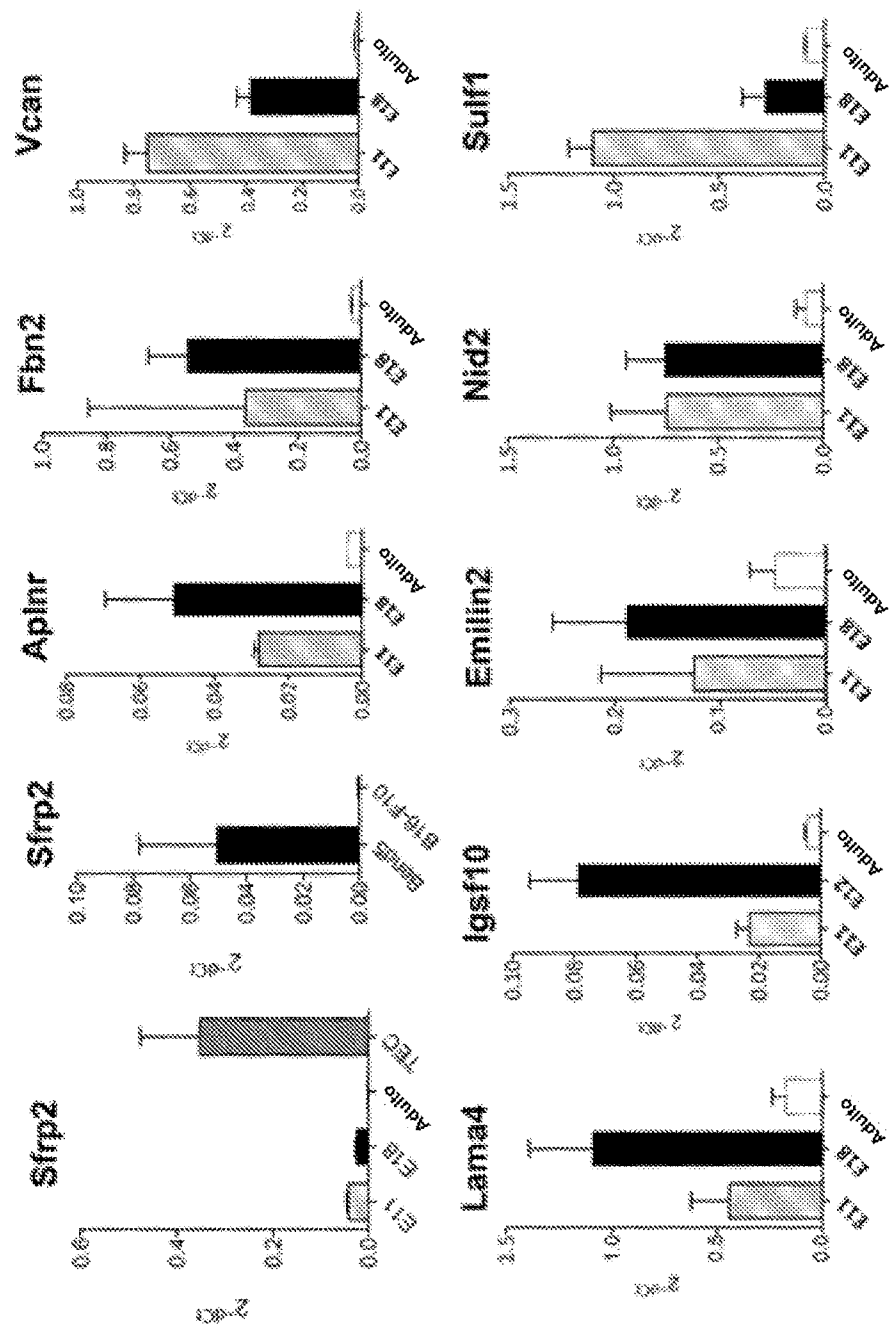


Figura 24

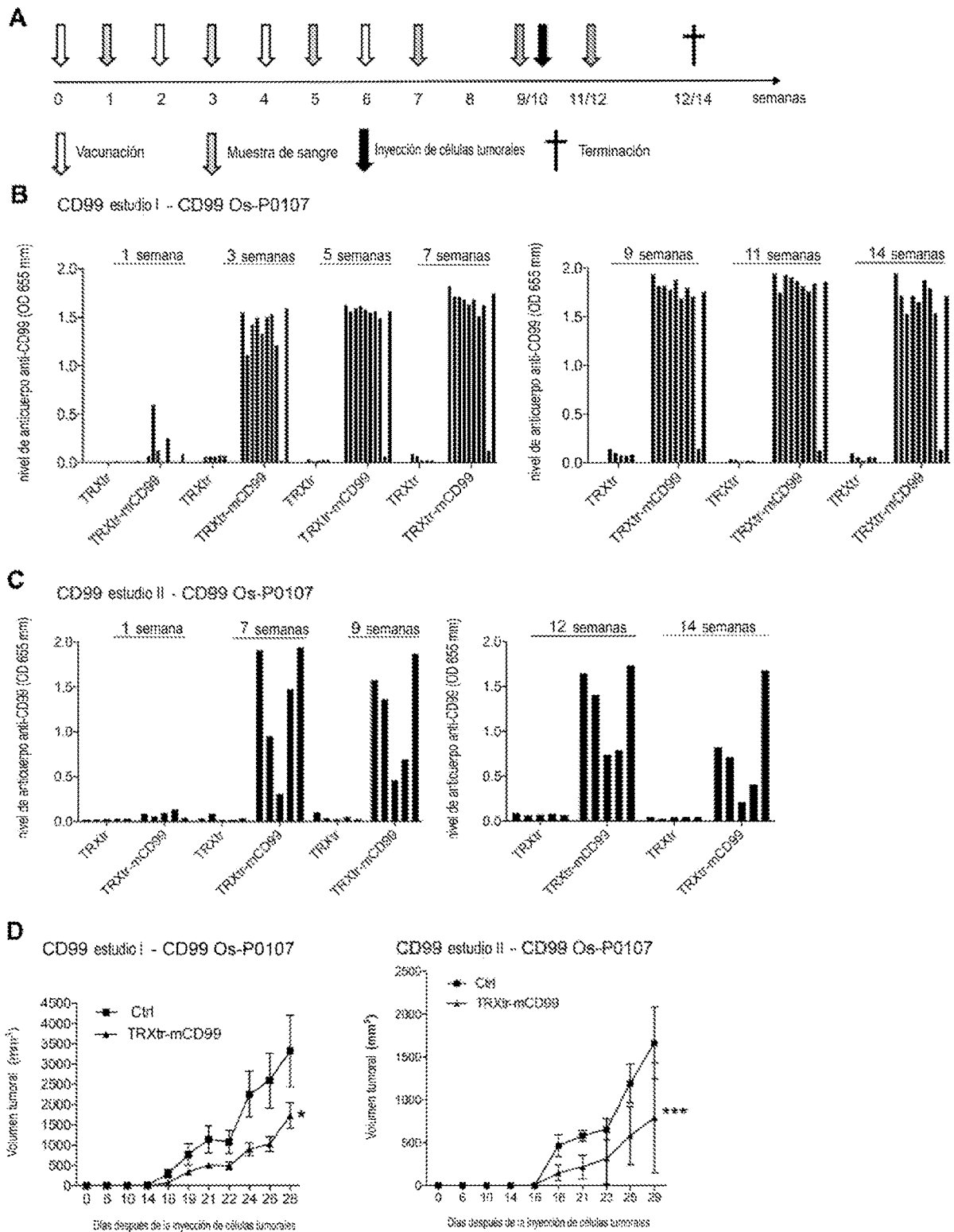


Figura 25

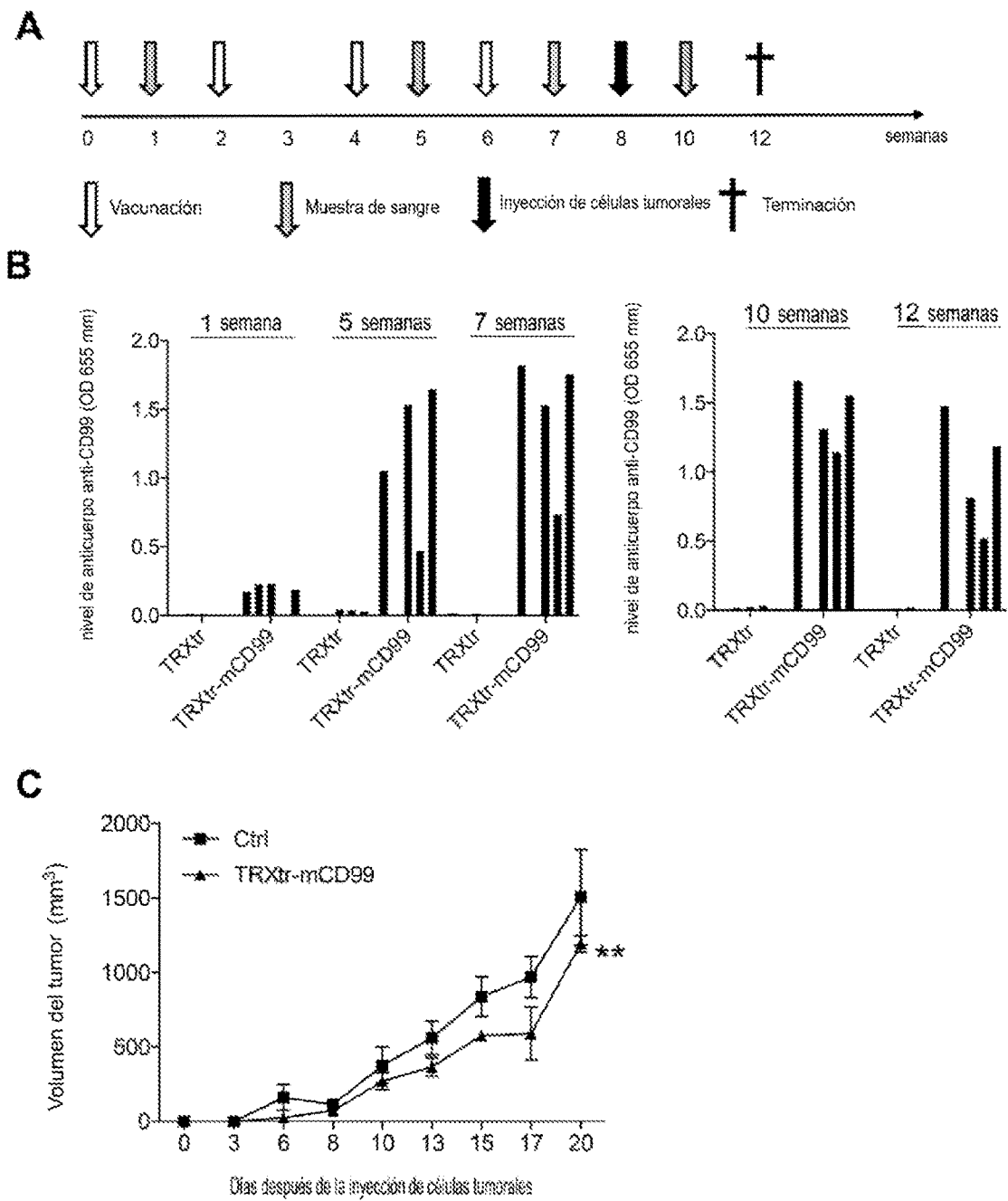


Figura 26

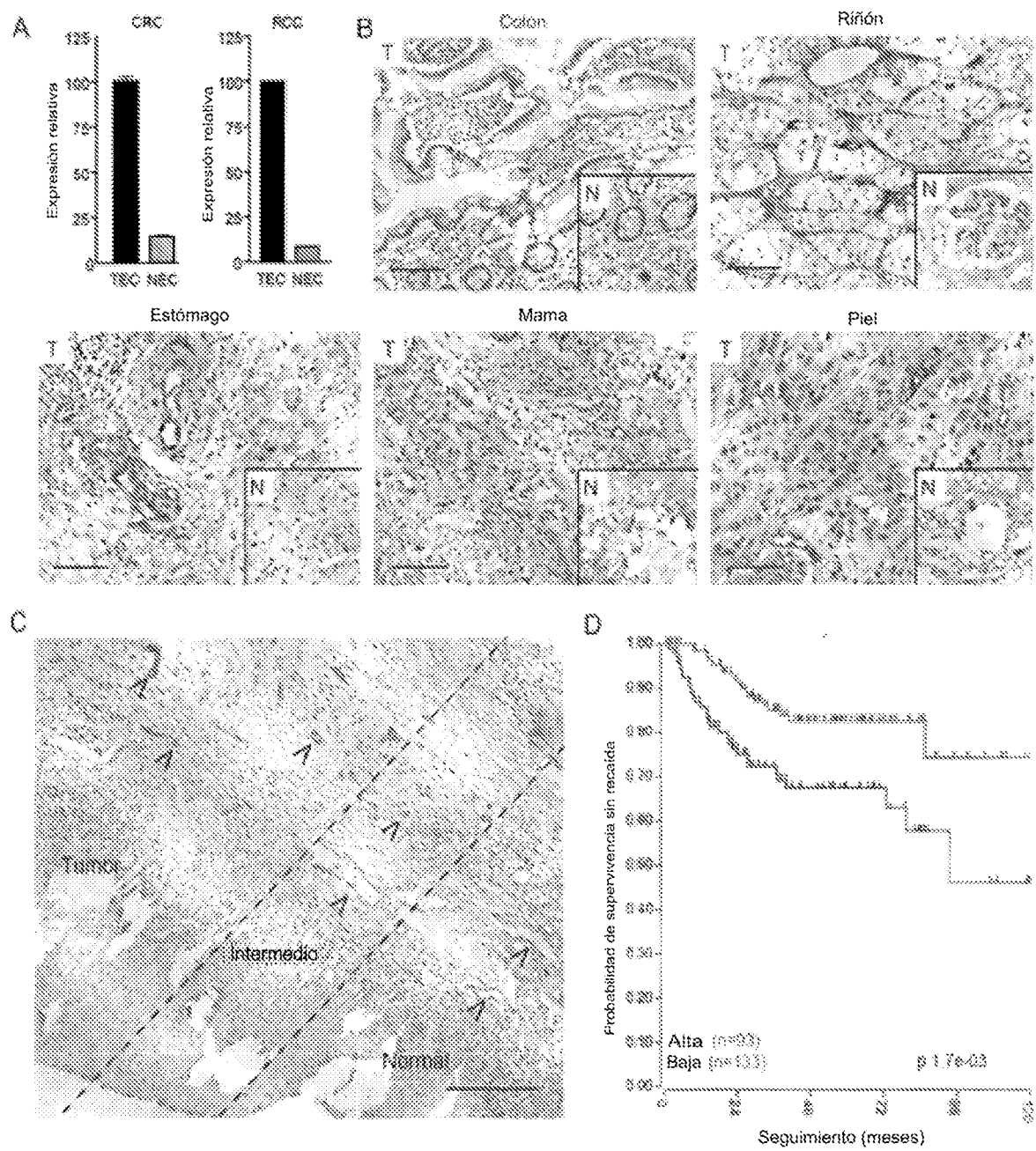


Figura 27

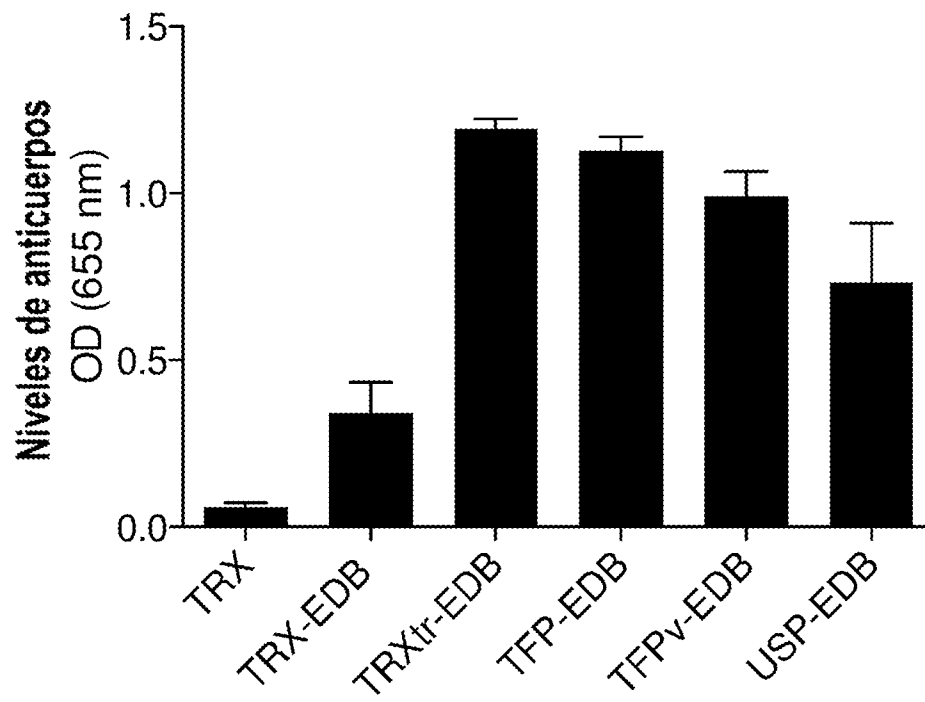


Figura 28