



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 659**

51 Int. Cl.:
A61K 38/45 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99924535 .0**
96 Fecha de presentación : **28.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1082415**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2001**

54 Título: **Procedimientos útiles para la modulación de la angiogénesis que utilizan la tirosina cinasa Src.**

30 Prioridad: **29.05.1998 US 87220 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73 Titular/es: **The Scripps Research Institute**
10550 North Torrey Pines Road
Mail Drop TRC 8
La Jolla, California 92037, US
The Government of the United States of America

72 Inventor/es: **Cheresh, David, A.;**
Eliceiri, Brian y
Schwartzberg, Pamela L.

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 361 659 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

Procedimientos útiles para la modulación de la angiogénesis que utilizan la tirosina cinasa Src.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente al campo de la medicina, y se refiere específicamente a procedimientos y composiciones para modular la angiogénesis de tejidos que utilizan la proteína tirosina cinasa Src, variantes de Src y a los ácidos nucleicos que las codifican.

10

Antecedentes

La angiogénesis es un proceso de vascularización tisular que implica el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en un tejido, y se hace asimismo referencia al mismo como neovascularización. El procedimiento está mediado por la infiltración de células endoteliales y células de músculo liso. El procedimiento se cree que procede en alguna de las tres formas: los vasos pueden brotar de vasos preexistentes, el desarrollo de nuevos vasos puede surgir de células madre (vasculogénesis) o pequeños vasos existentes pueden aumentar de diámetro. Blood *et al.*, *Bioch. Biophys. Acta*, 1032:89-118 (1990).

15

20

La angiogénesis es un proceso importante en el desarrollo de los recién nacidos, pero es también importante en la cicatrización de heridas y en la patogenia de una gran variedad de enfermedades clínicas incluyendo la inflamación de tejidos, artritis, crecimiento tumoral, retinopatía diabética, degeneración macular por neovascularización de la retina y enfermedades similares. Estas manifestaciones clínicas asociadas a la angiogénesis se denominan enfermedades angiogénicas. Folkman *et al.*, *Science*, 235:442-447 (1987). La angiogénesis está generalmente ausente en tejidos de adultos o maduros, aunque se produce en la cicatrización de heridas y en el ciclo del crecimiento del cuerpo lúteo. Véase, por ejemplo, Moses *et al.*, *Science*, 248:1408-1410 (1990).

25

Se ha propuesto que la inhibición de la angiogénesis sería una terapia útil para restringir el crecimiento tumoral. La inhibición de la angiogénesis ha sido propuesta por (1) inhibición de la liberación de "moléculas angiogénicas" tales como FGFb (factor de crecimiento de fibroblastos básico), (2) neutralización de moléculas angiogénicas, tales como mediante la utilización de anticuerpos anti- β bFGF, (3) utilización de inhibidores de receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_3$ y (4) inhibición de la respuesta de células endoteliales a estímulos angiogénicos. Esta última estrategia ha recibido atención, y Folkman *et al.*, *Cancer Biology*, 3:89-96 (1992), han descrito varios inhibidores de la respuesta a las células endoteliales, incluyendo el inhibidor de colagenasa, los inhibidores de recambio de la membrana basal, esteroides angioestáticos, inhibidores de la angiogénesis procedente de hongos, factor 4 de plaquetas, trombospondina, fármacos para la artritis tales como D-penicilamina y tiomalato de oro, análogos de la vitamina D₃, interferón alfa y similares que pueden utilizarse para inhibir la angiogénesis. Para inhibidores adicionales propuestos de angiogénesis, véase Blood *et al.*, *Bioch. Biophys. Acta*, 1032:89-118 (1990), Moses *et al.*, *Science*, 248:1408-1410 (1990), Ingber *et al.*, *Lab. Invest.*, 59:44-51 (1988) y patentes US n^o 5.092.885, n^o 5.112.946, n^o 5.192.744, n^o 5.202.352, n^o 5.753.230 y n^o 5.766.591. Ninguno de los inhibidores de la angiogénesis descritos en las referencias anteriores implica las proteínas Src.

30

35

40

Para que se produzca angiogénesis, las células endoteliales deben degradarse en primer lugar y atravesar la membrana basal del vaso sanguíneo de manera similar a la utilizada por las células tumorales durante la invasión y la formación de la metástasis.

45

Se ha publicado anteriormente que la angiogénesis depende de la interacción entre las integrinas vasculares y las proteínas de la matriz extracelular. Brooks *et al.*, *Science*, 264:569-571 (1994). Además, se publicó que la muerte celular programada (apoptosis) de las células vasculares angiogénicas se inicia por la interacción, que estaría inhibida por determinados antagonistas de la integrina vascular $\alpha_v\beta_3$. Brooks *et al.*, *Cell*, 79:1157-1164 (1994). Más recientemente, se ha publicado que la unión de la metaloproteínasa-2 de la matriz (MMP-2) al receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) puede inhibirse utilizando antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, y de este modo inhibir la función enzimática de la proteinasa. Brooks *et al.*, *Cell*, 85:683-693 (1996).

50

55

El documento WO 98/16638 se refiere a ligandos que incluyen secuencias de aminoácidos que se unen a por lo menos dos dominios de una proteína diana, en la que ligandos particularmente preferidos incluyen los que se dirigen a los dominios 2 y 3 de la homología Src de las proteínas eucarióticas tirosina cinasas.

60

Marx, M. y Dorsch, O. (*Kidney Int.*, 1997, Vol. 51(1):110-8) dan a conocer que c-src ejerce efectos reguladores sobre la proliferación de células del mesangio, la organización citoesquelética, proteasas de la matriz y diferenciación.

Russel R. *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 1991, Vol. 88:10696-10700) publican que la fosforilación del terminal carboxilo de pp-60^{c-src}, producto del protooncogen c-src, en Tyr-527 suprime la actividad de tirosina cinasa y la transformación potencial.

65

Irby R. *et al.* (Surgical Forum, 1998, Vol. 49:395-396) dan a conocer una implicación de Src en la iniciación y evolución del cáncer de colon.

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere a la modulación de la angiogénesis en tejidos por la tirosina cinasa Src, además en la presente memoria se denomina genéricamente Src, como se define en las reivindicaciones.

10 Se contemplan las composiciones y utilizaciones para modular la angiogénesis en un tejido asociada a una enfermedad. Una composición que comprende una cantidad moduladora de angiogénesis de una proteína Src debe administrarse al tejido para ser considerada una enfermedad que responde a la modulación de la angiogénesis. La composición que proporciona la proteína Src puede contener proteína purificada, fragmentos de proteína biológicamente activa, proteína Src, fragmentos de proteína o proteínas de fusión de los mismos producidos por recombinación o vectores de expresión de gen/ácido nucleico para expresar una proteína Src.

15 Cuando la proteína Src se inactiva o inhibe, la modulación es una inhibición de la angiogénesis. Cuando la proteína Src está activa o activada, la modulación es una potenciación de la angiogénesis.

20 El tejido que va a tratarse puede ser cualquier tejido en el que se desee la modulación de la angiogénesis. Para la inhibición de la angiogénesis, es útil tratar el tejido enfermo en el que se produce la neovascularización perjudicial. Los tejidos ejemplificativos incluyen tejido inflamado, tumores sólidos, metástasis, tejidos que experimentan restenosis y tejidos similares.

25 Para la potenciación, es útil tratar a los pacientes con extremidades isquémicas en las que existe una escasa circulación en las extremidades de diabéticos u con otras enfermedades. Pueden tratarse también los pacientes con heridas crónicas que no cicatrizan y por lo tanto podrían beneficiarse del aumento en la proliferación de células vasculares y neovascularización.

30 Resulta particularmente preferida la utilización de la proteína Src que contiene una secuencia de aminoácidos modificada como se describe en la presente memoria. Varias proteínas Src modificadas particularmente útiles y la expresión de las mismas se describen en la presente memoria.

35 La presente invención comprende además una composición farmacéutica para estimular la angiogénesis en un tejido diana de mamífero que comprende un vector de transferencia génica vírico o no vírico que contiene un ácido nucleico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; teniendo dicho ácido nucleico un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína Src, teniendo dicha proteína Src algún resto de aminoácido en el codón 527 excepto tirosina, serina o treonina.

40 Está asimismo prevista una composición farmacéutica para inhibir la angiogénesis en un tejido diana de mamífero que comprende un vector de transferencia génica vírico o no vírico que contiene un ácido nucleico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; presentando dicho ácido nucleico un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína Src que no presenta actividad de cinasa.

Breve descripción de los dibujos

45 En los dibujos que forman parte de la presente exposición:

50 La figura 1 es una secuencia de ADNc de c-Src de pollo que es la secuencia de codificación completa con los intrones eliminados como fue descrita en primer lugar por Takeya *et al.*, *Cell*, 32:881-890 (1983). La secuencia es accesible con el número de registro en GenBank J00844. La secuencia contiene 1759 nucleótidos con el fragmento que codifica la proteína que pertenece y finaliza en las posiciones de los nucleótidos 112 y 1713 respectivas.

55 La figura 2 es la secuencia de restos de aminoácidos codificada de c-Src de pollo de la secuencia de codificación mostrada en la figura 1.

60 La figura 3 es una secuencia de ADNc de c-Src humana que fue descrita en primer lugar por Braeuninger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:10411-10415 (1991). La secuencia es accesible con el número de registro X59932 X71157 del GenBank. La secuencia contiene 2187 nucleótidos comenzando y acabando la parte que codifica la proteína en las posiciones 134 y 1486 de nucleótidos respectivas.

65 La figura 4 es la secuencia del resto de aminoácidos codificada de la c-Src humana de la secuencia de codificación representada en la figura 3.

La figura 5 ilustra la activación de la Src endógena por FGFb o VEGF como se describe en el Ejemplo 4. La parte superior de la figura indica los resultados de un ensayo *in vitro* con cinasa con la activación doblada de c-Src

endógena por FGFb y VEGF. La parte inferior de la figura es el ensayo de transferencia de la cinasa sondado con un anticuerpo anti-Src como control de carga para el contenido equivalente de Src e IgG.

La figura 6 ilustra el efecto de la expresión génica mediada por retrovirus de c-Src A en la angiogénesis en la membrana corioalantoica de pollo (CAM) tal como se describe en el Ejemplo 4. Las CAM de pollo de nueve días de vida se expusieron a RCAS-Src A (c-Src mutada activa) o RCAS-GFP de referencia (proteína verde fluorescente; proteína fluorescente indicadora) retrovirus o tampón durante 72 h. Se cuantificó el nivel de angiogénesis como se muestra en la figura 6A con fotomicrografías (4x) representativas en la figura 6B correspondientes a cada tratamiento tomadas con un estereomicroscopio.

La figura 7 ilustra la expresión retroviral de c-Src A en la activación de la fosforilación de MAP cinasa vascular. La figura 7A muestra extractos de tejido de CAM de pollo de 10 días de vida que se habían expuesto a VEGF o PMA durante 30 minutos o se habían infectado con retrovirus de c-Src A durante 48 horas. NT no respalda ningún tratamiento. Se inmunoprecipitó Src en cantidades equivalentes de extracto total de proteína y se sometió a un ensayo con inmunocomplejo de cinasa *in vitro* utilizando proteína de fusión FAK-GST como sustrato, se realizó la electroforesis y se transfirió a nitrocelulosa. Se determinaron también alícuotas del tejido completo anterior para fosforilación de ERK endógena realizando la inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfo-ERK. La figura 7B muestra las CAM de 10 días de vida que fueron infectadas con RCAS simulado o RCAS que contiene SRC A. Después de dos días, se disecaron las CAM, se crioconservaron en OCT y se seccionaron en 4 µm. Se inmunotintaron las secciones con un anticuerpo ERK antifosforilado (New England Biolabs), se lavaron y se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado con anti-FITC de conejo en cabra. Se capturaron imágenes fluorescentes en una cámara con CCD enfriado (Princeton Inst.).

La figura 8 ilustra el requisito selectivo para la actividad de Src durante VEGF, pero no la angiogénesis inducida por FGFb. Las CAM de pollito de nueve días de vida se expusieron a RCAS-Src 251 o a retrovirus RCAS-GFP de referencia o a tampón durante 20 horas y a continuación se incubaron durante 72 horas más en presencia o ausencia de FGFb o de VEGF. El nivel de angiogénesis se cuantificó como se describió anteriormente en la figura 8A, y se tomaron fotomicrografías representativas (6x) con un estereomicroscopio como se muestra en la figura 8B. La figura 8C muestra una transferencia sondada con un anticuerpo anti-Src para confirmar la expresión de Src 251 en células transfectadas en comparación con tratamientos simulados.

La figura 9 ilustra los resultados de la administración retroviral de RCAS-Src 251 a tumores humanos. La figura 9A es una micrografía que muestra un fragmento de tumor meduloblastoma humano infectado con RCAS-GFP (RCAS-proteína verde fluorescente) que expresa GFP exclusivamente en los vasos sanguíneos del tumor (cabeza de flecha) tal como se detecta por seccionamiento óptico con un microscopio de barrido con focal de BioRad (barra = 500 µm). La figura 9B representa los datos de tumores tratados con la aplicación tópica de retrovirus, que se dejaron crecer durante 3 ó 6 días después de los cuales se extirparon y se determinaron los pesos en húmedo. Se expresan datos como el cambio medio en el peso del tumor (desde los 50 mg de peso de partida del tumor) ± SEM de 2 réplicas. La figura 9C representa micrografías representativas, tumores de meduloblastoma extirpados quirúrgicamente del embrión (barra = 350 µm). Los paneles inferiores son vistas en gran ampliación de cada tumor que muestran los vasos sanguíneos de cada tumor con detalle (barra = 350 µm). La cabeza de flecha indica la destrucción de vasos sanguíneos en tumores tratados con RCAS-Src 251.

La figura 10 es un diagrama que ilustra una cartografía de restricción del montaje del vector RCASPB (RCAS).

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Resto de aminoácido: Aminoácido formado en la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Los restos de aminoácido descritos en la presente memoria se encuentran preferentemente en la forma isomérica "L". Sin embargo, los restos en la forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier resto de L-aminoácido, siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH₂ se refiere al grupo amino presente en el terminal amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el terminal carboxilo de un polipéptido de acuerdo con la nomenclatura de polipéptido convencional (descrita en *J. Biol. Chem.*, 243:3552-59 (1969) y adoptada en 37 CFR §1.822(b) (2)).

Debe apreciarse que todas las secuencias de restos de aminoácidos están representadas en la presente memoria por las fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional del terminal amino al terminal carboxilo. Además, un guión al comienzo o final de una secuencia de restos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos.

Polipéptido: se refiere a una matriz lineal de restos de aminoácidos conectada a otra por enlaces peptídicos entre el grupo amino en alfa y el grupo carboxilo de los restos de aminoácidos contiguos.

Péptido: tal como se usa en la presente memoria se refiere a una matriz lineal de no más de aproximadamente 50 restos de aminoácidos conectados uno a otro como en un polipéptido.

Péptido cíclico: se refiere a un compuesto que tiene una estructura en anillo que incluye varios enlaces amida como en un péptido típico. El péptido cíclico puede ser un péptido cíclico homodético "cabeza con cola", o puede contener una estructura en anillo heterodética en la que el anillo está cerrado por puentes disulfuro, puentes lactama, tioésteres, tioamidas, guanidino y enlaces similares.

Proteína: se refiere a una matriz lineal de más de 50 restos de aminoácidos conectados uno a otro como en un polipéptido.

Proteína de fusión: se refiere a un polipéptido que contiene por lo menos dos dominios de polipéptido diferentes unidos funcionalmente mediante un enlace peptídico típico ("fusionado"), en el que los dos dominios corresponden a péptidos no unidos de naturaleza fusionada.

Péptido sintético: se refiere a una cadena producida químicamente de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos que está exenta de proteínas naturales y fragmentos de las mismas.

B. Consideraciones generales

La presente invención se refiere generalmente al descubrimiento de que la angiogénesis está mediada por la proteína tirosina cinasa Src, y que la angiogénesis puede modularse proporcionando proteínas Src activas o inactivas para potenciar o inhibir la angiogénesis, respectivamente.

Este descubrimiento es importante debido a la función que la angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos, desempeña en una variedad de procesos patológicos. Cuando los tejidos asociados a una enfermedad requieren angiogénesis para el desarrollo del tejido, es deseable inhibir la angiogénesis y de este modo inhibir el crecimiento del tejido enfermo. Cuando el tejido lesionado requiere angiogénesis para el crecimiento del tejido y la cicatrización, es deseable potenciar o activar la angiogénesis y de este modo favorecer la cicatrización y crecimiento del tejido.

Cuando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es la causa de la patología asociada a un tejido enfermo, o contribuye a la misma, la inhibición de la angiogénesis reduce los efectos nocivos de la enfermedad. Al inhibir la angiogénesis, se puede intervenir en la enfermedad, mejorar los síntomas, y en algunos casos curar la enfermedad.

Los ejemplos de tejido asociado a la enfermedad y a la neovascularización que se beneficiarán de la modulación inhibitoria de la angiogénesis incluyen la artritis reumatoidea, la retinopatía diabética, las enfermedades inflamatorias, la restenosis y similares. Cuando se necesita el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para soportar el crecimiento de un tejido nocivo, la inhibición de la angiogénesis reducirá el suministro de sangre al tejido y contribuye así a la reducción en la masa del tejido basándose en requisitos de suministro de sangre.

Los ejemplos incluyen el crecimiento de los tumores cuando la neovascularización es un requisito continuo para que el tumor crezca más allá de unos pocos milímetros de espesor, y para el establecimiento de metástasis del tumor sólido.

Cuando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos contribuye a la cicatrización del tejido, la potenciación de la angiogénesis ayuda a la cicatrización. Los ejemplos incluyen el tratamiento de pacientes con extremidades isquémicas en las que existe poca circulación en las extremidades en los limbos de enfermos de diabetes o de otras enfermedades. Se contemplan también para el tratamiento, los pacientes con heridas crónicas que no cicatrizan y por consiguiente podrían beneficiarse de un aumento en la proliferación y la neovascularización de células vasculares.

Las utilidades de la presente invención son eficaces en parte porque la terapia es muy selectiva para la angiogénesis y no para otros procesos biológicos.

Como se describió anteriormente, la angiogénesis incluye una variedad de procesos que implican neovascularización de un tejido incluyendo el "brote", la vasculogénia, o alargamiento de vasos, procesos de angiogénesis son efectuados en su totalidad por la proteína Src. Con excepción de la cicatrización de heridas traumáticas, la formación del cuerpo lúteo y la embriogénia, se cree que la mayoría de los procesos de angiogénesis están asociados a procesos patológicos. Por lo tanto, las presentes terapias son selectivas para la enfermedad y no tienen efectos secundarios nocivos.

C. Proteínas Src

Una proteína tirosina cinasa Src para su utilización en la presente invención puede variar dependiendo de la utilización deseada. Los términos "proteína Src" o "Src" se utilizan para referirse a las varias formas de proteínas tirosina cinasa Src descritas en la presente memoria, en formas activa o inactiva.

Una "proteína Src activa" se refiere a alguna de entre una variedad de formas de proteína Src que potencian la angiogénesis. Los ensayos para medir la potenciación de la angiogénesis se describen en la presente memoria, y no deben considerarse limitativos. Una proteína se considera activa si el nivel de angiogénesis es por lo menos 10% superior, preferentemente 25% superior, y más preferentemente 50% superior a un nivel de referencia en el que no se añade Src al sistema analítico. El ensayo preferido para medir la potenciación en el ensayo de CAM utilizando el vector vírico RCAS tal como se describe en los ejemplos en los que el índice angiogénico se calcula contando los puntos de ramificación. Una proteína Src activa preferida presenta también actividad de tirosina cinasa. Las proteínas Src activas ejemplificativas se describen en los ejemplos e incluyen Src-A.

Una "proteína Src inactiva" hace referencia a cualquiera de entre una variedad de formas de la proteína Src que inhiben la angiogénesis. En la presente memoria se describen los ensayos para medir la inhibición de la angiogénesis, y se proporcionan de manera no limitativa. Una proteína es considerada inactiva si el nivel de la angiogénesis es por lo menos 10% inferior, preferentemente 25% inferior, y más preferentemente 50% inferior a un nivel de control en el que no se añade al sistema de ensayo ninguna Src exógena. El ensayo preferido para medir la inhibición es el ensayo CAM que utiliza el vector viral RCAS como se describe en los ejemplos en el que el índice angiogénico es calculado mediante el conteo de los puntos de ramificación. Una proteína Src inactiva preferida presenta además una actividad de tirosina cinasa reducida. Las proteínas Src inactivas ejemplificativas se describen en los ejemplos, y comprenden la Src-251.

Una proteína Src útil en la presente invención puede producirse en alguno de una variedad de procedimientos incluyendo el aislamiento de fuentes naturales que incluyen tejido, producción por expresión y purificación del ADN recombinante, y similares. La proteína Src puede también suministrarse "in situ" por introducción de un sistema de terapia génica al tejido de interés que a continuación expresa la proteína en el tejido.

Un gen según una proteína Src puede prepararse por varios procedimientos conocidos en la técnica, y la invención no se considera limitativa a este respecto. Por ejemplo, los antecedentes naturales de Src son bien conocidos por incluir una variedad de homólogos procedentes de especies de mamífero, aves, virus y similares, y el gen puede clonarse fácilmente utilizando métodos de clonación de ADNc de cualquier tejido que exprese la proteína. Una Src preferida para su utilización en la invención es una proteína celular, tal como los homólogos de mamífero o ave denominados c-Src. Se prefiere particularmente una c-Src humana.

D. Moléculas de ADN recombinante y sistemas de expresión para la expresión de una proteína Src

La invención describe varias secuencias nucleotídicas de utilización específica en la presente invención. Estas secuencias incluyen secuencias que codifican una proteína Src útil en la invención, y varios segmentos de ADN, moléculas de ADN recombinante (ADNr) y vectores construidos para la expresión de la proteína Src.

Las moléculas (segmentos) de ADN de la presente invención por consiguiente pueden por lo tanto comprender secuencias que codifican genes estructurales completos, fragmentos de genes estructurales y unidades de transcripción descritas con mayor detalle en la presente memoria.

Un segmento de ADN preferido es una secuencia nucleotídica que codifica una proteína Src como la definida en la presente memoria, o fragmentos biológicamente activos de la misma.

La secuencia de restos de aminoácidos y la secuencia nucleotídica de una c-Src preferida se describen en los ejemplos.

Un segmento de ADN preferido codifica una secuencia de restos de aminoácidos sustancialmente la misma que, y preferentemente constituida esencialmente por, una secuencia de restos de aminoácidos o porciones de la misma correspondiente a la proteína Src descrita en la presente memoria. Segmentos de ADN representativos y preferidos se describen con mayor detalle en los ejemplos.

La secuencia de restos de aminoácidos de una proteína o polipéptido está directamente relacionada por el código genético con la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) del gen estructural que codifica la proteína. De este modo, un gen estructural o segmento de ADN, puede definirse por lo que respecta a la secuencia de restos de aminoácidos, es decir, proteína o polipéptido, que codifica.

Una propiedad importante y bien conocida del código genético es su redundancia. Es decir, para la mayoría de los aminoácidos utilizados para construir proteínas, más de un triplete (codón) de nucleótidos de codificación pueden codificar o designar un resto de aminoácido específico. Por consiguiente, un número de diferentes secuencias nucleotídicas puede codificar una secuencia de restos de aminoácidos específicos. Dichas secuencias nucleotídicas se consideran funcionalmente equivalentes ya que pueden dar como resultado la producción de la misma secuencia de restos de aminoácidos en todos los organismos. Ocasionalmente, una variante metilada de una purina o pirimidina puede incorporarse en una secuencia nucleotídica dada. Sin embargo, dichas metilaciones no afectan a la relación de codificación en modo alguno.

Un ácido nucleico es cualquier fragmento de polinucleótido o de ácido nucleico, si es un polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, es decir ARN o ADN o análogo del mismo. En las formas de realización preferidas, una molécula de ácido nucleico está en forma de un segmento de ADN doble, es decir, un segmento de ADN, aunque para determinadas metodologías de la biología molecular, resulta preferido el ADN o ARN monocatenario.

Los segmentos de ADN son producidos por numerosos medios incluyendo procedimientos de síntesis química y métodos recombinantes, preferentemente por clonación o por reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los segmentos de ADN que codifican fragmentos de una proteína Src pueden sintetizarse fácilmente por técnicas químicas, por ejemplo, el procedimiento del fosfotriéster de Mateucci *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185-3191, 1981, o utilizando procedimientos de síntesis automatizados. Además, pueden prepararse fácilmente segmentos de ADN más largos por procedimientos bien conocidos, tales como síntesis de un grupo de oligonucleótidos que definen el segmento de ADN, seguidos de hibridación y ligadura de oligonucleótidos para construir el segmento completo. Los métodos alternativos incluyen el aislamiento de un segmento de ADN preferido por RCP con un par de cebadores de oligonucleótidos utilizados en un banco de ADNc que se cree que contiene miembros que codifican una proteína Src.

Desde luego, mediante síntesis química, pueden introducirse algunas modificaciones deseadas simplemente sustituyendo las bases apropiadas por las que codifican la secuencia de restos de aminoácidos naturales. Este procedimiento es bien conocido, y puede aplicarse fácilmente a la producción de varias proteínas Src diferentes "modificadas" descritas en la presente memoria.

Además, los segmentos de ADN consistentes esencialmente en genes estructurales que codifican una proteína Src pueden modificarse posteriormente, como por mutagenia dirigida o aleatoria, para introducir algunas sustituciones deseadas.

1. Clonación de un gen Src

Un gen Src puede clonarse a partir de una fuente adecuada de ADN genómico o de ARN mensajero (ARNm) por varios procedimientos bioquímicos. La clonación de estos genes puede realizarse según los procedimientos generales descritos en los ejemplos y como se conoce en la técnica.

Las fuentes de ácidos nucleicos para la clonación de un gen Src adecuado para su utilización en los procedimientos de la presente invención pueden incluir ADN genómico o ARN mensajero (ARNm) en forma de un banco de ADNc, procedente de un tejido que se cree que expresa estas proteínas. Un tejido preferido es el tejido pulmonar humano, aunque puede utilizarse cualquier otro tejido adecuado.

Un procedimiento de clonación preferido implica la preparación de un banco de ADNc que utiliza procedimientos habituales, y el aislamiento de la secuencia nucleotídica que codifica a Src por ampliación por RCP utilizando cebadores oligonucleótidos emparejados basándose en las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria. Alternativamente, los clones deseados de ADNc pueden identificarse y aislarse en un ADNc o un banco genómico por procedimientos convencionales de hibridación de ácido nucleico utilizando una sonda de hibridación basada en las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Otros procedimientos de aislamiento y clonación adecuados de ácidos nucleicos que codifican a Src son fácilmente evidentes para un experto en la materia.

2. Vectores de expresión

Una molécula de ADN recombinante (ADNr) que contiene un segmento de ADN que codifica una proteína Src puede producirse como se describe en la presente memoria. En particular, un ADNr expresable puede producirse enlazando operativamente (en el marco, expresamente), un vector a un segmento de ADN que codifica Src. Por lo tanto, una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN híbrido que comprende por lo menos dos ácidos nucleicos de una secuencia nucleotídica que no se encuentran normalmente juntas en la naturaleza.

La elección del vector al que está operativamente unido el segmento de ADN, depende directamente, como es conocido en la técnica, de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, de la expresión de la proteína y de la célula hospedadora que va a transformarse. Un vector adecuado para utilización en la puesta en práctica de la presente invención es por lo menos capaz de dirigir la replicación, y preferentemente también la expresión, de un gen estructural incluido en los segmentos del ADN vector al que está operativamente unido.

Los vectores de expresión tanto procarióticos como eucarióticos son conocidos por cualquier experto en materia de construcción de vectores, y están descritos por Ausubel *et al.*, in *Current Protocols in Molecular Biology*; Willey and Sons, Nueva York (1993) y por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989). Estas referencias describen también muchos de los procedimientos generales del ADN recombinante referidos en la presente memoria.

En una forma de realización, un vector adecuado incluye un replicón procariótico, es decir, una secuencia de ADN con capacidad de dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante fuera del cromosoma en una célula hospedadora procariótica, tal como una célula hospedadora bacteriana, transformada con la misma. Dichos replicones son bien conocidos en la técnica. Además, las formas de realización que incluyen un replicón procariótico incluyen además un gen cuya expresión proporciona resistencia farmacéutica a un hospedador bacteriano transformado con el mismo. Los genes con resistencia farmacéutica bacteriana típica son los que proporcionan resistencia a la ampicilina o a la tetraciclina.

Los vectores que incluyen un replicón procariótico pueden incluir además un activador procariótico que puede dirigir la expresión (transcripción y traducción) de un gen estructural en una célula hospedadora bacteriana, tal como *E. coli*, transformada con el mismo. Un activador es un elemento de control de expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de una ARN polimerasa y que se produzca la transcripción. Las secuencias activadoras compatibles con hospedadores bacterianos son por lo general proporcionadas en vectores de plásmido que contienen zonas de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN para la presente invención. Típico de dichos vectores plásmidos son pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 comercializados por Biorad Laboratories (Richmond, CA), pRSET comercializado por Invitrogen (San Diego, CA) y pPL y pKK223 comercializado por Pharmacia, Piscataway, N.J.

Los vectores de expresión compatibles con células eucarióticas, preferentemente los compatibles con células de vertebrado, pueden utilizarse también para formar las moléculas de ADN recombinante de la presente invención. Los vectores de expresión de células eucarióticas son bien conocidos en la técnica y son comercializados por varios proveedores comerciales. Por lo general, dichos vectores se proporcionan conteniendo zonas de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Son típicos de dichos vectores, pSVL y pKSV-10 (Pharmacia, pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, n° 31255), pRc/CMV (Invitrogen, Inc.) el vector preferido descrito en los ejemplos y los vectores de expresión eucarióticos similares.

Un sistema particularmente preferido para la expresión génica en el contexto de la presente invención incluye un componente de suministro génico, es decir, la capacidad para suministrar el gen al tejido de interés. Los vectores adecuados son vectores "infecciosos" tales como los virus de ADN recombinante, vectores de adenovirus o retrovirus que están modificados genéticamente para expresar la proteína deseada y tienen propiedades que permiten la infección de tejidos diana preseleccionados. Particularmente preferido es el virus del sarcoma aviar competente para la replicación (RCAS) descrito en la presente memoria.

Los sistemas de células de mamífero que utilizan virus recombinantes o elementos víricos para dirigir la expresión pueden modificarse genéticamente. Por ejemplo, cuando se utilizan vectores de expresión de adenovirus, la secuencia de codificación de un polipéptido puede estar ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el activador tardío y la secuencia principal tripartita. Este gen híbrido puede insertarse a continuación en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una zona esencial del genoma vírico (por ejemplo, zona E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y puede expresar el polipéptido en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 81:3655-3659 (1984)). Alternativamente, puede utilizarse activador 7,5 K del virus de la vacuna (por ejemplo, Mackett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 79:7415-7419 (1982); Mackett *et al.*, *J. Virol.*, 49:857-864 (1984); Panicali *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 79:4927-4931 (1982)). Son de particular interés los vectores a base del virus de papiloma bovino que tienen capacidad para replicarse como elementos extracromosómicos (Sarver *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1:486 (1981)). En resumen, después de la introducción de este ADN en las células diana, el plásmido se replica hasta aproximadamente 100 a 200 copias por célula. La transcripción del ADNc insertado no requiere integración del plásmido en el cromosoma del hospedador, proporcionando así un alto nivel de expresión. Estos vectores pueden utilizarse para la expresión estable incluyendo un marcador seleccionable en el plásmido, tal como el gen *neo*. Alternativamente, el genoma retrovírico puede modificarse para su utilización como vector que puede introducir y dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos en células hospedadoras (Cone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 81:6349-6353 (1984)). Puede también conseguirse un nivel de expresión elevado utilizando activadores inducibles, que comprenden de manera no limitativa al activador de metalotionina IIA y a los activadores del choque térmico.

Recientemente, se ha estudiado la supervivencia a largo plazo del activador del citomegalovirus (CMV) frente a la terapia génica con timidina cinasa (TK) dirigida por el activador del virus del sarcoma de Rous (VSR) en ratones lampiños con cáncer de ovario humano. La eficacia de destrucción de células de la terapia del gen TK del virus del herpes simple dirigida por el activador del CMV mediada por adenovirus se observó que es de 2 a 10 veces más eficaz que la terapia conducida por VSR. (Tong *et al.*, 1999, *Hibrydoma*, 18(1):93-97). Se ha descrito también el diseño de activadores híbridos para aplicaciones en terapia génica, que exige bajo nivel de expresión seguido de la expresión inducible de alto nivel (Suzuki *et al.*, 1996, *Human Gene Therapy*, 7:1883-1893).

Para la producción con alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, resulta preferida la expresión estable. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden transformarse con un ADNc controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, secuencias activadora y potenciadora, terminadores de transcripción, zonas de poliadenilación, etc.) y

un marcador seleccionable. Como se mencionó anteriormente, el marcador seleccionable en el plásmido recombinante proporciona resistencia a la selección y permite a las células integrar establemente el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en las estirpes celulares.

5 Por ejemplo, después de la introducción del ADN extraño, las células modificadas genéticamente pueden dejarse crecer durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, y a continuación se cambian a un medio selectivo. Pueden utilizarse numerosos sistemas de selección, que comprenden de manera no limitativa los genes de la timidina cinasas del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, *Cell*, 11:223 (1977)), fosforribosiltransferasa de hipoxantina-guanina (Szybalska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 48:2026 (1962)), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell*, 22:817 (1980)), que pueden utilizarse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además, pueden utilizarse genes que proporcionan resistencia a antimetabolitos como base de selección; por ejemplo, los genes para dhfr, que proporcionan resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 77:3567 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 78:1527 (1981); gpt, que proporciona resistencia al ácido micofenólico (Mulligan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 78:2072 (1981); neo, que proporciona resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981)); e hygro, que proporciona resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, *Gene*, 30:147 (1984)). Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, a saber, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 85:804 (1988)); y ODC (ornitina descarboxilasa) que proporciona resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (Mc Conlogue, L., en: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, ed., (1987)).

Los principales vectores contemplados para la terapia génica humana proceden de origen retrovítico. (Wilson, 1997, *Clin. Exp. Immunol.*, 107 (Sup.1):31-31; Bank *et al.*, 1996, *Bioessays* 18(12):999-1007; Robbins *et al.*, 1998, *Pharmacol. Ther.* 80(1):35-47). El potencial terapéutico de la transferencia génica y de la terapia antisentido ha estimulado el desarrollo de muchos sistemas vectoriales para tratar una variedad de tejidos. (Sistema vascular, Stephan *et al.*, 1997, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 11(2):97-110; Feldman *et al.*, 1997, *Cardiovasc. Res.*, 35(3):391-404; Vassalli *et al.*, 1997, *Cardiovasc. Res.*, 35(3):459-69; Baek *et al.*, 1988, *Circ. Res.*, 82(3):295-305; riñón, Lien *et al.*, 1997, *Kidney Int. Suppl.* 61:S85-8; hígado, Ferry *et al.*, 1998, *Hum. Gene Ther.*, 9(14):1975-81; músculo, Marshall *et al.*, 1998, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8(3):360-5). Además de estos tejidos, una diana crítica para la terapia génica humana es el cáncer, ya sea el propio tumor o los tejidos asociados (Runnebaum, 1997, *Anticancer Res.*, 17(4B):2887-90; Spear *et al.*, 1998, *J. Neurovirol.*, 4(2):133-47).

Los ejemplos específicos de sistemas vectoriales de terapia génica vírica fácilmente adaptables para su utilización en los procedimientos de la presente invención se describen brevemente a continuación. El suministro génico retrovítico ha sido revisado recientemente por Federspiel y Hughes (1998, *Methods in Cell Biol.*, 52:179-214) que describe en particular, la familia de retrovirus del virus de la leucosis aviar (VLA) (Federspiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:4931 (1996); Federspiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 91:11241(1994)). Los vectores retrovíticos, incluyendo el VLA y el virus de la leucemia murina (VLM) son descritos con MAYOR detalle por Svoboda (1998, *Gene*, 206:153-163).

Los sistemas de expresión retrovítica/adenovítica modificados pueden adaptarse fácilmente para la puesta en práctica de los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, los sistemas del virus de la leucemia murina (VLM) están revisados por Karavanas *et al.*, 1998, *Crit. Rev. en Oncology/Hematology*, 28:7-30. Los sistemas de expresión de adenovirus están revisados por Von Seggern y Nemerow en *Gene Expression Systems* (ed. Fernandez & Hoefler, Academic Press, San Diego, CA, 1999, capítulo 5, páginas 112-117).

Se ha demostrado que los sistemas de expresión de proteínas presentan una utilización eficaz tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, se ha descrito la transferencia génica eficaz a carcinomas epidermoides humanos por un vector amplicón tipo 1 del virus del herpes simple (VHS) (Carew *et al.*, 1998, *Am. J. Surg.*, 176:404-408). El virus del herpes simple se ha utilizado para la transferencia génica al sistema nervioso (Goins *et al.*, 1997, *J. Neurovirol.*, 3 (Sup.1):S80-8). Los vectores suicidas dirigidos que utilizan VSH-TK se han probado en tumores sólidos (Smiley *et al.*, 1997, *Hum. Gene Ther.*, 8(8):965-77). El virus del herpes simple vector de tipo 1 se ha utilizado para la terapia génica del cáncer en células de carcinoma de colon (Yoon *et al.*, 1998, *Ann. Surg.*, 228(3):366-74). Se han desarrollado vectores híbridos para ampliar la duración de la transfección, incluyendo VSH/VAA (virus adenoasociado) híbridos para tratar hepatocitos (Fraefel *et al.*, 1997, *Mol. Med.*, 3(12):813-825).

Se ha desarrollado virus de vacuna para terapia génica humana debido a su largo genoma (Peplinski *et al.*, 1998, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 7(3):575-88). Se ha descrito el virus de la vacuna con timidina cinasa eliminada que expresan purina nucleósido pirofosforilasa para su utilización como vector de terapia génica dirigida al tumor (Puhlman *et al.*, 1999, *Human Gene Therapy*, 10:649-657).

Se ha descrito el virus 2 adenoasociado (VAA) para su utilización en terapia génica humana, sin embargo VAA requiere un virus cooperador (tal como adenovirus o virus herpético) para la replicación óptima y el encapsulado en células de mamífero (Snoeck *et al.*, 1997, *Exp. Nephrol.*, 5(6):514-20; Rabinowitz *et al.*, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):470-5). Sin embargo, se ha descrito el encapsulado *in vitro* de un VAA recombinante infeccioso, haciendo mucho más prometedor este sistema (Ding *et al.*, 1997, *Gene Therapy*, 4:1167-1172). Se ha demostrado que la

transferencia mediada por VAA de ADNc receptor ecotrópico de retrovirus permite la transducción retroviral ecotrópica de células humanas probadas y primarias (Qing *et al.*, 1997, *J. Virology*, 71(7):5663-5667). Se ha demostrado la terapia génica del cáncer que utiliza un vector VAA que expresa p53 natural humano (Qazilbash *et al.*, 1997, *Gene Therapy*, 4:675-682). Se ha demostrado también la transferencia génica en células vasculares que utiliza vectores VAA (Maeda *et al.*, 1997, *Cardiovascular Res.*, 35:514-521). Se ha demostrado VAA como vector apropiado para la terapia génica dirigida al hígado (Xiao *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72(12):10222-6). Se han demostrado los vectores VAA para su utilización en la terapia génica de tejidos cerebrales y del sistema nervioso central (Chamberlin *et al.*, 1998, *Brain Res.*, 793(1-2):169-75; During *et al.*, 1998, *Gene Therapy*, 5(6):820-7). Se han comparado también los vectores VAA con los vectores de adenovirus (VAd) para la terapia génica del pulmón y la transferencia a células epiteliales de la fibrosis quística humana (Teramoto *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72(11):8904-12).

Los sistemas vectoriales de la terapia génica VAd híbridos/retrovirales que incorporan las cualidades útiles de cada virus para crear VAd no integrador que resulta funcionalmente integrador mediante la generación intermedia de una célula productora retroviral (Feng *et al.*, 1997, *Nat. Biotechnology*, 15(9):866-70; Bilbao *et al.*, 1997, *FASEB J* 11, 8:624-34). Esta nueva generación potente de vector de la terapia génica se ha adaptado a la terapia génica del cáncer dirigida (Bilbao *et al.*, 1998, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 451:365-74). Una sola inyección de VAd que expresa p53 inhibió el crecimiento de los nódulos subcutáneos del tumor de las células del cáncer de próstata (Asgari *et al.*, 1997, *Int. J. Cancer*, 71(3):377-82). Se ha descrito la transferencia génica de p53 natural mediada por VAd en pacientes con cáncer de pulmón microcítico avanzado de células no microcíticas. (Schuler *et al.*, 1998, *Human Gene Therapy*, 9:2075-2082). Este mismo cáncer ha sido el tema de la terapia de sustitución del gen p53 por los vectores VAd (Roth *et al.*, 1998, *Semin. Oncol.*, 25(3 Supl. 8):33-7). La transferencia génica mediada por VAd de p53 inhibe una diferenciación de células endoteliales y la angiogénesis *in vivo* (Riccioni *et al.*, 1998, *Gene Ther.*, 5(6):747-54). También se ha descrito la expresión mediada por adenovirus del antígeno gp75 del melanoma como inmunoterapia para el melanoma metastásico (Hirschowitz *et al.*, 1998, *Gene Therapy*, 5:975-983). VAd facilita la infección de células humanas con retrovirus ecotrópico y aumenta la eficacia de la infección retroviral (Scott-Taylor *et al.*, 1998, *Gene Ther.*, 5(5):621-9). Se han utilizado vectores de VAd para la transferencia génica a las células vasculares del músculo liso (Li *et al.*, 1997, *Chin. Med. J. (Engl.)*, 110(12):950-4), células de carcinoma epidermoide (Goebel *et al.*, 1998, *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 119(4):331-6), células de cáncer de esófago (Senmaru *et al.*, 1998, *Int. J. Cancer*, 78(3):366-71), células de mesangio (Nahman *et al.*, 1998, *J. Invest. Med.*, 46(5):204-9), células gliales (Chen *et al.*, 1998, *Cancer Res.*, 58(16):3504-7), y en las articulaciones de animales (Ikeda *et al.*, 1998, *J. Rheumatol.*, 25(9):1666-73). Más recientemente, se ha demostrado la transferencia génica pericárdica a base de catéter mediada por vectores de VAc (March *et al.*, 1999, *Clin. Cardiol.*, 22 (1 Supl.1):123-9). La manipulación del sistema VAd con los elementos genéticos de control apropiados permite la expresión génica *in vivo* de la diana regulable mediada por VAd (Burcin *et al.*, 1999, *PNAS (USA)*, 96(2):356-60).

Se han desarrollado vectores de alfa virus para aplicaciones de la terapia génica humana, con estirpes celulares de encapsulación adecuadas para la transformación con casetes de expresión adecuadas para su utilización con virus de Sindbis y vectores derivados del virus de Semliki Forest (Polo *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:4598-4603). Se han desarrollado también sistemas a base de ARN replicón de flavivirus no citopáticos (Varnavski *et al.*, 1999, *Virology*, 255(2):366-75). El gen VSH-TK suicida que contiene vectores víricos de Sindbis se han utilizado para el direccionamiento específico en las células tumorales (Iijima *et al.*, 1998, *Int. J. Cancer*, 80(1):110-8).

Los vectores retrovirales a base de virus espumoso humano (HFV) también son prometedores como vectores de la terapia génica (Trobridge *et al.*, 1998, *Human Gene Therapy*, 9:2517-2525). Los vectores de virus espumoso han sido diseñados para la terapia génica suicida (Nestler *et al.*, 1997, *Gene Ther.*, 4(11):1270-7). Los citomegalovirus murinos recombinantes y los sistemas activadores se han utilizado como vectores para la expresión de alto nivel (Manning *et al.*, 1998, *J. Virol. Meth.*, 73(1):31-9; Tong *et al.*, 1998, *Hybridoma*, 18(1):93-7).

El suministro génico en las células que no se dividen se ha hecho posible por la generación de vectores a base de virus de Sendai (Nakanishi *et al.*, 1998, *J. Controlled Release*, 54(1):61-8).

En otros esfuerzos para permitir la transformación de células somáticas que no se dividen, se han explorado vectores lentivirales. Se ha descrito la terapia génica de la fibrosis quística que utiliza un vector a base de virus de inmunodeficiencia humana (VIH) con insuficiencia de replicación (Goldman *et al.*, 1997, *Human Gene Therapy*, 8:2261-2268). Se ha demostrado también la expresión mantenida de genes suministrados al hígado y músculo por vectores lentivirales (Kafri *et al.*, 1997, *Nat. Genet.*, 17(3) 314-7). Sin embargo, la preocupación por la seguridad es predominante, y el desarrollo del vector mejorado está procediendo rápidamente (Kim *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72(2):994-1004). El examen del VIH LTR y Tat proporciona importantes información sobre la organización del genoma para vectores en desarrollo (Sadaie *et al.*, 1998, *J. Med. Virol.*, 54(2):118-28). De este modo los requisitos genéticos para un vector a base de VIH eficaz se comprenden mejor actualmente (Gasmi *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73(3):1828-34). Se han descrito vectores autoinactivantes o estirpes celulares de encapsulación condicional (por ejemplo Zuffery *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72(12):9873-80; Miyoshi *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72(10):8150-7; Dull *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72(11):8463-71; y Kaul *et al.*, 1998, *Virology*, 249(1):167-74). se ha demostrado La transducción eficaz de linfocitos humanos y de células CD34+ por los vectores VIH (Douglas *et al.*, 1999, *Hum. Gene Ther.*, 10(6):935-45; Miyoshi *et al.*, 1999, *Science*, 283(5402):682-6). Se ha descrito la transducción eficaz de células humanas que no se dividen por los vectores lentivirales del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que minimiza las inquietudes en

seguridad utilizando vectores a base de VIH (Poeschla *et al.*, 1998, *Nature Medicine*, 4(3):354-357). Se ha demostrado la infección productiva de células mononucleares de la sangre humana por los vectores VIF (Johnston *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73(3):2491-8).

5 Aunque la manipulación de muchos vectores víricos resulta difícil, y la capacidad es limitada para insertar el ADN, se han estudiado estas limitaciones e inconvenientes. Por ejemplo, además de las estirpes celulares de encapsulación vírica simplificadas, los vectores minivíricos, procedentes del virus del herpes humano, virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) y del virus de Epstein-Barr (VEB) se han desarrollado para simplificar la manipulación del material genético y la generación de vectores víricos (Wang *et al.*, 1996, *J. Virology*, 70(12):8422-8430). Se han mostrado
10 anteriormente plásmidos adaptadores para simplificar la inserción de un ADN extraño en los vectores retrovíricos independientes del cooperador (1987, *J. Virology*, 61(10):3004-3012).

Los vectores víricos no son los únicos medios para efectuar la terapia génica, ya que se han descrito varios vectores no víricos. Un vector de suministro génico no vírico dirigido basado en la utilización del factor de crecimiento epidérmico/ADN polyplex (EGF/ADN) se ha demostrado que da como resultado un suministro génico eficaz y específico (Cristiano, 1998, *Anticancer Res.*, 18:3241-3246). Se ha demostrado la terapia génica del sistema vascular y del SNC utilizando liposomas catiónicos (Yang *et al.*, 1997, *J. Neurotrauma*, 14(5):281-97). La terapia génica temporal de la pancreatitis se ha realizado utilizando liposomas catiónicos (Denham *et al.*, 1998, *Ann. Surg.*, 227(6):812-20). Los complejos de vector/ADN a base de quitosán para suministro génico se ha demostrado que son
15 eficaces (Erbacher *et al.*, 1998, *Pharm. Res.*, 15(9):1332-9). Un vector de suministro de ADN no vírico basado en un sistema terplex se ha descrito (Kim *et al.*, 1998, 53(1-3):175-82). Los complejos de liposoma recubierto de partículas de virus se han utilizado también para efectuar la transferencia génica (Hirai *et al.*, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241(1):112-8).

25 Se ha demostrado la terapia génica del cáncer mediante inyecciones directas en el tumor del vector T7 no vírico que codifica un gen de timidina cinasa (Chen *et al.*, 1998, *Human Gene Therapy*, 9:729-736). La preparación del ADN plásmido es importante para la transferencia génica por inyección directa (Horn *et al.*, 1995, *Hum. Gene Ther.*, 6(5):656-73). Los vectores plásmidos modificados se han adaptado específicamente por inyección directa (Hartikka *et al.*, 1996, *Hum. Gene Ther.*, 7(10):1205-17).

30 De este modo, se conoce en la técnica una amplia variedad de vectores y montajes para transferencia génica/terapia génica. Estos vectores se adaptan fácilmente para su utilización en los procedimientos de la presente invención. Mediante la manipulación apropiada utilizando técnicas de ADN recombinante/biología molecular para insertar una src unida funcionalmente (activa o inactiva) en el vector de expresión/suministro seleccionado, pueden generarse muchos vectores equivalentes para la puesta en práctica de la presente invención.
35

E. Procedimientos para la modulación de la angiogénesis

40 La invención proporciona composiciones para su utilización en un procedimiento para la modulación de la angiogénesis en un tejido asociado a un proceso o enfermedad, y de este modo efectuar episodios en el tejido que dependen de la angiogénesis. Generalmente, el procedimiento comprende la administración al tejido asociado a un proceso o enfermedad, de una composición que comprende una cantidad que modula la angiogénesis de una proteína Src o vector de ácido nucleico que expresa Src activa o inactiva.

45 Como se describe en la presente memoria, alguno de una variedad de tejidos, u órganos compuesto por tejidos organizados, puede soportar angiogénesis en enfermedades incluyendo la piel, músculo, intestino, tejido conectivo, articulaciones, huesos y tejidos similares en los que los vasos sanguíneos pueden invadir en estímulos angiogénicos.

50 El paciente tratado según la presente invención en sus muchas formas de realización es deseable que sea un paciente humano, aunque debe apreciarse que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todos los mamíferos, que se pretende estén incluidos en el término "paciente". En este contexto, debe apreciarse que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en la que el tratamiento del tejido asociado a enfermedades que implican angiogénesis es deseable, particularmente especies de mamíferos agrícolas y
55 domésticos.

De este modo la utilización comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que contiene una proteína Src o vector de ADN para expresar una proteína Src en la puesta en práctica de la utilización de la invención.
60

Los intervalos de la dosis para la administración de una proteína Src dependen de la forma de la proteína, y de su potencia, tal como se describe con mayor detalle en la presente memoria. Las cantidades de dosis son lo suficientemente grandes para que produzcan el efecto deseado en el que la angiogénesis y los síntomas de la enfermedad mediados por angiogénesis mejoran. La dosis no debería ser tan grande, sin embargo, como para producir efectos secundarios adversos tal como los síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, y similares. Generalmente, la dosis variará con la edad, enfermedad, sexo del paciente, y el
65

alcance de la enfermedad en el paciente, y puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia. La dosis puede ser ajustada también por cada médico en caso de cualquier complicación.

5 Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de proteína Src, o de ácido nucleico que codifica la proteína Src (activa o inactiva), suficiente para producir una modulación detectable de angiogénesis en el tejido que se está tratando, es decir, una cantidad moduladora de la angiogénesis. La modulación de la angiogénesis puede medirse por el ensayo CAM descrito en la presente memoria, o por otros procedimientos conocidos por un experto en la materia.

10 La proteína Src o el vector de ácido nucleico que expresa la proteína Src puede administrarse por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo. Aunque puede accederse al tejido que va a ser tratado puede por lo general en el cuerpo por administración generalizada, y por consiguiente se trata más frecuentemente por administración intravenosa de composiciones terapéuticas, se contemplan también otros tejidos y medios de administración. De este modo, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía
15 intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, dentro de la cavidad, por vía transdérmica, y pueden administrarse por medios peristálticos.

20 Las composiciones terapéuticas que contienen una proteína Src o vector de ácido nucleico que expresa la proteína Src pueden administrarse convencionalmente por vía intravenosa, como, por ejemplo, mediante inyección de una dosis unitaria. La expresión "dosis unitaria" cuando se utiliza con relación a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitaria para el paciente, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido; es decir, excipiente o vehículo.

25 En una forma de realización preferida el reactivo se administra en una dosis unitaria por vía intravenosa. La administración localizada puede realizarse por inyección directa o aprovechando la ventaja de los compartimentos anatómicamente aislados, aislando la microcirculación de los sistemas del órgano diana, la reperusión en un sistema de circulación, u oclusión temporal a base de catéter de las regiones diana del sistema vascular asociadas a los tejidos enfermos.

30 Las composiciones se administran de manera compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que debe administrarse y el programa depende del paciente que se está tratando, de la capacidad del sistema del paciente para utilizar el principio activo, y del grado del efecto terapéutico deseado. Las cantidades exactas de principio activo requeridas que deben administrarse dependen del criterio del
35 médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados para la aplicación general se dan a conocer en la presente memoria y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a uno o más intervalos de hora mediante una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se contempla la inyección intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la
40 sangre en los intervalos especificados para las terapias *in vivo*.

1. Inhibición de la angiogénesis

45 La inhibición de la angiogénesis es importante en una variedad de enfermedades, denominadas enfermedades angiogénicas. Dichas enfermedades comprenden de manera no limitativa trastornos inflamatorios tales como la inflamación inmunitaria y no inmunitaria, el reumatismo articular crónico y la psoriasis, los trastornos asociados a la invasión inapropiada o inoportuna de vasos tales como la retinopatía diabética, el glaucoma neovascular, la restenosis, la proliferación capilar en placas ateroscleróticas y la osteoporosis, y los trastornos asociados al cáncer, tales como los tumores sólidos, la metástasis del tumor sólido, los angiofibromas, la fibroplasia retrolenticular, los
50 hemangiomas, el sarcoma de Kaposi y cánceres similares que requieren neovascularización para soportar el crecimiento del tumor.

Por lo tanto, los procedimientos que inhiben la angiogénesis en un tejido asociado a un estado patológico mejoran los síntomas de la enfermedad y dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a curar la enfermedad. En una
55 forma de realización, la invención contempla la inhibición de la angiogénesis, por sí misma, en un tejido asociado a un estado patológico. El alcance de la angiogénesis en un tejido, y por lo tanto el alcance de la inhibición conseguida por los presentes procedimientos, puede evaluarse por una variedad de procedimientos.

60 De este modo, en una forma de realización relacionada, un tejido que debe tratarse es un tejido inflamado y la angiogénesis que debe ser inhibida es la angiogénesis del tejido inflamado cuando existe neovascularización del tejido inflamado. En esta clase el procedimiento contempla la inhibición de la angiogénesis en tejidos artríticos, tal como en paciente con reumatismo articular crónico, en tejidos inflamados inmunes o no inmunes, en tejido psoriásico y similares.

65 En otra forma de realización relacionada, un tejido que debe tratarse es un tejido de la retina de un paciente con una enfermedad retiniana, tal como la retinopatía diabética, la degeneración macular o el glaucoma neovascular y la

angiogénesis que debe inhibirse es la angiogénesis del tejido retiniano en la que existe neovascularización del tejido retiniano.

5 En una forma de realización relacionada adicional, un tejido que debe tratarse es un tejido tumoral de un paciente con un tumor sólido, una metástasis, un cáncer de piel, un cáncer de mama, un hemangioma o angiofibroma y el cáncer similar, y la angiogénesis que debe inhibirse es la angiogénesis del tejido tumoral donde existe neovascularización de un tejido tumoral. Los tejidos de tumor sólido típicos tratables por los presentes procedimientos incluyen los tejidos de pulmón, páncreas, mama, colon, laringe, ovario y similares. La inhibición de la angiogénesis del tejido tumoral es una forma de realización particularmente preferida debido a la importante función que la neovascularización desempeña en el crecimiento del tumor. En ausencia de neovascularización del tejido tumoral, el tejido tumoral no obtiene los nutrientes requeridos, disminuye el crecimiento, cesa el crecimiento adicional, empeora y por último se vuelve necrosa dando como resultado la destrucción del tumor.

15 Dicho en otras palabras, la presente invención proporciona composiciones para su utilización en un procedimiento de inhibición de la neovascularización del tumor inhibiendo la angiogénesis del tumor según los presentes procedimientos. Asimismo, la invención proporciona composiciones para su utilización en un procedimiento de inhibición de crecimiento del tumor poniendo en práctica los procedimientos de inhibición de angiogénesis.

20 Los procedimientos son también particularmente eficaces contra la formación de metástasis porque (1) su formación requiere la vascularización de un tumor primario de modo que las células de cáncer metastásico pueden salir del tumor primario y (2) su establecimiento en una zona secundaria requiere la neovascularización para soportar el crecimiento de la metástasis.

25 En una forma de realización relacionada, la invención contempla la puesta en práctica de la utilización junto con otras terapias tales como la quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para el control del establecimiento de la metástasis. La administración de inhibidor de angiogénesis se realiza por lo general durante o después de la quimioterapia, resulta preferido inhibir la angiogénesis después de un régimen de quimioterapia a veces donde el tejido tumoral será el que responde al asalto tóxico induciendo angiogénesis para recuperar la provisión de un suministro de sangre y nutrientes al tejido tumoral. Además, resulta preferido administrar las utilidades de inhibición de la angiogénesis después de la intervención quirúrgica donde los tumores sólidos han sido extirpados como profilaxis contra la metástasis.

35 Siempre que las presentes utilidades se aplican a la inhibición de la neovascularización del tumor, pueden aplicarse también los procedimientos a la inhibición del crecimiento del tejido tumoral, a la inhibición de la formación de metástasis del tumor y al empeoramiento de los tumores arraigados.

40 La restenosis es un proceso de migración de células del musculo liso (SMC) y proliferación en el tejido en la zona de la angioplastia coronaria transluminal percutánea que obstaculiza el éxito de la angioplastia. La migración y la proliferación de las SMC durante la restenosis puede considerarse un proceso de la angiogénesis que está inhibido por los presentes procedimientos. Por consiguiente, la invención contempla además la inhibición de la restenosis inhibiendo la angiogénesis según los presentes procedimientos en un paciente después de los procedimientos de angioplastia. Para la inhibición de la restenosis, se administra tirosina cinasa inactivada por lo general después del procedimiento de angioplastia porque la pared del vaso coronario está en situación de riesgo de restenosis, por lo general desde aproximadamente 2 a aproximadamente 28 días, y más por lo general durante aproximadamente los primeros 14 días después del procedimiento.

50 La presente utilización para inhibir la angiogénesis en un tejido asociado a una enfermedad y por consiguiente para poner en práctica además los procedimientos para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la angiogénesis, comprende poner en contacto un tejido en el que la angiogénesis se produce, o está en situación de riesgo de producirse, con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína Src inactivada o un vector que expresa la proteína.

55 La inhibición de la angiogénesis y del empeoramiento del tumor ocurre desde 7 días después de la puesta en contacto inicial con la composición terapéutica. La exposición adicional o prolongada a la proteína Src inactiva resulta preferida durante 7 días a 6 semanas, preferentemente aproximadamente 14 a 28 días.

2. Potenciación de la angiogénesis

60 En los casos en los que se desea estimular o potenciar la angiogénesis, es útil la administración de una proteína Src activa al tejido. Las vías y el programa de administración son comparables a las utilidades descritas anteriormente en la presente memoria para la inhibición.

F. Composiciones terapéuticas

65 La presente invención contempla composiciones terapéuticas útiles para poner en práctica las utilidades terapéuticas descritas en la presente memoria. Las composiciones terapéuticas de la presente invención contienen

un vehículo fisiológicamente tolerable junto con una proteína Src o vector que puede expresar una proteína Src descrita en la presente memoria, disuelta o dispersada en la misma como principio activo. En una forma de realización preferida, la composición terapéutica no es inmunógena cuando se administra a un mamífero o paciente humano con fines terapéuticos.

5 Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y las variaciones gramaticales de la mismas, en la medida en que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se utilizan indistintamente y representan que los materiales son capaces de la administración a o en un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, indisposiciones gástricas y similares.

15 La preparación de una composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersos en la misma está bien comprendida en la técnica y no necesita limitarse a la formulación. Por lo general dichas composiciones se preparan en forma de soluciones o suspensiones inyectables, sin embargo, pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en forma líquida antes de su utilización. La preparación puede también emulsionarse o presentarse en forma de una composición de liposomas.

20 El principio activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su utilización en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente invención. Los excipientes adecuados, son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de las mismas. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tal como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH y similares que aumentan la eficacia del principio activo.

25 La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de cualesquiera componentes formadores de sales en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden proceder también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

35 Los vehículos fisiológicamente tolerables para los principios activos son bien conocidos en la técnica. A título de ejemplo de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y el agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambas, tal como la solución salina tamponada con fosfato. Aún más, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

40 Las composiciones líquidas pueden contener también fases líquidas además de y con la exclusión de agua. A título de ejemplo de dichas fases líquidas adicionales son la glicerina, aceites vegetales tales como el aceite de semillas de algodón y las emulsiones de agua-aceite.

45 Una composición terapéutica contiene una cantidad moduladora de angiogénesis de una proteína Src de la presente invención, o vector de expresión de ADN recombinante suficiente para expresar una cantidad eficaz de proteína Src, por lo general formulada para que contenga una cantidad de por lo menos 0,1 por ciento en peso de proteína Src por peso de composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una relación en peso de proteína de Src a la composición total. Por lo tanto, por ejemplo, 0,1% por ciento en peso es 0,1 gramos de proteína Src por 100 gramos de composición total. Para los vectores de expresión del ADN, la cantidad administrada depende de las propiedades del vector de expresión, del tejido que debe tratarse y de consideraciones similares.

G. Artículo de preparación

55 Un artículo de preparación que es un recipiente etiquetado puede utilizarse para suministrar una proteína Src. Un artículo de preparación comprende material encapsulado suministrado con etiquetado apropiado para la enfermedad que va a ser tratada y un agente farmacéutico contenido en el material encapsulado.

60 El agente farmacéutico en un artículo de preparación es cualquiera de las composiciones de la presente invención adecuada para suministrar una proteína Src y formulado en una forma farmacéuticamente aceptable como se describe en la presente memoria según las indicaciones descritas. Por lo tanto, la composición puede comprender una proteína Src o una molécula de ADN que es capaz de expresar una proteína Src. El artículo de preparación contiene una cantidad de agente farmacéutico suficiente para su utilización en el tratamiento de una enfermedad indicada en la presente memoria, ya sea en dosis unitarias o múltiples.

65 El material encapsulado comprende una etiqueta que indica la utilización del agente farmacéutico contenido en el mismo, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades asistido por la inhibición o potenciación de angiogénesis, y

enfermedades similares descritas en la presente memoria. La etiqueta puede incluir además instrucciones para su utilización e información relacionada en la medida que pueda ser necesaria para su comercialización. El material encapsulado puede incluir recipiente(s) para el almacenamiento del agente farmacéutico.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión material de envase se refiere a un material tal como vidrio, plástico, papel, hoja de aluminio y similares que pueden mantener dentro de medios fijos un agente farmacéutico. Por lo tanto, por ejemplo, el material de envase pueden ser viales de plástico o vidrio, envolturas laminadas y recipientes similares utilizados para contener una composición farmacéutica que incluye el agente farmacéutico.
- 10 En las formas de realización preferidas, el material de envase incluye una etiqueta que es una expresión tangible que describe el contenido del artículo de preparación y la utilización del agente farmacéutico contenido en el mismo.

Ejemplos

- 15 Los ejemplos siguientes que se refieren a la presente invención se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

1. Preparación de montajes de expresión de c-Src

- 20 Para preparar los montajes de expresión útiles en la modulación de la angiogénesis por los procedimientos de la presente invención, se manipula y se inserta ADNc con c-Src en un montaje/vector de expresión.

La secuencia de ADNc que codifica la c-Src de pollo natural (es decir, endógena) se representa en la figura 1 (SEC. ID. nº 2) con la secuencia del resto de aminoácido codificada representada en la figura 2 (SEC. ID. nº 3). La secuencia de proteínas codificada se traduce en las posiciones de los nucleótidos 112 a 1713 del ADNc. La secuencia de ácidos nucleicos correspondiente a la secuencia de ácidos nucleicos del ADNc con c-Src humano (SEC. ID. nº 4) y las secuencias de restos de aminoácidos codificadas (SEC. ID. nº 5) se representan respectivamente en las figuras 3 y 4. Para la secuencia de proteínas humana, la secuencia de codificación comienza en las posiciones 134 a 1486 de nucleótidos del ADNc.

Se prepararon los ADNc con c-Src naturales así como numerosos mutados. Se prepararon montajes de c-Src mutados por mutagenia dirigida como describe Kaplan *et al.*, *EMBO J.*, 13:4745-4756, (1994). Los montajes de c-Src mutados para codificar proteínas c-Src mutadas para su utilización en los procedimientos de la presente invención están descritas en Kaplan *et al.*, *id.* Kaplan *et al.* describen varios montajes de c-Src mutados y proteínas codificadas de utilidad para la puesta en la puesta en práctica de la presente invención. Por ejemplo, Kaplan *et al.* representa varios productos de alelos de c-Src de pollo en su figura 1, incluyendo SrcA y Src251.

Se describen dos categorías de función de c-Src para modular la angiogénesis. Como se expuso anteriormente, una categoría contiene moléculas Src que aumentan la angiogénesis y se considera así que son proteínas activas. La Src natural junto con varias mutaciones se presenta en la presente invención para provocar angiogénesis. Una mutación de c-Src natural que funciona en este contexto con respecto a su capacidad para provocar crecimiento de vasos sanguíneos y por consiguiente aumentar el peso del tumor *in vivo* es el mutante A de Src que presenta una mutación puntual en la posición 527 del resto de aminoácidos (aa) que cambia la tirosina 527 por fenilalanina. Este punto es normalmente un punto para la regulación negativa por la c-Src cinasa, denominado cinasa CSK. Cuando CSK fosforila aa527 en la src natural, la proteína se inactiva. Sin embargo, en Src A mutada la tirosina reguladora convertida en fenilalanina proporcionando así una proteína constitutivamente (es decir, permanentemente) activa no sometida a inactivación por fosforilación.

Se ha demostrado también que las mutaciones en src tienen el efecto modulador opuesto en la angiogénesis, inhibiendo la angiogénesis en lugar de estimularla. Dichas mutaciones se denominan mutaciones de src inactivas. Las proteínas con mutación que proporcionan esta actividad inhibidora se denominan también proteínas Src dominantes negativas porque inhiben la neovascularización, incluyendo las que proceden de la actividad endógena de Src así como de la actividad Src aumentada resultante de la estimulación del factor de crecimiento. Por lo tanto determinadas mutaciones de c-Src natural de la presente invención pueden funcionar también como una dominante negativa con respecto a su capacidad para bloquear el crecimiento de vasos sanguíneos, y por ejemplo, por lo tanto disminuir el peso del tumor *in vivo*.

Dicha proteína c-Src inhibidora preferida incluye la Src 251 en la que solamente se expresan los primeros 251 aminoácidos de Src. Este montaje carece del dominio cinasa completo y por consiguiente se denomina proteína src "cinasa muerta". Un segundo montaje es la mutación de Src (K295M) en la que el resto 295 el aminoácido lisina se muta en una metionina. Esta mutación puntual en el dominio de cinasa impide que el ATP se una y también bloquea las funciones Src dependientes de cinasa relacionadas con la señalización y proliferación de células vasculares y células tumorales.

Por ejemplo, para la mutación en el resto 527, con tal que el resto de aminoácido mutado resultante no sea tirosina, serina o treonina, la presente invención contempla la presencia de un aminoácido alternativo en la posición deseada dará como resultado una proteína Src con actividad moduladora estimulante de angiogénesis, activa deseada.

- 5 Con respecto a las mutaciones puntuales, cualquier mutación que produzca actividad inhibidora o estimulante deseada se contempla para su utilización en la presente invención. Los montajes de proteína de fusión que combinan la proteína src deseada (mutación o fragmento de la misma) con etiquetas de aminoácido, epítopos antigénicos, proteína fluorescente u otra de dichas proteínas o péptidos expresados se contemplan también, siempre que el efecto modulador deseado de la proteína Src esté intacto.

10

TABLA I

Src/Mutación	Función de Src	Efectos de angiogénesis
c-Src	+	activa estimula
SrcA (T527F)	+	activa estimula
Src527(puntual)	+	activa estimula
Src251	-	inactiva inhibe
Src (truncada)	-	inactiva inhibe
Src (K295M)	-	inactiva inhibe
Src295 (puntual)	-	inactiva inhibe

15 Un montaje de expresión preferido para su utilización en la presente invención es el montaje RCASBP(A) (SEC. ID. nº 1). Este vector de expresión se basa en una serie de virus de sarcoma aviar competente con replicación con aumento de una polimerasa de Bryan (PB) para valor mejorado, y es específico para la glucoproteína tipo A de la envoltura expresada en células aviarias normales (examinado en *Methods in Cell Biology*, 52:179-214, (1997); véanse también, Hughes *et al.*, 1987, *J. Virol.*, 61:3004-3012; Fekete & Cepko, 1993, *Moll. Cellular Biol.*, 13(4):2604-2613; Itoh *et al.*, 1996, *Development*, 122:291-300; y Sttrot *et al.*, 1998, *BioTechniques*, 24:660-666). La secuencia completa de RCASBP(A) (SEC. ID. nº 1) se proporciona en el listado de secuencias adjunto, y una cartografía de restricción del montaje se representa como figura 10, a la que se hace referencia en la presente memoria como RCAS.

25 El montaje Src 251 original fue subclonado por el Dr. Pam Schwartzberg, en NIH en el laboratorio del Dr. Harold Varmus. En resumen, la clonación de una secuencia de ADNc con src para la expresión del mismo se realizó insertando un enlazador que contenía las secuencias de restricción Not I-BstB1-Not I en una única secuencia Not I en el extremo 5' de Src 251. Src tiene una única secuencia Cla I en el extremo 3'. La digestión de Src 251 con Bst B1 y Cla I generó un fragmento de BstB1-Cla I que se ligó a continuación en la secuencia Cla I en RCASBP(A). Una prominencia de BstB1 permite que la ligadura con una prominencia de Cla I no se recorte con Cla I. Los montajes de Src adecuados para su utilización en la puesta en práctica de la presente invención se obtienen fácilmente en el vector anterior digiriendo en primer lugar el vector RCAS que contiene Src 251 con Not I y Cla I (en un DAM + fondo) para permitir que la inserción de un ADNc con Src se digiera igualmente. Por consiguiente este montaje RCASBP(A) inicial que contenía Src 251 se utilizó más para subclonar todos los demás montajes de Src descritos anteriormente y en Kaplan *et al.* (1994, *The EMBO J.*, 13(20):4745-4756), en RCASBP(A) mediante un fragmento Not I-Cla I generado mediante la construcción Src 251. Para producir las mutaciones de c-Src deseadas en el ADNc, se utilizaron procedimientos de mutagenia dirigidos conocidos por cualquier experto en la materia. Los cebadores de RCP diseñados para incorporar las mutaciones deseadas se diseñaron también con secuencias de restricción para facilitar las etapas de clonación posteriores. Los segmentos completos de secuencias de ácido nucleico que codifican a Src se eliminan de los montajes de ácido nucleico por técnicas de ampliación de RCP basadas en las secuencias conocidas de ADNc de pollo, humanas y homólogos similares de Src y la formación posterior de nuevos montajes.

45 En una forma de realización de la invención, el cebador de RCP 3' utilizado para ampliar ácidos nucleicos con src codifica también una secuencia en el marco. La utilización de este cebador añade una etiqueta de epítipo 9E10-myc al terminal carboxilo del montaje Src posterior.

50 Se añadieron los aminoácidos siguientes después del aminoácido 251 de Src para generar montajes vectoriales que contenían la etiqueta de epítipo 9E10-myc: VDMEQKLI AEEDLN (SEC. ID. nº 6). Se llevaron a cabo dos RCP por separado para cada montaje y se obtuvieron resultados similares. Todos los montajes mutantes contruidos por RCP se secuenciaron también por RCP para confirmar la secuencia de ADN prevista de clones. Los ADNc con Src natural y mutado para su utilización en los sistemas de expresión de la presente invención están también disponibles en Upstate Biotech Laboratories, Lake Placid, NY. que comercializa src aviar así como humano, y varias formas mutadas de cinasa muerta y activada.

55 Los vectores de expresión alternativos para su utilización en la expresión de las proteínas Src de la presente invención incluyen además vectores adenovíricos como se describe en las patentes US nº 4.797.368, nº 5.173.414, nº 5.436.146, nº 5.589.377 y nº 5.670.488. Los procedimientos alternativos para la administración de las proteínas moduladoras de Src incluyen la administración del ADNc de Src con un sistema de vector no vírico tal como se

describe en la patente US nº 5.675.954 y la administración del propio ADNc en forma de ADN desnudo tal como se describe en la patente US nº 5.589.466. La administración de montajes de la presente invención no se limita tampoco a la aplicación tópica de un vector vírico tal como se describe en el sistema analítico CAM a continuación. Por ejemplo, las preparaciones de vector vírico se inyectan también por vía intravenosa para la administración generalizada en el lecho vascular. Estos vectores son también dirigibles a secuencias de neovascularización aumentada por inyección localizada de un tumor, como ejemplo.

Las proteínas expresadas *in vitro* se contemplan también para la administración de las mismas después de la expresión y purificación de la proteína Src seleccionada por procedimientos útiles para la administración de proteínas o polipéptidos. Dicho procedimiento incluye sistemas de administración de liposomas, tal como se describe en las patentes US nº 4.356.167, nº 5.580.575, nº 5.542.935 y nº 5.643.599. Otros sistemas de administración de vector y proteína son bien conocidos por cualquier experto en la materia para su utilización en la expresión y/o administración de las proteínas Src de la presente invención.

2. Caracterización de la membrana corioalantoica (CAM) de pollito no tratada

A. Preparación de la CAM

La angiogénesis puede producirse en la membrana corioalantoica de pollito (CAM) una vez que la angiogénesis embrionaria normal ha producido la formación de vasos sanguíneos maduros. Se ha demostrado que la angiogénesis se produce en respuesta a citocinas específicas o fragmentos de tumor como describe Leibovich *et al.*, *Nature*, 329:630 (1987) y Ausprunk *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 79:597 (1975). Se prepararon CAM a partir de embriones de pollito por inducción posterior de angiogénesis e inhibición de la misma. Se extirparon embriones de pollito de diez días de vida de McIntyre Poultry (Lakeside, CA) y se incubaron a 37°C con 60% de humedad. Se hizo un pequeño orificio a través de la cáscara en el extremo del huevo directamente sobre el saco de aire utilizando un pequeño taladro manual (Dremel, Division of Emerson Electric Co. Racine WI). Se perforó un segundo orificio en el lado ancho del huevo en una zona desprovista de vasos sanguíneos embrionarios determinada anteriormente mirando el huevo a través. Se aplicó presión negativa al orificio original, lo que se produjo en la CAM (membrana corioalantoica) empujando hacia fuera la membrana de la cáscara y creando un falso saco aéreo sobre la CAM. Se cortó una ventana cuadrada de 1,0 centímetro (cm) x 1,0 cm a través de la cáscara sobre la CAM bajada mediante la utilización de un pequeño modelo de perforador de rotativo (Dremel). La pequeña ventana dejó acceso directo a la CAM subyacente.

La preparación de CAM resultante se utilizó a continuación a los 6 días de embriogenia, una etapa marcada por la neovascularización activa, sin tratamiento adicional al CAM reflejando el modelo utilizado para evaluar los efectos sobre la neovascularización o utilizada a los 10 días de la embriogenia donde ha subsistido la angiogénesis. Esta última preparación se utilizó por lo tanto en la presente invención para provocar angiogénesis renovada en respuesta al tratamiento con citocina o al contacto del tumor como se describe a continuación.

3. Ensayo de angiogénesis en CAM

A. Angiogénesis provocada por factores de crecimiento

Se ha demostrado que la angiogénesis es provocada por citocinas o factores de crecimiento.

Se provocó angiogénesis colocando un disco filtrante de 5 milímetros (mm) x 5 mm de Whatman (papel de filtro Whatman nº 1) saturado con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY) o HBSS que contenía 2 microgramos/mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante (FGFb) o factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) (Genzyme, Cambridge, MA) en la CAM de un embrión de pollito de 9 ó 10 días en una zona desprovista de vasos sanguíneos y las ventanas se sellaron después con cinta. Otras concentraciones de factores de crecimiento son también eficaces para provocar el desarrollo de vasos sanguíneos. Para los ensayos en los que se evalúa la inhibición de angiogénesis con inyecciones intravenosas de antagonistas, se provoca en primer lugar la angiogénesis con 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FGFb o VEGF en un medio de crecimiento de fibroblastos. Se realizó el seguimiento de la angiogénesis por fotomicroscopía después de 72 horas.

B. Angiogénesis embrionaria

La preparación de la CAM para evaluar el efecto de los inhibidores de angiogénesis en la formación natural de nuevos vasos sanguíneos embrionarios es el embrión de pollito embrionario de 6 días como se describió anteriormente. En esta etapa en desarrollo, los vasos sanguíneos están experimentando crecimiento nuevo y se proporciona así un sistema útil para evaluar la modulación de la angiogénesis por las proteínas Src de la presente invención. El sistema de CAM se prepara tal como se describió anteriormente con la excepción de que el ensayo se realiza en el 6º día embrionario en lugar de en el 9º ó 10º día.

4. Modulación de la angiogénesis medida en el ensayo de la CAM

Para evaluar el efecto de las proteínas Src en la angiogénesis, se llevaron a cabo los siguientes ensayos en preparaciones de CAM de pollito de 10 días de vida. Cinco µg de montajes RCAS preparados como se describe en el Ejemplo 1 se transfectaron en la estirpe de fibroblastos inmortalizada de pollo, DF-1 (donación de Doug Foster, U. de Minn.). Esta estirpe celular así como los fibroblastos embrionarios de pollito primarios fueron capaces de producir virus, sin embargo, la estirpe celular de DF-1 produjo valores mayores. Se recogieron sobrenadantes víricos de las estirpes celulares productoras de DF-1 subconfluente en un medio CLM exento de suero [composición: base del medio F-10 enriquecida con DMSO, ácido fólico, ácido glutámico y solución de vitaminas MEM]. Treinta y cinco ml de sobrenadante vírico se concentraron por ultracentrifugación a 4°C durante 2 horas a 22.000 rpm. Estos sedimentos víricos concentrados se volvieron a poner en suspensión en 1/100 del volumen original en medio CLM exento de suero, se tomaron alícuotas y se almacenaron a -80°C. El valor se evaluó por dilución en serie de un vector vírico de referencia con una secuencia nucleotídica que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), denominada RCAS-GFP, la infección en fibroblastos del embrión de pollito primarios que se incubaron durante 48 a 72 horas. Los valores de la solución madre vírica que se obtuvieron después de la concentración excedieron rutinariamente los 10⁸ I.u./ml. Para el ensayo de CAM utilizando soluciones madre víricas, se prepararon discos filtrantes Whatman empapados en acetato de cortisona de 6 mm de diámetro en 3 mg/ml de acetato de cortisona durante 30 min. en etanol al 95%. Se secaron los discos en una campana en flujo laminar y a continuación se empaparon en 20 µl de solución madre vírica por disco durante 10 min. Estos discos se aplicaron a la CAM de embriones de pollito de 9 ó 10 días y se sellaron con cinta de celofán y se incubaron a 37°C durante a 18 a 24 h. Se añadieron a continuación PBS simulada o factores de crecimiento a una concentración de 5 µg/ml a la CAM en un volumen de 20 µl de la solución madre de virus apropiado como refuerzo adicional de virus al tejido de la CAM. Después de 72 horas, se recogieron las CAM y se examinaron los cambios del índice angiogénico determinados por el recuento doble a ciegas del número de puntos de ramificación en la CAM subyacente al disco. Para los ensayos con cinasa, el tejido subyacente al disco se recogió en RIPA, se homogeneizó con un molino de bolas motorizado y se inmunoprecipitó con Src en cantidades equivalentes de proteína total y se sometió a un ensayo *in vitro* con cinasa utilizando una proteína de fusión FAK-GST como sustrato. Para los estudios de inmunofluorescencia el tejido CAM subyacente a los discos se congeló en OCT, crioconservador, se seccionó en 4 µm, se fijó en acetona durante 1 minuto, se incubó en suero de cabra normal al 3% durante 1 hora seguido de incubación en anticuerpo anti-ERK fosforilado de conejo primario como se describió anteriormente (Eliceiri *et al.*, *J. Cell Biol.*, 140:1255-1263 (1998)), se lavó en PBS y se detectó con un anticuerpo fluorescente secundario.

A. Activación de Src endógena por FGFb o VEGF

Para evaluar los efectos de los factores de crecimiento sobre la actividad de Src en angiogénesis moduladora, se realizaron los ensayos siguientes. Se lisaron los extractos tisulares de las CAM de pollitos de 10 días de vida que habían sido expuestas a FGFb o VEGF (2 µg/ml) durante 2 horas. Se inmunoprecipitó Src endógena en cantidades equivalentes de proteína total y se sometió a un ensayo *in vitro* del complejo inmunitario con cinasa utilizando una proteína de fusión FAK-GST como sustrato, se realizó la electroforesis y se transfirió a nitrocelulosa.

Los resultados de este ensayo se representan en la figura 5 en la que el aumento en la actividad de Src es evidente en el aumento de densidad del gel con tratamiento con FGFb o VEGF en comparación con las muestras (simuladas) sin tratar que son indicativas de la actividad de Src de referencia en el ensayo de CAM. Tanto FGFb como VEGF dieron como resultado aproximadamente un aumento al doble de la actividad de Src endógena presente en la CAM. El ensayo de transferencia de cinasa anterior se probó también con un anticuerpo anti-Src como control de carga para el contenido equivalente de Src e IgG.

B. Efecto de la expresión génica mediada por retrovirus de Src A sobre la angiogénesis en la CAM de pollito

Se llevó a cabo el ensayo siguiente para evaluar el efecto de las proteínas Src mutadas sobre la angiogénesis en la preparación de CAM. Para este ensayo, las CAM de pollito de 9 días de vida se expusieron a retrovirus que expresan RCAS-Src A o RCAS-GFP o tampón durante 72 horas siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de este ensayo se representan en la figura 6A en la que el nivel de angiogénesis se cuantificó como se describió anteriormente. Se tomaron fotomicrografías (4x) representativas con un estereomicroscopio como se representa en la figura 6B. La actividad de Src endógena de referencia tiene un índice angiogénico de aproximadamente 50. Por el contrario, las CAM tratadas con RCAS-Src A expresadas en el vector retroviral que tiene una mutación puntual en la posición 527 del resto de aminoácidos desde una tirosina a una fenilalanina produjo un aumento (inducción) de angiogénesis de un índice angiogénico de aproximadamente 90. El aumento de la angiogénesis mediado por Src-A es también evidente en las fotografías representadas en la figura 6B.

C. Expresión retroviral de Src A activa la fosforilación de MAP cinasa vascular

El efecto de Src A comparado con VEGF y PMA de los factores de crecimiento sobre la fosforilación de cinasa de la MAP vascular se evaluó también siguiendo los procedimientos de ensayo descritos anteriormente y en la presente memoria. Los extractos tisulares de las CAM de pollito de 10 días de vida expuestos a VEGF o PAM (otro mitógeno a una concentración comparable) durante 30 minutos se compararon a los infectados con retrovirus que expresa a Src A durante 48 horas. A continuación se inmunoprecipitó Src en cantidades equivalentes de extracto de proteína

total y se sometió a un ensayo de inmunocomplejo cinasa *in vitro* utilizando una proteína de fusión FAK-GST como sustrato, se realizó la electroforesis y se transfirió a nitrocelulosa.

5 Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 7A donde las CAM (NT) sin tratar presentan fosforilación de cinasa de MAP vascular mediada por Src endógena de referencia. Tanto VEGF como PAM produjeron un aumento al doble aproximado sobre la referencia. En cambio, Src A aumentó la actividad aproximadamente 5 a 10 veces sobre la observada con las muestras sin tratar.

10 Se midieron también las alícuotas de los lisados de tejido completo anteriores para la fosforilación de ERK endógena por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfo-ERK como se muestra en la figura 7B. Para esta evaluación, se infectaron las CAM de pollitos de 10 días de vida con RCAS simulada o RCAS que expresa a Src A. Después de dos días, se disecaron las CAM, se crioconservaron en OCT y se seccionaron a 4 µm. Las secciones se inmunotiniaron con un anticuerpo anti-ERK fosforilado (New England Biolabs), se lavaron y se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado con anti-FITC de conejo en cabra. Se capturaron imágenes fluorescentes en una cámara CCD enfriada (Princeton Inst.). Las fotomicrografías indican aumento de inmunofluorescencia en las preparaciones tratadas con Src A en comparación con las referencias simuladas.

D. Requisito selectivo para la activación de Src durante la angiogénesis provocada por VEGF, pero no por FGFb

20 Para evaluar el efecto de la actividad moduladora de Src sobre la angiogénesis provocada por el factor de crecimiento, se llevaron a cabo los siguientes ensayos. Se expusieron las CAM de pollito de nueve días de vida a la preparación de vector retroviral que expresaba la mutación de Src negativa dominante denominada Src 251 o Src K295M como se describió anteriormente. Los retrovirus de RCAS-Src 251 o RCAS-GFP de referencia o el tampón CAMS se trataron durante 20 horas y a continuación se incubaron durante 72 horas más en presencia o ausencia FGFb o VEGF.

30 El nivel de angiogénesis, cuantificado como se describió anteriormente, se muestra en la figura 8A. Las fotomicrografías representativas (6x), representadas en la figura 8B, se tomaron con un estereomicroscopio. La figura 8C ilustra una transferencia sondada con un anticuerpo anti-Src para confirmar la expresión de Src 251 en células transfectadas en comparación con tratamientos simulados.

35 Los resultados de los ensayos descritos anteriormente indican que las CAM tratadas tanto con FGFb como con VEGF en presencia de referencias de RCAS-GFP provocaban angiogénesis superior a la angiogénesis de referencia mediada por Src observada con preparaciones de CAM simuladas o sin tratar. El mutante Src 251 negativo dominante expresado fue eficaz inhibiendo la angiogénesis inducida por VEGF a niveles de referencia mientras que no fue eficaz inhibiendo la angiogénesis mediada por FGFb. Las fotomicrografías representadas en la figura 8B confirman gráficamente los datos mostrados en la figura 8A. De este modo, Src 251 expresada en retrovirus es un inhibidor eficaz de angiogénesis, cuando la angiogénesis es provocada con VEGF.

40 Las aplicaciones de las proteínas Src de la presente invención con otros modelos de angiogénesis descritos en los ejemplos a continuación se contemplan en la presente invención.

5. Regresión del crecimiento del tejido tumoral con moduladores de Src medida por el ensayo del modelo de ojo de conejo *in vivo*

45 El efecto de los moduladores de Src sobre la angiogénesis provocada por el factor de crecimiento puede observarse en estructuras naturales transparentes como se ilustra mediante la córnea del ojo. Nuevos vasos sanguíneos crecen en el borde de la córnea, que tiene un aporte rico en sangre, hacia el centro de la córnea, que normalmente no tiene un aporte de sangre. Los estimuladores de angiogénesis, tal como FGFb, cuando se aplican a la córnea provocan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el borde de la córnea. Los antagonistas de angiogénesis, aplicados a la córnea, inhiben el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el borde de la córnea. Por lo tanto, la córnea experimenta angiogénesis mediante una invasión de células endoteliales procedentes del borde de la córnea en el tejido de la córnea relleno con colágeno en bruto que es fácilmente visible. El ensayo del modelo de ojo de conejo proporciona por lo tanto un modelo *in vivo* para la observación directa de la estimulación e inhibición de la angiogénesis después de la implantación de compuestos directamente en la córnea del ojo.

A. Ensayo del modelo de ojo de conejo *in vivo*

1) Angiogénesis provocada por factores de crecimiento

60 La angiogénesis se provoca en el ensayo del modelo de ojo de conejo *in vivo* con factores de crecimiento FGFb o VEGF y se describe en los apartados siguientes.

a. Preparación de granulados Hydron que contienen factor de crecimiento y anticuerpos monoclonales

65

Se preparan granulados de polímero Hydron que contienen factor de crecimiento tal como describen D'Amato *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:4082-4085 (1994). Cada gránulo contiene 650 ng de los factores de crecimiento por separado unidos a sucralfato (Carafet, Marion Merrell Dow Corporation) para estabilizar el factor de crecimiento y garantizar su lenta liberación en el tejido circundante. Además, se preparan granulados Hydron que contienen un retrovirus que expresa Src deseada como se describió anteriormente. Los gránulos se funden en clavijas de Teflon que tienen un núcleo de 2,5 mm perforado en sus superficies. Se colocan aproximadamente 12 μ l de material de fundición en cada clavija y se polimerizan durante la noche en una caperuza estéril. Los granulados se esterilizan a continuación por irradiación ultravioleta. Los efectos de las proteínas Src se evalúan a continuación como se describió anteriormente.

6. Regresión *in vivo* del crecimiento de tejido tumoral con moduladores de Src medida por el ensayo híbrido de ratón:humano

Se genera un modelo híbrido ratón:humano *in vivo* sustituyendo una parte de la piel de un ratón SCID con prepucio de recién nacido humano. El modelo ratón:humano *in vivo* se prepara esencialmente como se describe en Yan *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 91:986-996 (1993). En resumen, un área de un cuadrado de 2 cm² de piel se extirpa quirúrgicamente de un ratón SCID (6 a 8 semanas de vida) y se reemplaza por prepucio humano. Se anestesia el ratón y se extrae pelo de un área de 5 cm² en cada lado de la región abdominal lateral por rasurado. Se preparan dos capas de injerto circular de 2 cm² retirando todo el espesor de la piel bajo la fascia. Los injertos de todo el espesor de piel humana del mismo tamaño procedentes de un prepucio de recién nacido humano se colocan en las capas de la herida y se suturan *in situ*. El injerto se cubre con una tirita que se sutura a la piel. Se aplica también cinta de tela Micropore para cubrir la herida.

La estirpe celular de melanoma humano M21-L o la estirpe celular de carcinoma de mama MDA 23.1 (ATCC HTB 26; $\alpha_v\beta_3$ negativa por inmunoreactividad de las secciones de tejido con mAb LM609), se utilizan para formar los tumores sólidos humanos sobre injertos de piel humana en ratones SCID. Una suspensión celular individual de 5 x 10⁶ células M21-L o MDA 23.1 se inyecta por vía intradérmica en el injerto de piel humana. Se observan a continuación los ratones durante 2 a 4 semanas para permitir el crecimiento de tumores humanos mensurables.

Una vez se ha creado un tumor mensurable, las preparaciones de retrovirus de la presente invención o PBS se inyecta en la vena caudal del ratón. Después de un periodo de 2 a 3 semanas, se escinde el tumor y se analiza por peso e histología. Se evalúa a continuación el efecto de las proteínas Src expresadas de la presente invención en los tumores.

7. Regresión *in vitro* del crecimiento del tejido tumoral humano con moduladores de Src medida por el ensayo de CAM

El crecimiento del tumor depende de la angiogénesis (Folkman, 1992; Weidner *et al.*, 1991; Brooks *et al.*, 1994). De hecho, recientes publicaciones sugieren que el crecimiento del tumor es sensible a los efectos antiangiogénicos de los antagonistas del receptor de VEGF (Kim *et al.*, 1993). Por lo tanto, se examinó si la supresión de la angiogénesis por administración de Src 251 sin cinasa influiría en el crecimiento de un meduloblastoma humano (DAOY), tumor muy angiogénico conocido porque produce VEGF y muy poco FGFb (datos no representados).

Los días 3 y 6 se realizaron ensayos de crecimiento del tumor DAOY de meduloblastoma en CAM de pollito esencialmente como se describió anteriormente (Brooks *et al.*, 1994). Se lavaron 5 x 10⁶ células DAOY cultivadas en RPMI 1640 que contenían suero de ternero fetal al 10% y se sembraron en la CAM de un embrión de 10 días para producir fragmentos de tumor DAOY. Después de 7 días, se disecaron fragmentos de tumor de 50 mg y se volvieron a sembrar en otro embrión de 10 días y se incubaron durante 3 ó 6 días con aplicación tópica (25 μ l) de retrovirus RCAS-GFP de referencia, RCAS-Src 251 o tratamiento simulado. Utilizando la detección por imagen confocal del tejido completo de tumores infectados como guía los autores pudo determinar que no había expresión significativa de los montajes de RCAS alrededor y en el interior del fragmento del tumor con este método tópico. Las resecciones del tumor y pesada se realizaron en un ensayo doble a ciegas extirpando solamente la masa de tumor sólido fácilmente definible (Brooks *et al.*, 1994). Los pesos de tumor sólido después de 3 ó 6 días se compararon con el peso inicial y el cambio por ciento del peso del tumor determinado para cada grupo.

Estos tumores se desarrollan fácilmente en la CAM y producen angiogénesis activa (figura 9) que permite a los autores dirigir selectivamente al sistema vascular del tumor aviar utilizando un retrovirus RCAS aviar específico.

La figura 9 representa los resultados que demuestran que la administración retroviral de RCAS-Src 251 a tumores humanos que crecen sobre la CAM del pollito invierte el crecimiento del tumor. La figura 9A presenta meduloblastomas humanos que se desarrollaron sobre la CAM de embriones de pollito como se describió anteriormente. El retrovirus que contiene RCAS-GFP o RCAS-Src 251 se aplicó por vía tópica a tumores prearraigados de más de 50 mg. Una micrografía representativa de un fragmento de tumor de meduloblastoma infectado con RCAS-GFP que expresa GFP pone de manifiesto la expresión exclusiva en los vasos sanguíneos del tumor (cabeza de flecha) como se detecta por el seccionamiento óptico con microscopio de barrido confocal de láser Bio Rad (barra = 500 μ m). La figura 9B presenta los resultados de tumores tratados como anteriormente que se

dejaron crecer durante 3 ó 6 días después de los cuales se extirparon y se determinaron los pesos en húmedo. Se expresan datos como el cambio medio en el peso del tumor (desde los 50 mg de peso de partida del tumor) \pm SEM de 2 réplicas. RCAS-Src 251 tuvo un impacto significativo en el crecimiento después de 3 días (*, $P < 0,002$) y 6 días (**, $P < 0,05$). La figura 9C presenta estereomicrografías representativas de tumores de meduloblastoma extirpados quirúrgicamente del embrión que se tomaron con un estereomicroscopio (barra = 350 μ m). (Panel inferior) Una micrografía en gran ampliación de cada tumor que muestra los vasos sanguíneos de cada tumor con detalle (barra = 350 μ m). La cabeza de flecha indica la destrucción de vasos sanguíneos en tumores tratados con RCAS-Src 251.

Los resultados demuestran que la administración de RCAS que contiene Src 251 a meduloblastomas prearraigados produjo la expresión vírica selectiva en vasos sanguíneos asociados al tumor (figura 9A) y esto por último condujo a la regresión de estos tumores en el lapso de seis días (figura 9B). De manera significativa, los vasos sanguíneos asociados al tumor en animales tratados con virus que contienen Src 251 se destruyeron gravemente y eran pocos en comparación con los vasos del tumor en los animales de referencia (figura 9C). El hecho de que los tumores infectados con RCAS-GFP presentaban una localización de GFP solamente en los vasos sanguíneos del tumor sugiere que los efectos antitumorales observados con Src 251 administrada retrovíricamente eran debidos a sus propiedades antiangiogénicas.

Listado de secuencias

- 20 <110> The Scripps Research Institute et al.
 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES ÚTILES PARA LA MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS QUE UTILIZAN TIROSINA CINASA SRC
- 25 <130> TSRI 651.1
 <140> Desconocido
 <141> Por determinar
- 30 <150> 60/087.220
 <151> 1998-05-29
 <160> 6
- 35 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 11627
 <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: RCASBP(A) basada en virus del sarcoma aviar
- 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7649)..(11258)
 <223> secuencias pBR322
- 50 <220>
 <221> LTR
 <222> (7166)..(7494)
 <223> corriente arriba
- 55 <220>
 <221> LTR
 <222> (1)..(101)
 <223> corriente arriba (numeración se inicia en R corriente arriba)
- 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11394)..(11623)
 <223> U3
- 65 <220>
 <221> misc_feature

- <222> (1) ..(21)
<223> R
- 5 <220>
<221> misc feature
<222> (22)..(101)
<223> U5
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (102)..(119)
- 15 <220>
<221> LTR
<222> (7166)..(7494)
<223> corriente abajo
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (7166)..(7393)
<223> U3
- 25 <220>
<221> misc feature
<222> (7394)..(7414)
<223> R
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (7415)..(7494)
<223> U5
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (7154)..(7165)
<223> PPT
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (388)..(391)
<223> donante de corte y empalme (AGGT)
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (5074)..(5077)
<223> aceptor de corte y empalme de env (AGGC)
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (6982)..(6985)
<223> aceptor de corte y empalme de Clal (AGGA)
- 55 <220>
<221> gen
<222> (372)..(902)
<223> gag p19
- 60 <220>
<221> gen
<222> (909)..(1094)
<223> gag p10
- 65 <220>
<221> gen
<222> (1095)..(1814)
<223> gag p27

<220>
 <221> gen
 <222> (1843)..(2108)
 5 <223> gag p12

 <220>
 <221> gen
 <222> (2109)..(2480)
 10 <223> gag p15

 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (2481)..(2483)
 15 <223> terminación gag

 <220>
 <221> gen
 <222> (2501)..(4216)
 20 <223> pol RT

 <220>
 <221> gen
 <222> (4217)..(5185)
 25 <223> pol IN

 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (5186)..(5188)
 30 <223> terminación pol

 <220>
 <221> gen
 <222> (5244)..(6263)
 35 <223> env gp85

 <220>
 <221> gene
 <222> (6264)..(6878)
 40 <223> env gp37

 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (6879)..(6881)
 45 <223> terminación env

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7027)
 50 <223> Sitio Clal / el sitio Clal en las cepas Dam+ y sin corte.

<400> 1

```

gccatttgac cattcaccac attggtgtgc acctgggttg atggccggac cgttgattcc 60
ctgacgacta cgagcacctg catgaagcag aaggcttcat ttggtgaccc cgacgtgata 120
gttagggaat agtggtcggc cacagacggc gtggcgatcc tgtctccate cgtctcgtct 180
atcgggaggc gagttcgatg accctggtgg agggggctgc ggcttaggga ggcagaagct 240
gagtaccgtc ggaggggagct ccagggcccc gagcgactga cccctgccga gaactcagag 300
ggtcgtcggg agacggagag tgagccccac gaccaccca ggcacgtctt tggtcggcct 360
  
```

gcggatcaag catggaagcc gtcattaagg tgatttcgtc cgcgtgtaaa acctattgcg 420
 ggaaaatctc tccttctaag aaggaaatcg gggccatggt gtccctgtta caaaaggaag 480
 ggttgcttat gtctccctca gatttatatt ctccggggtc ctgggatccc atcactgcgg 540
 cgctctccca gcgggcaatg gtacttgga aatcgggaga gttaaaaacc tggggattgg 600
 ttttgggggc attgaaggcg gctcgagagg aacaggttac atctgagcaa gcaaagtttt 660
 ggttgggatt agggggaggg agggctctct ccccagggtc ggagtgcac gagaaaccag 720
 ctacggagcg gcgaatcgac aaaggggagg aggtgggaga aacaactgtg cagcgagatg 780
 cgaagatggc gccagaggaa gcggccacac ctaaaaccgt tggcacatcc tgctatcatt 840
 gcggaacagc tgttggtctgca aattgcgcca ccgccacagc ctccggccct cctccccctt 900
 atgtggggag tggtttgtat ccttccctgg cgggggtggg agagcagcag ggccagggag 960
 ataacacgctc tcggggggcg gagcagcaa gggaggagcc agggcacgcy ggtcaggccc 1020
 ctgggcccgc cctgactgac tgggcaaggg taagggagga gcttgcgagt actggtccgc 1080
 ccgtgggtggc catgcctgta gtgattaaga cagagggacc cgcctggacc cctctggagc 1140
 caaaattgat cacaagactg gctgatacgg tcaggaccaa gggcttacga tccccgatca 1200
 ctatggcaga agtgggaagcg ctcatgtcct ccccggtgct gccgcatgac gtcacgaatc 1260
 taatgagagt gatttttagga cctgccccat atgccttatg gatggacgct tggggagtcc 1320
 aactccagac ggttatagcg gcagccactc gcgacccccg acaccagcag aacggtaacg 1380
 ggcgggggga acggactaac ttggatcgat taaagggctt agctgatggg atgggtgggca 1440
 acccacaggg tcaggccgca ttattaagac cgggggaatt ggttgcatt acggcgtcgg 1500
 ctctccaggc gtttagagaa gttgcccggc tggcggaaac tgcaggtcca tgggcccgca 1560
 tcacgcaggg accatctgag tcctttgttg attttgccaa tcggcttata aaggcggttg 1620
 aggggtcaga tctcccgcct tccgcggcgg ctccggtgat cattgactgc tttaggcaga 1680
 agtcacagcc agatattcag cagcttatac gggcagcacc ctccacgctg accaccccag 1740
 gagagataat caaatatgtg ctagacagcc agaagattgc ccctcttacg gatcaaggca 1800
 tagccgcggc catgtcgtct gctatccagc ccttagttat ggcagtagtc aatagagaga 1860
 5 gggatggaca aactgggtcg ggtggtcgtg cccgagggtc ctgctacact tgtggatccc 1920
 cgggacatta tcaggcacag tgcccgaaaa aacgaaagtc aggaaacagc cgtgagcgat 1980
 gtcagctgtg tgacgggatg ggacacaacg ctaaacagtg taggaagcgg gatggcaacc 2040
 agggccaacg cccaggaaga ggtctctctt cggggccggt gccccggcct gagcagcctg 2100
 ccgtctcggt agcagatgaca atggaacata aagatcgccc cttgggttagg gtcattctga 2160
 ctaacactgg gagtcatcca gtcaaaacac gttcgggtga taccacgcy ctggtggact 2220
 cgggagcggg catcactatt atttcggagg aggattggcc tactgatggg ccggtgggtg 2280
 acaccgcgaa cccacagatc catgcatag gagggggaat tcccatgca aatcccggg 2340
 atatgataga ggtgggggtt attaaccgag acgggtcgtt ggagcgacc ctgctcctct 2400
 tccccgcagt cgctatggtt agaggagta tcctaggaag agattgtctg cagggcctag 2460
 ggctccgctt gacaaattta tagggaggc cactgttctc actgttgcgc tacatctgge 2520
 tattccgctc aaatggaagc cagaccgcac gcctgtgtgg attgaccagt ggccccctcc 2580
 tgaaggtaaa cttgtaggcc taacgcaatt agtggaaaaa gaattacagt taggacatat 2640
 agagccctca cttagtgtt ggaacacacc tgtttttcgt gatccggaag gcttccgggt 2700
 cttatcgctt attgcatgat ttgcccgtg ttaacgcaa gcttgtccct tttggggccg 2760
 tccaacaggg ggcgccagtt ctctccgcgc tcccgcgtgg ctggcccctg atggctcctag 2820
 acctcaagga ttgcttcttt tctatccctc ttgcccgaaca agatcgcgaa gcttttgcat 2880
 ttacgctccc ctctgtgaat aaccaggccc ccgctcgaag attccaatgg aaggctctgc 2940
 cccaagggat gacctgttct cccactatct gtcagttggt agtgggtcag gtgctcgagc 3000
 ccttgcgact caagcaccca gctctcgca tgttgcat taaggacgat cttttgctag 3060
 ccgcctcaag tcatgatggg ttggaagcgg cagggaaagga ggttatcgg acattggaaa 3120
 gagccgggtt cactatttcg ccggataaga tccagagga gcccgagta caatatctt 3180
 10 ggtacaagtt aggcagtagc tatgtagcac ccgtaggctt ggtagcagaa cccaggatag 3240

ccacctgtg ggatgttcaa aagctggtgg ggtcacttca gtggcttcgc ccagcgtag 3300
 ggatccccgc acgactgatg ggtccctttt atgagcagtt acgagggtca gatcctaacy 3360
 aggcgagggga atggaatcta gacatgaaaa tggcctggag agagatcgta cagcttagca 3420
 ctactgctgc cttggaacga tgggaccctg cccagcctct ggaaggagcg gtcgctagat 3480
 gtgaacaggg ggcaataggg gtccctggac agggactgtc cacacacca aggccatgtt 3540
 tgtgggttatt ctcccaccaa cccaccaagg cgtttactgc ttggtttagaa gtgctcacc 3600
 ttttgattac taagctacgc gcttcggcag tgcgaacctt tggcaaggag gttgatatcc 3660
 tcctgttgcc tgcattgcttc cgggaggacc ttccgctccc ggaggggagc ctgttagcac 3720
 ttaggggggt tgcaggaaaa atcaggagta gtgacacgcc atctattttt gacattgctc 3780
 gtccactgca tgtttctctg aaagtgaggg ttaccgacca ccctgtgccc ggaccactg 3840
 tctttaccga cgcctcctca agcaccata aagggtggtt agtctggagg gagggcccaa 3900
 ggtgggagat aaaagaaata gttgatttgg gggcaagtgt acaacaactg gaggcacgcg 3960
 ctgtggccat ggcacttctg ctgtggccga caacgccac taatgtagtg actgactctg 4020
 cgtttgttgc gaaaaatgta ctcaagatgg gacaggaggg agtcccgtct acagcggcgg 4080
 cttttatttt agaggatgcg ttaagccaaa ggtcagccat ggccgcccgtt ctccacgtgc 4140
 ggagtcattc tgaagtgcc gggtttttca cagaaggaaa tgacgtggca gatagccaag 4200
 ccacctttca agcgtatccc ttgagagagg ctaaagatct tcataccgct ctccatattg 4260
 gaccccgctc gctatccaaa gcgtgtaata tatctatgca gcaggctagg gaggttgttc 4320
 agacctgccc gcattgtaat tcagccctg cgttggaggg cggggtaaac cctaggggtt 4380
 tgggaccctt acagatatgg cagacagact ttacgcttga gcctagaatg gctccccgtt 4440
 cctggctcgc tgttactgtg gacaccgct catcagcgat agtcgtaact cagcatggcc 4500
 5 gtgttacatc ggttgctgca caacatcatt gggccacggc tatcgccgtt ttgggaagac 4560
 caaaggccat aaaaacagat aacgggtcct gcttcacgtc cagatccacg cgagagtggc 4620
 tcgagagatg ggggatagca cacaccaccg ggattccggg aaattcccag ggtcaagcta 4680
 tggtagagcg ggccaaccgg ctcctgaaag ataagatccg tgtgctcggc gagggggacg 4740
 gctttatgaa aagaatcccc accagcaaac agggggaact attagccaag gcaatgtatg 4800
 ccctcaatca ctttgagcgt ggtgaaaaca caaaaacacc gatacaaaa cactggagac 4860
 ctaccgttct tacagaagga cccccggtta aaatacgaat agagacaggg gagtgggaaa 4920
 aaggatggaa cgtgctggtc tggggacgag gttatgcccg tgtgaaaaac agggacactg 4980
 ataaggttat ttgggtaccc tctcggaaa gttaaaccgga tgtcacccaa aaggatgagg 5040
 tgactaagaa agatgagggc agccctctt ttgcaggcat ttctgactgg ataccctggg 5100
 aagacgagca agaaggactc caaggagaaa ccgctagcaa caagcaagaa agaccgggag 5160
 aagacaccct tgcgccaac gagagttaat tatattctca ttattggtgt cctggtcttg 5220
 tgtgaggta cgggggtaag agctgatgtc cacttactcg agcagccagg gaacctttgg 5280
 attacatggg ccaaccgtac aggccaaaac gatttttgcc tctctacaca gtcagccacc 5340
 tcccccttcc aaacatggtt gataggtatc ccgtccccta tttccgaggg tgattttaag 5400
 ggatatgttt ctgatacaaa ttgaccacc ttgggaactg atcgggttagt ctcgtcagcc 5460
 gactttactg ggggacctga caacagtacc accctcactt atcgggaagt ctcatgcttg 5520
 ttgttaaagc tgaatgtctc tatgtgggat gagccacctg aactacagct gttagggttc 5580
 cagtctctcc ctaacattac taatattgct cagatttccg gtataaccgg gggatgcgta 5640
 ggcttcagac cacaaggggt tccttggtat ctagggtggt ctagacagga ggccacgagg 5700
 tttctcctta gacaccctc tttctctaaa tccacggaac cgtttacagt ggtgacagcg 5760
 gataggcaca atctttttat ggggagtgag tactgagggt catatggcta cagattttgg 5820
 aacatgtata actgctcaca ggtggggcgg cagtaccgct gtggtaatgc gcgcacgccc 5880
 cgcacgggtc ttcctgaaat ccagtgtaca aggagaggag gcaaatgggt taatcaatca 5940
 caggaaatta atgagtcgga gccgttcagc tttacggtga actgtacagc tagtagtttg 6000
 10 ggtaatgcca gtgggtgttg cggaaaagca ggcacgattc tccccggaaa gtgggtcgac 6060

agcacacaag gtagtttcac caaaccaaaa gcgctaccac cgcgaatttt cctcatttgt 6120
 ggggatcgcg catggcaagg aattcccagt cgtccggtag ggggccctcg ctatttaggc 6180
 aagcttacca tgtagcacc taagcataca gatattctca aggtgcttgt caattcatcg 6240
 cggacaggta taagacgtaa acgaagcacc tcacacctgg atgatacatg ctccagatgaa 6300
 gtgcagcttt ggggtcctac agcaagaatc tttgcatcta tcctagcccc gggggtagca 6360
 gctgcgcaag ccttaagaga aattgagaga ctagcctggt ggtccggtta acaggctaac 6420
 ttgacaacat cactcctcgg ggacttattg gatgatgtca cgagtattcg acacgcggtc 6480
 ctgcagaacc gagcggctat tgacttcttg ctctagctc acggccatgg ctgtgaggac 6540
 gttgccggaa tgtgctgttt caatttgagt gatcagagtg agtctataca gaagaagttc 6600
 cagctaatga aggaacatgt caataagatc ggcggtgata gcgacctaat tgggaagtgg 6660
 ctgcgaggac tattcggggg aataggagaa tgggccggtc atttgctgaa aggactgctt 6720
 ttggggcttg tagttatttt gttgctagta gtgtgcctgc cttgcctttt gcaaagtta 6780
 tgcggtaata ggagaaagat gattaataac tccatcagct accacacgga atataagaag 6840
 ctgcaaaagg cctgtgggca gcctgaaagc agaatagtat aaggcagtac atgggtggtg 6900
 gtatagcgct tgcgagtcca tcgagcaagg caggaaagac agctattggt aattgtgaaa 6960
 tacgcttttg tctgtgtgct gcaggagctg agctgactct gctgggtggc tcgctacca 7020
 ctgtggcatc gatgcatgt acggccaga tatacgcgta tctgagggga ctagggtgtg 7080
 tttaggcgaa aagcgggctc tcggttgtac gcggttagga gtccccttag gatatagtag 7140
 tttcgctttt gcatagggag ggggaaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca 7200
 acatggtaac gatgagttag caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc 7260
 gattggtgga agtaaggtgg tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga 7320
 5 catggattgg acgaaccact gaattccgca ttgcagagat attgtattta agtgccatgc 7380
 tcgatacaat aaacgccatt tgaccattca ccacattggt gtgcacctgg gttgatggcc 7440
 ggaccgttga ttccctgacg actacagaca cctgcatgaa gcagaaggct tcatttggtg 7500
 accccgacgt gatagttagg gaatagtggc cggccacaga cggcgtggcg atcctgtctc 7560
 catccgtctc gtctatcggg aggcgacttc gatgacctg gtggaggggg ctgcccctta 7620
 gggaggcaga agctgagtag cgctcggagg gatccacagg acgggtgtgg tcgccatgat 7680
 cgcgtagtgc atagtggctc caagttagca agcagacagg actggggcggc ggccaaagcg 7740
 gtcggacagt gctccgagaa cgggtgcgca tagaaattgc atcaacgcat atagcgctag 7800
 cagcacgcca tagtgactgg cgatgctgtc ggaatggacg atatcccga agaggcccgg 7860
 cagtaccggc ataaccaagc ctatgcctac agcatccagg gtgacggtgc cgaggatgac 7920
 gatgagcgca ttgttagatt tcatacacgg tgcctgactg cgtagcaat ttaactgtga 7980
 taaactaccg cattaaagct ccaaacttgg ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc 8040
 acaattccac acattatacg agccggaagc ataaagtgtg aaacctgggg tgccaatga 8100
 gtgagaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gtaaatgtca 8160
 tgataataat ggtttcttag acgtcagggt gcacttttgc gggaaatgtg cgcggaacct 8220
 ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 8280
 gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 8340
 cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 8400
 tgaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 8460
 tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 8520
 cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgcccgg caagagcaac 8580
 tcggtcgcgg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa 8640
 10 agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 8700
 ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 8760
 ttttgcaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 8820
 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc 8880
 gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 8940
 tggaggcggg taaagtgtca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta 9000

ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactggggc 9060
 cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 9120
 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 9180
 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 9240
 ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccctaa cgtgagtttt 9300
 cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 9360
 ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 9420
 tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 9480
 taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag aactctgtag 9540
 caccgcctac atacctcgtc ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 9600
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 9660
 gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 9720
 gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 9780
 ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagcct ccagggggaa 9840
 acgcttggtg tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcagtttt 9900
 tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 9960
 ggttcctggc cttttgctgg ccttttgcct acatgttctt tcctgcgcta tcccctgatt 10020
 ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgcg agccgaacga 10080
 ccgagcgcag cgagtcagtg agcggaggaag cggaaagagcg cctgatgcgg tattttctcc 10140
 ttacgcatct gtgcgggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 10200
 atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc 10260
 5 gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc 10320
 cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc 10380
 atcaccgaaa cgcgcgaggg agctgcggtg aagctcatca gcgtggctct gaagcgattc 10440
 acagatgtct gctctgtcat ccgctccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt 10500
 ctggcttctg ataaagcggg ccattgttaag ggcgggtttt tcctgtttgg tcaactgatg 10560
 cctccgtgta agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg 10620
 atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgccccgt tactggaacg ttgtgagggg 10680
 aaacaactgg ccgtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcagg tcaatgccag 10740
 cgcttcgcta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag 10800
 atccggaaca taatggtgca gggcgcctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg 10860
 aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacgca gcagtcgctt 10920
 cacgttcgct ccggtatcgg tgattcatcc tgctaaccag taaggcaacc ccgcccagct 10980
 agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgagcacc gtggccagga cccaacgctg 11040
 cccgagatgc gccgcgtgcg gctgctggag atggcggagc cgatggatat gttctgcca 11100
 gggttggtt gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttgagtg 11160
 gtgaatccgt tagcgaggtg ccgcccgtt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg 11220
 caccgcgacg caacgcgggg aggcagacaa ggtataggc ggcgatgcga tgtacgggccc 11280
 agatatacgc gtatctgagg ggactagggt gtgtttaggc gaaaagcggg gcttcggtt 11340
 tacgcggtta ggagtcacct taggatatag tagtttcgct tttgcatagg gagggggaaa 11400
 tgtagtetta tgcaatactc ttgtagtctt gcaacatggt aacgatgagt tagcaacatg 11460
 ccttacaacq aqaqaaaaaq cacctqcat gccgattggt ggaagtaagg tggtaacgat 11520
 gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat tggacgaacc actgaattcc 11580
 10 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaac 11627

<210> 2
 <211> 1759
 <212> ADN
 <213> Pollo

<220>

<221> gen
 <222> (1)..(1759)
 <223> ADNc con c-SRC de pollo

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (112)..(1710)

<400> 2

10 tctgacaccc atctgtctgt ctgtctgtgt gctgcaggag ctgagctgac tctgctgtgg 60
 cctcgcgtac cactgtggcc aggcggtagc tgggacgtgc agcccaccac c atg ggg 117
 Met Gly
 1
 agc agc aag agc aag ccc aag gac ccc agc cag cgc cgg cgc agc ctg 165
 Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro Ser Ser Gln Arg Arg Arg Ser Leu
 5 10 15
 gag cca ccc gac agc acc cac cac ggg gga ttc cca gcc tcg cag acc 213
 Glu Pro Pro Asp Ser Thr His His Gly Gly Phe Pro Ala Ser Gln Thr
 20 25 30
 ccc aac aag aca gca gcc ccc gac acg cac cgc acc ccc agc cgc tcc 261
 Pro Asn Lys Thr Ala Ala Pro Asp Thr His Arg Thr Pro Ser Arg Ser
 35 40 45 50
 ttt ggg acc gtg gcc acc gag ccc aag ctc ttc ggg ggc ttc aac act 309
 Phe Gly Thr Val Ala Thr Glu Pro Lys Leu Phe Gly Gly Phe Asn Thr
 55 60 65
 tct gac acc gtt acg tcg ccg cag cgt gcc ggg gca ctg gct ggc ggc 357
 Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Gly
 70 75 80
 gtc acc act ttc gtg gct ctc tac gac tac gag tcc cgg act gaa acg 405
 Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr Glu Thr
 85 90 95
 gac ttg tcc ttc aag aaa gga gaa cgc ctg cag att gtc aac aac acg 453
 Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn Asn Thr
 100 105 110
 gaa ggt gac tgg tgg ctg gct cat tcc ctc act aca gga cag acg ggc 501
 Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Gln Thr Gly
 115 120 125 130
 tac atc ccc agt aac tat gtc gcg ccc tca gac tcc atc cag gct gaa 549
 Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp Ser Ile Gln Ala Glu
 135 140 145
 gag tgg tac ttt ggg aag atc act cgt cgg gag tcc gag cgg ctg ctg 597
 Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg Leu Leu
 150 155 160
 ctc aac ccc gaa aac ccc cgg gga acc ttc ttg gtc cgg gag agc gag 645
 Leu Asn Pro Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu
 165 170 175
 acg aca aaa ggt gcc tat tgc ctc tcc gtt tct gac ttt gac aac gcc 693
 Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp Asn Ala
 180 185 190
 aag ggg ctc aat gtg aag cac tac aag atc cgc aag ctg gac agc ggc 741
 Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg Lys Leu Asp Ser Gly
 195 200 205 210
 ggc ttc tac atc acc tca cgc aca cag ttc agc agc ctg cag cag ctg 789
 Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Ser Ser Leu Gln Gln Leu
 215 220 225
 gtg gcc tac tac tcc aaa cat gct gat ggc ttg tgc cac cgc ctg acc 837
 Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg Leu Thr
 230 235 240
 aac qtc tqc ccc acq tcc aag ccc cag acc cag gga ctc gcc aag gac 885
 Asn Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln Gly Leu Ala Lys Asp
 245 250 255
 gcg tgg gaa atc ccc cgg gag tcg ctg cgg ctg gag gtg aag ctg ggg 933
 Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu Glu Val Lys Leu Gly
 260 265 270
 cag ggc tgc ttt gga gag gtc tgg atg ggg acc tgg aac ggc acc acc 981
 Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr Trp Asn Gly Thr Thr
 275 280 285 290

aga gtg gcc ata aag act ctg aag ccc ggc acc atg tcc ccg gag gcc 1029
 Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr Met Ser Pro Glu Ala
 295 300 305

ttc ctg cag gaa gcc caa gtg atg aag aag ctc cgg cat gag aag ctg 1077
 Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu Arg His Glu Lys Leu
 310 315 320

gtt cag ctg tac gca gtg gtg tcg gaa gag ccc atc tac atc gtc act 1125
 Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Val Thr
 325 330 335

gag tac atg agc aag ggg agc ctc ctg gat ttc ctg aag gga gag atg 1173
 Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe Leu Lys Met Gly Glu Met
 340 345 350

ggc aag tac ctg cgg ctg cca cag ctc gtc gat atg gct gct cag att 1221
 Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp Met Ala Ala Gln Ile
 355 360 365 370

gca tcc gcc atg gcc tat gtg gag agg atg aac tac gtg cac cga gac 1269
 Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn Tyr Val His Arg Asp
 375 380 385

ctg cgg gcg gcc aac atc ctg gtg ggg gag aac ctg gtg tgc aag gtg 1317
 Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Leu Val Cys Lys Val
 390 395 400

gct gac ttt ggg ctg gca cgc ctc atc gag gac aac gag tac aca gca 1365
 Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp Asn Glu Tyr Thr Ala
 405 410 415

cgg caa ggt gcc aag ttc ccc atc aag tgg aca gcc ccc gag gca gcc 1413
 Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ala
 420 425 430

ctc tat ggc cgg ttc acc atc aag tcg gat gtc tgg tcc ttc ggc atc 1461
 Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile
 435 440 445 450

ctg ctg act gag ctg acc acc aag ggc cgg gtg cca tac cca ggg atg 1509
 Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val Pro Tyr Pro Gly Met
 455 460 465

gtc aac agg gag gtg ctg gac cag gtg gag agg ggc tac cgc atg ccc 1557
 Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg Gly Tyr Arg Met Pro
 470 475 480

tgc ccg ccc gag tgc ccc gag tcg ctg cat gac ctc atg tgc cag tgc 1605
 Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp Leu Met Cys Gln Cys
 485 490 495

5 taa caa aag aac cct aag aag cgg ccc act ttt gag tac ctg cag gcc 1653
 Trp Arg Arg Asp Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ala
 500 505 510

ttc ctg gag gac tac ttc acc tcg aca gag ccc cag tac cag cct gga 1701
 Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro Gln Tyr Gln Pro Gly
 515 520 525 530

gag aac cta taggcctgga gctcctcctg gaccagaggg ctcgctgtgg ggtacaggg 1759
 Glu Asn Leu

<210> 3
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> Pollo

<400> 3

Met Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro Ser Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Glu Pro Pro Asp Ser Thr His His Gly Gly Phe Pro Ala Ser
 20 25 30

Gln Thr Pro Asn Lys Thr Ala Ala Pro Asp Thr His Arg Thr Pro Ser
 35 40 45

Arg Ser Phe Gly Thr Val Ala Thr Glu Pro Lys Leu Phe Gly Gly Phe
 50 55 60

Asn Thr Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr
 85 90 95

Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn
 100 105 110

Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Gln
 115 120 125

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp Ser Ile Gln
 130 135 140
 Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Asn Pro Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu
 165 170 175
 Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp
 180 185 190
 Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg Lys Leu Asp
 195 200 205
 Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Ser Ser Leu Gln
 210 215 220
 Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Asn Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln Gly Leu Ala
 245 250 255
 Lys Asp Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu Glu Val Lys
 260 265 270
 Leu Gly Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr Trp Asn Gly
 275 280 285
 Thr Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr Met Ser Pro
 290 295 300
 Glu Ala Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu Arg His Glu
 305 310 315 320
 Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro Ile Tyr Ile
 325 330 335
 Val Thr Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe Leu Lys Gly
 340 345 350
 Glu Met Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp Met Ala Ala
 355 360 365
 Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn Tyr Val His
 370 375 380
 Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Leu Val Cys
 385 390 395 400
 Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp Asn Glu Tyr
 405 410 415
 Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu
 420 425 430
 Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe
 435 440 445
 Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val Pro Tyr Pro
 450 455 460
 Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg Gly Tyr Arg
 465 470 475 480
 Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp Leu Met Cys
 485 490 495
 Gln Cys Trp Arg Arg Asp Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe Glu Tyr Leu
 500 505 510
 Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro Gln Tyr Gln
 515 520 525
 Pro Gly Glu Asn Leu
 530

5

10

15

20

<210> 4
 <211> 2187
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(2187)
 <223> ADNc con c-SRC humano

<220>
 <221> CDS
 <222> (134)..(1483)

<400> 4

```

gcgccgcgtc cgcagggccg tgatgccgcc cgcgcggagg tggcccggac cgcagtgccc 60
caagagagct ctaatggtac caagtgcacag gttggcttta ctgtgactcg gggacgccag 120
agctcctgag aag atg tca gca ata cag gcc gcc tgg cca tcc ggt aca 169
      Met Ser Ala Ile Gln Ala Ala Trp Pro Ser Gly Thr
      1           5           10

gaa tgt att gcc aag tac aac ttc cac ggc act gcc gag cag gac ctg 217
Glu Cys Ile Ala Lys Tyr Asn Phe His Gly Thr Ala Glu Gln Asp Leu
      15           20           25

ccc ttc tgc aaa gga gac gtg ctc acc att gtg gcc gtc acc aag gac 265
Pro Phe Cys Lys Gly Asp Val Leu Thr Ile Val Ala Val Thr Lys Asp
      30           35           40

ccc aac tgg tac aaa gcc aaa aac aag gtg ggc cgt gag ggc atc atc 313
Pro Asn Trp Tyr Lys Ala Lys Asn Lys Val Gly Arg Glu Gly Ile Ile
      45           50           55

cca gcc aac tac gtc cag aag cgg gag ggc gtg aag gcg ggt acc aaa 361
Pro Ala Asn Tyr Val Gln Lys Arg Glu Gly Val Lys Ala Gly Thr Lys
      65           70           75

ctc agc ctc atg cct tgg ttc cac ggc aag atc aca cgg gag cag gct 409
Leu Ser Leu Met Pro Trp Phe His Gly Lys Ile Thr Arg Glu Gln Ala
      80           85           90

gag cgg ctt ctg tac ccg ccg gag aca ggc ctg ttc ctg gtg cgg gag 457
Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Pro Glu Thr Gly Leu Phe Leu Val Arg Glu
      95           100           105

agc acc aac tac ccc gga gac tac acg ctg tgc gtg agc tgc gac ggc 505
Ser Thr Asn Tyr Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Cys Val Ser Cys Asp Gly
      110           115           120

aag gtg gag cac tac cgc atc atg tac cat gcc agc aag ctc agc atc 553
Lys Val Glu His Tyr Arg Ile Met Tyr His Ala Ser Lys Leu Ser Ile
      125           130           135

gac gag gag gtg tac ttt gag aac ctc atg cag ctg gtg gag cac tac 601
Asp Glu Glu Val Tyr Phe Glu Asn Leu Met Gln Leu Val Glu His Tyr
      145           150           155

acc tca gac gca gat gga ctc tgt acg cgc ctc att aaa cca aag gtc 649
Thr Ser Asp Ala Asp Gly Leu Cys Thr Arg Leu Ile Lys Pro Lys Val
      160           165           170

atg gag ggc aca gtg gcg gcc cag gat gag ttc tac cgc agc ggc tgg 697
Met Glu Gly Thr Val Ala Ala Gln Asp Glu Phe Tyr Arg Ser Gly Trp
      175           180           185

gcc ctg aac atg aag gag ctg aag ctg ctg cag acc atc ggg aag ggg 745
Ala Leu Asn Met Lys Glu Leu Lys Leu Leu Gln Thr Ile Gly Lys Gly
      190           195           200

gag ttc gga gac gtg atg ctg ggc gat tac cga ggg aac aaa gtc gcc 793
Glu Phe Gly Asp Val Met Leu Gly Asp Tyr Arg Gly Asn Lys Val Ala
      205           210           215

gtc aag tgc att aag aac gac gcc act gcc cag gcc ttc ctg gct gaa 841
Val Lys Cys Ile Lys Asn Asp Ala Thr Ala Gln Ala Phe Leu Ala Glu
      225           230           235

gcc tca gtc atg acg caa ctg cgg cat agc aac ctg gtg cag ctc ctg 889
Ala Ser Val Met Thr Gln Leu Arg His Ser Asn Leu Val Gln Leu Leu
      240           245           250

ggc gtg atc gtg gag gag aag ggc ggg ctc tac atc gtc act gag tac 937
Gly Val Ile Val Glu Glu Lys Gly Gly Leu Tyr Ile Val Thr Glu Tyr
      255           260           265

atg gcc aag ggg agc ctt gtg gac tac ctg cgg tct agg ggt cgg tca 985
Met Ala Lys Gly Ser Leu Val Asp Tyr Leu Arg Ser Arg Gly Arg Ser
      270           275           280

gtg ctg ggc gga gac tgt ctc ctc aag ttc tgg cta gat gtc tgc gag 1033
Val Leu Gly Gly Asp Cys Leu Leu Lys Phe Ser Leu Asp Val Cys Glu
      285           290           295

gcc atg gaa tac ctg gag ggc aac aat ttc gtg cat cga gac ctg gct 1081
Ala Met Glu Tyr Leu Glu Gly Asn Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala
      305           310           315

gcc cgc aat gtg ctg gtg tct gag gac aac gtg gcc aag gtc agc gac 1129
Ala Arg Asn Val Leu Val Ser Glu Asp Asn Val Ala Lys Val Ser Asp
      320           325           330

ttt ggt ctc acc aag gag gcg tcc agc acc cag gac acg ggc aag ctg 1177
Phe Gly Leu Thr Lys Glu Ala Ser Ser Thr Gln Asp Thr Gly Lys Leu
      335           340           345

```

5

10

```

cca gtc aag tgg aca gcc cct gag gcc ctg aga gag aag aaa ttc tcc 1225
Pro Val Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ala Leu Arg Glu Lys Lys Phe Ser
350 355 360

act aag tct gac gtg tgg agt ttc gga atc ctt ctg tgg gaa atc tac 1273
Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Tyr
365 370 375 380

tcc ttt ggg cga gtg cct tat cca aga att ccc ctg aag gac gtc gtc 1321
Ser Phe Gly Arg Val Pro Tyr Pro Arg Ile Pro Leu Lys Asp Val Val
385 390 395

cct cgg gtg gag aag ggc tac aag atg gat gcc ccc gac ggc tgc ccg 1369
Pro Arg Val Glu Lys Gly Tyr Lys Met Asp Ala Pro Asp Gly Cys Pro
400 405 410

ccc gca gtc tat gaa gtc atg aag aac tgc tgg cac ctg gac gcc gcc 1417
Pro Ala Val Tyr Glu Val Met Lys Asn Cys Trp His Leu Asp Ala Ala
415 420 425

atg cgg ccc tcc ttc cta cag ctg cga gag cag ctt gag cac atc aaa 1465
Met Arg Pro Ser Phe Leu Gln Leu Arg Glu Gln Leu Glu His Ile Lys
430 435 440

acc cac gag ctg cac ctg tgacggctgg cctccgcctg ggtcatgggc 1513
Thr His Glu Leu His Leu
445 450

ctgtgggggac tgaacctgga agatcatgga cctggtgccc ctgctcactg ggcccagagcc 1573
tgaactgagc cccagcgggc tgccgggcct ttttctgctg tcccagcctg caccctccg 1633
gcccctctc tcttggaacc acctgtgggg cctggggagc ccaactgaggg gccagggagg 1693
aaggaggcca cggagcggga ggcagcggcc caccacgtcg ggcttccctg gcctcccgcc 1753
actcgccttc ttagagtttt attcctttcc ttttttgaga ttttttttcc gtgtgtttat 1813
tttttattat ttttcaagat aaggagaaa aaagtaccca gcaaatgggc attttacaag 1873
aagtacgaat cttatttttc ctgtcctgccc cgtgaggggtg ggggggaccg ggcccctctc 1933
tagggacccc tcgccccagc ctcattcccc attctgtgtc ccatgtcccg tgtctcctcg 1993
gtcgcgccgt gtttgcgctt gaccatgttg cactgtttgc atgcgcccga ggcagacgtc 2053
tgtcaggggc ttggatttct tgtgcgctg ccaccgccc acccgccttg tgagatggaa 2113
ttgtaataaa ccacgcatg aggcacccgc cgcccgcctc ggcgcttctc ccaccgaaaa 2173
aaaaaaaaaaaa aaaa 2187

```

5

10

15

<210> 5
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

Met Ser Ala Ile Gln Ala Ala Trp Pro Ser Gly Thr Glu Cys Ile Ala
 1 5 10 15

Lys Tyr Asn Phe His Gly Thr Ala Glu Gln Asp Leu Pro Phe Cys Lys
 20 25 30

Gly Asp Val Leu Thr Ile Val Ala Val Thr Lys Asp Pro Asn Trp Tyr
 35 40 45

Lys Ala Lys Asn Lys Val Gly Arg Glu Gly Ile Ile Pro Ala Asn Tyr
 50 55 60
Val Gln Lys Arg Glu Gly Val Lys Ala Gly Thr Lys Leu Ser Leu Met
 65 70 75 80

Pro Trp Phe His Gly Lys Ile Thr Arg Glu Gln Ala Glu Arg Leu Leu
 85 90 95

Tyr Pro Pro Glu Thr Gly Leu Phe Leu Val Arg Glu Ser Thr Asn Tyr
100 105 110

Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Cys Val Ser Cys Asp Gly Lys Val Glu His
115 120 125
Tyr Arg Ile Met Tyr His Ala Ser Lys Leu Ser Ile Asp Glu Glu Val
130 135 140

Tyr Phe Glu Asn Leu Met Gln Leu Val Glu His Tyr Thr Ser Asp Ala
145 150 155 160

Asp Gly Leu Cys Thr Arg Leu Ile Lys Pro Lys Val Met Glu Gly Thr
165 170 175

Val Ala Ala Gln Asp Glu Phe Tyr Arg Ser Gly Trp Ala Leu Asn Met

```

```

                180                185                190
Lys Glu Leu Lys Leu Leu Gln Thr Ile Gly Lys Gly Glu Phe Gly Asp
   195                200                205
Val Met Leu Gly Asp Tyr Arg Gly Asn Lys Val Ala Val Lys Cys Ile
   210                215                220
Lys Asn Asp Ala Thr Ala Gln Ala Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Met
   225                230                235
Thr Gln Leu Arg His Ser Asn Leu Val Gln Leu Leu Gly Val Ile Val
   245                250                255
Glu Glu Lys Gly Gly Leu Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met Ala Lys Gly
   260                265                270
Ser Leu Val Asp Tyr Leu Arg Ser Arg Gly Arg Ser Val Leu Gly Gly
   275                280                285
Asp Cys Leu Leu Lys Phe Ser Leu Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr
   290                295                300
Leu Glu Gly Asn Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
   305                310                315
Leu Val Ser Glu Asp Asn Val Ala Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Thr
   325                330                335
Lys Glu Ala Ser Ser Thr Gln Asp Thr Gly Lys Leu Pro Val Lys Trp
   340                345                350
Thr Ala Pro Glu Ala Leu Arg Glu Lys Lys Phe Ser Thr Lys Ser Asp
   355                360                365
Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Tyr Ser Phe Gly Arg
   370                375                380
Val Pro Tyr Pro Arg Ile Pro Leu Lys Asp Val Val Pro Arg Val Glu
   385                390                395
Lys Gly Tyr Lys Met Asp Ala Pro Asp Gly Cys Pro Pro Ala Val Tyr
   405                410                415
Glu Val Met Lys Asn Cys Trp His Leu Asp Ala Ala Met Arg Pro Ser
   420                425                430
Phe Leu Gln Leu Arg Glu Gln Leu Glu His Ile Lys Thr His Glu Leu
   435                440                445

```

His Leu
450

5

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:etiqueta de epítopo 9E10-myc

15 <400> 6

```

Val Asp Met Glu Gln Lys Leu Ile Ala Glu Glu Asp Leu Asn
   1                5                10

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para su utilización en un procedimiento destinado a potenciar la angiogénesis en un tejido diana de mamífero asociado a una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por mala circulación, extremidades isquémicas y heridas crónicas, comprendiendo dicha composición farmacéutica un vector de expresión vírico o no vírico que codifica una secuencia nucleotídica que puede expresar una proteína Src, que presenta cualquier resto de aminoácido en el codón 527 excepto tirosina, serina o treonina.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicho vector es un vector vírico de transferencia génica y en la que dicha composición contiene además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha proteína Src es Src A.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicho tejido presenta mala circulación.
- 20 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica debe administrarse mediante administración intravenosa, transdérmica, intrasinoval, intramuscular u oral.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica debe administrarse como una sola dosis por vía intravenosa.
- 25 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica comprende además un liposoma.
8. Utilización de una proteína Src que presenta cualquier resto de aminoácido en el codón 527 excepto tirosina, serina o treonina o una secuencia nucleotídica que puede expresar dicha proteína para la preparación de una composición farmacéutica destinada a potenciar la angiogénesis en un tejido asociado a una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por mala circulación, extremidades isquémicas y heridas crónicas.
- 30 9. Utilización según la reivindicación 8, en la que dicha proteína Src es Src A.
10. Utilización según la reivindicación 8, en la que dicho tejido presenta una mala circulación.
- 35 11. Utilización de una proteína Src inactiva o de una secuencia nucleotídica que puede expresar dicha proteína para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la angiogénesis en un tejido asociado a una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por artritis, artritis reumatoide, tumor sólido, metástasis del tumor sólido, retinopatía, retinopatía diabética, degeneración macular, restenosis y enfermedades inflamatorias.
- 40 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicha proteína Src inactiva es Src 251 o Src K295M.
13. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho tejido está inflamado y dicha enfermedad es la artritis o la artritis reumatoide.
- 45 14. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho tejido es un tumor sólido o una metástasis de tumor sólido.
15. Utilización según la reivindicación 14, en la que la administración de dicha composición farmacéutica se realiza juntamente con la quimioterapia.
- 50 16. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho tejido es el tejido retiniano y dicha enfermedad es retinopatía, retinopatía diabética o degeneración macular.
17. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho tejido está en la zona de la angioplastia coronaria y dicho tejido presenta riesgo de restenosis.
- 55 18. Utilización según la reivindicación 8 u 11, en la que la administración de dicha composición farmacéutica comprende la administración intravenosa, transdérmica, intrasinoval, intramuscular u oral.
19. Utilización según la reivindicación 8 u 11, en la que la administración de dicha composición farmacéutica comprende una sola dosis por vía intravenosa.
- 60 20. Utilización según la reivindicación 8 u 11, en la que dicha composición farmacéutica comprende además un liposoma.
- 65 21. Utilización según la reivindicación 8 u 11, en la que dicha composición farmacéutica comprende un vector de expresión retrovírica que puede expresar dicha secuencia nucleotídica.

22. Utilización según la reivindicación 8 u 11, en la que dicha composición farmacéutica comprende un vector de expresión no vírica que puede expresar dicha secuencia nucleotídica.

ADNc-SRC DE POLLO

(SEC ID n° 2)

1 tctgacacc atctgtctgt ctgtctgtgt gctgcaggag ctgagctgac tctgctgtgg
 61 cctcgcgtac cactgtggcc aggcggtagc tgggacgtgc agcccaccac catggggagc
 121 agcaagagca agcccaagga cccagccag cgccggcgca gcctggagcc acccgacagc
 181 acccaccacg ggggattccc agcctcgcag accccaaca agacagcagc ccccgacacg
 241 caccgcaccc ccagccgctc ctttgggacc gtggccaccg agcccaagct cttcgggggc
 301 ttaacactt ctgacaccgt tacgtcgccg cagcgtgccg gggcactggc tggcggcgct
 361 accacttcg tggctctcta cgactacgag tccgggactg aaacggactt gtcctcaag
 421 aaaggagaac gcctgcagat tgtcaacaac acggaagggtg actggtggct ggctcattcc
 481 ctactacag gacagacggg ctacatcccc agtaactatg tcgcccctc agactccatc
 541 caggctgaag agtggctact tgggaagatc actcgtcggg agtccgagcg gctgctgctc
 601 aacccgaaa accccggggg aacctcttg gtccgggaga gcgagacgac aaaagggtgcc
 661 tattgectet cegtttctga ctttgacaac gccaaagggc tcaatgtgaa gcactacaag
 721 atccgaagc tggacagcgg cggtctctac atcacctcac gcacacagt cagcagcctg
 781 cagcagctgg tggcctacta ctcaaacat gctgatggct tgtgccaccg cctgaccaac
 841 gtctgcccc cgtccaagcc ccagaccag ggactcgcca aggacgcgtg ggaaatcccc
 901 cgggagtcgc tgcggctgga ggtgaagctg gggcagggct gcttggaga ggtctggatg
 961 gggacctgga acggcaccac cagagtggcc ataaagactc tgaagcccgg caccatgtcc
 1021 ccggaggcct tcctgcagga agcccaagtg atgaagaagc tccggcatga gaagctggtt
 1081 cagctgtacg cagtgggtgc ggaagagccc atctacatcg tcaactgagta catgagcaag
 1141 gggagcctcc tggatttctt gaaggggagag atgggcaagt acctgcggct gccacagctc
 1201 gtcgatatgg ctgctcagat tgcacccggc atggcctatg tggagaggat gaactacgtg
 1261 caccgagacc tgcgggcggc caacatcctg gtgggggaga acctggtgtg caaggtggct
 1321 gactttgggc tggcacgcct catcgaggac aacgagtaca cagcacggca aggtgccaag
 1381 ttccccatca agtggacagc ccccgaggca gccctctatg gccggttcac catcaagtgc
 1441 gatgtctggt ccttcggcat cctgctgact gagctgacca ccaagggccg ggtgccatac
 1501 ccagggatgg tcaacaggga ggtgctggac caggtggaga ggggctaccg catgcctgc
 1561 ccgcccagat gccccgagtc gctgcatgac ctcatgtgcc agtgctggcg gagggacctt
 1621 gaggagcggc ccacttttga gtacctgcag gccttctgg aggactactt cacctcgaca
 1681 gagccccagt accagcctgg agagaacctt taggcctgga gctcctcctg gaccagaggg
 1741 ctgctgtggt ggtacaggg

FIG. 1

PROTEÍNA CODIFICADA Src DE POLLO

(SEC ID nº 3)

MGSSKSKPKDPSQRRRSLEPPDSTHHGGFPASQTPNKTA
PDTHRTPSRSGFTVA TE PKLFGGFNTSDTVTSPQRAGALA
GGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTTEGDWWL
AHSLTTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAEEWYFGKITRRESER
LLNPNENPRGTFVRESETTKAYCLSVSDFDNAKGLNVK
HYKIRKLDSGGFYITSRTQFSSLQQLVAYYSKHADGLCHR
LTNVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGCFCGE
VWMGTWNGTTRVAIKTLKPGTMSPEAFLQEAQVMKKLRHE
KLVQLYAVVSEEPYIVTEYMSKGSLLDFLKGEMGKYLR
PQLVDMAAQIASGMAYVERMNYVHRDLRAANILVGENL
VCKVADFGLARLIEDNEYTARQGAKFPIKWTAPEAALYGR
FTIKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPGMVNREVLDQVERG
YRMPCPECPESLHDLMCQCWRRDPEERPTFEYLQAFLE
DYFTSTEPQYQPGENL

FIG. 2

ADN con c-SRC HUMANO

(SEC ID nº 4)

1 ggcggcgtc cgcaggccg tgatgccgc cgcgggagg tggccggac cgcagtccc
 61 caagagagct ctaatggtac caagtacag gttggctta ctgtgactcg gggacgccag
 121 agtcctgag aagatgtcag caatacagc gcctggcca tccggtacag aatgtattgc
 181 caagtacaac ttccaggca ctgcccagca ggacctgcc ttctgcaaag gagacgtgt
 241 caccattgtg gccgtacca aggacccca ctggtacaaa gcaaaaaa aggtgggccc
 301 tgagggcatc atcccagca actacgtcca gaagcgggag ggctgaagg cgggtacca
 361 actcagctc atgcttggg tccaggcaa gatcacagg gagcaggctg agcggctct
 421 gtaccgccg gagacaggcc tgttctggg ggggagagc accaactacc cgggagacta
 481 cacgtgtgc gtgagctgc acggcaagg ggagcactac cgcacatgt accatgccg
 541 caagctcagc atcagcagg aggtgtactt tgagaacctc atgcagctgg tggagacta
 601 cacctcagc gcagatggc tctgtacgc cctcattaaa ccaagggtca tggaggccac
 661 agtggcggc caggatgagt tctaccgag cggctggcc ctgaacatga aggagctgaa
 721 gctgtgcag accatcggga agggggagt cggagacgtg atgctgggcg attaccgag
 781 gaacaaagc gccgtcaagt gcattaagaa cgacgccact gccaggcct tctggctga
 841 agcctcagc atgacgcaac tgcggcatag caacctggg cagctcctgg gctgtatct
 901 ggaggagaag ggcgggctc acatcgtcac tgagtacatg gcaagggga gccttggga
 961 ctacctcgg tctaggggtc ggtcagtgt ggcgggagc tctctctca agttctcgt
 1021 agatgtctc gaggccatg aatacctgga gggcaacaat tctgtcatc gagacctggc
 1081 tggccgaat gtctgtgtg ctgaggaca cgtggccaag gtcagcact ttggtctac
 1141 caaggaggc tccagcacc aggacacgg caagctgcca gtcaagtga cagcccctga
 1201 ggccctgaga gagaagaaat tctccactaa gctgtacgtg tggagtttcg gaatcctt
 1261 ctgggaaatc tactccttg ggcgagtgc ttatccaaga attcccctga aggacgtct
 1321 ccctcgggtg gagaagggtc acaagatgga tgccccgac ggctgcccgc ccgagctca
 1381 tgaagtcag aagaactgct ggcacctgga cgccccatg cggccctct tctacagct
 1441 ccgagagcag cttgagcaca tcaaaccca cgagctgcac ctgtgacggc tggcctccg
 1501 ctgggtcatg ggctgtggg gactgaacct ggaagatcat ggacctggg cccctgctca
 1561 ctgggccga gctgaactg agcccagcg ggctggcggg ctttttct gctcccagc
 1621 ctgaccctc ccggcccgt cctcttggg cccacctgtg gggcctgggg agcccactga
 1681 ggggccaggg aggaaggagg ccacggagcg ggaggcagcg cccaccacg tcgggcttc
 1741 ctggcctccc gccactgcc ttcttagagt ttattctt tctttttg agattttt
 1801 tccgtgtgt tatttttat tattttcaa gataaggaga aagaagtac ccagcaaatg
 1861 ggcattttac aagaagtac aatctattt ttctgtct gcccgtgagg gtggggggga
 1921 ccgggccctc ctctagggc ccctgcgcc agcctcatt cccattctgt gtccatgtc
 1981 ccgtgtctc tcggtcggc cgtgttggc cttgacctg ttgactgtt tgcagcggc
 2041 cgaggcagc gtctgtcagg ggcttgatt tcgtgtcgg ctgccaccg ccccccgc
 2101 ttgtgagat gaattgaa aaaccacgc atgaggacac cgccggccgc ctggcgct
 2161 cctccaccg aaaaaaaaa aaaaaa

FIG. 3

PROTEÍNA CODIFICADA Src HUMANA

(SEC ID nº 5)

MSAIQAAWPSGTECIAKYNFHGTAEQDLPFCKGDVLTIVAVTKD
PNWYKAKNKVGREGIIPANYVQKREGVKAGTKLSLMPWFHGKIT
REQAERLLYPPETGLFLVRESTNYPGDYTLCVSCDGKVEHYRIMY
HASKLSIDEEVYFENLMQLVEHYTSDADGLCTRLIKPKVMEGTVA
AQDEFYRSGWALNMKELKLLQTIGKGEFGDVMLGDYRGNKVAV
KCIKNATAQAFLAEASVMTQLRHSNLVQLLGVIVEEKGGLYIVTE
YMAKGSLVDYLRSRGRSVLGGDCLLKFSLDVCEAMEYLEGNFVH
RDLAARNVLVSEDNVAKVSDFGLTKEASSTQDTGKLPVKWTAPEAL
REKKFSTKSDVWSFGILLWEIYSFGRVPYPRIPKDVVPRVEKGYKM
DAPDGCPPAVYEVKNCWHLDAAMRPSFLQLREQLLEHIKTHELHL

FIG. 4

Activación de la actividad de Src endógena por FGFb y VEGF

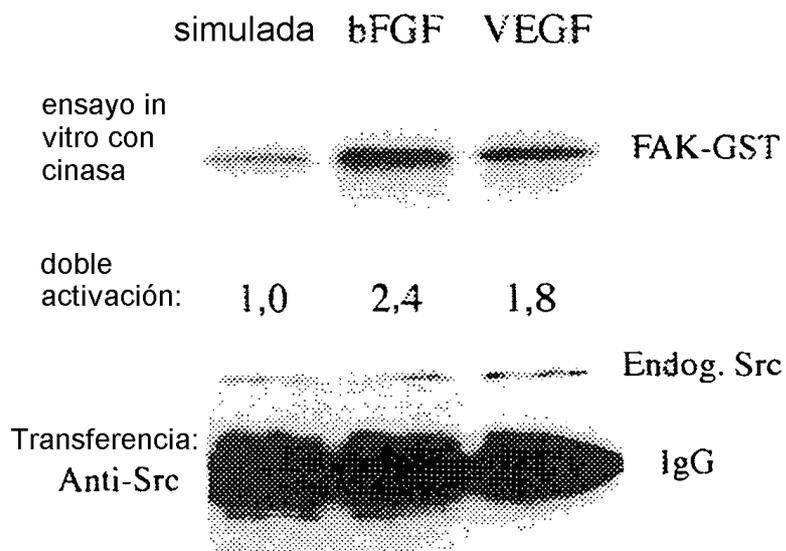
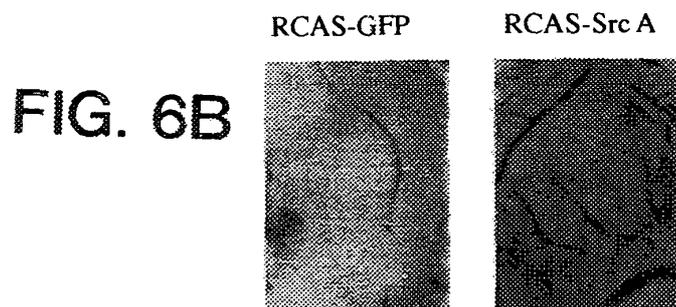
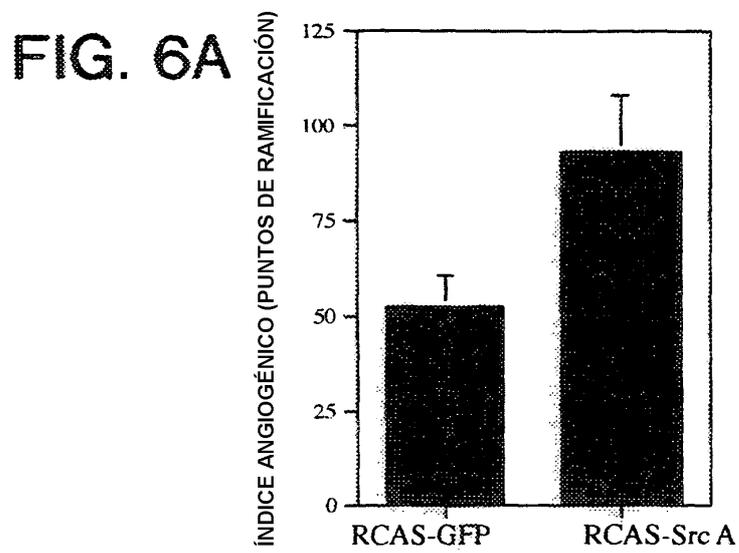


FIG. 5

Efecto de la expresión mediada por RCAS de Src A sobre la angiogenia en la CAM de pollito



**La expresión retrovímica de Src A
activa de la fosforilación de MAP
cinasa vascular**

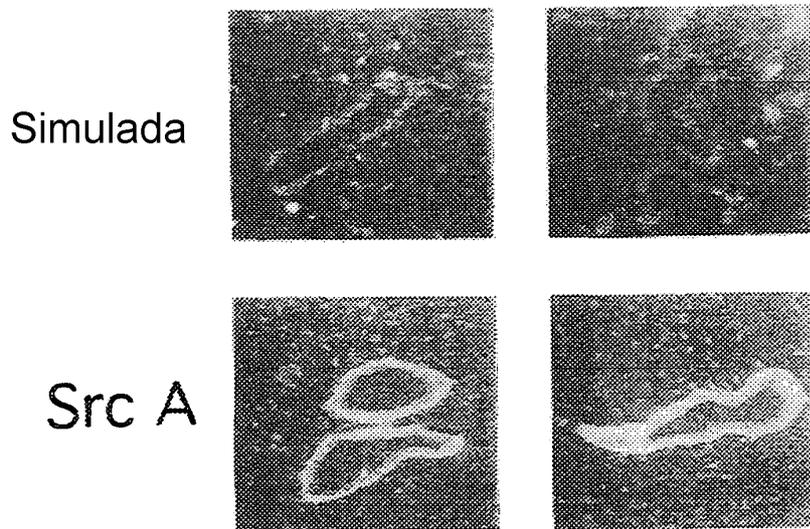
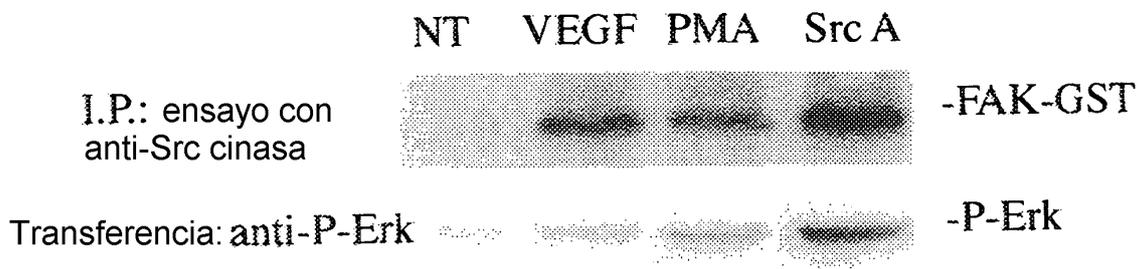


FIG. 7

Requisito selectivo para la actividad de Src durante VEGF, pero no la angiogenia inducida por FGFB

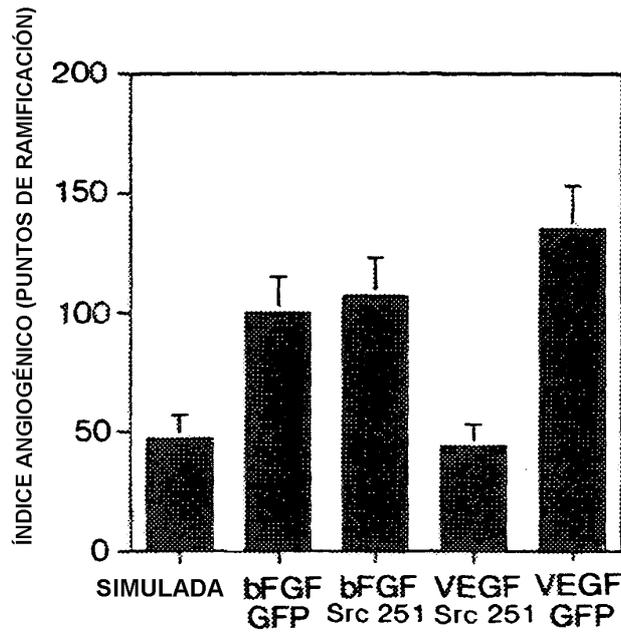


FIG. 8A

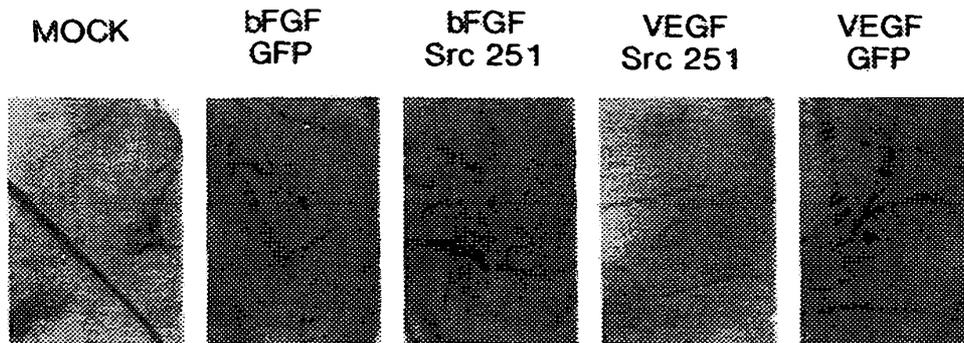


FIG. 8B

SIMULADA Src 251-myc

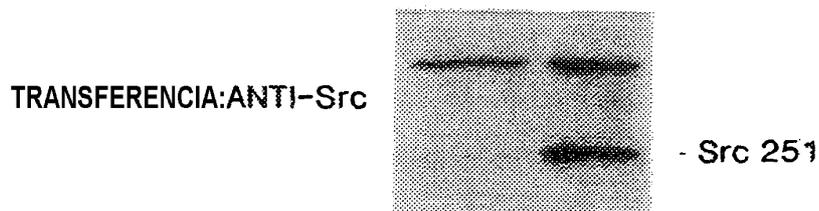


FIG. 8C

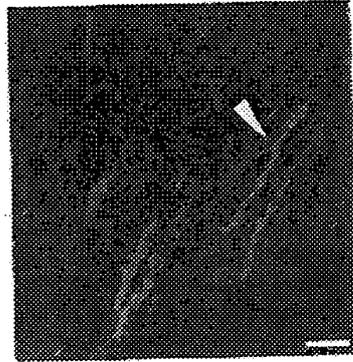


FIG. 9A

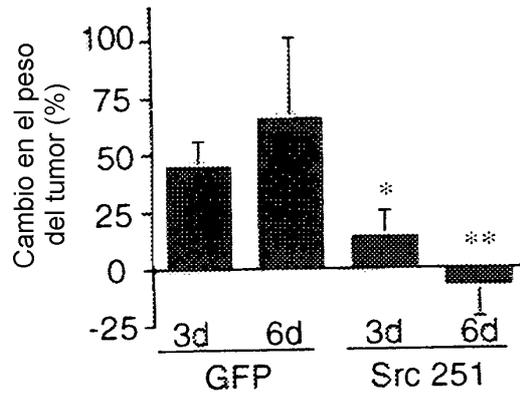


FIG. 9B

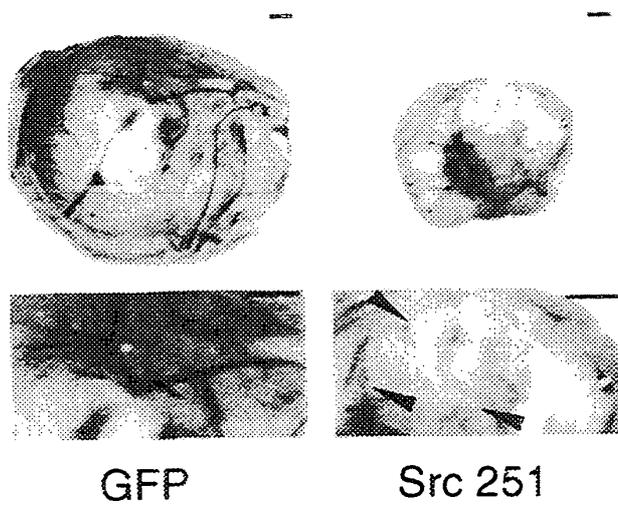


FIG. 9C

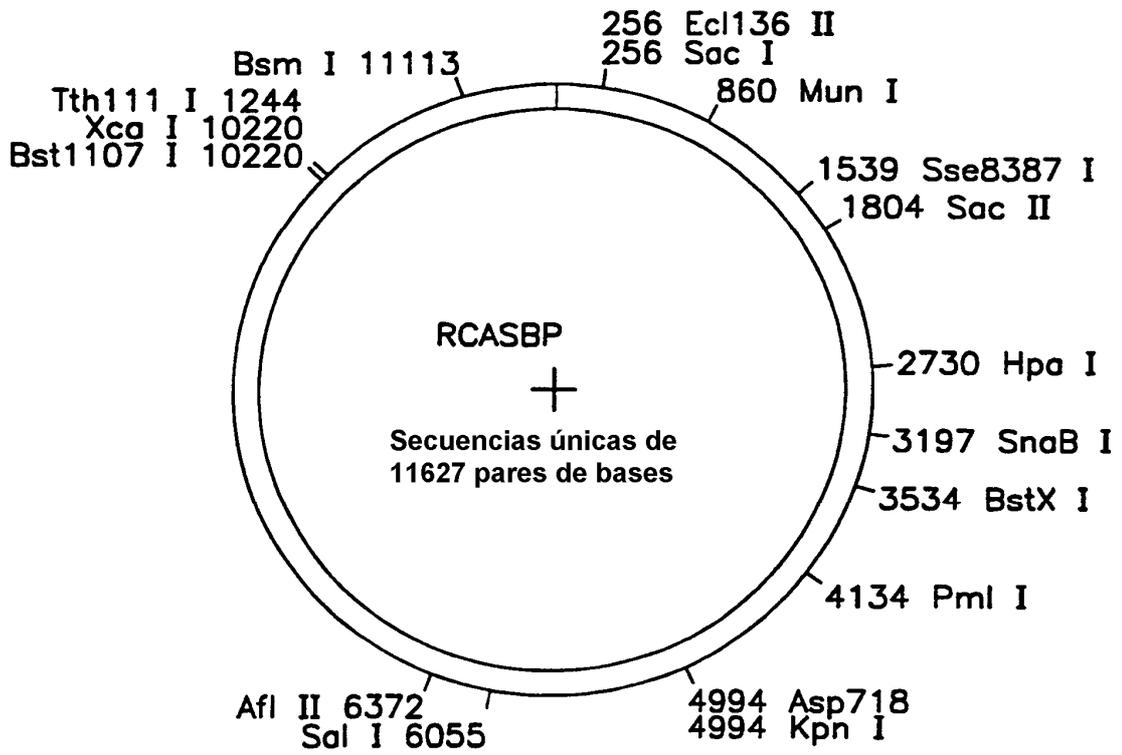


FIG. 10