



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 307**

51 Int. Cl.:
C12N 9/68 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05106596 .9**
96 Fecha de presentación : **05.05.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1612272**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **Péptidos antiangiogénicos polinucleótidos que codifican los mismos y procedimiento para inhibir angiogénesis.**

30 Prioridad: **03.05.1996 US 643219**
03.04.1997 US 832087

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
D-377 Ap6A-1 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6008, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

72 Inventor/es: **Davidson, Donald J.;**
Wang, Jieyi y
Gubbins, Earl J.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 307 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

Péptidos antiangiogénicos, polinucleótidos que codifican los mismos y procedimientos para inhibir angiogénesis

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la química de los péptidos. Más particularmente, la invención se refiere a la preparación y al uso de péptidos que contienen secuencias de aminoácidos sustancialmente similares a secuencias correspondientes de la región en rosquilla 5 de plasminógeno de mamífero, a composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos, a anticuerpos específicos para el receptor de angiostatina, a medios para la detección y la medición de angiostatina, a agentes citotóxicos ligados a proteínas de angiostatina y al tratamiento de enfermedades que se producen a partir de o son exacerbadas por angiogénesis.

15 **Antecedentes de la invención**

La angiogénesis, el procedimiento por el que se forman nuevos vasos sanguíneos, es esencial para las actividades normales del cuerpo que incluyen reproducción, desarrollo y reparación de heridas. Aunque el procedimiento no se entiende completamente, se cree que implica una compleja interacción de moléculas que regulan el crecimiento de células endoteliales (las células primarias de vasos sanguíneos capilares). Bajo condiciones normales, estas moléculas parecen mantener la microvasculatura en un estado quiescente (es decir, uno sin crecimiento de capilares) durante periodos prolongados que pueden durar durante semanas o, en algunos casos, décadas. Cuando sea necesario (tal como durante la reparación de heridas), estas mismas células pueden someterse a la rápida proliferación y reposición en el transcurso de un periodo de 5 días (Folkman, J. y Shing, Y., *The Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 10931-10934, y Folkman, J. y Klagsbrun, M., *Science*, 235, 442-447 (1987)).

Aunque la angiogénesis es un proceso altamente regulado bajo condiciones normales, muchas enfermedades (caracterizadas como enfermedades angiogénicas) son accionadas por angiogénesis sin regular persistente. Establecido de otro modo, la angiogénesis sin regular puede tanto producir una enfermedad particular directamente como exacerbar una afección patológica existente. Por ejemplo, la neovascularización ocular se ha implicado como la causa más común de ceguera y domina aproximadamente 20 enfermedades del ojo. En ciertas afecciones existentes, tales como artritis, los vasos sanguíneos capilares recientemente formados invaden las articulaciones y destruyen el cartílago. En diabetes, los nuevos capilares formados en la retina invaden el vítreo, sangran y producen ceguera. El crecimiento y la metástasis de tumores sólidos también depende de la angiogénesis (Folkman, J., *Cancer Research*, 46, 467-473 (1986), Folkman, J., *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-6 (1989)). Se ha mostrado, por ejemplo, que los tumores que se agrandan a más de 2 mm deben obtener su propio riego sanguíneo y lo hacen induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Una vez que estos nuevos vasos sanguíneos se incorporan en el tumor, proporcionan un medio para que las células tumorales entren en la circulación y metastaticen a sitios distantes tales como el hígado, pulmón o hueso (Weidner, N., y col., *The New England Journal of Medicine*, 324(1): 1-8 (1991)).

Hasta la fecha se han descrito y caracterizado varios factores angiogénicos que se producen naturalmente (Fidler, J.I. y Ellis, L.M., *Cell*, 79: 185-189 (1994)). Recientemente, O'Reilly y col. han aislado y purificado una proteína de 38 kilodalton (kDa) de suero y orina de ratones que tienen un tumor que inhibe la proliferación de células endoteliales (O'Reilly, M. y col., *Cell*, 79: 315-328 (1994) y la solicitud internacional WO 95/29242 publicada el 2 de noviembre de 1995). El análisis de microsecuencias de este inhibidor endotelial mostró el 98% de homología de secuencias con un fragmento interno de plasminógeno murino. La angiostatina, como se llamó al fragmento inhibidor murino, era un péptido que incluyó las cuatro primeras regiones en rosquilla de plasminógeno murino. Un fragmento de péptido de la misma región de plasminógeno humano (es decir, que contiene las rosquillas 1-4) también inhibió fuertemente la proliferación de células endoteliales capilares *in vitro* e *in vivo*. El plasminógeno intacto del que se derivó este fragmento de péptido no tuvo un efecto inhibidor tan potente.

Varios inhibidores de angiogénesis están actualmente en desarrollo para su uso en el tratamiento de enfermedades angiogénicas (Gasparini, G. y Harris, A. L., *J. Clin. Oncol.*, 13(3): 765-782, (1995)), pero hay desventajas asociadas a estos compuestos. La suramina, por ejemplo, es un potente inhibidor de la angiogénesis, pero produce toxicidad sistémica grave en seres humanos a las dosis requeridas para la actividad antitumoral. Compuestos tales como retinoides, interferones y antiestrógenos son seguros para el uso humano, pero tienen efectos antiangiogénicos débiles. Todavía otros compuestos pueden ser difíciles o costosos de preparar.

Por tanto, existe la necesidad de compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades angiogénicas en mamíferos. Más específicamente, existe la necesidad de inhibidores de la angiogénesis que sean seguros para uso terapéutico y que presenten toxicidad selectiva con respecto a la afección patológica tal como inhibiendo selectivamente la proliferación de células endoteliales, a la vez que no muestran un grado de toxicidad o sólo un bajo grado de toxicidad para células normales (es decir, no cancerosas). Tales compuestos también se prepararían fácilmente y rentablemente.

65

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un compuesto del péptido de la rosquilla 5 representado por la fórmula estructural A-B₁-C₁-X₁-Y (II) o una sal farmacéuticamente aceptable, éster o profármaco del mismo en la que A está ausente o es un grupo protector de nitrógeno; Y está ausente o es un grupo protector de ácido carboxílico; B₁ está ausente o tiene de 1 a aproximadamente 176 residuos de aminoácidos que se producen naturalmente correspondientes a la secuencia de aproximadamente la posición de aminoácidos 334 a la posición de aminoácidos 513 de SEC ID N°:1; C₁ es la secuencia de la posición de aminoácidos 514 a la posición de aminoácidos 523 de SEC ID N°:1; y X₁ está ausente o tiene de 1 a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos que se producen naturalmente correspondientes a la secuencia de la posición de aminoácidos 524 a la posición de aminoácidos 533 de SEC ID N°:1 y homólogos de fórmula A-B₁-C₁-X₁-Y que tienen al menos el 95% de identidad de aminoácidos con el fragmento B₁-C₁-X₁ en la que los homólogos poseen actividad antiangiogénica.

También se desvela un procedimiento para tratar un paciente en necesidad de terapia antiangiogénica que comprende administrar al paciente un compuesto que contiene el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o una proteína de fusión del mismo.

La presente invención también incluye una composición para tratar un paciente en necesidad de terapia antiangiogénica que comprende un compuesto que contiene el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo tanto solo como en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/u opcionalmente compuestos de liberación sostenida para formar una composición terapéutica.

La presente invención también incluye una composición para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, artritis, degeneración macular y retinopatía diabética que comprende un compuesto que contiene el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o una proteína de fusión del mismo.

La presente invención también incluye una composición que comprende una secuencia de polinucleótidos mono o bicatenaria aislada que codifica el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo. Un polinucleótido tal es preferentemente una molécula de ADN. La presente invención también incluye un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo, en el que el vector puede expresar el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo cuando está presente en una célula y una composición que comprende una célula que contiene un vector en la que el vector contiene una secuencia de ADN que codifica el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo. La presente invención engloba adicionalmente procedimientos de terapia génica por los cuales secuencias de ADN que codifican el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo o conjugado del fragmento del péptido de la rosquilla 5 se introducen en un paciente para modificar *in vivo* los niveles de la rosquilla 5.

La presente invención también incluye un procedimiento de preparación del fragmento del péptido de la rosquilla 5 que comprende las etapas de: (a) exponer plasminógeno de mamífero a elastasa humana o porcina a una relación de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:300 para formar una mezcla de dicho plasminógeno y dicha elastasa; (b) incubar dicha mezcla y (c) aislar el fragmento del péptido de la rosquilla 5 de dicha mezcla.

La presente invención también incluye un procedimiento de preparación del fragmento del péptido de la rosquilla 5 que comprende las etapas de: (a) exponer plasminógeno de mamífero a elastasa humana o porcina a una relación de elastasa:plasminógeno de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:300 para formar una mezcla de dicha elastasa y dicho plasminógeno; (b) incubar dicha mezcla; y (c) aislar un conjugado de proteína del fragmento del péptido de la rosquilla 5 de dicha mezcla; (d) exponer dicho conjugado de proteína del fragmento del péptido de la rosquilla 5 a pepsina a una relación de aproximadamente 1:0,2 para formar una mezcla de dicha pepsina y dicho plasminógeno y (d) aislar dicho fragmento del péptido de la rosquilla 5 de dicha mezcla. Alternativamente, el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión del mismo puede prepararse mediante un procedimiento que comprende las etapas de: (a) aislar un polinucleótido que codifica dicho fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión; (b) clonar el polinucleótido en un vector de expresión, (c) transformar el vector en una célula huésped adecuada; y cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del fragmento del péptido de la rosquilla 5 soluble o proteína de fusión.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano (SEC ID N°: 1).

La FIG. 2 muestra la homología comparativa en secuencias de aminoácidos de la rosquilla 5 humana (SEC ID N°:34), de ratón (SEC ID N°:35), de mono Rhesus (SEC ID N°:36), bovina (SEC ID N°:37) y porcina (SEC ID N°:38).

La FIG. 3 muestra la secuencia de ADN (SEC ID N°: 12) de plasminógeno humano.

La FIG. 4 muestra una gráfica de la actividad antiproliferativa de una dosis única de diversos fragmentos de rosquilla en células endoteliales de capilares bovinos (BCE) cuando se probaron en un ensayo de proliferación celular *in vitro*.

La FIG. 5 muestra un mapa del vector de expresión pHil-D8 que contiene una secuencia conductora para la secreción de proteína recombinante.

La FIG. 6 muestra un barrido de una fotografía de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de sobrenadantes de cultivo (10 µl/banda) de *Pichia pastoris* que expresa un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión. Bandas 1, 6 y 10: controles negativos; bandas 2, 3 y 4: tres clones distintos que expresan K5A; banda 5: un clon que expresa K5F; bandas 7 y 8: clones que expresan K4-5A; banda 9: un clon que expresa K4-5F. Las flechas indican bandas de proteínas de K5A (aproximadamente 11 kDa) y K4-5F (aproximadamente 20 kDa). Los marcadores de peso molecular se muestran en las bandas que preceden a las bandas 1 y 10.

La FIG. 7 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie barrido de cepas de *E. coli* que expresan un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión. A menos que se indique de otro modo, cada banda contiene 10 µl de material de cultivo equivalente a una A₆₀₀ de 10. Banda 1: marcadores de bajo peso molecular; banda 2: K5A/pET32a, cultivo total; banda 3: K5A/pET32a, cultivo total (1/10 de la cantidad de la banda 2); banda 4: K5A/pET32a, fracción soluble; banda 5: K5A/pET32a, fracción insoluble; banda 6: K4-5A/pET32a, cultivo total; banda 7: K4-5A/pET32a, cultivo total (1/10 de la cantidad de la banda 6); banda 8: K4-5A/pET32a, fracción soluble; banda 9: K4-5A/pET32a, fracción insoluble; banda 10: K4-5A/pGEX-4T-2, cultivo total; banda 11: K4-5A/pGEX-4T-2, fracción soluble; banda 12: K4-5A/pGEX-4T-2, fracción insoluble; banda 13: patrón de rosquilla 5; banda 14: marcadores de alto peso molecular.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, el término “rosquilla 5” (K5, denominada en lo sucesivo) se refiere a la región de plasminógeno de mamífero que tiene tres enlaces disulfuro que contribuyen a la confirmación tridimensional específica definida por la quinta región en rosquilla de la molécula de plasminógeno de mamífero. Un enlace disulfuro tal enlaza los residuos de cisteína localizados en las posiciones de aminoácidos 462 y 541, un segundo enlaza los residuos de cisteína localizados en las posiciones de aminoácidos 483 y 524 y un tercero enlaza los residuos de cisteína localizados en las posiciones de aminoácidos 512 y 536. La secuencia de aminoácidos de una molécula de plasminógeno de mamífero completa (la molécula de plasminógeno humano), que incluye su región en rosquilla 5, se muestra en la FIG. 1 (SEC ID N°: 1).

Como se usa en este documento, el término “fragmento del péptido de la rosquilla 5” se refiere a un péptido que tiene la fórmula A-B1-C1-X1-Y en la que A está ausente o es un grupo protector de nitrógeno, Y está ausente o es un grupo protector carboxílico, B1 está ausente o tiene de 1 a 176 residuos de aminoácidos que se producen naturalmente correspondientes a la secuencia de la posición de aminoácidos 334 a la posición de aminoácidos 513 de SEC ID N° 1, C1 es la secuencia de la posición de aminoácidos 514 a la posición de aminoácidos 523 de SEC ID N° 1 y X1 está ausente o tiene de 1 a 10 residuos de aminoácidos que se producen naturalmente correspondientes a la secuencia de la posición de aminoácidos 524 a la posición de aminoácidos 533 de SEC ID N° 1; y homólogos de fórmula A-B1-C1-X1-Y que tienen al menos el 95% de identidad de aminoácidos con el fragmento B1-C1-X1 en los que los homólogos poseen actividad antiangiogénica.

Como se usa en este documento, el término “proteína de fusión de la rosquilla 5” se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos extraída de dos o más proteínas individuales, una de las cuales es un fragmento del péptido de K5. Una proteína de fusión se forma por la expresión de un polinucleótido en el que la secuencia codificante de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 se ha unido a la secuencia codificante de al menos otro polipéptido de forma que los dos (o más) marcos de lecturas estén en marco. Proteínas de fusión de la rosquilla 5 preferidas son aquellas en las que el fragmento del péptido de la rosquilla 5 está fusionado con una secuencia de plasminógeno humano correspondiente tal como la rosquilla 4 (K4), rosquillas 3-4 (K3-4), rosquillas 2-4 (K2-4) y rosquillas 1-4 (K1-4). Una proteína de fusión de K5 preferida es las rosquillas 4-5 (K4-5). Otros ejemplos de proteínas de fusión de la rosquilla 5 de la presente invención incluyen un fragmento del péptido de K5 o K4-5 unidos adicionalmente a una marca biológica. Tales proteínas de fusión pueden o pueden no escindirse en las proteínas separadas de las que se derivan.

Como se usa en este documento, el término “conjugado de un fragmento del péptido de K5” significa un fragmento del péptido de la rosquilla 5 químicamente acoplado a otra proteína para formar un conjugado. Ejemplos de conjugados de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 incluyen un fragmento del péptido de la rosquilla 5 acoplado a albúmina o a un fragmento de péptido de otra región en rosquilla de plasminógeno de mamífero. Los pesos moleculares de los conjugados de los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 están entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 25.000 kDa.

Como se usa en este documento, el término “homología de secuencias sustancial” significa aproximadamente el 60% de identidad de aminoácidos, deseablemente al menos aproximadamente el 70% de identidad de aminoácidos, más deseablemente aproximadamente el 80% de identidad de aminoácidos y lo más deseablemente aproximadamente el 95% de identidad de aminoácidos de la secuencia de péptidos correspondiente de plasminógeno humano. Las secuencias que tienen homología de secuencias sustancial con plasminógeno humano se denominan en lo sucesivo “homólogos”. Además de tener homología de secuencias sustancial, los homólogos de la presente invención muestran actividad biológica similar (es decir, actividad antiangiogénica) a la de los fragmentos

del péptido de K5 descritos en este documento. Debido a que la secuencia de aminoácidos o el número de aminoácidos en un fragmento del péptido de la rosquilla 5 puede variar de especie a especie o dependiendo del procedimiento de producción, el número total de aminoácidos en un fragmento del péptido de la rosquilla 5 no puede definirse exactamente en algunos casos. Dado que estas secuencias son idénticas en al menos el 73% de sus aminoácidos, debe entenderse que la secuencia de aminoácidos de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 es sustancialmente similar entre especies y que los procedimientos de producción de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 proporcionan fragmentos del péptido de la rosquilla 5 con homología de secuencias sustancial a las secuencias de aminoácidos correspondientes de plasminógeno humano. La FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 humano que tiene 95 aminoácidos (SEC ID N°:34) en comparación con las secuencias de fragmentos de la rosquilla 5 de plasminógeno murino (SEC ID N°:35), de mono Rhesus (SEC ID N°:36), bovino (SEC ID N°:37) y porcino (SEC ID N°:38).

Es muy conocido en la técnica que las modificaciones y los cambios puedan hacerse sin alterar sustancialmente la función biológica de ese péptido. En la realización de tales cambios, las sustituciones de residuos de aminoácidos similares pueden hacerse basándose en la similitud relativa de sustituyentes de las cadenas laterales, por ejemplo, su tamaño, carga, hidrofobia, hidrofilia y similares. Las alteraciones del tipo descrito pueden hacerse para potenciar la potencia o estabilidad del péptido a la ruptura enzimática farmacocinética. Por tanto, secuencias consideradas dentro del alcance de la invención incluyen aquellas secuencias caracterizadas por un cambio en la secuencia o tipo de residuos de aminoácido en las que el cambio no altera la naturaleza y actividad biológica fundamental de los fragmentos del péptido de K5 y/o proteínas de fusión anteriormente mencionados.

Un fragmento del péptido de K5 o proteína de fusión de K5 de la presente invención puede caracterizarse basándose en la potencia cuando se prueba para su capacidad para inhibir el crecimiento de células capilares bovinas (BCE) *in vitro*. Los datos en la Tabla 1 y la FIG. 4 ilustran que un fragmento del péptido de K5 que tiene la secuencia de la posición de aminoácidos 443 a la posición de aminoácidos 543 de SEC ID N°:1 muestra aproximadamente un aumento de 300 veces en la actividad (es decir, en la inhibición de la proliferación de células BCE) cuando se comparó con un fragmento del péptido de la rosquilla 5 que tiene la secuencia de la posición de aminoácidos 443 a la posición de aminoácidos 546 de SEC ID N°:1 y aproximadamente un aumento de 800 veces en la actividad cuando se comparó con los fragmentos del péptido de las rosquillas 1-4.

El término "aislado" como se usa en este documento significa que el material se elimina de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce naturalmente). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se produce naturalmente presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, que se separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tal polinucleótido podría ser parte de un vector y/o tal polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición, e incluso aislarse porque el vector o composición no es parte de su entorno natural.

El término "cebador" denota una secuencia de oligonucleótidos específica complementaria a una secuencia de nucleótidos diana y se usa para hibridarse con la secuencia de nucleótidos diana y sirven de punto de iniciación para la polimerización de nucleótidos catalizada por tanto ADN polimerasa, ARN polimerasa como transcriptasa inversa.

El término "sonda" denota un segmento de ácido nucleico definido (o segmento de análogo de nucleótido, es decir, PNA) que puede usarse para identificar ADN específico presente en muestras que llevan la secuencia complementaria.

Un "polipéptido recombinante" como se usa en este documento significa al menos un polipéptido que en virtud de su origen o manipulación no está asociado a todo o una parte del polipéptido con el que está asociado en la naturaleza y/o está ligado a un polipéptido distinto del que está ligado en la naturaleza. Un polipéptido recombinante o derivado no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. También puede generarse de cualquier manera, que incluye síntesis química o expresión de un sistema de expresión recombinante.

El término "péptido sintético" como se usa en este documento significa una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud que puede sintetizarse químicamente mediante procedimientos muy conocidos para un experto habitual. Estos péptidos sintéticos son útiles en diversas aplicaciones.

"Polinucleótido purificado" se refiere a un polinucleótido de interés o fragmento del mismo que está esencialmente libre, es decir, contiene menos de aproximadamente el 50%, preferentemente menos de aproximadamente el 70% y más preferentemente menos de aproximadamente el 90% de la proteína con la que el polinucleótido está naturalmente asociado. Las técnicas para purificar polinucleótidos de interés son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, homogeneización de la célula que contiene el polinucleótido con un agente caotrópico y separación del (de los) polinucleótido(s) y proteínas por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación según densidad. Por tanto, "polipéptido purificado" significa un polipéptido de interés o fragmento del mismo que está esencialmente libre, es decir, contiene menos de aproximadamente el 50%, preferentemente menos de aproximadamente el 70% y más preferentemente menos de aproximadamente el 90% de componentes celulares con los que el polipéptido de interés está naturalmente asociado. Los procedimientos para purificar se conocen en la técnica.

“Polipéptido” como se usa en este documento indica una cadena molecular de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término también pretende referirse a modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares.

“Células huésped recombinantes”, “células huésped”, “células”, “líneas celulares”, “cultivos celulares” y otros términos tales que denotan microorganismos o líneas celulares de eucariotas superiores cultivados como entidades unicelulares se refieren a células que pueden usarse o han sido usadas como receptores de vector recombinante u otro ADN transferido e incluyen la progenie original de la célula original que se ha transfectado.

Como se usa en este documento, “replicón” significa cualquier elemento genético tal como un plásmido, un cromosoma o un virus que se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula.

Un “vector” es un replicón en el que otro segmento de polinucleótido está unido tal como para provocar la replicación y/o expresión del segmento unido.

El término “secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control se diferencia dependiendo del organismo huésped. En procariontes tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómico y terminadores; en eucariotas tales secuencias de control incluyen generalmente promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores. Por tanto, el término “secuencia de control” pretende incluir como mínimo todos los componentes cuya presencia sea necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras.

“Operativamente ligada” se refiere a una situación en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su modo previsto. Por tanto, por ejemplo, una secuencia de control “operativamente ligada” a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logre en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “marco de lectura abierto” u “ORF” se refiere a una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una parte de una secuencia codificante o una secuencia codificante total.

Una “secuencia codificante” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe en ARNm y se traduce en un polipéptido cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación de la traducción en el extremo 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ARNm, ADNc y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

El término “transformación” se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del procedimiento usado para la inserción. Por ejemplo, se incluyen captación directa, transducción o apareamiento f. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido o, alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped.

“Producto purificado” se refiere a una preparación del producto que ha sido aislada de los constituyentes celulares con los que el producto está normalmente asociado, y de otros tipos de células que pueden estar presentes en la muestra de interés.

Todas las secuencias de péptidos están escritas según la convención generalmente aceptada por la que el residuo de aminoácidos del extremo α -N está a la izquierda y el extremo α -C está a la derecha. Como se usa en este documento, el término “extremo α -N” se refiere al grupo alfa-amino libre de un aminoácido en un péptido y el término “extremo α -C” se refiere al extremo de ácido alfa-carboxílico libre de un aminoácido en un péptido.

Como se usa en este documento, el término “grupo protector de N” se refiere a aquellos grupos previstos para proteger el extremo α -N de un aminoácido o péptido o proteger de otro modo el grupo amino de un aminoácido o péptido contra reacciones no deseadas durante procedimientos de síntesis. Grupos protectores de N comúnmente usados se desvelan en Greene, “Protective Groups In Organic Synthesis”, (John Wiley & Sons, Nueva York (1981)). Adicionalmente, grupos protectores pueden usarse como profármacos que se escinden fácilmente *in vivo*, por ejemplo, por hidrólisis enzimática, para liberar el parental biológicamente activo. Grupos protectores de N comprenden grupos alcanoilo inferiores tales como formilo, acetilo (“Ac”), propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo y similares; otros grupos acilo incluyen 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α -clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo y similares; grupos sulfonilo tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo y similares; grupos formadores de carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo,

2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidriloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo y similares; grupos arilalquilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y similares y grupos sililo tales como trimetilsililo y similares. Grupos protectores de N preferidos son formilo, acerilo, benzóilo, pivaloilo, t-butilacetilo, fenilsulfonilo, bencilo, t-butiloxicarbonilo (Boc) y benciloxicarbonilo (Cbz). Por ejemplo, la lisina puede protegerse en el extremo α -N por un grupo lábil de ácido (por ejemplo, Boc) y protegerse en el extremo ϵ -N por un grupo lábil de base (por ejemplo, Fmoc), luego desprotegerse selectivamente durante la síntesis.

Como se usa en este documento, el término "grupo protector de carboxi" se refiere a un grupo éster o amida protector de ácido carboxílico empleado para bloquear o proteger la funcionalidad ácido carboxílico mientras que se realizan las reacciones que implican otros sitios funcionales del compuesto. Los grupos protectores de carboxi se desvelan en Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" pág. 152-186 (1981), que se incorpora por este documento por referencia. Adicionalmente, un grupo protector de carboxi puede usarse como profármaco por el cual el grupo protector de carboxi puede escindirse fácilmente *in vivo*, por ejemplo, por hidrólisis enzimática, para liberar el parental biológicamente activo. Tales grupos protectores de carboxi son muy conocidos para los expertos en la materia, habiéndose usado extensamente en la protección de grupos carboxilo en los campos de la penicilina y la cefalosporina como se describe en las patentes de EE.UU. n° 3.840.556 y 3.719.667, cuyas divulgaciones se incorporan por este documento en este documento por referencia. Grupos protectores de carboxi representativos son alquilo C₁-C₈ inferior (por ejemplo, metilo, etilo o t-butilo y similares); arilalquilo tal como fenetilo o bencilo y derivados sustituidos de los mismos tales como grupos alcoxibencilo o nitrobencilo y similares; arilalquenilo tal como feniletlenilo y similares; arilo y derivados sustituidos del mismo tales como 5-indanilo y similares; dialquilaminoalquilo tal como dimetilaminoetilo y similares); grupos alcanoiloxialquilo tales como acetoximetilo, butiriloximetilo, valeriloximetilo, isobutililoximetilo, isovaleriloximetilo, 1-(propioniloxi)-1-etilo, 1-(pivaloiloxil)-1-etilo, 1-metil-1-(propioniloxi)-1-etilo, pivaloiloximetilo, propioniloximetilo y similares; grupos cicloalcanoiloxialquilo tales como ciclopropilcarboniloximetilo, ciclobutilcarboniloximetilo, ciclopentilcarboniloximetilo, ciclohexilcarboniloximetilo y similares; aroiloxialquilo tal como benzoiloximetilo, benzoiloxietilo y similares; arilalquilcarboniloxialquilo tal como bencilcarboniloximetilo, 2-bencilcarboniloxietilo y similares; alcoxycarbonilalquilo o cicloalquiloxycarbonilalquilo tal como metoxicarbonilmetilo, ciclohexiloxycarbonilmetilo, 1-metoxicarbonil-1-etilo y similares; alcoxycarboniloxialquilo o cicloalquiloxycarboniloxialquilo tal como metoxicarboniloximetilo, t-butiloxycarboniloximetilo, 1-etoxicarboniloxi-1-etilo, 1-ciclohexiloxycarboniloxi-1-etilo y similares; aroiloxycarboniloxialquilo tal como 2-(fenoxicarboniloxi)etilo, 2-(5-indaniloxycarboniloxi)etilo y similares; alcoxialquilcarboniloxialquilo tal como 2-(1-metoxi-2-metilpropan-2-oloxi)etilo y similares; arilalquiloxycarboniloxialquilo tal como 2-(benciloxycarboniloxi)etilo y similares; arilalqueniloxycarboniloxialquilo tal como 2-(3-fenilpropen-2-iloxycarboniloxi)etilo y similares; alcoxycarbonilaminoalquilo tal como t-butiloxycarbonilaminometilo y similares; alquilaminocarbonilaminoalquilo tal como metilaminocarbonilaminometilo y similares; alcanoilaminoalquilo tal como acetilaminometilo y similares; carboniloxialquilo heterocíclico tal como 4-metilpiperazinilcarboniloximetilo y similares; dialquilaminocarbonilalquilo tal como dimetilaminocarbonilmetilo, dietilaminocarbonilmetilo y similares; (5-(alquil inferior)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo tal como (5-t-butil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo y similares; y (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo tal como (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo y similares.

Grupos protectores de carboxi de amida representativos son grupos aminocarbonilo y alquil inferior-aminocarbonilo.

Compuestos protegidos en carboxi preferidos de la invención son compuestos en los que el grupo carboxi protegido es un éster de alquilo inferior, cicloalquilo o arilalquilo, por ejemplo, éster metílico, éster etílico, éster propílico, éster isopropílico, éster butílico, éster sec-butílico, éster isobutílico, éster amílico, éster isoamílico, éster octílico, éster ciclohexílico, éster feniletílico y similares, o un éster alcanoiloxialquílico, cicloalcanoiloxialquílico, aroiloxialquílico o arilalquilcarboniloxialquílico. Grupos protectores de carboxi de amida preferidos son grupos alquil inferior-aminocarbonilo. Por ejemplo, el ácido aspártico puede protegerse en el extremo α -C por un grupo lábil de ácido (por ejemplo, t-butilo) y protegerse en el extremo β -C por un grupo lábil de hidrogenación (por ejemplo, bencilo), luego desprotegerse selectivamente durante la síntesis.

Como se usa en este documento, el término "alquil inferior-aminocarbonilo" significa un grupo $-C(O)NHR^{10}$ que tapa el extremo α -C de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 sintético en la que R¹⁰ es alquilo C₁-C₄.

Como se usa en este documento, el término "aminocarbonilo" indica un grupo $-C(O)NH_2$ que tapa el extremo α -C de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 sintético.

Como se usa en este documento, el término "profármaco" se refiere a compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* dando el compuesto parental, por ejemplo, por hidrólisis enzimática en sangre. Una discusión meticulosa se proporciona en T. Higuchi y V. Stella, Prodrugs as Novel Delivery Systems, vol. 14 de the A.C.S. Symposium Series y en Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Como se usa en este documento, el término “profármaco farmacéuticamente aceptable” se refiere a (1) aquellos profármacos de los compuestos de la presente invención que están dentro del alcance del criterio médico sensato adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, acordes con una relación beneficio con respecto a riesgo adecuada y eficaces para su uso previsto y (2) formas de ión bipolar, cuando sea posible, del compuesto parental.

El término “derivado de éster activado” como se usa en este documento se refiere a haluros de ácido tales como cloruros de ácido y ésteres activados que incluyen, pero no se limitan a, anhídridos derivados de ácido fórmico y acético, anhídridos derivados de haluros de alcoxycarbonilo tales como cloruro de isobutiloxycarbonilo y similares, ésteres derivados de N-hidroxisuccinimida, ésteres derivados de N-hidroxifalimida, ésteres derivados de N-hidroxibenzotriazol, ésteres derivados de N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxamida, ésteres derivados de 2,4,5-triclorofenol y similares.

Como se usa en este documento, el término “actividad antiangiogénica” se refiere a la capacidad de una molécula para inhibir el crecimiento de vasos sanguíneos.

Como se usa en este documento, el término “actividad inhibidora endotelial” se refiere a la capacidad de una molécula para inhibir angiogénesis en general y, por ejemplo, para inhibir el crecimiento o la migración de células endoteliales de capilares bovinos en cultivo en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos u otros factores de crecimiento conocidos.

Como se usa en este documento, el término “DE₅₀” es una abreviatura de la dosis de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión que es eficaz para inhibir el crecimiento de vasos sanguíneos o inhibir el crecimiento de células endoteliales de capilares bovinos en cultivo en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos u otros factores de crecimiento conocidos o inhibir la migración de células endoteliales la mitad de lo que sería el crecimiento o la migración en ausencia del inhibidor.

Como se usa en este documento, en su mayoría, los nombres de aminoácidos que se producen naturalmente y residuos de aminoácido usados en este documento siguen las convenciones de nombres sugeridas por la IUPAC Comisión de la IUPAC sobre nomenclatura en química orgánica y la Comisión de la IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica como se explica en Nomenclature of α -Amino Acids (Recommendations, 1974), Biochemistry, 14(2), (1975). Por consiguiente, los términos “Ala”, “Arg”, “Asn”, “Asp”, “Cys”, “Gln”, “Glu”, “Gly”, “His”, “Ile”, “Leu”, “Lys”, “Met”, “Phe”, “Pro”, “Ser”, “Thr”, “Trp”, “Tyr” y “Val” se refieren a los aminoácidos alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina y sus residuos de aminoácido correspondientes en péptidos en sus formas L, D o D,L. Si no se indica configuración específica, un experto en la entendería que la estereoquímica del carbono α de los aminoácidos y los residuos de aminoácido en los péptidos descritos en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas es la configuración que se produce naturalmente o “L” con la excepción de la glicina de molécula aquiral y con la excepción adicional de cualquier aminoácido que sea aquiral o que se designe de otro modo “D-.”

Como se usa en este documento, el término “3-I-Tyr” significa un residuo de L-, D-, o D,L-tirosilo en el que un radical de hidrógeno orto al hidroxilo fenólico se sustituye por un radical yoduro. El radical yoduro puede ser radiactivo o no radiactivo.

La presente invención también contempla residuos de aminoácidos con residuos de cadenas laterales que no se producen naturalmente tales como homofenilalanina, fenilglicina, norvalina, norleucina, ornitina, tiazolalanina (sustituida en 2-, 4- y 5-) y similares.

Por tanto, debe entenderse que se contempla que la presente invención engloba cualquier derivado de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 y proteínas de fusión de la rosquilla 5 que tienen actividad antiangiogénica e incluye la clase entera de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 y las proteínas de fusión descritas en este documento y homólogos que tienen al menos el 95% de identidad de aminoácidos con el péptido de la rosquilla 5 de aquellos fragmentos y proteínas. Adicionalmente, la invención no depende del modo en el que se produce el fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión, es decir, por (1) escisión proteolítica de un plasminógeno de mamífero aislado, (2) por expresión de una molécula recombinante que tiene un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión y (3) técnicas de síntesis en fase sólida conocidas para los expertos en la materia.

La presente invención proporciona péptidos con la estructura general A-B₁-C₁-X₁-Y en la que A es acetilo; B₁ y X₁ están ausentes, C₁ es un péptido 10-mero que empieza en la posición de aminoácidos Arg⁵¹⁴ y que termina en la posición de aminoácidos Trp⁵²³ de SEC ID N°:1 e Y es aminocarbonilo.

Un compuesto representativo es uno en el que A es acetilo e Y es aminocarbonilo y B₁-C₁-X₁ es la secuencia de las posiciones de aminoácidos 514-523 de SEC ID N°:1.

Los fragmentos de K5 o las proteínas de fusión de K5 pueden obtenerse por expresión de una molécula recombinante que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia que codifica una proteína que tiene un fragmento del péptido de la rosquilla 5 y luego purificando el producto peptídico que se expresa (véase Menhart, N., y col., *Biochemistry*, 32: 8799-8806 (1993)). La secuencia de ADN de plasminógeno humano se ha publicado (Browne, M.J. y col. *Fibrinolysis*, 5(4): 257-260 (1991)) y se muestra en la FIG. 3(a-b) (SEC ID N°: 12). Una secuencia de polinucleótidos que codifica la rosquilla 5 empieza en aproximadamente la posición de nucleótido 1421 de SEC ID N°: 12 y termina en aproximadamente la posición de nucleótido 1723.

El gen que codifica un fragmento del péptido de K5 o proteína de fusión de K5 puede aislarse de células o tejidos que expresan altos niveles de plasminógeno humano o proteínas de fusión de K5 (1) aislando ARN mensajero del tejido o células, (2) usando transcriptasa inversa para generar la secuencia de ADN correspondiente y (3) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores apropiados para amplificar la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de K5 activa o proteína de fusión de la misma. Además, un polinucleótido que codifica un fragmento del péptido de K5 o proteína de fusión de K5 puede clonarse en cualquier vector de expresión comercialmente disponible (tal como los vectores pBR322, pUC y similares) o vectores de expresión/purificación (tales como un vector de fusión de GST (Pharmacia®, Piscataway, NJ)) y luego expresarse en un huésped procarionta, vírico o eucariota adecuado. La purificación puede entonces lograrse mediante medios convencionales o, en el caso de un sistema de expresión/purificación comercial, según instrucciones del fabricante.

Un fragmento del péptido de K5 o proteína de fusión de K5 también puede sintetizarse mediante procedimientos convencionales de química en fase sólida conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, fragmentos del péptido de la rosquilla 5 pueden sintetizarse por técnicas de química en fase sólida siguiendo los procedimientos descritos por Steward y Young (Steward, J.M. y Young, J.D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, (1984) usando un sintetizador de Applied Biosystems. Similarmente, múltiples fragmentos pueden sintetizarse, luego enlazarse juntos para formar fragmentos más largos. Estos fragmentos de péptidos sintéticos también pueden prepararse con sustituciones de aminoácidos en localizaciones específicas para probar actividad antiangiogénica *in vitro* e *in vivo*. Para la síntesis de péptidos en fase sólida, un resumen de las muchas técnicas puede encontrarse en J.M. Stewart y J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 y J. Meienhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 2, pág. 46, Academic Press (Nueva York), 1973. Para la síntesis en solución clásica véase G. Schroder y K. Lupke, *The Peptides*, vol. 1, Academic Press (Nueva York). En general, estos procedimientos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos adecuadamente protegidos a la cadena de péptidos en crecimiento. Normalmente, tanto el grupo amino como carboxilo del primer aminoácido se protegen por un grupo protector adecuado. Entonces, el aminoácido protegido o derivatizado o bien se une a un soporte sólido inerte o bien se utiliza en disolución añadiendo el siguiente aminoácido a la secuencia que tiene el grupo (amino o carboxilo) gratuito adecuadamente protegido y en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. Entonces, el grupo protector se elimina de este residuo de aminoácido recientemente añadido y se añade el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido), etc. Después de haberse ligado todos los aminoácidos deseados en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) se elimina secuencialmente o simultáneamente para proporcionar el polipéptido final. Mediante la simple modificación de este procedimiento general es posible añadir más de un aminoácido de uno en uno a una cadena en crecimiento, por ejemplo, acoplando (en condiciones que no racemicen centros quirales) un tripéptido protegido a un dipéptido adecuadamente protegido para formar después de la desprotección un pentapéptido.

Un procedimiento particularmente preferido de preparación de compuestos de la presente invención implica la síntesis de péptidos en fase sólida en la que el extremo α -N del aminoácido se protege por un grupo sensible a ácido o base. Tales grupos protectores deben tener las propiedades de ser estables a las condiciones de formación de enlaces peptídicos, a la vez que puedan eliminarse fácilmente sin destrucción de la cadena de péptidos en crecimiento o racemización de cualquiera de los centros quirales contenidos en su interior. Grupos protectores adecuados son 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), t-butiloxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Cbz), bifenilisopropiloxicarbonilo, t-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-t-butiloxicarbonilo y similares. El grupo protector de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) se prefiere particularmente para la síntesis de fragmentos del péptido de la rosquilla 5. Otros grupos protectores de la cadena lateral preferidos son, para grupos amino de la cadena lateral como lisina y arginina 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (pmc), nitro, p-toluenosulfonilo, 4-metoxibencenosulfonilo, Cbz, Boc y adamantiloxicarbonilo; para tirosina bencilo, o-bromobenciloxicarbonilo, 2,6-diclorobencilo, isopropilo, t-butilo (t-Bu), ciclohexilo, ciclopentilo y acetilo (Ac); para serina t-butilo, bencilo y tetrahidropirranilo; para histidina tritilo, bencilo, Cbz, p-toluenosulfonilo y 2,4-dinitrofenilo; para triptófano formilo; para ácido aspártico y ácido glutámico bencilo y t-butilo y para cisteína trifenilmetilo (tritilo). En el procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida, el aminoácido del extremo α -C está unido a un soporte sólido adecuado o resina. Soportes sólidos adecuados útiles para la síntesis anterior son aquellos materiales que son inertes a los reactivos y condiciones de reacción de las reacciones de condensación-desprotección escalonadas, además de ser insolubles en los medios usados. El soporte sólido preferido para la síntesis de carboxipéptidos del extremo α -C es 4-hidroximetilfenoximetil-copoli(estireno-1% de divinilbenceno). El soporte sólido preferido para los péptidos de amina del extremo α -C es la resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetil disponible de Applied Biosystems (Foster City, CA). El aminoácido del extremo α -C se acopla a la resina por medio de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-

diisopropilcarbodiimida (DIC) o hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), con o sin 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfina (BOPCl), acoplamiento mediado durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas a una temperatura de entre 10° y 50°C en un disolvente tal como diclorometano o DMF. Si el soporte sólido es resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi-acetamidoetilo, el grupo Fmoc se escinde con una amina secundaria, preferentemente piperidina, antes del acoplamiento con el aminoácido del extremo α -C como se ha descrito anteriormente. El procedimiento preferido para el acoplamiento a la resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi-acetamidoetilo desprotegida es hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU, 1 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 1 equiv.) en DMF. El acoplamiento de aminoácidos protegidos sucesivos puede llevarse a cabo en un sintetizador de polipéptidos automático que es muy conocido en la técnica. En una realización preferida, el extremo α -N en los aminoácidos de la cadena de péptidos en crecimiento se protegen con Fmoc. La eliminación del grupo protector Fmoc del lado del extremo α -N del péptido en crecimiento se lleva a cabo mediante tratamiento con una amina secundaria, preferentemente piperidina. Entonces, cada aminoácido protegido se introduce en un exceso aproximadamente 3 veces molar, y el acoplamiento se lleva a cabo preferentemente en DMF. El agente de acoplamiento es normalmente hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU, 1 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 1 equiv.). Al final de la síntesis en fase sólida, el polipéptido se elimina de la resina y se desprotege tanto sucesivamente como en una operación individual. La eliminación del polipéptido y la desprotección pueden llevarse a cabo en una única operación tratando el polipéptido unido a la resina con un reactivo de escisión que comprende tianisól, agua, etanoditiol y ácido trifluoroacético. En los casos en los que el extremo α -C del polipéptido sea una alquilamida, la resina se escinde por aminólisis con una alquilamina. Alternativamente, el péptido puede eliminarse por transesterificación, por ejemplo, con metanol, seguido de aminólisis o por transamidación directa. El péptido protegido puede purificarse en este momento o llevarse directamente a la siguiente etapa. La eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral se lleva a cabo usando la mezcla de escisión descrita anteriormente. El péptido completamente desprotegido se purifica por una secuencia de etapas cromatográficas empleando cualquiera o todos de los siguientes tipos: intercambio iónico en una resina débilmente básica (forma de acetato); cromatografía por adsorción hidrófoba en poliestireno-divinilbenceno sin derivatizar (por ejemplo, Amberlite XAD); cromatografía por adsorción en gel de sílice; cromatografía de intercambio iónico en carboximetilcelulosa; cromatografía de reparto, por ejemplo, en Sephadex G-25, LH-20 o distribución en contracorriente; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), especialmente HPLC en fase inversa en empaquetamiento de columna en fase unida a octil- o octadecilsilil-sílice. Los pesos moleculares de estos fragmentos del péptido de la rosquilla 5 se determinan usando espectroscopía de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB). La síntesis del fragmento del péptido de la rosquilla 5 en fase sólida se ilustra en los Ejemplos 1 a 12.

Dependiendo de cómo se produzca, un fragmento del péptido de K5 o proteína de fusión de K5 puede existir con o sin los enlaces disulfuro anteriormente mencionados de la región en rosquilla 5 de plasminógeno de mamífero o en el caso de una proteína de fusión con otras regiones en rosquilla de mamífero, con o sin los enlaces disulfuro de aquellas regiones correspondientes, o puede existir con enlaces disulfuro que forman una estructura terciaria que se diferencia de la estructura terciaria encontrada en plasminógeno de mamífero nativo. Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 producidos por escisión enzimática de Glu-, Lys- o miniplasminógeno con elastasa y/o pepsina (enzimas que escinden en sitios eliminados de los enlaces de cisteína) contendrán la estructura de la proteína de la rosquilla 5 terciaria nativa; fragmentos del péptido de la rosquilla 5 preparados por síntesis de péptidos en fase sólida pueden o no contener residuos de cistilaminoácido y fragmentos del péptido de la rosquilla 5 preparados por expresión pueden contener enlaces disulfuro en diferentes posiciones distintas de aquellas encontradas en fragmentos del péptido de la rosquilla 5 producidos por escisión enzimática.

Los compuestos de la invención que incluyen, pero no se limitan a, aquellos especificados en los ejemplos poseen actividad antiangiogénica. Como inhibidores de la angiogénesis, tales compuestos son útiles en el tratamiento de tumores sólidos tanto primarios como metastásicos y carcinomas de mama; colon; recto; pulmón; bucofaringe; hipofaringe; esófago; estómago; páncreas; hígado; vesícula biliar; vías biliares; intestino delgado; vías urinarias que incluye riñón, vejiga y urotelio; aparato genital femenino que incluye cuello del útero, útero, ovario, coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional; aparato genital masculino que incluye próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de las células reproductoras; glándulas endocrinas que incluyen tiroidea, suprarrenal y pituitaria; piel que incluye hemangiomas, melanomas, sarcomas que se producen a partir de tejidos óseos o blandos y sarcoma de Kaposi; tumores del cerebro, nervios, ojos y meninges que incluyen astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas; tumores sólidos que se producen a partir de tumores malignos hematopoyéticos tales como leucemias y que incluyen cloromas, plasmacitomas, placas y tumores de micosis fungoides y linfoma de linfocitos T cutáneo/leucemia; linfomas que incluyen tanto linfoma de Hodgkin como de no Hodgkin; profilaxis de enfermedades autoinmunitarias que incluyen artritis reumatoide, inmunitaria y degenerativa; enfermedades oculares que incluyen retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, rechazo de injerto de córnea, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, rubeosis, neovascularización retiniana debida a degeneración macular e hipoxia; condiciones de neovascularización anormal del ojo; enfermedades de la piel que incluyen psoriasis; enfermedades de los vasos sanguíneos que incluyen hemangiomas y proliferación de capilares dentro de placas ateroscleróticas; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; granulación de heridas, enfermedades caracterizadas por estimulación excesiva o anormal de células endoteliales que incluyen adhesiones

intestinales, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas (es decir, queloides) y enfermedades que tienen angiogénesis como una consecuencia patológica que incluyen enfermedad por arañazo de gato (*Rochele minalia quintosa*) y úlceras (*Helicobacter pilori*). Otro uso es un agente de regulación de la natalidad que inhibe la ovulación y el establecimiento de la placenta.

5 Los compuestos de la presente invención también pueden ser útiles para la prevención de metástasis de los tumores descritos anteriormente tanto cuando se usan solos como en combinación con radioterapia y/u otros tratamientos quimioterapéuticos convencionalmente administrados a pacientes para tratar enfermedades angiogénicas. Por ejemplo, cuando se usan en el tratamiento de tumores sólidos, los compuestos de la presente invención pueden administrarse con agentes quimioterapéuticos tales como interferón alfa, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), PRO-MACE/MOPP (prednisona, metotrexato (rescate con w/leucovina), doxorubicina, ciclofosfamida, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona), vincristina, vinblastina, angiioinhibinas, TNP-470, polisulfato de pentosano, factor 4 de plaquetas, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG y similares. Otros agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno que incluyen mecloretamina, melfan, clorambucilo, ciclofosfamida e ifosfamida; nitrosoureas que incluyen carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina; alquilsulfonatos que incluyen busulfano; triazinas que incluyen dacarbazina, etieniminas que incluyen tiotepa y hexametilmelamina; análogos de ácido fólico que incluyen metotrexato; análogos de pirimidina que incluyen 5-fluorouracilo, citosina arabinósido; análogos de porina que incluyen 6-mercaptoporina y 6-tioguanina; antibióticos antitumorales que incluyen actinomicina D; las antraciclina que incluyen doxorubicina, bleomicina, mitomicina C y metramicina; hormonas y antagonistas de hormonas que incluyen tamoxifeno y cortiosteroides y agentes variados que incluyen cisplatino y brequinar. Por ejemplo, un tumor puede tratarse convencionalmente con cirugía, radiación o quimioterapia y la administración de la rosquilla 5 con posterior administración de la rosquilla 5 para prolongar el letargo de micrometástasis y para estabilizar e inhibir el crecimiento de cualquier tumor primario residual.

Agentes citotóxicos tales como ricina pueden ligarse a fragmentos del péptido de la rosquilla 5 y así proporcionar una herramienta para la destrucción de células que se unen a la rosquilla 5. Los péptidos ligados a agentes citotóxicos pueden infundirse de un modo diseñado para maximizar la administración a la localización deseada. Por ejemplo, fragmentos de la rosquilla 5 de alta afinidad ligados a ricina pueden administrarse mediante cánula directamente en la diana o en vasos que suministran al sitio diana. Tales agentes también pueden administrarse en un modo controlado mediante bombas osmóticas acopladas a cánulas de infusión. Una combinación de antagonistas de la rosquilla 5 puede coaplicarse con estimulantes de angiogénesis para aumentar la vascularización de tejido. Las pautas terapéuticas de este tipo podrían proporcionar un medio eficaz de destrucción de cáncer metastásico.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos. Por "sal farmacéuticamente aceptable" se indican aquellas sales que están dentro del alcance del criterio médico sensato adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge, y col. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66: 1 y siguientes. Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Sales de adición de ácido representativas incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Por tanto, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dimetilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenitilo y otros. Así se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite. Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

Las sales de adición básicas pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 haciendo reaccionar un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoniaco o una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y cationes de amoniaco y amina cuaternarios no tóxicos que incluyen amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen

etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares. Sales de los compuestos de la invención preferidas incluyen fosfato, tris y acetato.

Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5, antisueros de la rosquilla 5, agonistas del receptor de la rosquilla 5, antagonistas del receptor de la rosquilla 5 o combinaciones de los mismos pueden combinarse con matrices de liberación sostenida farmacéuticamente aceptables tales como polímeros biodegradables para formar composiciones terapéuticas. Una matriz de liberación sostenida, como se usa en este documento, es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o ácido-base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz actúa por enzimas y fluidos corporales. Una matriz de liberación sostenida se elige deseablemente de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicolidas (polímero de ácido glicólico), polilactida-co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de una de cualquiera de polilactida, poliglicolida, o polilactida-co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5, proteínas de fusión de la rosquilla 5, agonistas del receptor de la rosquilla 5, antagonistas del receptor de la rosquilla 5 o combinaciones de los mismos pueden combinarse con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para formar composiciones terapéuticas. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulamiento o auxiliar de formulación de cualquier tipo. Las composiciones pueden administrarse parenteralmente, sublingualmente, intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, rectalmente, bucalmente o tópicamente (como por polvo, pomada, gotas, parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis).

El término "parenteral", como se usa en este documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular. Las composiciones farmacéuticas para inyección parenteral comprenden disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, además de polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso. Ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerina, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos tales como parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes tales como monoestearato de aluminio y gelatina que retrasan la absorción. Las formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices de microencapsulamiento del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Dependiendo de la relación de fármaco con respecto al polímero y a la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación de fármaco puede controlarse. Las formulaciones inyectables de liberación prolongada también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención bacteriano o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otros medios inyectables estériles justo antes de uso.

La administración tópica incluye administración a la piel, mucosa y a superficies del pulmón y el ojo. Las composiciones para administración tópica, que incluyen aquellas para inhalación, pueden prepararse como un polvo seco que puede presurizarse o no presurizarse. En composiciones en polvo no presurizadas, el principio activo en forma finamente dividida puede usarse en mezcla con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable de mayor tamaño que comprende partículas que tienen un tamaño, por ejemplo, de hasta 100 micrómetros de diámetro. Vehículos inertes adecuados incluyen azúcares tales como lactosa. Deseablemente, al menos el 95% en peso de las partículas del principio activo tienen un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros. Para administración tópica al ojo, un compuesto de la invención se administra en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable de forma que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en las regiones corneales e internas del ojo como, por ejemplo, la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulación. Alternativamente, un compuesto de la invención puede inyectarse directamente en el humor vítreo y acuoso.

La composición puede presurizarse y contener un gas comprimido tal como nitrógeno o un propulsor de gas licuado.

El medio de propulsor licuado y de hecho la composición total es preferentemente de forma que el principio activo no se disuelva en su interior a ningún grado sustancial. La composición presurizada también puede contener un agente tensioactivo tal como un agente tensioactivo no iónico líquido o sólido o puede ser un agente tensioactivo aniónico sólido. Se prefiere usar el agente tensioactivo aniónico sólido en forma de una sal de sodio.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, por tanto, funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilaminares que están dispersados en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que pueda formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los procedimientos para formar liposomas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), pág. 33 y siguientes.

Cuando se usan los tratamientos anteriores u otros, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos de la presente invención puede emplearse en forma pura o, si existe tal forma, en forma de sal farmacéuticamente aceptable y con o sin un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto de la invención significa una cantidad suficiente del compuesto para tratar una enfermedad angiogénica (por ejemplo, para limitar el crecimiento tumoral o para ralentizar o bloquear la metástasis tumoral) a una tasa de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis eficaz terapéuticamente específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado y factores similares muy conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, dentro de la habilidad de la materia está bien empezar con dosis del compuesto a niveles inferiores a aquellas requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. La dosis diaria total de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 o proteínas de fusión que van a administrarse localmente o sistémicamente a un ser humano u otro mamífero huésped en dosis únicas o divididas puede ser en cantidades, por ejemplo, de 0,0001 a 200 mg/kg de peso corporal al día y más normalmente de 1 a 300 mg/kg de peso corporal. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis para los fines de administración. Por consiguiente, las composiciones de dosis única pueden contener cantidades tales o submúltiplos de las mismas para preparar la dosis diaria.

Se entenderá que los agentes que pueden combinarse con el compuesto de la presente invención para la inhibición, el tratamiento o la profilaxis de enfermedades angiogénicas no se limitan a aquellos enumerados anteriormente, pero incluyen, en principio, cualquier agente útil para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades angiogénicas.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican un fragmento del péptido o proteína de fusión de la rosquilla 5 de mamífero que tiene actividad inhibidora de angiogénesis. Tales polinucleótidos pueden usarse para la expresión de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 recombinantes o en terapia génica (como se describe más adelante).

Un polinucleótido de la presente invención puede estar en forma de ARNm o ADN. Los polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico y ADN sintético están dentro del alcance de la presente invención. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario y, si es monocatenario, puede ser la hebra codificante (sentido) o la hebra no codificante (antisentido). Un polinucleótido de la invención puede ser una forma sin modificar o incluir una modificación tal como metilación o tapado.

La secuencia codificante que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en este documento o puede ser una secuencia codificante diferente cuya secuencia codificante, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que el ADN proporcionado en este documento. Este polinucleótido puede incluir sólo la secuencia codificante para el polipéptido, o la secuencia codificante para el polipéptido y la secuencia codificante adicional tal como una secuencia conductora o secretora o una secuencia de proproteínas, o la secuencia codificante para el polipéptido (y opcionalmente la secuencia codificante adicional) y la secuencia no codificante tal como una secuencia no codificante en 5' y/o 3' de la secuencia codificante para el polipéptido.

Además, la invención incluye polinucleótidos de variantes que contienen modificaciones tales como deleciones, sustituciones o adiciones de polinucleótido; y cualquier modificación del polipéptido resultante de la secuencia de polinucleótidos de las variantes. Un polinucleótido de la presente invención también puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica que se produce naturalmente de la secuencia codificante proporcionada en este documento.

Además, la secuencia codificante para el polipéptido puede fusionarse en el mismo marco de lectura con una secuencia de polinucleótidos que ayuda en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped, por ejemplo, una secuencia conductora que sirve de secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido de la célula. El polipéptido que tiene una secuencia conductora es una preproteína y puede tener la secuencia conductora escindida por la célula huésped para formar el polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína más residuos de aminoácidos de 5' adicionales. Una proteína que tiene una prosequencia es una proproteína y en algunos casos puede ser una forma inactiva de la proteína. Una vez se escinde la prosequencia queda una proteína activa. Por tanto, el polinucleótido de la presente invención puede codificar una proteína, o una proteína que tiene una prosequencia o una proteína que tiene tanto una prosequencia (secuencia conductora) como una prosequencia.

Los polinucleótidos de la presente invención también pueden tener la secuencia codificante fusionada en marco con una secuencia del marcador que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia del marcador puede ser una marca GST suministrada por un vector pGEX para proporcionar la purificación del polipéptido fusionado con el marcador en el caso de un huésped bacteriano o, por ejemplo, la secuencia del marcador puede ser una marca de hemaglutinina (HA) cuando se usa un huésped mamífero, por ejemplo, células COS-7. La marca HA se corresponde con un epítipo derivado de la proteína de la hemaglutinina de la gripe. Véase, por ejemplo, I. Wilson, y col., Cell 37:767 (1984).

El polinucleótido puede generarse de cualquier manera que incluye, pero no se limita a, síntesis química, replicación, transcripción inversa o transcripción que se basa en la información proporcionada por la secuencia de bases en la(s) región (regiones) de las que se deriva el polinucleótido; como tal puede representar tanto una orientación sentido como una antisentido del polinucleótido original. Un procedimiento preferido de generación de un polinucleótido es por la reacción en cadena de la polimerasa descrita en las patentes de EE.UU. 4.683.195 y 4.683.202.

Se contempla que se considerará que los polinucleótidos se hibridarán con las secuencias proporcionadas en este documento si hay al menos el 50%, y preferentemente al menos el 70%, de identidad entre el polinucleótido y la secuencia.

La presente invención también proporciona vectores que incluyen polinucleótidos de la presente invención, células huésped que están genéticamente manipuladas con vectores de la presente invención y procedimientos para producir polipéptidos de la presente invención por técnicas recombinantes. Tales procedimientos comprenden cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido derivado de la rosquilla 5 y recuperar el polipéptido derivado de la rosquilla 5 del cultivo celular.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden emplearse para producir un polipéptido por técnicas recombinantes. Por tanto, la secuencia de polinucleótidos puede incluirse en una cualquiera de una variedad de vehículos de expresión, en particular vectores o plásmidos para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN vírico tal como variolovacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar y seudorrabia. Sin embargo, cualquier otro plásmido o vector puede usarse mientras que sea replicable y viable en el huésped.

La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en sitios de endonucleasa de restricción apropiados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se consideran que están dentro del alcance de los expertos en la materia. La secuencia de ADN en el vector de expresión está operativamente ligada a una secuencia(s) de control de la expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Ejemplos representativos de tales promotores incluyen, pero no se limitan a, promotor de LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor P sub L del fago lambda y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariontas o eucariotas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión contienen preferentemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como resistencia a dihidrofolato-reductasa o neomicina para cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se ha descrito anteriormente en este documento, además de un promotor o secuencia de control apropiado, puede emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese la proteína. Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados pueden

mencionarse: células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; *Streptomyces spp.*; células fúngicas tales como levadura; células de insecto tales como *Drosophila* y Sf9; y células animales tales como CHO, COS o Bowes, etc. La selección de un huésped apropiado se considera que está dentro del alcance de los expertos en la materia de las enseñanzas proporcionadas en este documento.

Más particularmente, la presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias que se han descrito ampliamente anteriormente. Las construcciones comprenden un vector tal como un plásmido o vector vírico en el que una secuencia de la invención se ha insertado en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor operativamente ligado a la secuencia. Los expertos en la materia conocen una gran cantidad de vectores y promotores adecuados y están comercialmente disponibles. A modo de ejemplo se proporcionan los siguientes vectores. Bacterianos: pSPORT1 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen) pBs, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene®, La Jolla, CA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia®). Eucariotas: pWLnco, pSV2cat, pOG44, pXT1 pSG (Stratagene®) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia®). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siembra y cuando sea replicable y viable en el huésped.

Pueden seleccionarse regiones promotoras de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol-transferasa) u otros vectores con marcadores de selección. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Promotores bacterianos nombrados particulares incluyen lacI, lacZ, T3, SP6, T7, gpt, lambda P sub R, P sub L y trp. Promotores eucariotas incluyen temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple (VHS), timidina-cinasa, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus y metalotioneína 1 de ratón. La selección del vector y promotor apropiado es de competencia del nivel del experto en la materia.

En otra realización, la presente invención proporciona células huésped que contienen la construcción anteriormente descrita. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior tal como una célula de mamífero o una célula eucariota inferior tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación (L. Davis y col., "Basic Methods in Molecular Biology", 2ª edición, Appleton y Lang, Paramount Publishing, East Norwalk, CT (1994)).

Las construcciones en células huésped pueden usarse de un modo convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden producirse sintéticamente por sintetizadores de péptidos convencionales.

Las proteínas pueden expresarse en células de mamífero, levadura, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir tales proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN de la presente invención. Vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas se describen por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción en cis de ADN, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el último lado del origen de replicación (pb 100 a 270), un potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, un potenciador de polioma en el último lado del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Generalmente, vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores de selección que permiten la transformación de la célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y *S. cerevisiae* el gen TRP1, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en la dirección 3'. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), factor alfa, fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción, y preferentemente una secuencia conductora que puede dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación del extremo N que confiere las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de iniciación y terminación de la traducción adecuadas en la fase de lectura factible con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores de selección fenotípicos y un origen de replicación para garantizar el mantenimiento del vector y, si se desea, para proporcionar la amplificación dentro del huésped. Huéspedes procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y

Staphylococcus, aunque también pueden emplearse otras como materia rutinaria de elección.

5 Vectores de expresión útiles para uso bacteriano comprenden un marcador de selección y origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos que comprenden elementos genéticos del vector de clonación muy conocido pBR322 (ATCC 37017). Otros vectores incluyen, pero no se limitan a, PKK223-3 (Pharmacia® Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI). Estas secciones de "esqueleto" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que va a expresarse.

10 Vectores de expresión útiles también pueden comprender un componente de fusión para facilitar la purificación de un polipéptido deseado de la invención o para producir polipéptidos solubles. Ejemplos de vectores de fusión comerciales incluyen, pero no se limitan a, pET32a (Novagen, Madison, WI), pGEX-4T-2 (Pharmacia®) y pCYB3 (New England Biolabs, Beverly, MA). También pueden construirse vectores de expresión que evitan el uso de componentes de fusión, particularmente para la expresión de alto nivel de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 o proteínas de fusión en células bacterianas. Por ejemplo, los vectores pueden prepararse para optimizar el acoplamiento traduccional como se describe por Pilot-Matias, T. J., y col., en *Gene*, 128: 219-225 (1993).
 15 Alternativamente, un polinucleótido de la invención puede coexpresarse con un plásmido accesorio separado que por sí mismo codifica una proteína o péptido que ayuda en la solubilización del primer péptido de interés (véase, por ejemplo, Makrides, S.C., *Microbiological Reviews*, 60: 512 (1996)). Por ejemplo, ciertos fragmentos del péptido de la rosquilla 5 (que se ha mostrado que se producen como proteínas de fusión solubles con tioredoxina (véase el Ejemplo 20)) pueden expresarse a partir de un vector de no fusión simultáneamente con (es decir, en la misma célula huésped que) un segundo vector que expresa tioredoxina.

20 Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped a una densidad de células apropiada, el promotor seleccionado se desreprea por medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de la temperatura o inducción química), y las células se cultivan durante un periodo adicional. Las células se recogen normalmente por centrifugación, se homogeneizan por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se retiene para la posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden homogeneizarse por cualquier procedimiento conveniente que incluye ciclos de congelación-descongelación, sonicación, homogeneización mecánica, o uso de agentes de lisis de células; tales procedimientos son muy conocidos para el experto habitual.
 25
 30

También pueden emplearse diversos de sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono descritas por Gluzman, *Cell* 23: 175 (1981), y otras líneas celulares que pueden expresar un vector compatible tal como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuado, y también cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitio de donante y aceptor de corte y empalme, secuencia de terminación de la transcripción y secuencia no transcrita flanqueante en 5'. Las secuencias de ADN derivadas del genoma vírico de SV40, por ejemplo, promotor temprano del origen de SV40, potenciador, corte y empalme y sitios de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. Vectores útiles representativos incluyen pRc/CMV y pcDNA3 (disponibles de Invitrogen, San Diego, CA).
 35
 40

La presente invención también engloba terapia génica por la cual el gen que codifica fragmentos del péptido de la rosquilla 5 o conjugados del fragmento del péptido de la rosquilla 5 se regula en un paciente. En *Gene Transfer into Mammalian Somatic Cells in vivo*, N. Yang, *CriL Rev. Biotechn.* 12(4): 335-356 (1992), se desvelan diversos procedimientos de transferencia o administración de ADN a células para la expresión de la proteína del producto génico, denominado de otro modo en lo sucesivo terapia génica. La terapia génica engloba la incorporación de secuencias de polinucleótidos en células somáticas o células de la línea germinal para su uso en terapia tanto *ex vivo* como *in vivo*. La terapia génica funciona reemplazando genes para aumentar la función génica normal o anormal y para combatir enfermedades infecciosas y otras patologías.
 45
 50

Las estrategias para tratar problemas médicos con terapia génica incluyen estrategias terapéuticas tales como identificar el gen defectuoso y luego añadir un gen funcional para o bien sustituir la función del gen defectuoso o bien aumentar un gen ligeramente funcional o estrategias profilácticas tales como añadir un gen que codifica un producto de proteína que tratará la afección o que hará que el tejido u órgano sea más susceptible a una pauta de tratamiento. Como ejemplo de una estrategia profiláctica, un gen que codifica un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o un conjugado del fragmento del péptido de la rosquilla 5 puede situarse en un paciente y, por tanto, prevenir la aparición de angiogénesis o podría insertarse un gen que hiciera que las células tumorales fueran más susceptibles a radiación de manera que la radiación del tumor produjera un aumento de la destrucción de las células tumorales.
 55
 60

En la presente invención se prevén muchos protocolos para la transferencia de ADN que codifica un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión de la rosquilla 5 o para la transferencia del ADN para las secuencias reguladoras del fragmento del péptido de la rosquilla 5 (o aquellas del componente de fusión). La transfección de secuencias promotoras distintas de las específicamente asociadas a un fragmento del péptido de la rosquilla 5 u otras secuencias que aumentarían la producción de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 también se prevé como
 65

procedimientos de terapia génica. Un ejemplo de esta tecnología se encuentra en Transkaryotic Therapies Inc., de Cambridge, Massachusetts, usando recombinación de homólogos para insertar un "interruptor genético" que convierte un gen de eritropoyetina en células como se desvela en Genetic Engineering News, 15 de abril de 1994. Tales "interruptores genéticos" podrían usarse para activar un fragmento del péptido de la rosquilla 5 (o un receptor de la rosquilla 5) en células que normalmente no expresan estas proteínas.

Los procedimientos de transferencia génica para terapia génica se clasifican en tres amplias categorías: (1) físicos (por ejemplo, electroporación, transferencia génica directa y bombardeo de partículas), (2) químicos (por ejemplo vehículos basados en lípidos y otros vectores no víricos) y (3) biológicos (por ejemplo, vectores derivados de virus). Por ejemplo, los vectores no víricos tales como liposomas recubiertos con ADN pueden inyectarse directamente intravenosamente en el paciente. Se cree que los complejos de liposoma/ADN se concentran en el hígado en el que administran el ADN a macrófagos y células de Kupffer. Los vectores o el ADN "desnudo" del gen también pueden inyectarse directamente en el órgano, tejido o tumor deseado para la administración que elige diana del ADN terapéutico.

Las metodologías de terapia génica también pueden describirse por el sitio de administración. Las vías fundamentales para administrar genes incluyen transferencia génica *ex vivo*, transferencia génica *in vivo* y transferencia génica *in vitro*. En la transferencia génica *ex vivo*, las células se extraen del paciente y se cultivan en cultivo celular. El ADN se transfecta en las células, y las células transfectadas se expanden en número y luego se reimplantan en el paciente. En la transferencia génica *in vitro*, las células transformadas son células que se cultivan en cultivo tal como células de cultivo de tejido, y no células particulares de un paciente particular. Estas "células de laboratorio" se transfectan, y las células transfectadas se seleccionan y se expanden para tanto la implantación en un paciente como para otros usos. La transferencia génica *in vivo* implica introducir el ADN en las células del paciente cuando las células están dentro del paciente. Las tres categorías de amplia base descritas anteriormente pueden usarse para lograr transferencia génica *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Los procedimientos de administración de ADN mecánicos (es decir, físicos) pueden lograrse por microinyección de ADN en células germinales o somáticas, partículas recubiertas de ADN neumáticamente administradas tales como las partículas de oro usadas en una "pistola de genes" y enfoques químicos inorgánicos tales como transfección de fosfato de calcio. Se ha encontrado que la inyección física de ADN de plásmido en células de músculo da un alto porcentaje de células que se transfectan y tienen una expresión sostenida de genes de marcador. El ADN de plásmido puede o puede no integrarse en el genoma de las células. La no integración del ADN transfectado permitiría la transfección y expresión de proteínas del producto génico en tejidos terminalmente diferenciados no proliferativos durante un periodo de tiempo prolongado sin temor de inserciones, deleciones o alteraciones mutacionales en el genoma celular o mitocondrial. La transferencia a largo plazo, pero no necesariamente permanente, de genes terapéuticos en células específicas puede proporcionar tratamientos para enfermedades genéticas o para uso profiláctico. El ADN podría reinyectarse periódicamente para mantener el nivel de producto génico sin mutaciones que se producen en los genomas de las células del receptor. La no integración de ADN exógenos puede permitir la presencia de varias construcciones de ADN exógeno diferentes dentro de una célula expresando todas las construcciones diversos productos génicos.

La transferencia génica mediada por partículas también puede emplearse para inyectar ADN en células, tejidos y órganos. Con un dispositivo de bombardeo de partículas o "pistola de genes" se genera una fuerza motriz para acelerar las partículas de alta densidad recubiertas de ADN (tal como oro o tungsteno) a una alta velocidad que permite la penetración de los órganos, tejidos o células diana. La electroporación para la transferencia génica usa una corriente eléctrica para hacer que las células o tejidos sean susceptibles a transferencia génica mediada por electroporación. Se usa un breve impulso eléctrico con una intensidad de campo dada para aumentar la permeabilidad de una membrana de tal forma que las moléculas de ADN puedan penetrar en las células. Las técnicas de transferencia génica mediada por partículas y la electroporación son muy conocidas para los expertos en la materia.

Los procedimientos químicos de terapia génica implican transferencia génica mediada por portador mediante el uso de vesículas de lípidos fusogénicos tales como liposomas u otras vesículas para la fusión de membranas. Un vehículo que aloja un ADN de interés puede introducirse convenientemente en fluidos corporales o la circulación sanguínea y luego dirigirse específicamente al sitio al órgano o tejido diana en el cuerpo. Por ejemplo, pueden desarrollarse liposomas que llevan ADN específico de células o de órgano, y el ADN exógeno es transportado por el liposoma absorbido por aquellas células específicas. La inyección de inmunoliposomas que son elegidos como diana para un receptor específico sobre ciertas células puede usarse como un procedimiento conveniente de inserción de ADN en las células que llevan ese receptor. Otro sistema de portador que se ha usado es el sistema de conjugados de asialoglicoproteína/polilisina para transportar el ADN a hepatocitos para transferencia génica *in vivo*.

El ADN transfectado también puede conjugarse con otros tipos de portadores de manera que el ADN sea transportada a la célula del receptor y luego se deposite en el citoplasma o en el nucleoplasma. El ADN puede acoplarse a proteínas nucleares transportadoras en complejos de vesículas específicamente manipulados por ingeniería y transportarse directamente al núcleo.

- La transferencia génica mediada por portador también puede implicar el uso de compuestos basados en lípidos que no son liposomas. Por ejemplo, las lipofectinas y las citofectinas son iones positivos basados en lípidos que se unen a ADN negativamente cargado y forman un complejo que puede transportar el ADN a través de una membrana celular. Otro procedimiento de transferencia génica mediada por portador implica la endocitosis basada en receptor.
- 5 En este procedimiento se prepara un ligando (específico para un receptor de la superficie celular) para formar un complejo con un gen de interés y luego se inyecta en la circulación sanguínea. Las células diana que tienen el receptor de la superficie celular se unirán específicamente al ligando y transportarán el complejo ligando-ADN a la célula.
- 10 Las metodologías de terapia génica biológica emplean vectores víricos o vectores no víricos (tales como los conjugados de ligando-ADN, liposomas y los complejos de lípido-ADN tratados anteriormente) para insertar genes en células. Las células transfectadas pueden ser células derivadas de los tejidos normales del paciente, los tejidos enfermos del paciente o células de no paciente.
- 15 Puede ser deseable que una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN del fragmento del péptido de la rosquilla 5 o una secuencia de ADN de la proteína de fusión de la rosquilla 5 esté operativamente ligada a una secuencia de control de la expresión para formar un vector de expresión que puede expresar un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión, respectivamente. Alternativamente, la regulación génica de un fragmento del péptido de la rosquilla 5 o una proteína de fusión de la rosquilla 5 puede llevarse a cabo
- 20 administrando compuestos que se unen al gen de la rosquilla 5, el gen del componente de fusión o regiones de control asociadas al gen de la rosquilla 5 o el gen de su componente de fusión o a un transcrito de ARN correspondiente (o cualquiera de los dos) para modificar la tasa de transcripción o traducción.
- Los vectores víricos que se han usado para protocolos de terapia génica incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, otros virus de ARN tales como poliovirus o virus Sindbis, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, SV 40, variolovacuna y otros virus de ADN. Los vectores retrovíricos murinos defectuosos en la replicación son los vectores de transferencia génica más ampliamente utilizados. Los retrovirus de leucemia murina están compuestos por un ARN monocatenario complejado con una proteína vital nuclear y enzimas de polimerasa (pol) recubiertas de un núcleo de proteína (gag) y rodeadas por una envuelta de glicoproteína (env) que determina el rango del huésped. La
- 25 estructura genómica de retrovirus incluye genes gag, pol y env encerrados en las repeticiones terminales largas de 5' y 3' (LTR). Los sistemas de vectores retrovíricos explotan el hecho de que un vector mínimo que contiene las LTR de 5' y 3' y la señal de encapsidación sean suficientes para permitir la encapsidación del vector y la infección e integración en células diana siempre que las proteínas estructurales víricas se suministren en *trans* en la línea celular de encapsidación. Las ventajas fundamentales de los vectores retrovíricos para la transferencia génica incluyen infección y expresión génica eficiente en la mayoría de los tipos de células, integración precisa del vector de una única copia en ADN cromosómico de células diana y facilidad de manipulación del genoma retrovírico. Por ejemplo, se han usado vectores de retrovirus alterados en procedimientos *ex vivo* para introducir genes en linfocitos periféricos e infiltrantes de tumores, hepatocitos, células epidérmicas, miocitos u otras células somáticas (que pueden entonces introducirse en el paciente para proporcionar el producto génico del ADN insertado).
- 30 El adenovirus está compuesto por ADN bicatenario lineal complejado con proteínas nucleares y rodeado por proteínas de la cápside. Los avances en la virología molecular han conducido a la capacidad de explotar la biología de estos organismos para crear vectores que puedan transducir secuencias genéticas novedosas en células diana *in vivo*. Los vectores basados en adenovíricos expresarán péptidos del producto génico a altos niveles. Los vectores adenovíricos tienen altas eficiencias de infectividad, incluso con bajos títulos de virus. Adicionalmente, el virus es completamente infeccioso como un virión sin célula, por lo que no se necesita la inyección de líneas celulares productoras. Otra posible ventaja de los vectores adenovíricos es la capacidad para lograr la expresión a largo plazo de genes heterólogos *in vivo*.
- 35 El adenovirus está compuesto por ADN bicatenario lineal complejado con proteínas nucleares y rodeado por proteínas de la cápside. Los avances en la virología molecular han conducido a la capacidad de explotar la biología de estos organismos para crear vectores que puedan transducir secuencias genéticas novedosas en células diana *in vivo*. Los vectores basados en adenovíricos expresarán péptidos del producto génico a altos niveles. Los vectores adenovíricos tienen altas eficiencias de infectividad, incluso con bajos títulos de virus. Adicionalmente, el virus es completamente infeccioso como un virión sin célula, por lo que no se necesita la inyección de líneas celulares productoras. Otra posible ventaja de los vectores adenovíricos es la capacidad para lograr la expresión a largo plazo de genes heterólogos *in vivo*.
- 40 Los vectores víricos también se han usado para insertar genes en células usando protocolos *in vivo*. Para dirigir la expresión específica de tejido de genes exógenos pueden usarse elementos reguladores de acción en cis o los promotores que son conocidos por ser específicos de tejido. Alternativamente, esto puede lograrse usando administración *in situ* de ADN o vectores víricos a sitios anatómicos específicos *in vivo*. Por ejemplo, la transferencia génica a vasos sanguíneos *in vivo* se logró implantando células endoteliales transducidas *in vitro* en sitios elegidos
- 45 en las paredes arteriales. Las células de alrededor infectadas por el virus también expresaron a su vez el producto génico. Un vector vírico puede administrarse directamente al sitio *in vivo* (por catéter, por ejemplo), permitiendo así que sólo se infecten ciertas áreas por el virus y proporcionando expresión génica específica de sitio a largo plazo. La transferencia génica *in vivo* usando vectores de retrovirus también se ha demostrado en tejido mamario y tejido hepático mediante inyección del virus alterado a vasos sanguíneos que conducen a los órganos.
- 50 Los vectores víricos también se han usado para insertar genes en células usando protocolos *in vivo*. Para dirigir la expresión específica de tejido de genes exógenos pueden usarse elementos reguladores de acción en cis o los promotores que son conocidos por ser específicos de tejido. Alternativamente, esto puede lograrse usando administración *in situ* de ADN o vectores víricos a sitios anatómicos específicos *in vivo*. Por ejemplo, la transferencia génica a vasos sanguíneos *in vivo* se logró implantando células endoteliales transducidas *in vitro* en sitios elegidos en las paredes arteriales. Las células de alrededor infectadas por el virus también expresaron a su vez el producto génico. Un vector vírico puede administrarse directamente al sitio *in vivo* (por catéter, por ejemplo), permitiendo así que sólo se infecten ciertas áreas por el virus y proporcionando expresión génica específica de sitio a largo plazo. La transferencia génica *in vivo* usando vectores de retrovirus también se ha demostrado en tejido mamario y tejido hepático mediante inyección del virus alterado a vasos sanguíneos que conducen a los órganos.
- 55 Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 también pueden producirse y usarse en una variedad de aplicaciones. Como ejemplos, diferentes fragmentos de péptidos de la rosquilla 5 pueden usarse (1) como agonistas y antagonistas activos en los sitios de unión de la rosquilla 5, (2) como antígenos para el desarrollo de antisueros específicos, (3) como péptidos para su uso en kits de diagnóstico y (4) como péptidos ligados a o usados en combinación con agentes citotóxicos para la destrucción de células elegidas como diana que se unen a fragmentos del péptido de la rosquilla 5. Las secuencias de aminoácidos que comprenden estos fragmentos de péptidos pueden
- 60 Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 también pueden producirse y usarse en una variedad de aplicaciones. Como ejemplos, diferentes fragmentos de péptidos de la rosquilla 5 pueden usarse (1) como agonistas y antagonistas activos en los sitios de unión de la rosquilla 5, (2) como antígenos para el desarrollo de antisueros específicos, (3) como péptidos para su uso en kits de diagnóstico y (4) como péptidos ligados a o usados en combinación con agentes citotóxicos para la destrucción de células elegidas como diana que se unen a fragmentos del péptido de la rosquilla 5. Las secuencias de aminoácidos que comprenden estos fragmentos de péptidos pueden
- 65 Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 también pueden producirse y usarse en una variedad de aplicaciones. Como ejemplos, diferentes fragmentos de péptidos de la rosquilla 5 pueden usarse (1) como agonistas y antagonistas activos en los sitios de unión de la rosquilla 5, (2) como antígenos para el desarrollo de antisueros específicos, (3) como péptidos para su uso en kits de diagnóstico y (4) como péptidos ligados a o usados en combinación con agentes citotóxicos para la destrucción de células elegidas como diana que se unen a fragmentos del péptido de la rosquilla 5. Las secuencias de aminoácidos que comprenden estos fragmentos de péptidos pueden

seleccionarse basándose en su posición en las regiones exteriores de la molécula que son accesibles para la unión a antisueros o la potencia inhibidora de los fragmentos de péptidos hacia procesos que se producen a partir de o se exacerban por angiogénesis. Además, estas secuencias de péptidos pueden compararse con secuencias conocidas usando bases de datos de secuencias de proteínas tales como GenBank, Brookhaven Protein, SWISS-PROT y PIR para determinar las posibles homologías de secuencias. Esta información facilita la eliminación de secuencias que presentan un alto grado de homología de secuencias con otras moléculas y así potencia las posibilidades de alta especificidad en el desarrollo de antisueros, agonistas y antagonistas para la rosquilla 5.

Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 o proteínas de fusión también pueden usarse como un medio para aislar un receptor de la rosquilla 5 por inmovilización del fragmento del péptido de la rosquilla 5 o proteína de fusión sobre un soporte sólido en, por ejemplo, una columna de afinidad a través de la cual pasan células endoteliales cultivadas o extractos de membrana. Como se conoce en la técnica, el aislamiento y la purificación de un receptor de la rosquilla 5 puede seguirse por secuenciación de aminoácidos para identificar y aislar polinucleótidos que codifican el receptor de la rosquilla 5. Tales polinucleótidos pueden entonces clonarse en un vector de expresión adecuado y transfectarse en células tumorales. La expresión del receptor por las células tumorales transfectadas potenciaría la receptividad de estas células a fragmentos del péptido de la rosquilla 5 endógenos o exógenos y así disminuiría la tasa de crecimiento metastásico. Además, la expresión recombinante de este receptor permitiría que se produjeran mayores cantidades de receptor, por ejemplo, para producir una cantidad suficiente para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar antagonistas más pequeños que imitan la acción de la rosquilla 5.

La sustitución sistemática de aminoácidos dentro de estos péptidos sintetizados puede proporcionar agonistas y antagonistas de péptidos de alta afinidad para el receptor de la rosquilla 5 que potencian o disminuyen la unión del fragmento del péptido de la rosquilla 5 a su receptor. Tales agonistas pueden usarse para suprimir el crecimiento de micrometástasis y así limitar la diseminación del cáncer. En casos de vascularización inadecuada, los antagonistas para los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 pueden aplicarse para bloquear los efectos inhibidores de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 y promover la angiogénesis. Por ejemplo, este tipo de tratamiento puede tener efectos terapéuticos en la promoción de la cicatrización en diabéticos.

Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 o proteínas de fusión o conjugados de la presente invención también pueden usarse como antígenos para generar anticuerpos policlonales o monoclonales que son específicos para el inhibidor de la rosquilla 5. Una forma en la que podrían usarse tales anticuerpos es en procedimientos de diagnóstico y kits para detectar o cuantificar fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en un fluido o tejido corporal. Los resultados de estas pruebas podrían usarse para diagnosticar o determinar la relevancia del pronóstico de fragmentos del péptido de la rosquilla 5.

Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 o proteínas de fusión de la rosquilla 5 pueden marcarse con isótopos radiactivos (véase el Ejemplo 13) o acoplarse químicamente a proteínas para formar conjugados. Los conjugados incluyen enzimas, proteínas portadoras, agentes citotóxicos, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes y bioluminiscentes que se usan para facilitar la prueba de la capacidad de los compuestos que contienen fragmentos del péptido de la rosquilla 5 para unirse a antisueros de la rosquilla 5, detectar tipos de células que poseen un receptor del fragmento del péptido de la rosquilla 5 o ayudar en la purificación de fragmentos del péptido de la rosquilla 5. La técnica de acoplamiento se elige generalmente basándose en los grupos funcionales disponibles en la secuencia de los aminoácidos del fragmento del péptido de la rosquilla 5 que incluyen, pero no se limitan a alquilo, amino, sulfhidrilo, carboxilo, amida, fenol, indolilo e imidazolo. Diversos reactivos usados para efectuar tales acoplamientos incluyen, entre otros, glutaraldehído, bencidina diazotizada, carbodiimidas y p-benzoquinona. La eficiencia de la reacción de acoplamiento se determina usando diferentes técnicas apropiadas para la reacción específica. Por ejemplo, el radiomarcado de un péptido de la rosquilla 5 o un fragmento biológicamente activo del mismo con I^{125} puede llevarse a cabo usando cloramina T y NaI^{125} de alta actividad específica. La reacción se termina con metabisulfito de sodio y la mezcla se desala en columnas desechables. El péptido marcado se eluye de la columna y las fracciones se recogen. Las alícuotas se eliminan de cada fracción y la radiactividad se mide en un contador gamma. Este procedimiento proporciona el fragmento del péptido de la rosquilla 5 radiomarcado libre de NaI^{125} sin reaccionar. En otro ejemplo, la sangre o los extractos de tejido que contienen un fragmento del péptido de la rosquilla 5 acoplado a la rosquilla 4 pueden purificarse en una columna de afinidad de resina de polilisina por lo que el fragmento del péptido de la rosquilla 4-rosquilla 5 se une a la resina mediante la afinidad del fragmento del péptido de la rosquilla 4 por la lisina. La elución de la proteína unida proporcionaría un fragmento del péptido de la rosquilla 4-rosquilla 5 purificado.

Otra aplicación de la conjugación de péptidos es la producción de antisueros policlonales. La producción de antisuero contra fragmentos del péptido de la rosquilla 5 puede realizarse usando técnicas establecidas conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, los fragmentos del péptido 5 individuales que contienen residuos de lisina pueden ligarse a albúmina de suero bovino (BSA) purificada usando glutaraldehído. La eficiencia de esta reacción puede determinarse midiendo la incorporación de péptido radiomarcado. El glutaraldehído sin reaccionar y el péptido pueden separarse por diálisis, y el conjugado puede usarse para producir antisueros policlonales en conejos, ovejas, cabras u otros animales. Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 conjugados con una molécula portadora tal como BSA pueden combinarse con una mezcla de adyuvantes, emulsionarse e inyectarse subcutáneamente en múltiples sitios en la espalda, cuello, ijadas y algunas veces en las almohadillas de las patas

de un huésped adecuado. Generalmente, las inyecciones de refuerzo se administran luego a intervalos regulares tales como cada 2 a 4 semanas. Aproximadamente 7 a 10 días después de cada inyección se obtienen muestras de sangre por venopunción usando, por ejemplo, las venas marginales de la oreja después de la dilatación. Se deja que las muestras de sangre coagulen durante la noche a 4°C y se centrifugan a aproximadamente 2400 X g a 4°C durante aproximadamente 30 minutos. El suero se elimina, se separa en alícuotas y se guarda a 4°C para uso inmediato o a -20 a -90°C para posterior análisis.

Las muestras de suero de la generación de antisueros policlonales o muestras de medios de producción de antisueros monoclonales pueden analizarse para la determinación del título de anticuerpos y en particular para la determinación de antisueros de alto título. Posteriormente, los antisueros del fragmento del péptido de la rosquilla 5 de mayor título pueden probarse para establecer lo siguiente: a) dilución de antisuero óptima para la mayor unión específica del antígeno y la menor unión no específica, b) capacidad de unir cantidades crecientes de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en una curva de desplazamiento patrón, c) posible reactividad cruzada con péptidos y proteínas relacionados que incluyen plasminógeno y fragmentos del péptido de la rosquilla 5 de especies relacionadas y d) capacidad para detectar fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en medios de cultivo celular y en extractos de plasma, orina y tejidos. El título puede establecerse mediante varios medios conocidos en la técnica tales como por transferencia puntual y análisis de densidad, y también mediante precipitación de complejos de péptido-anticuerpo radiomarcados usando proteína A, antisueros secundarios, etanol frío o carbón vegetal-dextrano seguido de la medición de la actividad con un contador gamma. Si se desea, los antisueros de mayor título pueden purificarse en columnas de afinidad. Por ejemplo, los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 pueden acoplarse a una resina comercialmente disponible y usarse para formar una columna de afinidad. Las muestras de antisuero pueden entonces pasarse a través de la columna de manera que los anticuerpos de la rosquilla 5 se unan (mediante los fragmentos del péptido de la rosquilla 5) a la columna. Estos anticuerpos unidos se eluyen posteriormente, se recogen y se evalúan para la determinación del título y la especificidad.

Los kits para la medición de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 y el receptor de la rosquilla 5 también se contemplan como parte de la presente invención. Los antisueros que poseen el mayor título y especificidad y pueden detectar fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en extractos de plasma, orina, tejidos y medios de cultivo celular pueden usarse para establecer kits de ensayo para la medición y la localización rápida, fidedigna, sensible y específica de fragmentos del péptido de la rosquilla 5. Estos kits de ensayo pueden emplear, pero no se limitan a, las siguientes técnicas: ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoensayos, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos fluorométricos, ensayos de sándwich, ensayos inmunoradiométricos, transferencias puntuales, ensayos ligados a enzima que incluyen ELISA, placas de microtitulación, inmunocitoquímica y tiras recubiertas de anticuerpos o tiras reactivas para la rápida monitorización de orina o sangre. Para cada kit, el intervalo, la sensibilidad, la precisión, la fiabilidad, la especificidad y la reproducibilidad del ensayo se establecen por medios muy conocidos para los expertos en la materia.

Un ejemplo de un kit de ensayo comúnmente usado en investigación y en la clínica es un kit de radioinmunoensayo (RIA). Un RIA del fragmento del péptido de la rosquilla 5 puede establecerse del siguiente modo: después de la radioyodación y purificación satisfactoria de un fragmento del péptido de la rosquilla 5, el antisuero que posee el mayor título de anticuerpos anti-fragmento del péptido de la rosquilla 5 se añade a varias diluciones a tubos que contienen una cantidad relativamente constante de radiactividad, tal como 10.000 cpm, en un sistema de tampón adecuado. (El tampón o el suero preinmune se añaden a otros tubos para determinar la unión no específica). Después de la incubación a 4°C durante 24 horas se añade proteína A a todos los tubos y los tubos se agitan con vórtex, se incuban a temperatura ambiente durante 90 minutos y se centrifugan a aproximadamente 2000 - 2500 X g a 4°C para precipitar los complejos de anticuerpo unidos al antígeno marcado. El sobrenadante se elimina por aspiración y la radiactividad en los sedimentos se cuenta en un contador gamma. La dilución del antisuero que se une aproximadamente el 10 al 40% del péptido marcado después de la resta de la unión no específica se selecciona para la posterior caracterización.

A continuación, un intervalo de dilución (aproximadamente 0,1 pg a 10 ng) del fragmento del péptido de la rosquilla 5 usado para el desarrollo del antisuero se evalúa añadiendo cantidades conocidas del péptido a tubos que contienen péptido radiomarcado y antisuero. Después de un periodo de incubación (24 ó 48 horas, por ejemplo), la proteína A se añade y los tubos se centrifugan, el sobrenadante se elimina y se cuenta la radiactividad en el sedimento. El desplazamiento de la unión del fragmento del péptido de la rosquilla 5 radiomarcado por el fragmento del péptido de la rosquilla 5 sin marcar (patrón) proporciona una curva patrón. Adicionalmente pueden añadirse varias concentraciones de otros fragmentos del péptido de la rosquilla 5, plasminógenos, fragmentos del péptido de la rosquilla 5 de diferentes especies y péptidos homólogos a los tubos de ensayo para caracterizar la especificidad del antisuero del fragmento del péptido de la rosquilla 5.

Después de esto, los extractos de diversos tejidos que incluyen, pero no se limitan a, tumores primarios y secundarios, carcinoma de pulmón de Lewis, cultivos de células productoras del fragmento del péptido de la rosquilla 5, placenta, útero y otros tejidos tales como cerebro, hígado e intestino se preparan usando técnicas de extracción que se han empleado satisfactoriamente para extraer fragmentos del péptido de la rosquilla 5. Después del procesamiento de los extractos de tejido se añade tampón de ensayo y diferentes alícuotas / se colocan en los tubos de RIA. Los extractos de las células productoras del fragmento del péptido de la rosquilla 5 conocidas

5 producen curvas de desplazamiento que son paralelas a la curva patrón mientras que los extractos de tejidos que no producen fragmentos del péptido de la rosquilla 5 no desplazan los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 radiomarcados del antisuero del fragmento del péptido de la rosquilla 5. Tales curvas de desplazamiento indican la utilidad del ensayo de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 para medir fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en tejidos y fluidos corporales.

10 Los extractos de tejido que contienen fragmentos del péptido de la rosquilla 5 también pueden caracterizarse sometiendo alícuotas a HPLC de fase inversa. Se recogen fracciones de eluato, se secan en Speed Vac, se reconstituyen en tampón de RIA y se analizan en el RIA de la rosquilla 5. En este caso, la cantidad máxima de la inmunorreactividad del fragmento del péptido de la rosquilla 5 se localiza en las fracciones correspondientes a la posición de elución del fragmento del péptido de la rosquilla 5.

15 El kit de ensayo anteriormente descrito proporcionaría instrucciones, antisuero, un fragmento del péptido de la rosquilla 5 y posiblemente un fragmento del péptido de la rosquilla 5 radiomarcado y/o reactivos para la precipitación de complejos de fragmento del péptido de la rosquilla 5 unido/anticuerpo de la rosquilla 5. Un kit tal sería útil para la medición de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en fluidos biológicos y extractos de tejido de animales y seres humanos con y sin tumores.

20 Puede usarse otro kit para visualizar o localizar fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en tejidos y células. Por ejemplo, las técnicas y kits de inmunohistoquímica que emplean tales técnicas son muy conocidos para los expertos en la materia. Como se conoce en la técnica, un kit de inmunohistoquímica proporcionaría un antisuero del fragmento del péptido de la rosquilla 5, y posiblemente suero de bloqueo y antisuero secundario ligado a una molécula fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína o a algún otro reactivo usado para visualizar el antisuero primario. Usando esta metodología, los tumores sometidos a biopsia pueden examinarse para sitios de producción del fragmento del péptido de la rosquilla 5 o para sitios del receptor del fragmento del péptido de la rosquilla 5. Alternativamente, un kit puede suministrar ácidos nucleicos radiomarcados para su uso en hibridación *in situ* a la sonda para el ARN mensajero del fragmento del péptido de la rosquilla 5.

30 Los compuestos de la invención pueden prepararse usando procedimientos muy conocidos para los expertos en la materia. (véase, por ejemplo, Sottrup-Jensen y col., *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*, vol. 3, Davidson, J.F., Rowan, R.M., Samama, M.M. y Desnoyers, P.C. editors, Raven Press, Nueva York, 1978). Un modo de preparación de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 es por escisión enzimática de la proteína nativa (glu-plasminógeno) o una variante de la misma (que significa una forma truncada de la proteína de longitud completa que puede ser responsable de la escisión por digestión enzimática y que comprende al menos una secuencia de la rosquilla 5 como se define anteriormente tal como lys-plasminógeno o miniplasminógeno). Este procedimiento requiere en primer lugar aislar la proteína de plasma humano en ausencia de inhibidores de la plasmina y así promover la conversión de glu-plasminógeno en lys-plasminógeno (véase Novokhatny, V y Kudinov, S.A., *J. Mol. Biol.* 179: 215-232 (1984)). Posteriormente, la molécula truncada se trata con una enzima proteolítica a una concentración suficiente para escindir fragmentos del péptido de la rosquilla 5 del polipéptido y luego se purifica de los fragmentos restantes por medios conocidos para los expertos en la materia. Una enzima proteolítica preferida es elastasa humana o porcina que escinde plasminógeno y sus variantes truncadas entre regiones en la rosquilla 3-4 y 4-5 (y así puede formar fragmentos de péptidos que contienen las rosquillas 1-3 y 1-4 o las rosquillas 4 ó 5 solas). Por ejemplo, el lys-plasminógeno o el glu-plasminógeno pueden tratarse con elastasa de neutrófilos porcina o humana a una relación de aproximadamente 1:100-1:300 de lys-plasminógeno:elastasa (preferentemente a una relación de 1:150-1:250 y lo más preferentemente a una relación de 1:150) en una disolución de tampón (tal como Tris-HCl, NaCl, fosfato de sodio y similares). Alternativamente, la elastasa puede inmovilizarse en primer lugar (tal como a una resina) para facilitar la purificación de los productos de escisión. El glu-plasminógeno o el lys-plasminógeno se tratan generalmente con elastasa humana o porcina a temperaturas que oscilan de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C y durante periodos de tiempo que oscilan de aproximadamente 4 a aproximadamente 24 horas dependiendo del grado de escisión deseado. Para lograr la digestión completa de glu-plasminógeno, lys-plasminógeno o miniplasminógeno con elastasa humana o porcina se requiere la exposición de estos polipéptidos a la enzima durante al menos aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente. Variando el pH y el tiempo de exposición a la enzima se produce menos escisión o escisión parcial en uno o más de los sitios de escisión susceptibles. Entonces, los productos de escisión se purifican mediante cualquier medio muy conocido en la técnica (tal como cromatografía en columna). Un esquema de purificación preferido implica aplicar los productos de escisión a una columna de lisina-Sepharose como se describe en el Ejemplo 14.

Síntesis en fase sólida de fragmentos del péptido de la rosquilla 5

60 Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar la preparación de compuestos de los que sólo el Ejemplo 4 es una realización de la invención.

EJEMPLO 1

65 N-Ac-Val-Leu-Leu-Pro-Asp-Val-Glu-Thr-Pro-Ser-Glu-Glu-Asp-NH₂

Una columna de síntesis de péptidos de amida (Applied Biosystems) se colocó en la posición de la columna de síntesis de péptidos de un sintetizador de péptidos "Synergy" de Perkin Elmer/Applied Biosynthesis y se usó la siguiente secuencia de síntesis:

- 5 1. Solvatar la resina con DMF durante aproximadamente 5 minutos;
 2. Desbloquear el grupo Fmoc del extremo α -N del aminoácido unido a la resina usando 20% de piperidina en DMF durante aproximadamente 15 minutos;
 3. Lavar la resina con DMF durante aproximadamente 5 minutos;
 10 4. Activar el extremo α -C del aminoácido n° 1 (Fmoc-Asp(β -O^tBu), 25 μ moles) usando una disolución 0,2 M de HBTU (25 μ moles) y HOBT (25 μ moles) en DMSO-NMP (N-metilpirrolidona) y una disolución 0,4 M de diisopropiletilamina (25 μ moles) en DMSO-NMP y acoplar el aminoácido activado a la resina:
 5. Acoplar el aminoácido protegido con Fmoc activado (preparado en la etapa 5) al aminoácido unido a la resina (preparado en la etapa 2) en DMF durante aproximadamente 30 minutos;
 6. Lavar con DMF durante 5 minutos;
 15 7. Repetir las etapas 3 a 6 con los siguientes aminoácidos:

N°	Aminoácido
2.	Fmoc-Glu(γ -O ^t Bu)
3.	Fmoc-Glu(γ -O ^t Bu)
4.	Fmoc-Ser(^t Bu)
5.	Fmoc-Pro
6.	Fmoc-Thr(^t Bu)
7.	Fmoc-Glu(γ' -O ^t Bu)
8.	Fmoc-Val
9.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
10.	Fmoc-Pro
11.	Fmoc-Leu
12.	Fmoc-Leu
13.	Fmoc-Val

8. Acoplar ácido acético al extremo α -N del péptido unido a la resina mediante las condiciones de las etapas 4 y 5.
 9. Lavar la resina con THF durante aproximadamente 5 minutos para eliminar la DMF y reducir la resina, luego secar la resina con argón durante 10 minutos y nitrógeno durante 10 minutos más para proporcionar péptido unido a la resina puro.
 10. Escindir el péptido de la resina con desprotección concomitante de cadenas laterales de aminoácidos mediante agitación con reactivo de escisión (tioanisol recientemente preparado (100 μ l), agua (50 μ l), etanoditiol (50 μ l) y ácido trifluoroacético (1,8 ml) mezclado en el orden anterior a -5°C a -10°C) a 0°C durante 10-15 minutos y luego a temperatura ambiente durante 1,75 horas adicionales (más 0,5 horas adicionales para cada Arg(Pmc), si está presente). La cantidad de reactivo de escisión usada se determinó por la siguiente fórmula:

Peso de resina con péptido unido (mg)	Cantidad de reactivo de escisión (μ l)
0-10	100
10-25	200
25-50	400
50-100	700
100-200	1200

11. Filtrar y aclarar el producto con ácido trifluoroacético puro, añadir el filtrado en porciones de 0,5 ml a un tubo de centrífuga que contiene aproximadamente 8 ml de éter dietílico frío, centrifugar y decantar y repetir el procedimiento hasta que todo el péptido haya precipitado (si el péptido no había precipitado tras la adición al éter, la mezcla se extrajo con ácido acético acuoso al 30% (3 x 1 ml) y los extractos acuosos combinados se liofilizaron para proporcionar el producto).
 12. Usar el péptido bruto o purificar el péptido por HPLC usando una columna Symmetry Prep C18 de 7 μ m (7,8 x 300 mm) con mezclas de disolventes que varían en un gradiente del 5% al 100% de acetonitrilo-(agua, 0,1% de TFA) durante un periodo de 50 minutos seguido de liofilizar para proporcionar 35 mg de N-Ac-Val-Leu-Leu-Pro-Asp-Val-Glu-Thr-Pro-Ser-Glu-Glu-Asp-NH₂.

EJEMPLO 2

N-Ac-Met-Phe-Gly-Asn-Gly-Lys-Gly-Tyr-Arg-Gly-Lys-Arg-Ala-Thr-Thr-Val-Thr-Gly-Thr-Pro-NH₂

- 5 El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Pro como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Thr(^t Bu)
3.	Fmoc-Gly
4.	Fmoc-Thr(^t Bu)
5.	Fmoc-Val
6.	Fmoc-Thr(^t Bu)
7.	Fmoc-Thr(^t Bu)
8.	Fmoc-Ala
9.	Fmoc-Arg(Pmc)
10.	Fmoc-Lys(Boc)
11.	Fmoc-Gly
12.	Fmoc-Arg(Pmc)
13.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
14.	Fmoc-Gly
15.	Fmoc-Lys(Boc)
16.	Fmoc-Gly
17.	Fmoc-Asn(Trt)
18.	Fmoc-Gly
19.	Fmoc-Phe
20.	Fmoc-Met

- 10 para proporcionar 35 mg de N-Ac-Met-Phe-Gly-Asn-Gly-Lys-Gly-Tyr-Arg-Gly-Lys-Arg-Ala-Thr-Thr-Val-Thr-Gly-Thr-Pro-NH₂.

Ejemplos

- 15 Ac-Gln-Asp-Trp-Ala-Ala-Gln-Glu-Pro-His-Arg-His-Ser-Ile-Phe-Thr-Pro-Glu-Thr-Asn-Pro-Arg-Ala-Gly-Leu-Glu-Lys-Asn-Tyr-NH₂

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asn(Trt)
3.	Fmoc-Lys(Boc)
4.	Fmoc-Glu(γ -O ^t Bu)
5.	Fmoc-Leu
6.	Fmoc-Gly
7.	Fmoc-Ala
8.	Fmoc-Arg(Pmc)
9.	Fmoc-Pro
10.	Fmoc-Asn(Trt)
11.	Fmoc-Thr(^t Bu)

Nº	Aminoácido
12.	Fmoc-Glu(γ -O ^t Bu)
13.	Fmoc-Pro
14.	Fmoc-Thr(^t Bu)
15.	Fmoc-Phe
16.	Fmoc-Ile
17.	Fmoc-Ser(^t Bu)
18.	Fmoc-His(Trt)
19.	Fmoc-Arg(Pmc)
20.	Fmoc-His(Trt)
21.	Fmoc-Pro
22.	Fmoc-Glu(γ -O ^t Bu)
23.	Fmoc-Gln(Trt)
24.	Fmoc-Ala
25.	Fmoc-Ala
26.	Fmoc-Trp
27.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
28.	Fmoc-Gln(Trt)

para proporcionar 40 mg de N-Ac-Gln-Asp-Trp-Ala-Ala-Gln-Glu-Pro-His-Arg-His-Ser-Ile-Phe-Thr-Pro-Glu-Thr-Asn-Pro-Arg-Ala-Gly-Leu-Glu-Lys-Asn-Tyr-NH₂.

5 EJEMPLO 4

N-Ac-Arg-Asn-Pro-Asp-Gly-Asp-Val-Gly-Gly-Pro-Trp-NH₂

10 El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Trp como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Pro
3.	Fmoc-Gly
4.	Fmoc-Gly
5.	Fmoc-Val
6.	Fmoc-Asp(β -O ^t -Bu)
7.,	Fmoc-Gly
8.	Fmoc-Asp(β -O ^t -Bu)
9.	Fmoc-Pro
10.	Fmoc-Asn(Trt)
11.	Fmoc-Arg(Pmt)

para proporcionar 20 mg de N-Ac-Arg-Asn-Pro-Asp-Gly-Asp-Val-Gly-Gly-Pro-Trp-NH₂.

15 EJEMPLO 5

N-Ac-Tyr-Thr-Thr-Asn-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-Tyr-NH₂

20 El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
3.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
4.	Fmoc-Leu
5.	Fmoc-Lys(Boc)
6.	Fmoc-Arg(Pmc)
7.	Fmoc-Pro
8.	Fmoc-Asn(Trt)
9.	Fmoc-Thr(^t Bu)
10.	Fmoc-Thr(^t Bu)
11.	Fmoc-Tyr(^t Bu)

para proporcionar 10 mg de N-Ac-Tyr-Thr-Thr-Asn-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-Tyr-NH₂.

EJEMPLO 6

5

N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-Tyr-NH₂

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

10

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
3.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
4.	Fmoc-Leu
5.	Fmoc-Lys(Boc)
6.	Fmoc-Arg(Pmc)
7.	Fmoc-Pro

para proporcionar N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-Tyr-NH₂ (4 mg). EM (FAB) m/z 995 (M+H)⁺.

EJEMPLO 7

15

N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-NH₂

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

20

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
3.	Fmoc-Leu
4.	Fmoc-Lys(Boc)
5.	Fmoc-Arg(Pmc)
6.	Fmoc-Leu

para proporcionar N-Ac-Pro-Arg-Lys-leu-Tyr-Asp-NH₂ (6 mg). EM (ESI) m/z 832 (M+H)⁺.

EJEMPLO 8

25

N-Ac-Pro-Glu-Lys-Arg-Tyr-Asp-Tyr-NH₂

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
3.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
4.	Fmoc-Arg(Pmc)
5.	Fmoc-Lys(Boc)
6.	Fmoc-Glu
7.	Fmoc-Pro

para proporcionar N-Ac-Pro-Glu-Lys-Arg-Tyr-Asp-Tyr-NH₂ (6 mg). EM (FAB) m/z (101) (M+H)⁺.

EJEMPLO 9

5

N-Ac-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-Tyr-NH₂

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

10

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
3.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
4.	Fmoc-Leu
5.	Fmoc-Lys(Boc)
6.	Fmoc-Arg(Pmc)

para proporcionar N-Ac-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-Tyr-NH₂ (8 mg). EM (ESI) m/z 898 (M+H)⁺.

EJEMPLO 10

15

N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-3-I-Tyr-Asp-Tyr-NH₂ (SEC ID Nº: 13)

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

20

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
3.	Fmoc-3-I-Tyr(^t Bu)
4.	Fmoc-Leu
5.	Fmoc-Lys(Boc)
6.	Fmoc-Arg(Pmc)
7.	Fmoc-Pro

para proporcionar N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-3-I-Tyr-Asp-Tyr-NH₂ (2 mg). EM (ESI) m/z (1121) (M+H)⁺.

EJEMPLO 11

25

N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-3-I-Tyr-NH₂ (SEC ID Nº: 14)

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-3-I-Tyr(^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

30

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Asp(β -O ^t Bu)
3.	Fmoc-Tyr(^t Bu)

Nº	Aminoácido
4.	Fmoc-Leu
5.	Fmoc-Lys(Boc)
6.	Fmoc-Arg(Pmc)
7.	Fmoc-Pro

para proporcionar N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-3-I-Tyr-NH₂ (2,5 mg). EM (ESI) m/z 1121 (M+H)⁺.

EJEMPLO 12

5

N-Ac-Lys-Leu-Tyr-Asp-NH₂

El compuesto del título se preparó usando la secuencia de síntesis descrita en el Ejemplo 1 y usando Fmoc-Asp(β-O^tBu) como aminoácido nº 1. Los siguientes aminoácidos se añadieron usando las condiciones indicadas:

10

Nº	Aminoácido
2.	Fmoc-Tyr(^t Bu)
3.	Fmoc-leu
4.	Fmoc-Lys

para proporcionar 2 mg de N-Ac-Lys-Leu-Tyr-Asp-NH₂ (2 mg).

EJEMPLO 13

15

Preparación y separación de una mezcla de N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-3-I¹²⁵-Tyr⁵³⁵-NH₂ y N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-3-I¹²⁵-Tyr⁵³³-Asp-Tyr-NH₂ (SEC ID Nº: 13) y (SEQ NO: ID 14), respectivamente.

20

A una disolución de 30 µg de N-aceti-prolil-arginil-lisil-leucil-tirosil-aspartil-tirosilamida en 80 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se añadió una perla de yodo (Pierce, Rockford, IL) y 100 µCi de NaI¹²⁵. Después de 10 minutos, el reactivo de NaI¹²⁵ en exceso se eliminó aplicando la mezcla de reacción a una columna Waters C18-Light SepPack y eluyendo con agua, luego 0,1% de TFA en 1:1 de CH₃CN/agua y recogiendo 3 X 200 µl de fracciones para proporcionar una mezcla de péptidos radiomarcados con Tyr⁵³³ y Tyr⁵³⁵.

25

La mezcla de péptidos caliente se coinyectó en una columna de HPLC C18 con una disolución equimolar de vehículos fríos N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-3-I-Tyr-NH₂ y N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-3-I-Tyr-Asp-Tyr-NH₂ de los cuales se habían predeterminado tiempos de elución de 36 y 38 minutos, respectivamente. Las eluciones repetidas con el sistema de disolventes en el Ejemplo 1 y la liofilización de las fracciones relevantes combinadas proporcionó el compuesto deseado N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-3-I-Tyr-NH₂ con una impureza mínima N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-3-I-Tyr-Asp-Tyr-NH₂.

30

Metodologías generales

EJEMPLO 14

35

Aislamiento y purificación de fragmentos del péptido de la rosquilla 5

40

Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 se prepararon a partir de la digestión de Lys plasminógeno (Lys-HPg, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) con elastasa porcina (SIGMA, St. Louis, MO) por una modificación del procedimiento de Powell y col. (Arch Biochem. Biophys. 248(1): 390-400 (1986)). Se incubaron 1,5 mg de elastasa porcina con 200 mg de Lys-HPg en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 y se balanceó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de DPF (fluorofosfato de diisopropilo, SIGMA) a una concentración final de 1 mM. La mezcla se balanceó durante 30 minutos adicionales, se dializó contra Tris 50 mM a pH 8,0 durante la noche y se concentró. El plasminógeno escindido se colocó sobre una columna de 2,5 cm x 15 cm de lisina-Sepharose 4B (Brockway, W.J. y Castellino, F.J., Arch. Biochem. Biophys. 151: 194-199 (1972)) y se equilibró con Tris 50 mM a pH 8,0 hasta que se alcanzó una absorbancia de 0,05 (a 280 nm). (Esta etapa se realizó para eliminar cualquier fragmento que contuviera una región en la rosquilla 1 y/o una región en la rosquilla 4 (uniéndose ambas a la lisina)). Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 no absorbidos se dializaron contra tampón Na₂PO₄ 50 mM, pH 5,0, luego se aplicaron a una columna BioRad Mono-S equilibrada con el mismo tampón. La porción de la rosquilla 5 escindida, mini-HPg sin cortar y la fracción del dominio de proteasa restante se eluyeron con un gradiente en etapa del 0-20%, 20-50% y 50-70% de fosfato 20 mM / KCl 1 M a pH 5,0. Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 se eluyeron en la etapa al 50% como se determina por electroforesis en gel.

50

El pico recogido se dializó durante la noche contra Tris 20 mM a pH 8,0.

Se determinó que los fragmentos de la rosquilla 5 separados tenían al menos el 95% de pureza por cromatografía FPLC y DodSO₄/PAGE con tinción con plata (azul de Coomassie). El análisis de secuencias de la porción del extremo amino de los fragmentos purificados reveló la presencia de tres polipéptidos que tenían secuencias del extremo α-N de VLLPDVETPS, VAPPPVVLL y VETPSEED que se corresponden con las posiciones de aminoácidos Val⁴⁴⁹-Ser⁴⁵⁸, Val⁴⁴³-Leu⁴⁵⁰ y Val⁴⁵⁴-Asp⁴⁶¹ de SEC ID N°: 1, respectivamente.

EJEMPLO 15

Ensayo de proliferación endotelial

La proliferación *in vitro* de células endoteliales se determinó como se describe por Lingen y col. en Laboratory Investigation, 74: 476-483 (1996) usando el kit de ensayo de proliferación de células no radiactivo acuoso Cell Titer 96 (Promega Corporation, Madison, WI). Se sembraron células endoteliales de capilares bovinos (suprarrenales) a una densidad de 1000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero bovino de donante y 1% de BSA (albúmina de suero bovino, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Después de 8 horas, las células se privaron de alimento durante la noche en DMEM que contenía 0,1% de BSA, luego se volvieron a alimentar con medios que contenían concentraciones especificadas de inhibidor y 5 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Los resultados del ensayo se corrigieron para tanto las células sin estimular (es decir, sin adición de bFGF) como para la referencia y para células estimuladas con bFGF solo (es decir, sin adición de inhibidor) como proliferación máxima. Cuando se combinaron múltiples experimentos, los resultados se representaron como el cambio de porcentaje en el número de células con respecto a bFGF solo.

EJEMPLO 16

Ensayo de migración de células endoteliales

El ensayo de migración de células endoteliales se realizó esencialmente como se describe por Polverini, P.J. y col., Methods Enzymol, 198: 440-450 (1991). Brevemente, células endoteliales de capilares bovinos (suprarrenales) (BCE, suministradas por Judah Folkman, Harvard University Medical School) se privaron de alimento durante la noche en DMEM que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA). Entonces, las células se recogieron con tripsina y se resuspendieron en DMEM con 0,1% de SBF a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml. Las células se añadieron al fondo de una cámara de Boyden modificada de 48 pocillos (Nucleopore Corporation, Cabin John, MD). La cámara se ensambló y se invirtió, y se dejó que las células se unieran durante 2 horas a 37°C a las membranas de policarbonato por quimiotaxis (tamaño de poro de 5 µm) que se habían empapado en 0,1% de gelatina durante la noche y se secaron. Entonces, la cámara se volvió a invertir y las sustancias de prueba se añadieron a los pocillos de la cámara superior (a un volumen total de 50 µl); entonces, el aparato se incubó durante 4 horas a 37°C. Las membranas se recuperaron, se fijaron y se tiñeron (DiffQuick, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se contó el número de células que habían migrado a la cámara superior por cada 10 campos de gran aumento. Se restó la migración del fondo para DMEM + 0,1% de BSA y los datos se informaron como el número de células migradas por 10 campos de gran aumento (400X) o, cuando los resultados de múltiples experimentos se combinaron, como la inhibición en porcentaje de la migración en comparación con un control positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

EJEMPLO 17

Efecto de los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en proliferación de células endoteliales *in vitro*

El efecto de los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 sobre la proliferación de células endoteliales se determinó *in vitro* usando el ensayo de proliferación de células endoteliales anteriormente descrito. Para estos experimentos, los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 se prepararon como se ilustra en los Ejemplos 1 a 14 y se probaron a diversas concentraciones que oscilaban de aproximadamente 100 a 1000 pM usando bFGF como un control de proliferación máxima. La SEC ID N°: 3 del fragmento del péptido de la rosquilla 5 fue eficaz en la inhibición de la proliferación de células BCE de un modo dependiente de la dosis. La concentración de SEC ID N°: 3 del fragmento del péptido de la rosquilla 5 requerida para alcanzar la inhibición del 50% (DE₅₀) se determinó a aproximadamente 300 pM. A diferencia, se mostró que la DE₅₀ de las rosquillas 1-4 era 135 nM.

Un resumen del efecto de otros fragmentos del péptido de la rosquilla sobre la inhibición de la proliferación de células BCE se muestra en la Tabla 1. El fragmento del péptido de la rosquilla 3 fue el menos eficaz en la inhibición de la proliferación de células BCE (DE₅₀ = 460 nM), seguido por el fragmento del péptido de la rosquilla 1 (DE₅₀ = 320 nM), los fragmentos del péptido de las rosquillas 1-4 (DE₅₀ = 135 nM) y los fragmentos del péptido de las rosquillas 1-3 (DE₅₀ = 75 nM). El fragmento del péptido de la rosquilla 5 fue el más eficaz en la inhibición de la proliferación de células BCE con una DE₅₀ de 0,3 nM.

EJEMPLO 18

Efecto de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 sobre la migración de células endoteliales *in vitro*

5 El efecto de los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 sobre la migración de células endoteliales también se determinó *in vitro* usando el ensayo de migración de células endoteliales anteriormente descrito. Los fragmentos del péptido de la rosquilla 5 inhibieron la migración de células BCE de un modo dependiente de la dosis con una DE₅₀ de aproximadamente 300 pM. A la concentración de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 requerida para la inhibición máxima de células BCE también se inhibieron las células PC-3 y las células MDA 486. Este resultado, considerado junto con el resultado en el Ejemplo 2, indica que la inhibición de la proliferación estimulada y la migración de células BCE por fragmentos del péptido de la rosquilla 5 es tanto potente como específico para células endoteliales y no para células normales o tumorales.

15 Lo anterior es meramente ilustrativo de la invención y no pretende limitar la invención a los compuestos desvelados. Las variaciones y cambios que son obvios para un experto en la materia pretenden estar dentro del alcance y la naturaleza de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 La Tabla I muestra un resumen de valores de DE₅₀ obtenidos de la inhibición de diversos fragmentos de rosquilla en la proliferación de células y la migración de células BCE *in vitro*. En la tabla, los fragmentos del péptido de la rosquilla se marcan según su homología de secuencias correspondiente a SEC ID N°: 1. El símbolo "*" indica datos tomados de Marti, D., y col., Eur. J. Biochem., 219:455-462 (1994), "-" indica sin datos.

Tabla 1

Fragmento de proteína de SEC ID N°: 1	Actividad antiproliferativa de células BCE (DE ₅₀)	Inhibición migratoria de células HMVEC (DE ₅₀)
rosquillas 1-4 (angiotatina)*	135 nM	160 nM
rosquilla 1 (Tyr ⁸⁰ -Glu ¹⁶³)*	320 nM	-
rosquilla 2 (Glu ¹⁶¹ -Thr ²⁴⁵)*	sin actividad	-
rosquilla 3 (Thr ²⁵³ -Ser ³³⁵)*	460 nM	-
rosquilla 4 (Val ³⁵⁴ -Val ⁴⁴³)*	sin actividad	-
rosquillas 1-3 (Tyr ⁸⁰ -Pro ³⁵³)*	75 nM	60 nM
rosquillas 2-3 (Glu ¹⁶¹ -Ser ³³⁵)*	-	-
rosquilla 5 (Val ⁴⁴³ -Ala ⁵⁴³)	250 pM	200 pM
rosquilla 5 (Val ⁴⁴⁹ -Ala ⁵⁴³)	-	240 pM
rosquilla 5 (Val ⁴⁵⁴ -Ala ⁵⁴³)	-	220 pM
rosquilla 5 (Val ⁴⁴³ -Phe ⁵⁴⁶)	60 nM	55 nM
rosquilla 5 (Val ⁴⁴⁹ -Phe ⁵⁴⁶)	-	-
rosquilla 5 (Val ⁴⁵⁴ -Phe ⁵⁴⁶)	-	-
rosquillas 4-5 (Val ³⁵⁵ -Ala ⁵⁴³)	-	280 pM
rosquillas 4-5 (Val ³⁵⁵ -Phe ⁵⁴⁶)	-	-
N-Ac-Val ⁴⁴⁹ -Asp ⁴⁶¹ -NH ₂	-	> 1 mM
N-Ac-Met ⁴⁶³ -Pro ⁴⁸² -NH ₂	-	> 1 mM
N-Ac-Gln ⁴⁸⁴ -Tyr ⁵¹¹ -NH ₂	-	> 100 μM
N-Ac-Arg ⁵¹³ -Trp ⁵²³ -NH ₂	-	500 pM
N-Ac-Tyr ⁵²⁵ -Tyr ⁵³⁵ -NH ₂	-	200 pM
N-Ac-Pro ⁵²⁹ -Tyr ⁵³⁵ -NH ₂	-	120 pM
N-Ac-Pro ⁵²⁹ -Asp ⁵³⁴ -NH ₂	-	123 pM
N-Ac-Pro ¹⁵⁰ -Tyr ¹⁵⁶ -NH ₂	-	160 nM
N-Ac-Arg ⁵³⁰ -Tyr ⁵³⁵ -NH ₂	-	80 pM
N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-3-I-Tyr-Asp-Tyr-NH ₂	-	> 100 nM
N-Ac-Pro-Arg-Lys-Leu-Tyr- Asp-3-I-Tyr-NH ₂	-	400 pM

Fragmento de proteína de SEC ID N°: 1	Actividad antiproliferativa de células BCE (DE ₅₀)	Inhibición migratoria de células HMVEC (DE ₅₀)
N-Ac-Lys ⁵³¹ -Tyr ⁵³⁴ -NH ₂	-	-

EJEMPLO 19

Expresión recombinante de fragmentos de la rosquilla 5 en *Pichia pastoris*

5 A. Producción de ADNc que codifican fragmentos de la rosquilla 5 por PCR: Se empleó PCR para generar fragmentos de ADNc que codifican fragmentos del péptido de la rosquilla 5 que tienen secuencias de aminoácidos de (1) las posiciones de aminoácidos 450-543 de SEC ID N°: 1 (denominadas en lo sucesivo, K5A), (2) las posiciones de aminoácidos 450-546 de SEC ID N°: 1 (denominadas en lo sucesivo K5F), (3) las posiciones de aminoácidos 355-543 de SEC ID N°: (denominadas en lo sucesivo K4-5A) y (4) las posiciones de aminoácido 355-546 de SEC ID N°:1 (denominadas en lo sucesivo K4-5F) para clonar y expresar en tanto huéspedes eucariotas como procariontes. Los fragmentos de ADN se generaron usando un ADNc que codifica plasminógeno humano (obtenido del Dr. E. Reich, Universidad estatal de Nueva York, Stony Brook, NY) como molde y a continuación se muestran conjuntos de cebadores directos e inversos (obtenidos de Operon Technologies, Inc. Alameda, CA):

5'-ATTAATGGATCCTTGGACAAGAGGCTGCTTCCAGATGTAGAGACT-3'	SEC ID N°:2
5'-ATTAATGGATCCTTGGACAAGAGGGTCCAGGACTGCTACCATGGT-3'	SEC ID N°:3
5' -ATTAATCTCGAGGCATGCTTAGGCCGCACACTGATGGACA-3'	SEC ID N°:4
5'-ATTAATCTCGAGGCATGCTTAAAATGAAGGGGCCGCACACT-3'	SEC ID N°:5

15 Las amplificaciones por PCR se realizaron usando los conjuntos de cebadores SEC ID N°:2 y SEC ID N°:4 (para K5A), SEC ID N°:2 y SEC ID N°:5 (para K5F), SEC ID N°:3 y SEC ID N°:8 (para K4-5A) y SEC ID N°:3 y SEC ID N°:5 (para K4-5A) bajo condiciones de PCR estándar, es decir, en un volumen de reacción total de 100 µl que contiene 200 µM de cada dNTP en la que N era A, T, G y C, 0,2 µM de cada cebador, aproximadamente 10 ng de ADN mensajero y 1 unidad de ADN polimerasa Vent® (New England Biolabs). Las amplificaciones se llevaron a cabo durante un total de 25 ciclos (1 ciclo = 94°C durante un minuto, 48°C durante dos minutos, 72°C durante 1 minuto) en un ciclador térmico de ADN 480 (Perkin Elmer, Foster City, CA). Después de la amplificación, los productos de PCR se purificaron en gel, se digirieron con *Bam*HI y *Xho*I (New England Biolabs), se ligaron a un vector de expresión de *Pichia* modificado (pHil-D8, véase más adelante) cortado con las mismas enzimas y se transformaron en células HB101 (BioRad) por electroporación. El ADN se preparó a partir de clones individuales y se sometió a digestión con enzimas de restricción y análisis de secuencias para identificar clones que contenían insertos con la secuencia correcta y en la orientación apropiada. Los plásmidos de clones positivamente identificados se transformaron entonces en la cepa GS 115 de *Pichia pastoris* (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las indicaciones del fabricante. Para identificar clones positivos en *Pichia*, las células se cultivaron en 5 ml de medio BMGY (Invitrogen) a 29°C durante la noche, se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 0,5 ml de medio BMMY (Invitrogen) para la expresión. Después de la incubación a 29°C durante dos días, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y las alícuotas se sometieron a SDS-PAGE y análisis por transferencia Western según técnicas conocidas. Un gel de SDS-PAGE se muestra en la FIG. 6.

35 B. Construcción del vector de expresión pHil-D8: El vector de expresión de *Pichia*, pHil-D8, se construyó por modificación del vector pHil-D2 (Invitrogen) para incluir una secuencia conductora de síntesis para la secreción de una proteína recombinante (véase la FIG. 5). La secuencia conductora, 5'-ATGTTCTCTCCAATTTTGTCTTGGAAATTATTTTAGCTTTGGCTACTTTGCAATC TGTCTTCGCTCAGCCAGTTATCTGCACTACCGTTGGTTCGCTGCCGAG GGATCC-3' (SEC ID N°:9) codifica una señal de secreción PHO1 (subrayada sencillo) operativamente ligada a una secuencia de pro-péptidos (marcada en negrita) para la escisión de KEX2. Para la construcción de pHil-D8 se realizó PCR usando pHil-S1 (Invitrogen) como molde ya que este vector contiene la secuencia que codifica PHO1, un cebador directo (SEC ID N°:7) correspondiente a los nucleótidos 509-530 de pHil-S1 y un cebador inverso (SEC ID N°:8) que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la última porción de la señal de secreción de PHO1 (nucleótidos 45-66 de SEC ID N°:9) y la secuencia de pro-péptidos (nucleótidos 67-108 de SEC ID N°:9). Las secuencias de los cebadores (obtenidas de Operon Technologies, Inc. Alameda, CA) fueron del siguiente modo:

5'-GAAACTTCCAAAAGTCGCCATA-3'	SEC ID N°:7
	SEC ID N°:8

La amplificación se realizó durante 25 ciclos como se describe en el Ejemplo 19. El producto de PCR

(aproximadamente 500 pb) se purificó en gel, se cortó con *BlnI* y *EcoRI* y se ligó a pHil-D2 cortado con las mismas enzimas. El ADN se transformó en células HB 101 de *E. coli* y se identificaron clones positivos por digestión con enzimas de restricción y análisis de secuencias. Un clon que tiene la secuencia apropiada se designó pHil-D8.

5 EJEMPLO 20

Expresión recombinante de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 en bacterias

10 Las enzimas de restricción u otras enzimas de modificación, además de otros reactivos usados, se obtuvieron de fuentes comerciales. Los cebadores se sintetizaron en Abbott Laboratories en un sintetizador automático mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

15 Los ADN de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 también se generaron por amplificación por PCR para la clonación y expresión en células bacterianas (*E. coli*). El enfoque general tomado fue generar fragmentos de PCR de regiones codificantes deseadas, con y sin codones de terminación, cinasar los extremos y clonar los fragmentos directamente en vectores de elección. Entonces, las construcciones de vectores se transformaron en células huésped apropiadas y las colonias se cribaron por PCR con cebadores de vectores para confirmar la presencia de un inserto. Para determinar la orientación de un inserto, las reacciones de PCR que mostraban clones positivos para el inserto se sometieron a PCR direccional usando 1 cebador de vector y 1 cebador de inserto.

20 A. Preparación de vectores fosfatados de extremos romos: Una descripción de vectores de expresión útiles para la producción bacteriana de fragmentos del péptido de la rosquilla 5 se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Vector	Fuente	Enzimas de restricción	Fusión
UpET	pET21d modificado por Abbott	<i>SapI</i>	Ninguna
UpET-HTh	pET21d modificado por Abbott	<i>SapI</i>	Reconocimiento de His6-trombina del extremo N
UpET-Ubi	pF-T21d modificado por Abbott	<i>SapI</i>	Reconocimiento de His6-ubiquitina-enterocinasa del extremo N
pET32a	Novagen	<i>NcoI</i> + <i>XhoI</i>	Reconocimiento de tiorredoxina-enterocinasa
pGEX-4T-2	Pharmacia®	<i>EcoRI</i> + <i>NotI</i>	GST
pCYB3	New England Biolabs	<i>NcoI</i> + <i>SapI</i>	Inteína del extremo C

25 Todos los vectores se aislaron en primer lugar y se purificaron usando columnas Qiagen según las instrucciones del fabricante (QIAGEN, Inc., Santa Clarita, CA). El ADN de vector (1 µg) se digirió con enzimas de restricción apropiadas (véase la Tabla 2) en 20 µl de tampón NEB4 (New England Biolabs) que contenía 100 µg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). La reacción se centrifugó brevemente, se añadieron 20 µl de H₂O desionizada, 0,4 µl de mezcla de dNTP (Pharmacia®; 20 mM de cada dNTP) y 0,25 µl de *pfu* ADN polimerasa clonada (Stratagene®; 2,5 unidades/µl) y la mezcla de reacción se incubó a 65°C durante 20 minutos para llenar los extremos del vector. La mezcla de reacción se centrifugó brevemente de nuevo y se añadieron 4 µl de fosfatasa intestinal de ternero diluida (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD; total de 5 unidades). La mezcla se incubó entonces a 50°C durante una hora. Se añadieron cinco 5 µl de 10% de SDS, 2 µl de NaCl 5 M, 2 µl de EDTA 0,5 M y 45 µl de H₂O, la reacción se centrifugó brevemente y luego se incubó a 65°C durante 20 minutos. Entonces, la reacción se extrajo tres veces con fenol-cloroformo saturado con tampón (GIBCO BRL) y una vez con cloroformo. La fase acuosa se purificó a través de una columna CHROMA SPIN™ 1000 TE (CLONTECH, Palo Alto, CA).

40 B. Generación de fragmentos de ADN por PCR: Se diseñaron cebadores de PCR y se ordenaron basándose en la secuencia publicada para plasminógeno humano (véase la SEC ID N°:12) y se muestran a continuación:

5'-GTCCAGGACTGCTACCAT-3'	SEC ID N°:10
5'-CTGCTTCCAGATGTAGAGA-3'	SEC ID N°:11
5'-TTATTAGGCCGCACACTGAGGGA-3'	SEC ID N°:13

45 A menos que se indique de otro modo, todas las PCR se realizaron con *pfu* ADN polimerasa y tampón (Stratagene®) usando 200 µM de cada dNTP y 1 µM de cada cebador. Los conjuntos de cebadores usados fueron SEC ID N°:11 y SEC ID N°:13 (para K5A) y SEC ID N°:10 y SEC ID N°:13 (para K4-5A). Como molde se usó el vector pHil-D8 que contiene K4-K5A (descritas en el Ejemplo 19). Antes del uso como molde, este ADN se digirió con Dral (que hace múltiples cortes fuera de las regiones en rosquilla) con el fin de eliminar el fondo debido al vector pHil-D8 en

transformaciones. Se usaron aproximadamente 10 ng de molde por 50 µl de reacción de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron a 94°C durante 2 min; luego durante 15 ciclos a 94°C, 30 s; 49°C, 1 min; 72°C, 4 min; y 72°C, 7 min. Después de la reacción de PCR se añadieron 0,5 µl de ATP 100 mM y 5 unidades de T4 cinasa y la reacción se incubó a 37°C durante 20 min para cinasar los extremos. Entonces, la reacción se calentó a 68°C durante 15 min y se purificó en una columna de centrifugación S400-HR (Pharmacia®) para su uso en ligaciones.

C. Ligación de fragmentos de PCR en vectores de expresión: Se prepararon seis construcciones recombinantes (específicamente, (i) K5A en UpET-PS3, (ii) K5A en pET32a, (iii) K4-5A en UpET-PS3, (iv) K4-5A en UpET-Ubi, (v) K4-5A en pET32a y (vi) K4-5A en pGEX-4T-2) del siguiente modo: se ligaron vector fosfatado de extremos romos (1 µl de la etapa A anterior) y fragmento de PCR (1 µl de la etapa B anterior) en un volumen total de 5,5 µl usando un kit de ligación rápida según las instrucciones del fabricante (BOEHRINGER-MANNHEIM Corp., Indianápolis, IN). Entonces, la mezcla de ligación (1 µl) se transformó en 20 µl de células competentes (células XL1-Blue supcompetentes o células XL2-Blue ultracompetentes (Stratagene®)) según las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron células recombinantes en placas de agar LB-Amp (MicroDiagnostics, Lombard, IL).

D. Estudios de expresión: Se expresaron vectores pGEX en XL1-Blue o XL2-Blue de *E. coli*. Todos los otros vectores se aislaron y se retransformaron en *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) según las instrucciones del fabricante. Las colonias individuales se inocularon en 2,5 ml de LB/Amp y se agitaron a 225 rpm, 37°C durante la noche. Entonces, el cultivo durante la noche (0,5 ml) se inoculó en 50 ml de LB/Amp en un matraz de 250 ml y se agitó a 225 rpm, 37°C a una DO600 de 0,5 - 0,6. Entonces se añadió isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG, 100 mM) a una concentración final de 1 mM. El cultivo se agitó a 225 rpm, 30°C durante 3 horas antes de centrifugarse. Las muestras se prepararon para SDS-PAGE según técnicas conocidas. Los experimentos preliminares mostraron que las células que tenían K5A/pET32a, K4-5A/pET32a y K4-5A/pGEX produjeron la mayoría de la proteína recombinante. Entonces, los cultivos de estos clones se analizaron para expresión soluble frente a insoluble por SDS-PAGE. Como muestra la FIG. 7, K5A/pET32a produjo proteína recombinante que es casi completamente soluble (compárense las bandas S y P de Trx-K5A), mientras que K4-5A/pET32a y K4-5A/pGEX produjeron aproximadamente el 75% de proteína soluble.

E. Construcción de vectores modificados por Abbott

i. Preparación del casete de VB1, VB2, VB3 y VB4: VB1, VB2, VB3 y VB4 se prepararon como ADN sintéticos usando técnicas muy conocidas para los expertos en la materia. Las secuencias de synVB1, synVB2, synVB3, y synVB4 se muestran a continuación:

synVB1	5' - AGCGTCTCATGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGC GCCTTGGCGCGCCAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAATGAGCGG GCTTTTTTTTGCTCTTCATAGTACTGACAGCTCG - 3'	SEC ID N°:14
synVB2	5' - AGCGTCTCAGGTGGTGGTCAATCACCATCACCATCAGGTGGTGGT CTGGTGGCGCGCGCAGCTGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCT TTCTGCGCCTTGGCGCGCCAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAAT GAGCGGGCTTTTTTTTGCTCTTCACGAGACGTCG - 3'	SEC ID N°:15
synVB3	5' - AGCGTCTCAGGTGGTGGTCAATCACCATCACCATCAGGTGGTGGT TGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGCCTTGGCGCGC CAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGC TCTTCACGAGACGTC - 3'	SEC ID N°:16
synVB4	5' - AGCGTCTCAGGTGGTGGTCAATCACCATCACCATCAGGTGGTGGT GATGACGATGACAAGTGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTC TGCGCCTTGGCGCGCCAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAATGAG CGGGCTTTTTTTTGCTCTTCACGAGACGTCG - 3'	SEC ID N°:17

Cada secuencia de síntesis se hizo bicatenaria y se clonó en pCR-Script Cam™ (Stratagene®) según las instrucciones del fabricante; entonces, los clones con la secuencia correcta se aislaron por procedimientos convencionales. Se digirieron cinco µg de ADN purificado con 8 unidades de *BsmBI* a 55°C en reacciones de 20 µl en 1x tampón NEB4 que contenía 100 µg/ml de BSA. La reacción se centrifugó brevemente, se añadieron 20 µl de H₂O desionizada, 0,4 µl de mezcla de dNTP (Pharmacia®; 20 mM de cada dNTP) y 0,25 µl de *pfu* ADN polimerasa clonada (Stratagene®; 2,5 unidades por µl) y la reacción se incubó a 65°C durante 20 minutos para llenar los extremos. Entonces, el ADN se ejecutó en un gel de agarosa al 3% de MetaPhor™ (FMC, Rockland, Maine) en 0,5x tampón Tris-acetato-EDTA (TAE). La banda del casete se cortó y el ADN se eluyó liberando el gel y centrifugando el tampón a través de un cartucho Ultrafree™ Probind (MILLIPORE Corp., Bedford, MA), seguido de precipitación con

isopropanol usando Pellet Paint™ (Novagen) como portador. El ADN (cfvB1, cfvB2, cfvB3 y cfvB4) se aclaró con 70% de etanol, se secó brevemente y se resuspendió en 25 µl de tampón Tris-EDTA (TE).

5 ii. Construcción de UpET: Se digirió el vector pET21d (Novagen) con *SapI*, se trató primero con ADN Polimerasa T4 + dGTP, luego con nucleasa Mung Bean, luego fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y se religó. Las colonias individuales se cribaron para seleccionar un plásmido en el que se había eliminado el sitio *SapI* existente. Entonces, este ADN se digirió con *NcoI* + *BamHI* y se ligó a 5'-CATGTGAAGAGC-3' (SEC ID N°: 19) + 5'-GATCGCTCTCA-3' (SEC ID N°:20) para introducir un único sitio *SapI*. El ADN purificado, verificado y clonado se cortó con *SapI* + *HindIII*, se hicieron romos los extremos y se trató con fosfatasa como se ha descrito anteriormente, se ligó con el casete cfvB1, se transformó en *E. coli* y se sembró en placas LB-Amp. Las colonias se escogieron con puntas de pipeta estériles sobre placas de agar LB-Amp y en 20 µl de mezcla de PCR AmpliTaq® PCR (Perkin Elmer) en placas Costar Thermowell que contenían 1 µM de cada cebador de vectores 5'-AGATCTCGATCCCGCGAA-3' (cebador directo, SEC ID N°:21) y 5'-ATCCGGATATAGTTCCTC-3' (SEC ID N°:22). Las reacciones se calentaron a 94° durante 5', luego se ciclaron usando un ciclador térmico GeneAmp 9600 durante 30 ciclos de 94°, 30 segundos; 15 40°, 1 minuto; 72°, 2 minutos. 10 µl de cada reacción se ejecutaron sobre gel de agarosas. Para determinar la orientación del casete, 0,25 µl de un cribado de PCR con el tamaño correcto se añadieron a una reacción fresca que contenía el cebador inverso del vector y un cebador del casete 5'-CGGGCTTTTTTTTGTCTTCA-3' (SEC ID N°:23). Las reacciones se ciclaron como antes durante 10 ciclos adicionales. Los vectores finales se secuenciaron usando procedimiento convencional y un clon se designó UpET.

20 iii. Construcción de UpET-HTh: UpET se digirió con *SapI* y se preparó para el clonado fosfatado de extremos romos. Se ligó al casete cfvB2, se transformó, las colonias se cribaron y se secuenciaron como para la ligación de cfvB I anterior.

25 iv. Construcción de UpET-H: UpET se digirió con *SapI* y se preparó para el clonado fosfatado de extremos romos. Se ligó al casete cfvB3, se transformó, las colonias se cribaron y se secuenciaron como para la ligación de cfvB I anterior.

30 v. Construcción de UpET-Ubi: Se generó un fragmento de PCR para ubiquitina de *S. cerevisiae* usando la ADN polimerasa Ultma y tampón (Perkin Elmer), 40 µM de cada dNTP, 1 µM de cada uno de los cebadores 5'-CAGATTTTCGTCAGACTT-3' (Ubi-5p, SEC ID N°:24) y 5'-ACCACCTTAGCCTTAG-3' (Ubi-3p, SEC ID N°:25) y 1,75 µg de ADN de levadura a 94°C, 2 min. Luego 25 ciclos de 94°C, 1 min; 40°C, 1 min; 72°C, 2 min; luego 72°C durante 7 min. Se generó un fragmento de PCR de 20 ng de pET15b (Novagen) usando los cebadores 5'-CATGGTATATCTCCTTCTT-3' (pET3p-ATG, SEC ID N°:26) y 5'-TGAGCAATAACTAGCATAAC-3' (T7RevTerm, SEC ID N°:27) a 94°C, 2 min. Luego 10 ciclos de 94°C, 45 s; 42°C, 1 min; 72°C, 15 min; luego 72°C durante 7 min. Los fragmentos de PCR derivados de ubiquitina y pET15b se purificaron en gel y se ligaron juntos usando la T4 ligasa BRL y tampón ligasa. Entonces se generó un fragmento de PCR de T7 promotor-ubiquitina (T7-ubiquitina) usando la ligación como molde y ADN polimerasa Ultma y los cebadores 5'-AGATCTCGATCCCGCGAA-3' (pET5p, SEC ID N°:28) y SEC ID N°:25 a 94°C, 2 min, luego 25 ciclos de 94°C, 30 s; 42°C, 1 min; 72°C, 3 min; luego 72°C, 7 40 min. El fragmento de PCR T7-ubiquitina se purificó en gel.

Se generó un fragmento de PCR para estromelina humana madura usando ADN polimerasa Ultma (como antes) con el cebador 5'-TTAGGTCTCAGGGGAGT-3' (Strom-3p, SEC ID N°:29) y el cebador cinasado 5'-TTCAGAACCTTCTGGCA-3' (Strom-5p, SEC ID N°:30) y aproximadamente 20 ng de molde (es decir, estromelina clonada en pET3b (Novagen)) a 94°C, 2', luego 15 ciclos de 94°C, 1 min; 44°C, 1 min; 72°C, 2 min, luego 72°C durante 7 min. La reacción de PCR de la estromelina (10 µl) se ligó con 100 pmoles de oligonucleótidos hibridados 5'-AGCGGCGACGACGACGACAAG-3' (Ek-Cut-5p, SEC ID N°:31) y 5'-CTTGTCGTCGTCGTCGCCGCT-3' (Ek-Cut-3p, SEC ID N°:32 que codifican un sitio de escisión de enterocinasa) en 40 µl de ligasa BRL y tampón ligasa. Un fragmento de PCR de sitio de enterocinasa - estromelina madura (Ek-estromelina) se generó usando 1 50 µl de esta ligación como molde, cebadores SEC ID N°:29 y cinasado SEC ID N°:31, ADN polimerasa Ultma y tampón a 94°C, 2 min; luego 10 ciclos de 94°C, 1 min; 44°C, 1 min; 72°C, 2 min, luego 72° durante 7 min. El fragmento de PCR de Ek-estromelina se purificó en gel.

Los fragmentos de PCR de T7-ubiquitina y Ek-estromelina se ligaron juntos en ligasa BRL y tampón ligasa. Entonces se generó un fragmento de PCR de T7-ubiquitina-Ek-estromelina usando la ligación como molde y ADN polimerasa Ultma y los cebadores SEC ID N°:28 y SEC ID N°:29 a 94°C, 2', luego 25 ciclos de 94°C, 30 s; 42°C, 1 min; 72°C, 6 min, luego 72°C durante 7 min.

Se generó un fragmento de PCR usando el molde de estromelina-plásmido pET3b con los cebadores de SEC ID N°:26 y SEC ID N°:30 con KJenTaq (AB Peptides, St. Louis, MO) y *pfu* ADN polimerasas a 94°C, 2', luego 15 ciclos de 94°C, 30 s; 42°C, 2 min; 68°C, 20 min. Este fragmento de PCR se mezcló con el fragmento de PCR de T7-ubiquitina-Ek-estromelina y se transformó en células competentes de eficiencia máxima BRL DH5α. Los clones correctos se identificaron por aislamiento de ADN de plásmido, transfección en BL21 (DE3) y la expresión se estudió como se ha descrito anteriormente.

65 Se generó un fragmento de PCR para ubiquitina-Ek a partir de un plásmido de expresión correcto de T7-ubiquitina-

Ek-estromelisisina con los cebadores SEC ID N°:24 y SEC ID N°:32 y *pfu* ADN polimerasa a 94°C, 2', luego 20 ciclos de 94°C, 30 s; 40°C, 1 min; 72°C, 3 min, 72°C, 7 min. El fragmento se purificó sobre una columna de centrifugación Pharmacia S-400 HR y se ligó al casete de VBC1 usando el kit de ligación rápida de ARN. Se generó un fragmento de PCR usando la ligación como molde y los cebadores SEC ID N°:24 y 5'-TGAAGAGCAAAAAAAAAAGCCCG-3' (SEC ID N°:33) y *pfu* ADN polimerasa a 94°C, 2 min, luego 20 ciclos de 94°C, 30 s; 40°C, 1 min; 72°C, 2 min, 72°C, 7 min. El fragmento de PCR se cinasó y se ligó a Upet-H preparado para el clonado fosfatado de extremos romos. La ligación se transformó en células competentes y las colonias se cribaron por PCR como antes. El ADN de plásmido se secuenció para identificar clones correctos de UpET-Ubi.

10 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Abbott Laboratories Davidson, Donald J.
- <120> PÉPTIDOS ANTIANGIOGÉNICOS NOVEDOSOS, POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LOS MISMOS Y PROCEDIMIENTOS PARA INHIBIR ANGIOGÉNESIS
- 15 <130> 5940.US.P2
- <140> US 08/851.350
- <141> 05/05/1997
- <150> US 08/832.087
- <151> 04/03/1997
- 20 <150> US 08/643.219
- <151> 05/03/1996
- <160> 40
- <170> FastSEQ for Windows versión 4.0
- <210> 1
- 25 <211> 791
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser
 1          5          10          15
Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala
 20          25          30
Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
 35          40          45
Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
 50          55          60
Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr
 65          70          75          80
Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met
 85          90          95
Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser
 100         105         110
Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu
 115         120         125
Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp
 130         135         140
Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu
 145         150         155         160
Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly
 165         170         175
Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser
 180         185         190
Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys
 195         200         205
Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro
 210         215         220
Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile

```

30

	690				695					700					
Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Tyr	Glu	Phe	Leu	Asn	Gly	Arg	Val
705					710					715				720	
Gln	Ser	Thr	Glu	Leu	Cys	Ala	Gly	His	Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Asp	Ser
				725					730					735	
Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Phe	Glu	Lys	Asp	Lys
			740				745						750		
Tyr	Ile	Leu	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Ala	Arg	Pro
	755						760					765			
Asn	Lys	Pro	Gly	Val	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Phe	Val	Thr	Trp	Ile
	770					775					780				
Glu	Gly	Val	Met	Arg	Asn	Asn									
785					790										

5 <210> 2
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 2

10 **attaatggat ccttggacaa gaggtgctt ccagatgtag agact**
45

15 <210> 3
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 3

20 **attaatggat ccttggacaa gaggtccag gactgctacc atggt**
45

25 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 4

30 **attaatctcg aggcattgctt aggccgcaca ctgatggaca**
40

35 <210> 5
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 5

40 **attaatctcg aggcattgctt aaaatgaagg ggcgcacac t**
41

45 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de K5 sintético
 <221> VARIANTE

<222> (5)...(5)
 <223> Xaa = 3-I-Tyr en la posición 5
 <400> 6

Pro Arg Lys Leu Xaa Asp Tyr
1 5

5

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 7

gaaacttcca aaagtgcga ta
22

15

<210> 8
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso
 <400> 8

attaatgaat tcctcgagcg gtccgggac cctcggcagc ggaaccaacg gtagtgcaga
60
taactggctg agcgaagaca gattgcaaag ta
92

25

<210> 9
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia conductora de síntesis que codifica una señal de secreción de PHO1
 <400> 9

atgttctctc caatcttctc ctctggaaatt attttagctt tggctacttt gcaatctctc
60
tccgctcagc cagttatctg cactaccggtt ggttccgctg ccgagggatc c
111

35

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 10

gtccaggact gctaccat
18

45

<210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 11

50

55

ctgcttccag atgtagaga
19

- <210> 12
- <211> 2497
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 12

```

catcctggga ttgggacca ctttctgggc actgetggcc agtcccaaaa tggaacataa
60
ggaagtgggt cttctacttc ttttatttct gaaatcaggt caaggagagc ctctggatga
120
ctatgtgaat acccaggggg cttcactggt cagtgtcact aagaagcagc tgggagcagg
180
aagtatagaa gaatgtgcag caaatgtga ggaggacgaa gaattcacct gcagggcatt
240
ccaatatcac agtaaagagc aacaatgtgt gataatggct gaaaacagga agtcctccat
300
aatcattagg atgagagatg tagttttatt tgaaaagaaa gtgtatctct cagagtgcaa
360
gactgggaat gaaaagaact acagagggac gatgtccaaa acaaaaaatg gcatcacctg
420
tcaaaaatgg agttccactt ctccccacag acctagattc tcacctgcta cacaccctc
480
agagggactg gaggagaact actgcaggaa tccagacaac gatccgcagg ggcctgggtg
540
ctatactact gatccagaaa agagatatga ctactgcgac attcttgagt gtgaagagga
600
atgtatgcat tgcagtggag aaaactatga cggcaaaatt tccaagacca tgtctggact
660
ggaatgccag gcctgggact ctcaagagccc acaagctcat ggatacattc ettccaaatt
720

```

tccaaacaag aacctgaaga agaattactg tcgtaacccc gatagggagc tgcggccttg
 780
 gtgtttcacc accgacccca acaagcgctg ggaactttgt gacatccccc gctgcacaac
 840
 acctccacca ttttctggtc ccacctacca gtgtctgaag ggaacagggtg aaaactatcg
 900
 cgggaatgtg gctgttaccg tgtccgggca cacctgtcag cactggagtg cacagacccc
 960
 tcacacacat aacaggacac cagaaaactt cccctgcaaa aatttggatg aaaactactg
 1020
 ccgcaatcct gacggaaaaa gggccccatg gtgccataca accaacagcc aagtgcgggtg
 1080
 ggagtactgt aagataccgt cctgtgactc ctccccagta tccacggaac aattggctcc
 1140
 cacagcacca cctgagctaa cccctgtggt ccaggactgc taccatggtg atggacagag
 1200
 ctaccgaggc acatcctcca ccaccaccac aggaaagaag tgtcagtctt ggcatctat
 1260
 gacaccacac cggcaccaga agaccccaga aactaccca aatgctggcc tgacaatgaa
 1320
 ctactgcagg aatccagatg ccgataaagg cccctggtgt ttaccacag accccagcgt
 1380
 cagtggggag tactgcaacc tgaaaaaatg ctcaggaaca gaagcgagtg ttgtagcacc
 1440
 tccgcctggt gtcctgctc cagatgtaga gactcctcc gaagaagact gtatgtttgg
 1500
 gaatgggaaa ggataccgag gcaagagggc gaccactggt actgggacgc catgccagga
 1560
 ctgggctgcc caggagcccc atagacacag cttttcact ccagagacaa atccacgggc
 1620
 gggctctgaa aaaattact gccgtaaccc tgatggtgat gtaggtggtc cctggtgcta
 1680
 cagcaaaat ccaagaaaac tttacgacta ctgtgatgtc cctcagtgtg cggccccctc
 1740
 atttgattgt gggaaagcctc aagtggagcc gaagaaatgt cctggaaggg ttgtaggggg
 1800
 gtgtgtggcc caccacatt cctggccctg gcaagtcagt cttagaaca ggtttggaat
 1860
 gcacttctgt ggaggcacct tgatatcccc agagtgggtg ttgactgctg cccactgctt
 1920
 ggagaagtcc ccaaggcctt catcctacaa ggtcatcctg ggtgcacacc aagaagtgaa
 1980
 tctcgaaccg catgttcagg aaatagaagt gtctaggctg ttcttgagc ccacacgaaa
 2040
 agatattgcc ttgctaaaag taagcagtc tgcctcctc actgacaaaag taatcccage
 2100
 ttgtctgcca tccccaaatt atgtggtcgc tgaccggacc gaatgtttcg tcaactggctg
 2160
 ggggaaaacc caaggtactt ttggagctgg ccttctcaag gaagcccage tccctgtgat
 2220
 tgagaataaa gtgtgcaatc gctatgagtt tctgaatgga agagtccaat ccaccgaact
 2280
 ctgtgctggg ctttggccg gaggcactga cagttgccag ggtgacagtg gaggtcctct
 2340
 ggtttgcttc gagaaggaca aatacatttt acaaggagtc acttcttggg gtcttggctg
 2400
 tgcacgcccc aataagcctg gtgtctatgt tcgtgtttca aggtttgta cttggattga
 2460

gggagtgatg agaataatt aattggacgg gagacag
 2497

<210> 13
 <211> 23

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplificación por cebador de PCR
 <400> 13

**ttattaggcc gcacactgag gga
 23**

10 <210> 14
 <211> 128
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético synVB1
 15 <400> 14

**agcgtctcat gaagagctgg ctcaccttcg ggtggcctt tctgcgcctt ggcgcgcaa
 60
 ccttaattaa ccgggagccc gcctaataag cgggcttttt tttgctcttc atagtgactg
 120
 agacgtcg
 128**

20 <210> 15
 <211> 175
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético synVB2
 25 <400> 15

**agcgtctcag gtggtggtca tcaccatcac catcacggtg gtggtctggt gccgcgcggc
 60
 agctgaagag ctggctcacc ttcgggtggg cctttctgag ccttggcgcg ccaaccttaa
 120
 ttaaccggga gcccgacctaa tgagcgggct tttttttgct cttcacgaga cgtcg
 175**

30 <210> 16
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético synVB3
 35 <400> 16

**agcgtctcag gtggtggtca tcaccatcac catcacggtg gtggttgaag agctggctca
 60
 ccttcgggtg ggcctttctg cgccttggcg cgccaacctt aattaaccgg gagccgcgct
 120
 aatgagcggg ctttttttg ctcttcacga gacgtc
 156**

40 <210> 17
 <211> 172
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético synVB4
 45 <400> 17

agcgtctcag gtggtggtca tcaccatcac catcacggtg gtggtgatga cgatgacaag
 60
 tgaagagctg gctcaccttc gggtgggcct ttctgcgcct tggcgcgcca accttaatta
 120
 accgggagcc cgcctaataga gcgggctttt ttttgccttt cacgagacgt cg
 172

- <210> 18
- <211> 7
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de K5 sintético
- <221> VARIANTE
- 10 <222> (7)...(7)
- <223> Xaa = 3-I-Tyr en la posición 7
- <400> 18

Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Xaa
 1 5

- 15 <210> 19
- <211> 12
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Fragmento de ADN
- <400> 19

catgtgaaga gc
 12

- 25 <210> 20
- <211> 12
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Fragmento de ADN
- <400> 20

gatcgtcttt ca
 12

- 35 <210> 21
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Cebador directo del vector
- <400> 21

agatctcgat cccgcgaa
 18

- 45 <210> 22
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> Cebador inverso del vector
- <400> 22

atccggatat agttcttc
 18

55

5 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador del casete
 <400> 23

cgggcttttt tttgctcttc a
21

10 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador Ubi-5p
 <400> 24

cagatttttcg tcaagactt
19

20 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador Ubi-3p
 <400> 25

accacctctt agccttag
18

30 <210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador pET3p-ATG
 <400> 26

catggtatat ctccttctt
19

40 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador T7RevTerm
 <400> 27

tgagcaataa ctgcataac
20

50 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador pET5p
 <400> 28

agatctcgat cccgcgaa
18

5 <210> 29
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Strom-3p
 <400> 29

ttaggtctca ggggagt
17

15 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Strom-5p
 <400> 30

ttcagaacct ttctggca
19

25 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Ek-Cut-5p
 <400> 31

agcggcgacg acgacgacaa g
21

35 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Ek-Cut-3p
 <400> 32

cttctctctc tctctctctc t
21

45 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 33

tgaagagcaa aaaaaagccc g
21

55 <210> 34
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

```

Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser
 1                    5                    10                    15
Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg
 20                    25                    30
Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu
 35                    40                    45
Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly
 50                    55                    60
Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro
 65                    70                    75                    80
Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val
 85                    90                    95
Pro Gln Cys Ala Ala
 100
    
```

5 <210> 35
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 35

```

Val Glu Leu Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser
 1                    5                    10                    15
Glu Thr Asp Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr
 20                    25                    30
Ala Val Thr Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu
 35                    40                    45
Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Gly
 50                    55                    60
Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro
 65                    70                    75                    80
Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile
 85                    90                    95
Pro Leu Cys Ala Ser Ala
 100
    
```

10 <210> 36
 <211> 101
 <212> PRT
 15 <213> Macaca mulatta
 <400> 36

```

Ala Ala Pro Pro Pro Val Ala Gln Leu Pro Asp Ala Glu Thr Pro Ser
 1                    5                    10                    15
Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys
 20                    25                    30
Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu
 35                    40                    45
Pro His Ser His Arg Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly
 50                    55                    60
Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro
 65                    70                    75                    80
Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Val
 85                    90                    95
Pro Gln Cys Ala Ala
 100
    
```

20 <210> 37
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 25 <400> 37

Pro Ala Ala Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Asn Pro Pro Glu Ala Asp
 1 5 10 15
 Cys Met Ile Gly Thr Gly Lys Ser Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr
 20 25 30

Val Ala Gly Val Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His His
 35 40 45
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 50 55 60
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 65 70 75 80
 Thr Met Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 85 90 95
 Glu

- <210> 38
- <211> 100
- 5 <212> PRT
- <213> Sus scrofa
- <400> 38

Thr Asn Phe Pro Ala Ile Ala Gln Val Pro Ser Val Glu Asp Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Arg Tyr Arg Gly Lys Arg Ala
 20 25 30
 Thr Thr Val Ala Gly Val Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro
 35 40 45
 His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu
 50 55 60
 Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Asp Asn Gly Pro Trp
 65 70 75 80
 Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Gln Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Val Pro
 85 90 95
 Gln Cys Val Thr
 100

- 10 <210> 39
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 15 <400> 39

Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr
 1 5

- 20 <210> 40
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 40

Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro
 1 5 10 15
 Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr
 20 25

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que tiene la fórmula
A-B1-C1-X1-Y
o una sal farmacéuticamente aceptable o éster del mismo, en la que
A está ausente o es un grupo protector de nitrógeno,
Y está ausente o es un grupo protector de ácido carboxílico,
10 B1 está ausente o tiene de 1 a 176 residuos de aminoácidos que se producen naturalmente correspondientes a la
secuencia de la posición de aminoácidos 334 a la posición de aminoácidos 513 de SEC ID N° 1,
C1 es la secuencia de la posición de aminoácidos 514 a la posición de aminoácidos 523 de SEC ID N° 1 y
X1 está ausente o tiene de 1 a 10 residuos de aminoácidos que se producen naturalmente correspondientes a la
15 secuencia de la posición de aminoácidos 524 a la posición de aminoácidos 533 de SEC ID N° 1; y
homólogos de fórmula A-B1-C1-X1-Y que tienen al menos el 95% de identidad de aminoácidos con el fragmento B1-
C1-X1 en el que los homólogos poseen actividad antiangiogénica.
2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que B y X1 están ausentes y A, C1 e Y son como se definen aquí.
3. El compuesto de la reivindicación 2 en el que A es N-Ac e Y es -NH₂.
- 20 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en las reivindicaciones 1, 2 ó 3 y un
excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Un compuesto como se define en las reivindicaciones 1, 2 ó 3 para tratar una enfermedad en un paciente en
25 necesidad de terapia antiangiogénica.
6. El compuesto según la reivindicación 5 en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer,
artritis, degeneración macular y retinopatía diabética.
- 30 7. El compuesto según la reivindicación 6 en el que dicha enfermedad es cáncer.
8. Una composición que comprende una secuencia de polinucleótidos mono o bicatenaria aislada que codifica un
compuesto según la reivindicación 1.
- 35 9. La composición de la reivindicación 8 en la que dicha secuencia de polinucleótidos es una secuencia de ADN.
10. Una célula adecuada para ser implantada en un animal humano o no humano, conteniendo dicha célula un
vector en la que dicho vector contiene una secuencia de ADN que codifica un compuesto como se define en la
reivindicación 1, en la que la célula no es un citoblasto embrionario humano.
- 40 11. Un procedimiento de preparación de un compuesto según la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
(a) exponer un plasminógeno de mamífero a elastasa a una relación de 1:100 a 1:3000 para formar una
mezcla de dicho plasminógeno y dicha elastasa;
45 (b) incubar dicha mezcla;
(c) aislar dicho compuesto de dicha mezcla.
12. Un polinucleótido mono o bicatenario aislado que codifica un compuesto según la reivindicación 1.
13. El polinucleótido de la reivindicación 12 que es una molécula de ADN.
- 50 14. El polinucleótido de la reivindicación 12 que es una molécula de ARN.
15. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un compuesto según la reivindicación 1.
- 55 16. El vector de la reivindicación 15 que es un vector de expresión.
17. El vector de la reivindicación 16 en el que el vector de expresión se construye incorporando un polinucleótido
que codifica un compuesto según la reivindicación 1 en los vectores seleccionados del grupo que consiste en pHiL-
D8 preparado según el procedimiento descrito en el Ejemplo 19, parte B, pET32a, pGEX-4T.2, UpET-Ubi preparado
60 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 20, parte E, y pCYB3.
18. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 16, en la que la célula no es un citoblasto
embrionario humano.
- 65 19. La célula huésped de la reivindicación 18 en la que dicha célula huésped es una célula eucariota.

20. La célula huésped de la reivindicación 19 en la que dicha célula eucariota es *Pichia pastoris*.
21. La célula huésped de la reivindicación 18 en la que dicha célula huésped es una célula procariota.
- 5 22. La célula huésped de la reivindicación 21 en la que dicha célula procariota es *E. coli*.
23. Un procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- 10 (a) aislar un polinucleótido que codifica dicho compuesto;
(b) clonar dicho polinucleótido en un vector de expresión;
(c) transformar dicho vector en una célula huésped adecuada; y
(d) cultivar dicha célula huésped de manera que exprese dicho compuesto.

FIG. 1(a) (SEC ID N°: 1)

GLU	PRO	LEU	ASP	ASP	TYR	VAL	ASN	THR	GLN	GLY	ALA	SER	LEU	PHE
1				5					10					15
SER	VAL	THR	LYS	LYS	GLN	LEU	GLY	ALA	GLY	SER	ILE	GLU	GLU	CYS
				20					25					30
ALA	ALA	LYS	CYS	GLU	GLU	ASP	GLU	GLU	PHE	THR	CYS	ARG	ALA	PHE
				35					40					45
GLN	TYR	HIS	SER	LYS	GLU	GLN	GLN	CYS	VAL	ILE	MET	ALA	GLU	ASN
				50					55					60
ARG	LYS	SER	SER	ILE	ILE	ILE	ARG	MET	ARG	ASP	VAL	VAL	LEU	PHE
				65					70					75
GLU	LYS	LYS	VAL	TYR	LEU	SER	GLU	CYS	LYS	THR	GLY	ASN	GLY	LYS
				80					85					90
ASN	TYR	ARG	GLY	THR	MET	SER	LYS	THR	LYS	ASN	GLY	ILE	THR	CYS
				95					100					105
GLN	LYS	TRP	SER	SER	THR	SER	PRO	HIS	ARG	PRO	ARG	PHE	SER	PRO
				110					115					120
ALA	THR	HIS	PRO	SER	GLU	GLY	LEU	GLU	GLU	ASN	TYR	CYS	ARG	ASN
				125					130					135
PRO	ASP	ASN	ASP	PRO	GLN	GLY	PRO	TRP	CYS	TYR	THR	THR	ASP	PRO
				140					145					150
GLU	LYS	ARG	TYR	ASP	TYR	CYS	ASP	ILE	LEU	GLU	CYS	GLU	GLU	GLU
				155					160					165
CYS	MET	HIS	CYS	SER	GLY	GLU	ASN	TYR	ASP	GLY	LYS	ILE	SER	LYS
				170					175					180
THR	MET	SER	GLY	LEU	GLU	CYS	GLN	ALA	TRP	ASP	SER	GLN	SER	PRO
				185					190					195
HIS	ALA	HIS	GLY	TYR	ILE	PRO	SER	LYS	PHE	PRO	ASN	LYS	ASN	LEU
				200					205					210
LYS	LYS	ASN	TYR	CYS	ARG	ASN	PRO	ASP	ARG	GLU	LEU	ARG	PRO	TRP
				215					220					225
CYS	PHE	THR	THR	ASP	PRO	ASN	LYS	ARG	TRP	GLU	LEU	CYS	ASP	ILE
				230					235					240
PRO	ARG	CYS	THR	THR	PRO	PRO	PRO	SER	SER	GLY	PRO	THR	TYR	GLN
				245					250					255
CYS	LEU	LYS	GLY	THR	GLY	GLU	ASN	TYR	ARG	GLY	ASN	VAL	ALA	VAL
				260					265					270

FIG. 1(b)

THR	VAL	SER	GLY	HIS	THR	CYS	GLN	HIS	TRP	SER	ALA	GLN	THR	PRO
				275					280					285
HIS	THR	HIS	ASN	ARG	THR	PRO	GLU	ASN	PHE	PRO	CYS	LYS	ASN	LEU
				290					295					300
ASP	GLU	ASN	TYR	CYS	ARG	ASN	PRO	ASP	GLY	LYS	ARG	ALA	PRO	TRP
				305					310					315
CYS	HIS	THR	THR	ASN	SER	GLN	VAL	ARG	TRP	GLU	TYR	CYS	LYS	ILE
				320					325					330
PRO	SER	CYS	ASP	SER	SER	PRO	VAL	SER	THR	GLU	GLN	LEU	ALA	PRO
				335					340					345
THR	ALA	PRO	PRO	GLU	LEU	THR	PRO	VAL	VAL	GLN	ASP	CYS	TYR	HIS
				350					355					360
GLY	ASP	GLY	GLN	SER	TYR	ARG	GLY	THR	SER	SER	THR	THR	THR	THR
				365					370					375
GLY	LYS	LYS	CYS	GLN	SER	TRP	SER	SER	MET	THR	PRO	HIS	ARG	HIS
				380					385					390
GLN	LYS	THR	PRO	GLU	ASN	TYR	PRO	ASN	ALA	GLY	LEU	THR	MET	ASN
				395					400					405
TYR	CYS	ARG	ASN	PRO	ASP	ALA	ASP	LYS	GLY	PRO	TRP	CYS	PHE	THR
				410					415					420
THR	ASP	PRO	SER	VAL	ARG	TRP	GLU	TYR	CYS	ASN	LEU	LYS	LYS	CYS
				425					430					435
SER	GLY	THR	GLU	ALA	SER	VAL	VAL	ALA	PRO	PRO	PRO	VAL	VAL	LEU
				440					445					450
LEU	PRO	ASP	VAL	GLU	THR	PRO	SER	GLU	GLU	ASP	CYS	MET	PHE	GLY
				455					460					465
ASN	GLY	LYS	GLY	TYR	ARG	GLY	LYS	ARG	ALA	THR	THR	VAL	THR	GLY
				470					475					480
THR	PRO	CYS	GLN	ASP	TRP	ALA	ALA	GLN	GLU	PRO	HIS	ARG	HIS	SER
				485					490					495
ILE	PHE	THR	PRO	GLU	THR	ASN	PRO	ARG	ALA	GLY	LEU	GLU	LYS	ASN
				500					505					510
TYR	CYS	ARG	ASN	PRO	ASP	GLY	ASP	VAL	GLY	GLY	PRO	TRP	CYS	TYR
				515					520					525
THR	THR	ASN	PRO	ARG	LYS	LEU	TYR	ASP	TYR	CYS	ASP	VAL	PRO	GLN
				530					535					540

FIG. 1(c)

CYS	ALA	ALA	PRO	SER	PHE	ASP	CYS	GLY	LYS	PRO	GLN	VAL	GLU	PRO
				545					550					555
LYS	LYS	CYS	PRO	GLY	ARG	VAL	VAL	GLY	GLY	CYS	VAL	ALA	HIS	PRO
				560					565					570
HIS	SER	TRP	PRO	TRP	GLN	VAL	SER	LEU	ARG	THR	ARG	PHE	GLY	MET
				575					580					585
HIS	PHE	CYS	GLY	GLY	THR	LEU	ILE	SER	PRO	GLU	TRP	VAL	LEU	THR
				590					595					600
ALA	ALA	HIS	CYS	LEU	GLU	LYS	SER	PRO	ARG	PRO	SER	SER	TYR	LYS
				605					610					615
VAL	ILE	LEU	GLY	ALA	HIS	GLN	GLU	VAL	ASN	LEU	GLU	PRO	HIS	VAL
				620					625					630
GLN	GLU	ILE	GLU	VAL	SER	ARG	LEU	PHE	LEU	GLU	PRO	THR	ARG	LYS
				635					640					645
ASP	ILE	ALA	LEU	LEU	LYS	LEU	SER	SER	PRO	ALA	VAL	ILE	THR	ASP
				650					655					660
LYS	VAL	ILE	PRO	ALA	CYS	LEU	PRO	SER	PRO	ASN	TYR	VAL	VAL	ALA
				665					670					675
ASP	ARG	THR	GLU	CYS	PHE	ILE	THR	GLY	TRP	GLY	GLU	THR	GLN	GLY
				680					685					690
THR	PHE	GLY	ALA	GLY	LEU	LEU	LYS	GLU	ALA	GLN	LEU	PRO	VAL	ILE
				695					700					705
GLU	ASN	LYS	VAL	CYS	ASN	ARG	TYR	GLU	PHE	LEU	ASN	GLY	ARG	VAL
				710					715					720
GLN	SER	THR	GLU	LEU	CYS	ALA	GLY	HIS	LEU	ALA	GLY	GLY	THR	ASP
				725					730					735
SER	CYS	GLN	GLY	ASP	SER	GLY	GLY	PRO	LEU	VAL	CYS	PHE	GLU	LYS
				740					745					750
ASP	LYS	TYR	ILE	LEU	GLN	GLY	VAL	THR	SER	TRP	GLY	LEU	GLY	CYS
				755					760					765
ALA	ARG	PRO	ASN	LYS	PRO	GLY	VAL	TYR	VAL	ARG	VAL	SER	ARG	PHE
				770					775					780
VAL	THR	TRP	ILE	GLU	GLY	VAL	MET	ARG	ASN	ASN				
				785					790					

FIG. 3(a) (SEC ID N°: 12)

1 CATCCTGGGA TTGGGACCCA CTTTCTGGGC ACTGCTGGCC AGTCCCAAAA
 51 TGGAACATAA GGAAGTGGTT CTCTACTTTC TTTTATTTCT GAAATCAGGT
 101 CAAGGAGAGC CTCTGGATGA CTATGTGAAT ACCCAGGGGG CTTCACTGTT
 151 CAGTGTCACT AAGAAGCAGC TGGGAGCAGG AAGTATAGAA GAATGTGCAG
 201 CAAAATGTGA GGAGGACGAA GAATTCACCT GCAGGGCATT CCAATATCAC
 251 AGTAAAGAGC AACAATGTGT GATAATGGCT GAAAACAGGA AGTCCTCCAT
 301 AATCATTAGG ATGAGAGATG TAGTTTTATP TGAAAAGAAA GTGTATCTCT
 351 CAGAGTGCAA GACTGGGAAT GGAAAGAACT ACAGAGGGAC GATGTCCAAA
 401 ACAAAAAATG GCATCACCTG TCAAAAATGG AGTTCCACTT CTCCCACAG
 451 ACCTAGATTG TCACCTGCTA CACACCCCTC AGAGGGACTG GAGGAGAACT
 501 ACTGCAGGAA TCCAGACAAC GATCCGCAGG GGCCCTGGTG CTATACTACT
 551 GATCCAGAAA AGAGATATGA CTACTGCGAC ATTCTTGAGT GTGAAGAGGA
 601 ATGTATGCAT TGCAGTGGAG AAAACTATGA CGGCAAAATT TCCAAGACCA
 651 TGTCTGGACT GGAATGCCAG GCCTGGGACT CTCAGAGCCC ACACGCTCAT
 701 GGATACATTC CTTCCAAATP TCCAACAAG AACCTGAAGA AGAATTACTG
 751 TCGTAACCCC GATAGGGAGC TGCGGCCTTG GTGTTTCACC ACCGACCCCA
 801 ACAAGCGCTG GGAACTTTGT GACATCCCCC GCTGCACAAC ACCTCCACCA
 851 TCTTCTGGTC CCACCTACCA GTGTCTGAAG GGAACAGGTG AAAACTATCG
 901 CGGGAATGTG GCTGTTACCG TGTCGGGCA CACCTGTCAG CACTGGAGTG
 951 CACAGACCCC TCACACACAT AACAGGACAC CAGAAACTT CCCCTGCAAA
 1001. AATTTGGATG AAAACTACTG CCGCAATCCT GACGGAAAAA GGGCCCCATG
 1051 GTGCCATACA ACCAACAGCC AAGTGCGGTG GGAGTACTGT AAGATACCGT
 1101 CCTGTGACTC CTCCCCAGTA TCCACGGAAC AATTGGCTCC CACAGCACCA
 1151 CCTGAGCTAA CCCCTGTGGT CCAGGACTGC TACCATGGTG ATGGACAGAG
 1201 CTACCGAGGC ACATCCTCCA CCACCACCAC AGGAAAGAAG TGTCAGTCTT
 1251 GGTCATCTAT GACACCACAC CGGCACCAGA AGACCCCA GA AACTACCCA

FIG. 3(b)

1301 AATGCTGGCC TGACAATGAA CTA CTACTGCAGG AATCCAGATG CCGATAAAGG
 1351 CCCCTGGTGT TTTACCACAG ACCCCAGCGT CAGGTGGGAG TACTGCAACC
 1401 TGAAAAAATG CTCAGGAACA GAAGCGAGTG TTGTAGCACC TCCGCCTGTT
 1451 GTCCTGCTTC CAGATGTAGA GACTCCTTCC GAAGAAGACT GTATGTTTGG
 1501 GAATGGGAAA GGATACCGAG GCAAGAGGGC GACCACTGTT ACTGGGACGC
 1551 CATGCCAGGA CTGGGCTGCC CAGGAGCCCC ATAGACACAG CATTTTCACT
 1601 CCAGAGACAA ATCCACGGGC GGGTCTGGAA AAAAATTACT GCCGTAACCC
 1651 TGATGGTGAT GTAGGTGGTC CCTGGTGCTA CACGACAAAT CCAAGAAAAC
 1701 TTTACGACTA CTGTGATGTC CCTCAGTGTG CGGCCCTTC ATTTGATGTG
 1751 GGGAAAGCCTC AAGTGGAGCC GAAGAAATGT CCTGGAAGGG TTGTAGGGGG
 1801 GTGTGTGGCC CACCCACATP CCTGGCCCTG GCAAGTCAGT CTTAGAACAA
 1851 GGTTTGGAAAT GCACTTCTGT GGAGGCACCT TGATATCCCC AGAGTGGGTG
 1901 TTGACTGCTG CCCACTGCTT GGAGAAGTCC CCAAGGCCTT CATCCTACAA
 1951 GGTATCCTG GGTGCACACC AAGAAGTGAA TCTCGAACCG CATGTTTCCAGG
 2001 AAATAGAAGT GTCTAGGCTG TTCTTGGAGC CCACACGAAA AGATATTGCC
 2051 TTGCTAAAGC TAAGCAGTCC TGCCGTCATC ACTGACAAAG TAATCCCAGC
 2101 TTGTCTGCCA TCCCCAAATP ATGTGGTCCG TGACCCGACC GAATGTTTCG
 2151 TCACTGGCTG GGGAGAAACC CAAGGTACTT TTGGAGCTGG CCTTCTCAAG
 2201 GAAGCCCAGC TCCCTGTGAT TGAGAATAAA GTGTGCAATC GCTATGAGTT
 2251 TCTGAATGGA AGAGTCCAAT CCACCGAACT CTGTGCTGGG CATTTGGCCG
 2301 GAGGCACTGA CAGTTGCCAG GGTGACAGTG GAGGTCTCT GGTTTGCTTC
 2351 GAGAAGGACA AATACATTTT ACAAGGAGTC ACTTCTTGGG GTCTTGCTG
 2401 TGCACGCCCC AATAAGCCTG GTGTCTATGT TCGTGTTC AAGTTTGTTA
 2451 CTTGGATTGA GGGAGTGATG AGAAATAATT AATTGGACGG GAGACAG

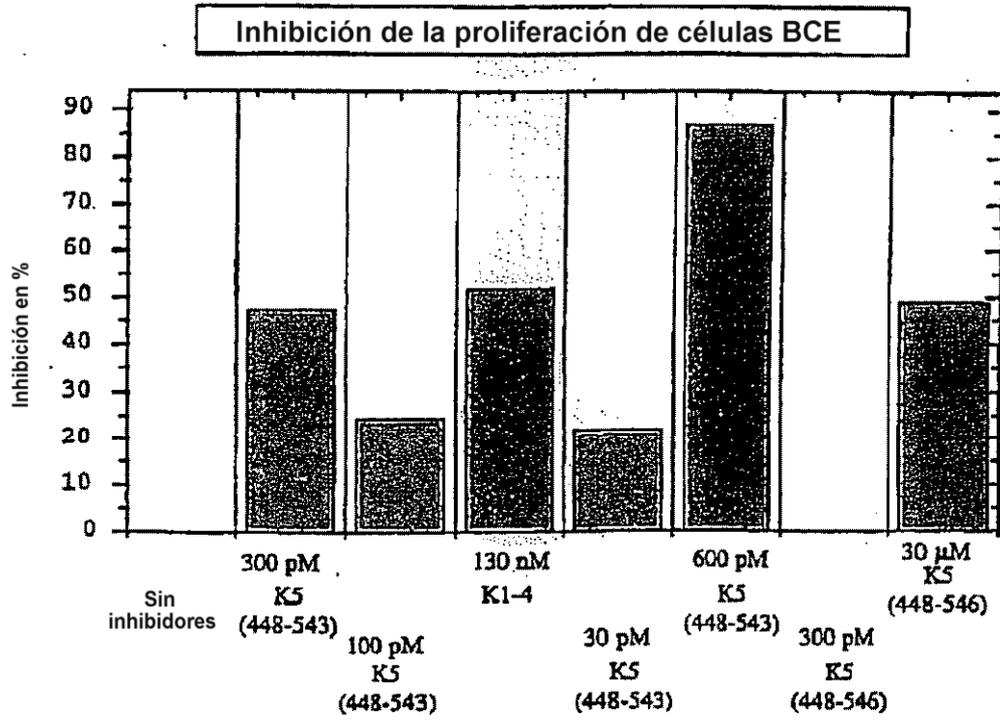
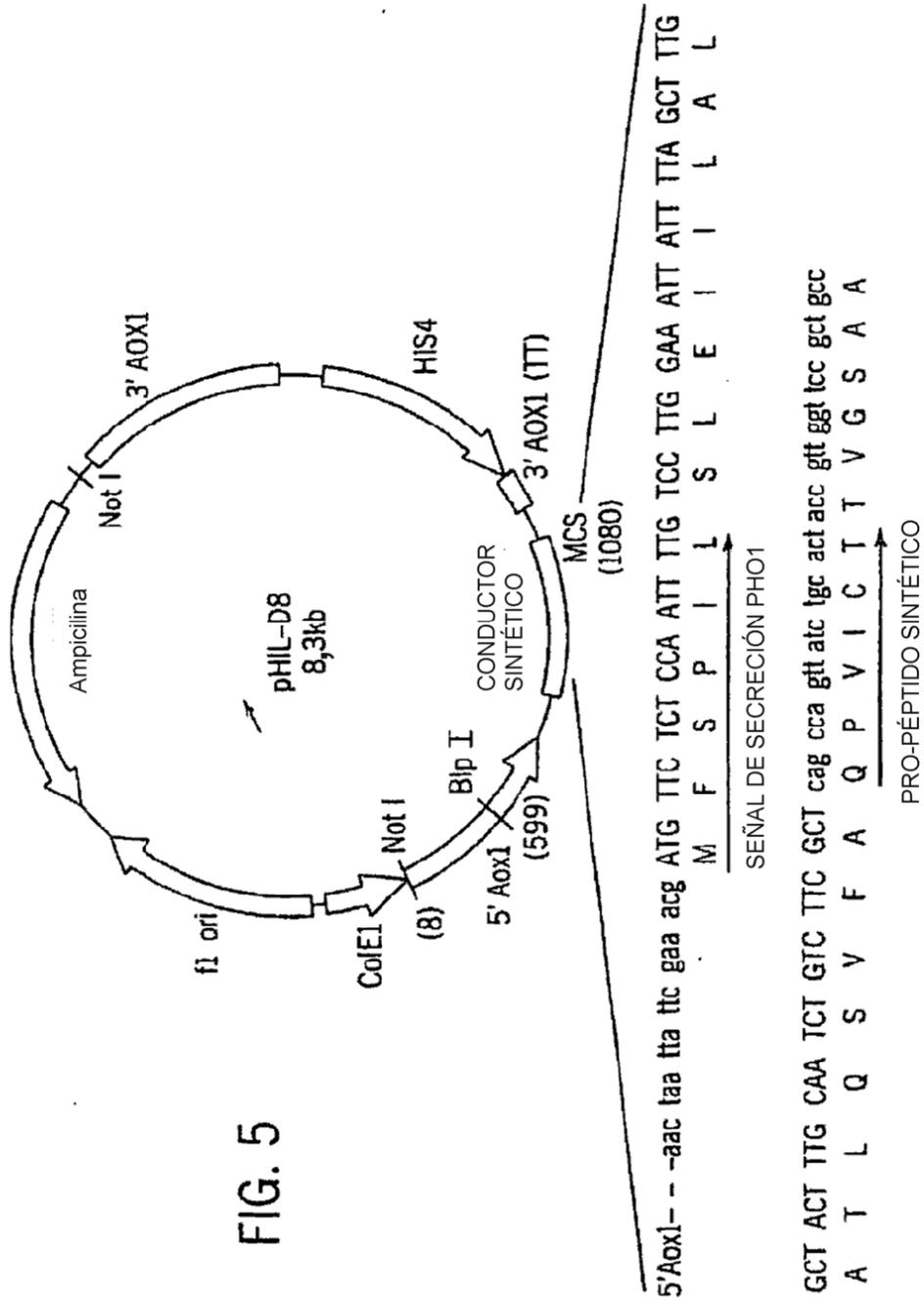


FIG. 4



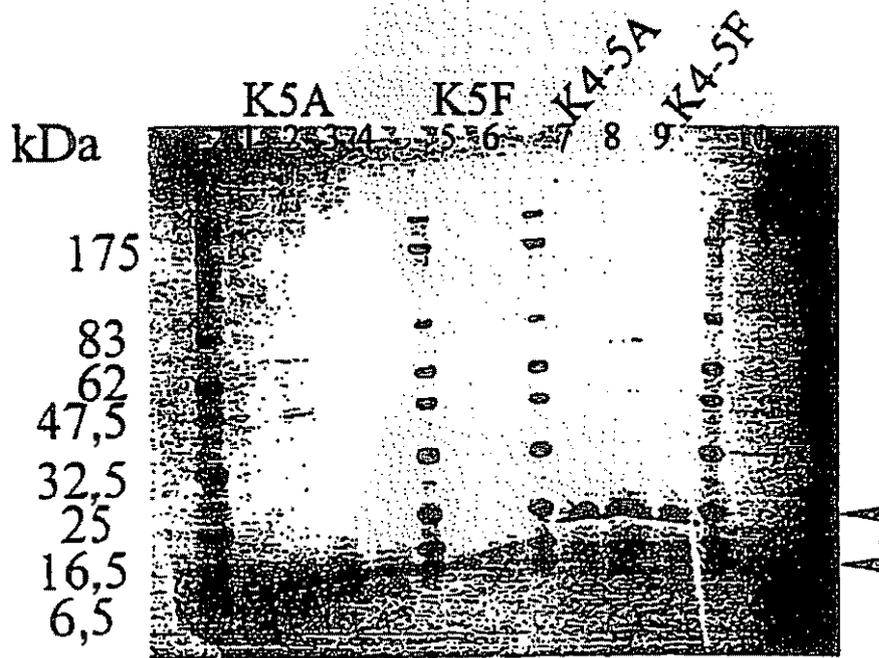


FIG. 6

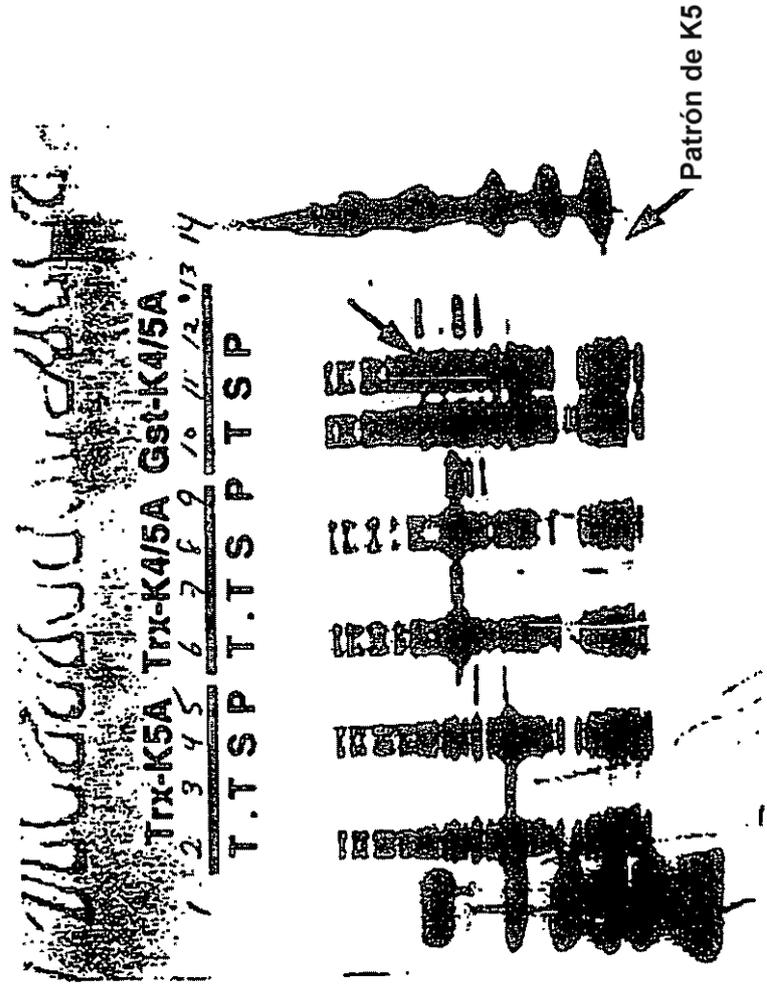


FIG. 7