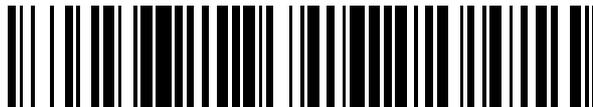


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 155**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/68** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07003963 .1**

96 Fecha de presentación: **26.04.1995**

97 Número de publicación de la solicitud: **1783215**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **ANGIOSTATINA Y MÉTODO PARA LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS.**

30 Prioridad:  
**26.04.1994 US 248629**  
**20.10.1994 US 326785**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.12.2011**

73 Titular/es:  
**THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER  
CORPORATION  
300 LONGWOOD AVENUE  
BOSTON, MASSACHUSETTS 02115, US**

72 Inventor/es:  
**O'Reilly, Michael S.;**  
**Folkman, Judah M.;**  
**Sim, Kim Lee y**  
**Cao, Yihai**

74 Agente: **Veiga Serrano, Mikel**

**ES 2 370 155 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).

**DESCRIPCION**

Angiostatina y método de uso para la inhibición de la angiogénesis

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a inhibidores endoteliales, denominados angiostatina, que inhiben de manera reversible la proliferación de células endoteliales.

**10 Estado de la técnica**

Tal como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" significa la generación de nuevos vasos sanguíneos en un tejido u órgano. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos o animales experimentan angiogénesis sólo en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, normalmente se observa angiogénesis en la cicatrización de heridas, el desarrollo fetal y embrionario y la formación del cuerpo lúteo, endometrio y placenta. El término "endotelio" significa una capa fina de células epiteliales planas que revisten cavidades serosas, vasos linfáticos y vasos sanguíneos.

Se cree que la angiogénesis tanto controlada como no controlada se realiza de una manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que revisten la luz de vasos sanguíneos, sobresalen entonces a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen la migración de células endoteliales a través de la membrana basal erosionada. Las células en migración forman un "brote" del vaso sanguíneo original, en el que las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales confluyen entre sí formando bucles capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

Se produce angiogénesis persistente, no regulada en una multiplicidad de estados patológicos, metástasis tumoral y crecimiento anómalo por células endoteliales y soporta el daño patológico observado en estos estados. Los diversos estados patológicos en los que está presente la angiogénesis no regulada se han agrupado entre sí como enfermedades asociadas a la angiogénesis o dependientes de la angiogénesis.

La hipótesis de que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis se propuso por primera vez en 1971. (Folkman J., Tumor angiogenesis: Therapeutic implications., N. Engl. Jour. Med. 285:1182-1186, 1971). En sus términos más sencillos establece: "Una vez que se ha producido la "captación" tumoral, cada aumento en la población de células tumorales debe verse precedido por un aumento de nuevos capilares que convergen en el tumor. "Captación tumoral" se entiende actualmente indicando una fase prevascular del crecimiento tumoral en la que una población de células tumorales que ocupa un volumen de unos cuantos milímetros cúbicos y que no supera unos cuantos millones de células, puede sobrevivir con los microvasos del huésped existentes. La expansión del volumen tumoral más allá de esta fase requiere la inducción de nuevos vasos sanguíneos capilares. Por ejemplo, las micrometástasis pulmonares en la fase prevascular temprana en ratones serían indetectables excepto por la microscopía de gran aumento en secciones histológicas.

Los ejemplos de las pruebas indirectas que apoyan este concepto incluyen:

(1) La velocidad de crecimiento de tumores implantados en cámaras transparentes subcutáneas en ratones es lenta y lineal antes de la neovascularización, y rápida y claramente exponencial tras la neovascularización. (Algire GH, *et al.* Vascular reactions of normal and malignant tumors *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6:73-85, 1945)

(2) Los tumores hechos crecer en órganos perfundidos aislados en los que no proliferan vasos sanguíneos están limitados a 1-2 mm<sup>3</sup> pero se expanden rápidamente hasta >1000 veces este volumen cuando se trasplantan a ratones y se neovascularizan. (Folkman J, *et al.*, Tumor behavior in isolated perfused organs: *in vitro* growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segments. Annals of Surgery 164:491-502, 1966)

(3) El crecimiento tumoral en la córnea avascular avanza lentamente y a una velocidad lineal, pero cambia a crecimiento exponencial tras la neovascularización. (Gimbrone, M.A., Jr. *et al.*, Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. J. Natl. Cancer Institute 52:41-427, 1974)

(4) Los tumores suspendidos en el fluido acuoso de la cámara anterior del ojo del conejo permanecen viables, avasculares y limitados en tamaño a < 1 mm<sup>3</sup>. Una vez que se implantan en el lecho vascular del iris, se neovascularizan y crecen rápidamente, alcanzando 16.000 veces su volumen original en el plazo de 2 semanas. (Gimbrone MA Jr., *et al.*, Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. J. Exp. Med. 136:261-276)

- 5 (5) Cuando los tumores se implantan en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, crecen rápidamente durante una fase avascular de >72 horas, pero no superan un diámetro medio de  $0,93 + 0,29$  mm. Se produce expansión tumoral rápida en el plazo de 24 horas tras la aparición de la neovascularización, y en el día 7 estos tumores vascularizados alcanzan un diámetro medio de  $8,0 + 2,5$  mm. (Knighton D., Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *British J. Cancer*, 35:347-356, 1977)
- 10 (6) Las castas vasculares de la metástasis en el hígado de conejo revelan la heterogeneidad del tamaño de las metástasis, pero muestran un punto de corte relativamente uniforme para el tamaño en el que está presente vascularización. Los tumores son generalmente avasculares hasta 1 mm de diámetro, pero se neovascularizan más allá de este diámetro. (Lien W., *et al.*, The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber. *Surgery* 68:334-340, 1970)
- 15 (7) En ratones transgénicos que desarrollan carcinomas en las células beta de los islotes pancreáticos, los islotes hiperplásicos prevasculares están limitados en tamaño a  $< 1$  mm. A las 6-7 semanas de edad, el 4-10% de los islotes se neovascularizan, y de estos islotes surgen grandes tumores vascularizados de más de 1000 veces el volumen de los islotes prevasculares. (Folkman J., *et al.*, Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339:58-61, 1989)
- 20 (8) Un anticuerpo específico contra VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) reduce la densidad de microvasos y provoca una inhibición "significativa o drástica" del crecimiento de tres tumores humanos que dependen de VEGF como su único mediador de la angiogénesis (en ratones desnudos). El anticuerpo no inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vitro*. (Kim K J, *et al.*, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 362:841-844, 1993)
- 25 (9) Un anticuerpo monoclonal anti-bFGF provoca una inhibición del 70% del crecimiento de un tumor de ratón que depende de la secreción de bFGF como su único mediador de la angiogénesis. El anticuerpo no inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vitro*. (Hori A, *et al.*, Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Research*, 51:6180-6184, 1991)
- 30 (10) La inyección intraperitoneal de bFGF potencia el crecimiento de un tumor primario y su metástasis estimulando el crecimiento de células endoteliales capilares en el tumor. Las propias células tumorales carecen de receptores para bFGF, y bFGF no es un mitógeno para las células tumorales *in vitro*. (Gross JL, *et al.* Modulation of solid tumor growth *in vivo* by bFGF. *Proc. Amer. Assoc. Canc. Res.* 31:79, 1990)
- 35 (11) Un inhibidor de la angiogénesis específico (AGM-1470) inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*, pero es mucho menos activo en la inhibición de la proliferación de células tumorales *in vitro*. Inhibe la proliferación de células endoteliales vasculares a la mitad de la máxima a una concentración 4 logs inferior a la que inhibe la proliferación celular. (Ingber D, *et al.*, Angiogenesis inhibitors: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature*, 48:555-557, 1990). Hay también pruebas clínicas indirectas de que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis.
- 40 (12) Los retinoblastomas humanos que son metastásicos en el humor vítreo se desarrollan en esferoides avasculares que están restringidos a menos de  $1 \text{ mm}^3$  a pesar del hecho de que son viables e incorporan  $^3\text{H}$ -timidina (cuando se extirpan de un ojo enucleado y se analizan *in vitro*).
- 45 (13) El carcinoma del ovario se metastatiza a la membrana peritoneal como semillas blancas avasculares diminutas ( $1-3 \text{ mm}^3$ ). Estos implantes rara vez crecen más hasta que uno o más de ellos se neovascularizan.
- 50 (14) La intensidad de la neovascularización en el cáncer de mama (Weidner N, *et al.*, Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324:1-8, 1991, y Weidner N, *et al.*, Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma, *J Natl. Cancer Inst.* 84: 1875-1887, 1992) y en el cáncer de próstata (Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *American Journal of Pathology*, 143(2):401-409, 1993) se correlaciona altamente con riesgo de futura metástasis.
- 55 (15) La metástasis del melanoma cutáneo humano es rara antes de la neovascularización. La aparición de neovascularización conduce a un aumento del grosor de la lesión y a un riesgo creciente de metástasis. (Srivastava A, *et al.*, The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. *Amer. J. Pathol.* 133: 419-423, 1988)
- 60 (16) En el cáncer de vejiga, el nivel urinario de un péptido angiogénico, bFGF, es un indicador más sensible del estado y grado de enfermedad que su citología. (Nguyen M, *et al.*, Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:241-242, 1993)

Por tanto, está claro que la angiogénesis desempeña un papel principal en la metástasis de un cáncer. Si esta actividad angiogénica pudiese reprimirse o eliminarse, entonces el tumor, aunque estuviese presente, no crecería. En el estado patológico, la prevención de la angiogénesis podría evitar el daño provocado por la invasión del nuevo sistema microvascular. Las terapias dirigidas al control de los procesos angiogénicos podrían conducir a la supresión o mitigación de estas enfermedades.

Lo que se necesita por tanto es una composición y un método que puedan inhibir el crecimiento no deseado de vasos sanguíneos, especialmente en tumores. También se necesita un método para detectar, medir y localizar la composición. La composición debe poder vencer la actividad de factores de crecimiento endógenos en tumores premetastásicos y prevenir la formación de los capilares en los tumores inhibiendo de ese modo el crecimiento de los tumores. La composición, los fragmentos de la composición y los anticuerpos específicos frente a la composición también deben poder modular la formación de capilares en otros procesos angiogénicos, tales como cicatrización de heridas y reproducción. La composición y el método para inhibir la angiogénesis deben ser preferiblemente no tóxicos y producir pocos efectos secundarios. También se necesita un método para detectar, medir y localizar los sitios de unión para la composición así como sitios de biosíntesis de la composición. La composición y los fragmentos de la composición deben poder conjugarse con otras moléculas para fines de marcaje tanto radiactivo como no radiactivo.

### Objeto de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones. Se proporcionan composiciones y métodos que son eficaces para modular la angiogénesis, e inhibir la angiogénesis no deseada, especialmente la angiogénesis relacionada con crecimiento tumoral. Se da a conocer una proteína, que se ha denominado "angiostatina", definida por su capacidad para vencer la actividad angiogénica de factores de crecimiento endógenos tales como bFGF, *in vitro*, y por su homología de secuencia de aminoácidos y similitud estructural con una parte interna de plasminógeno que comienza en aproximadamente el aminoácido de plasminógeno 98. La angiostatina comprende una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons tal como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el número de aminoácido 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta (SEQ ID NO:2).

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre especies. Por ejemplo, en la angiostatina humana, la secuencia de aminoácidos es sustancialmente similar a la secuencia del fragmento de plasminógeno murino descrito anteriormente, aunque una secuencia de angiostatina humana activa puede comenzar en el número de aminoácido o bien 97 o bien 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano intacto. Además, los fragmentos de plasminógeno humano tienen actividad anti-angiogénica similar tal como se muestra en un modelo de tumor de ratón. Debe entenderse que el número de aminoácidos en la molécula de angiostatina activa puede variar y se contempla que todas las secuencias de aminoácidos que tienen actividad de inhibición endotelial estén incluidas en la presente invención.

Se dan a conocer métodos y composiciones para tratar enfermedades y procesos mediados por la angiogénesis no deseada y no controlada administrando a un ser humano o animal una composición que comprende una angiostatina o derivado de angiostatina sustancialmente purificado en una dosificación suficiente para inhibir la angiogénesis. La presente invención es particularmente útil para tratar o para reprimir el crecimiento de tumores. La administración de angiostatina a un ser humano o animal con tumores metastatizados prevascularizados prevendrá el crecimiento o la expansión de esos tumores.

La presente invención también abarca secuencias de ADN que codifican para angiostatina, vectores de expresión que contienen secuencias de ADN que codifican para angiostatina y células que contienen uno o más vectores de expresión que contienen secuencias de ADN que codifican para angiostatina. La presente invención abarca además métodos de terapia génica mediante los cuales se introducen secuencias de ADN que codifican para angiostatina en un paciente para modificar los niveles de angiostatina *in vivo*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para tratar enfermedades y procesos que están mediados por la angiogénesis.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para tratar enfermedades y procesos que están mediados por la angiogénesis incluyendo, pero sin limitarse a, hemangioma, tumores sólidos, tumores de transmisión sanguínea, leucemia, metástasis, telangiectasia, psoriasis, esclerodermia, granuloma piógeno, angiogénesis miocárdica, enfermedad de Crohn, neovascularización de placas, síntomas colaterales coronarios, síntomas colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis de extremidades isquémicas, enfermedades corneales, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, artritis, neovascularización diabética, degeneración macular, cicatrización de heridas, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con *Helicobacter*, fracturas, queloides, vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, menstruación, placentación y fiebre por arañazo de gato.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para tratar o reprimir el crecimiento de un cáncer.

5 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una terapia para el cáncer que tenga efectos secundarios mínimos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para la administración dirigida de composiciones relacionadas con angiostatina a ubicaciones específicas.

10 Aún otro objeto de la invención es proporcionar composiciones útiles para terapia génica para la modulación de procesos angiogénicos.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes tras una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones dadas a conocer y las reivindicaciones adjuntas.

15 **Descripción de las figuras**

La figura 1 muestra SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno murino completo.

20 La figura 2 muestra el comienzo de la secuencia de la angiostatina murina (SEQ ID NO:2) y compara la secuencia murina con fragmentos peptídicos de plasminógeno humano (SEQ ID NO:3), de mono Rhesus (SEQ ID NO:4), porcino (SEQ ID NO:5) y bovino (SEQ ID NO:6) correspondientes. La secuencia de ratón se enumera en primer lugar, seguida de la humana, la de mono Rhesus, la porcina y la bovina.

25 La figura 3 muestra el índice de marcaje con BrdU de células tumorales en el pulmón en presencia o ausencia de un tumor primario.

La figura 4 muestra el análisis Matrigel de la influencia de un tumor primario de pulmón de Lewis sobre la angiogénesis dirigida por bFGF *in vivo*.

30 La figura 5 muestra la curva de dosis-respuesta para suero derivado de ratones que llevan carcinoma de pulmón de Lewis (LLC-bajo) frente a suero de ratones normales. Se sometieron a ensayo células endoteliales capilares bovinas en un ensayo de proliferación de 72 horas dirigido por bFGF.

35 La figura 6 muestra que tumores metastásicos tanto bajos como altos contienen actividad mitogénica endotelial en sus ascitis, pero sólo la línea tumoral metastásica baja tiene actividad inhibitoria endotelial en el suero.

La figura 7 muestra un perfil cromatográfico en fase inversa C4 de orina o suero parcialmente purificado de animales que llevan tumores.

40 La figura 8 muestra metástasis pulmonares superficiales tras el tratamiento de 13 días con molécula de plasminógeno intacta, fracción activa de una preparación de sitio I de unión a lisina de plasminógeno humano, orina concentrada de ratones que llevan tumores y orina concentrada de ratones normales.

45 La figura 9 muestra el peso de los pulmones tras el tratamiento de 13 días con molécula de plasminógeno intacta de plasminógeno humano, fracción activa de preparación de sitio I de unión a lisina, orina concentrada de ratones que llevan tumores y orina concentrada de ratones normales.

La figura 10 es una representación esquemática del vector pTrcHis.

50 La figura 11 representa una inmunotransferencia de angiostatina humana expresada en *E. coli* a partir de una fermentación aumentada a escala de 10 l, estudiada con sonda con anticuerpo monoclonal contra la región kringle de plasminógeno humano 1-3. La flecha muestra angiostatina humana recombinante. A) Muestra angiostatina recombinante eluida con ácido aminocaproico 0,2 M; B) muestra el último lavado con 1 X PBS de la columna de lisina; y C) muestra el lisado clarificado de células rotas.

55 La figura 12 es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición del crecimiento de células endoteliales capilares bovinas como función de la dilución de la disolución madre; A1, A2, B1, B2, y E son clones recombinantes que expresan la actividad anti-angiogénesis de la angiostatina humana; los controles C1, C2, D1 y D2 son clones control negativo que contienen sólo el vector sin la secuencia de ADN humano que codifica para angiostatina.

60 La figura 13 muestra el efecto inhibitorio sobre la proliferación de angiostatina humana recombinante sobre células endoteliales capilares bovinas *in vitro*.

- La figura 14 muestra el índice de proliferación del crecimiento y el índice apoptótico tras la eliminación del tumor primario y el tratamiento con solución salina o un análogo de fumagilina con actividad anti-angiogénica.
- 5 La figura 15 muestra la inhibición del crecimiento de un tumor primario T241 en ratones mediante el tratamiento con angiostatina humana *in vivo* con una única inyección de 40 mg/kg/día.
- La figura 16 muestra la inhibición del crecimiento de un tumor primario LLC-LM en ratones mediante el tratamiento con angiostatina humana *in vivo* a dos dosis de 40 mg/kg por dosis (80 mg/kg/día).
- 10 La figura 17 muestra el efecto de la extracción de un tumor primario de carcinoma de pulmón de Lewis sobre el crecimiento de sus metástasis pulmonares.
- La figura 18 muestra la proliferación del crecimiento y el índice apoptótico tras la resección del tumor.
- 15 La figura 19 muestra el efecto de la administración de la proteína angiostatina a ratones que tienen células de fibrosarcoma T241 implantadas sobre el volumen tumoral total como función del tiempo.
- La figura 20 muestra el efecto de la administración de la proteína angiostatina a ratones que tienen células de carcinoma de pulmón de Lewis (LM) implantadas sobre el volumen tumoral total como función del tiempo.
- 20 La figura 21 muestra el efecto de la administración de la proteína angiostatina a ratones que tienen células de reticulosarcoma implantadas sobre el volumen tumoral total como función del tiempo.
- La figura 22 muestra el efecto de la administración de proteína angiostatina a ratones SCID inmunodeficientes que tienen células PC-3 de carcinoma de próstata humano implantadas sobre el volumen tumoral total como función del tiempo a lo largo de un periodo de 24 días.
- 25 La figura 23 muestra el efecto de la administración de la proteína angiostatina a ratones SCID inmunodeficientes que tienen células MDA-MB de carcinoma de mama humano sobre el volumen tumoral total como función del tiempo a lo largo de un periodo de 24 días.
- 30 La figura 24 es una representación esquemática de la clonación de la secuencia de ADN de ratón que codifica para la proteína angiostatina de ratón derivada del ADNc de plasminógeno de ratón. La angiostatina de ratón abarca las regiones kringle de plasminógeno de ratón 1-4. PCR significa reacción en cadena de la polimerasa; P1 es el cebador oligonucleotídico del extremo 5' para la PCR; P2 es el cebador oligonucleotídico del extremo 3' para la PCR; SS designa la secuencia señal; ATG es el codón de iniciación de la traducción; TAA es el codón de terminación de la traducción; HA representa la etiqueta de epítipo hemaglutinina (YPYDVPDYASL); K1, K2, K3 y K4 representan las regiones kringle de plasminógeno de ratón 1, 2, 3 y 4 respectivamente. CMV es el promotor de citomegalovirus; T7 es el promotor de fago de bacterias; PA representa péptidos de pre-activación; y SP6 es el promotor Sp 6.
- 35 La figura 25 representa el número de células como función de los días para células no transfectadas (simulado); células transfectadas con el vector solo, sin la secuencia de ADN que codifica para angiostatina (vector 5), y dos clones que expresan angiostatina (AST 31 y AST 37). El panel (a) representa los resultados de la transfección de células T241. El panel (b) representa los resultados de células LL2.
- 40 La figura 26 muestra los resultados del medio de cultivo derivado de células de *E. coli* que contienen el clon de angiostatina sobre el número de células. Células no transfectadas (simulado); células transfectadas con el vector solo, sin la secuencia de ADN que codifica para angiostatina (vector 5), y tres clones que expresan angiostatina (AST 25, AST 31 y AST 37). El panel (a) representa los resultados de la incubación de medio de cultivo del control (simulado) y todos los clones de angiostatina (que expresan y que no expresan) sobre el número de células. El panel (b) representa los resultados de la incubación del medio de cultivo del control (simulado), vector solo (vector 6) y clones de angiostatina que expresan angiostatina de ratón sobre el número de células. El panel (c) representa los resultados de la incubación de medio de cultivo purificado del control (simulado) y clones de angiostatina que expresan angiostatina de ratón sobre el número de células, en el que el medio de cultivo se purificó sobre una columna de lisina-Sepharose para producir componentes que se unen a lisina.
- 45 La figura 27 muestra el efecto sobre el volumen tumoral total como función del tiempo de la implantación de células de fibrosarcoma T241 en ratones, en los que las células de fibrosarcoma se han transfectado con un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica para la proteína angiostatina, y en los que el vector puede expresar proteína angiostatina. "No transfectadas" representa células de fibrosarcoma T241 inalteradas implantadas en ratones. "Vector 6" representa células de fibrosarcoma T241 transfectadas con el vector sólo, que no contiene la secuencia de ADN que codifica para proteína angiostatina, implantadas en ratones. "Clon 25, clon 31 y clon 37" representan tres clones que producen angiostatina de células de fibrosarcoma T241 transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica para proteína angiostatina implantados en ratones.
- 50
- 55
- 60
- 65

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención incluye composiciones para el tratamiento de enfermedades y procesos que están mediados por o asociados a la angiogénesis. La angiostatina puede aislarse de fluidos corporales incluyendo, pero sin limitarse a, suero, orina y ascitis, o sintetizarse por métodos químicos o biológicos (por ejemplo, cultivo celular, expresión génica recombinante, síntesis peptídica y catálisis enzimática *in vitro* de plasminógeno o plasmina para producir angiostatina activa). Las técnicas recombinantes incluyen amplificación génica a partir de fuentes de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y amplificación génica a partir de fuentes de ARN usando PCR/transcriptasa inversa. La angiostatina inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos en tejidos tales como tumores vascularizados o no vascularizados.

La presente invención también abarca una composición que comprende un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica para angiostatina, en la que el vector puede expresar angiostatina cuando está presente en una célula, una composición que comprende una célula que contiene un vector, en la que el vector contiene una secuencia de ADN que codifica para angiostatina o fragmentos o análogos de la misma, y en la que el vector puede expresar angiostatina cuando está presente en la célula, y un método que comprende implantar en un ser humano o animal no humano una célula que contiene un vector, en la que el vector contiene una secuencia de ADN que codifica para angiostatina, y en la que el vector puede expresar angiostatina cuando está presente en la célula.

Más particularmente, se describe una proteína designada angiostatina que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 a 45 kilodaltons (kD) que puede vencer la actividad angiogénica de factores de crecimiento endógenos tales como bFGF, *in vitro*. La angiostatina es una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons tal como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el número de aminoácido 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta. La expresión "sustancialmente similar", cuando se usa en referencia a secuencias de aminoácidos de angiostatina, significa una secuencia de aminoácidos que tiene actividad anti-angiogénica y que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kD a 45 kD, que también tiene un alto grado de homología de secuencia con el fragmento peptídico de plasminógeno de ratón que comienza aproximadamente en el número de aminoácido 98 en plasminógeno de ratón y que pesa de 38 kD a 45 kD. Un alto grado de homología significa una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 60%, deseablemente una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 70% y más deseablemente una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%. La expresión "actividad inhibitoria endotelial" tal como se usa en el presente documento significa la capacidad de una molécula para inhibir la angiogénesis en general y, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de células endoteliales capilares bovinas en cultivo en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos.

La secuencia de aminoácidos de la molécula de plasminógeno murino completa se muestra en la figura 1 y en SEQ ID NO:1, la secuencia de la angiostatina comienza aproximadamente en el aminoácido 98. La angiostatina humana activa puede comenzar o bien en el aminoácido 97 o bien en el 99 de la molécula de plasminógeno humano intacta. La secuencia de aminoácidos de los primeros 339 aminoácidos de angiostatina de ratón se muestra en la figura 2, (SEQ ID NO:2), y se compara con las secuencias de fragmentos peptídicos de plasminógeno correspondientes de plasminógeno humano (SEQ ID NO:3), de mono Rhesus (SEQ ID NO:4), porcino (SEQ ID NO:5) y bovino (SEQ ID NO:6). Dado que estas secuencias son idénticas en bastante más del 50% de sus aminoácidos, debe entenderse que la secuencia de aminoácidos de la angiostatina es sustancialmente similar entre especies. El número total de aminoácidos de la angiostatina no se conoce de manera precisa sino que se define por el peso molecular de la molécula activa. La secuencia de aminoácidos de la angiostatina de la presente invención puede variar dependiendo de qué especie se deriva la molécula de plasminógeno. Por tanto, aunque la angiostatina de la presente invención que se deriva de plasminógeno humano tiene una secuencia ligeramente diferente que la angiostatina derivada de ratón, tiene actividad anti-angiogénica tal como se muestra en un modelo de tumor de ratón.

Se ha mostrado que la angiostatina puede inhibir el crecimiento de células endoteliales *in vitro*. La angiostatina no inhibe el crecimiento de líneas celulares derivadas de otros tipos de células. Específicamente, la angiostatina no tiene efecto sobre líneas celulares de carcinoma de pulmón de Lewis, epitelio de pulmón de visón, fibroblastos 3T3, células de músculo liso aórtico bovino, epitelio pigmentario de la retina bovina, células MDCK (epitelio renal canino), células WI38 (fibroblastos de pulmón fetal humano), células EFN (fibroblastos fetales murinos) y células LM (tejido conjuntivo murino). La angiostatina endógena en un ratón que lleva tumores es eficaz en la inhibición de la metástasis a una concentración sistémica de aproximadamente 10 mg de angiostatina/kg de peso corporal.

La angiostatina tiene una conformación tridimensional específica que se define por la región kringle de la molécula de plasminógeno. (Robbins, K.C., "The plasminogen-plasmin enzyme system" Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Practice, 2ª edición, ed. por Colman, R.W. *et al.* J.B. Lippincott Company, págs. 340-357, 1987). Hay cinco de tales regiones kringle, que son motivos conformacionalmente relacionados y tienen una homología de secuencia sustancial, en la parte terminal NH<sub>2</sub> de la molécula de plasminógeno. Se cree que la conformación tridimensional de la angiostatina abarca las regiones kringle de plasminógeno 1 hasta 3 y una parte de la región kringle 4. Cada región kringle de la molécula de plasminógeno contiene aproximadamente 80 aminoácidos y

5 contiene 3 enlaces disulfuro. Se sabe que este motivo de cisteínas existe en otras proteínas biológicamente activas. Estas proteínas incluyen, pero no se limitan a, protrombina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de dispersión y proteína estimulante de macrófagos. (Yoshimura, T, *et al.*, "Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MST1) confirms MSP as a member of the family of kringle proteins and locates the MSP gene on Chromosome 3" J. Biol. Chem., vol. 268, n.º 21, págs. 15461-15468, 1993). Se contempla que cualquier péptido o proteína aislada que tenga una conformación de tipo kringle tridimensional o motivo de cisteínas que tenga actividad anti-angiogénica *in vivo*, sea parte de la presente invención.

10 La presente invención también abarca terapia génica mediante la cual el gen que codifica para angiostatina se regula en un paciente. Diversos métodos de transferir o suministrar ADN a células para la expresión del producto génico de proteína, denominados de otro modo terapia génica, se dan a conocer en Gene Transfer into Mammalian Somatic Cells *in vivo*, N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12(4): 335-356 (1992). La terapia génica abarca la incorporación de secuencias de ADN en células somáticas o células de la línea germinal para su uso en terapia o bien *ex vivo* o bien *in vivo*. La terapia génica funciona reemplazando genes, aumentando la función génica normal o anómala y combatiendo enfermedades infecciosas y otras patologías.

15 Las estrategias para tratar estos problemas médicos con terapia génica incluyen estrategias terapéuticas tales como identificar el gen defectuoso y añadir entonces un gen funcional o bien para reemplazar la función del gen defectuoso o bien para aumentar un gen ligeramente funcional; o estrategias profilácticas, tales como añadir un gen para el producto de proteína que tratará el estado o que hará que el tejido u órgano sea más susceptible a un régimen de tratamiento. Como ejemplo de una estrategia profiláctica, puede colocarse un gen tal como angiostatina en un paciente y prevenir así la aparición de angiogénesis; o podría insertarse un gen que hace que las células tumorales sean más susceptibles a la radiación y entonces la radiación del tumor podría provocar un aumento de la destrucción de células tumorales.

20 Se prevén muchos protocolos para la transferencia de ADN de angiostatina o secuencias reguladoras de angiostatina en esta invención. La transfección de secuencias promotoras, distintas de las normalmente encontradas asociadas específicamente con la angiostatina, u otras secuencias que aumentarían la producción de la proteína angiostatina, también se prevé como métodos de terapia génica. Un ejemplo de esta tecnología se encuentra en Transkaryotic Therapies, Inc., de Cambridge, Massachusetts, que usa recombinación homóloga para insertar un "interruptor genético" que activa un gen de eritropoyetina en células. Véase Genetic Engineering News, 15 de abril de 1994. Tales "interruptores genéticos" podrían usarse para activar angiostatina (o el receptor de angiostatina) en células que normalmente no expresan angiostatina (o el receptor de angiostatina).

25 Los métodos de transferencia génica para terapia génica se encuentran en tres amplias categorías físicas (por ejemplo, electroporación, transferencia génica directa y bombardeo de partículas), químicas (portadores a base de lípidos, u otros vectores no virales) y biológicas (vector derivado de virus y captación de receptores). Por ejemplo, pueden usarse vectores no virales que incluyen liposomas recubiertos con ADN. Tales complejos de liposoma/ADN pueden inyectarse directamente por vía intravenosa en el paciente. Se cree que los complejos de liposoma/ADN se concentran en el hígado, en el que suministran el ADN a macrófagos y células de Kupffer. Estas células son de vida larga y por tanto proporcionan expresión a largo plazo del ADN suministrado. Adicionalmente, pueden inyectarse directamente vectores o el ADN "desnudo" del gen en el órgano, tejido o tumor deseado para suministro dirigido del ADN terapéutico.

30 Las metodologías de terapia génica pueden describirse también por el sitio de suministro. Los modos fundamentales para suministrar genes incluyen transferencia génica *ex vivo*, transferencia génica *in vivo* y transferencia génica *in vitro*. En la transferencia génica *ex vivo*, se toman células del paciente y se hacen crecer en cultivo celular. Se transfecta el ADN en las células, se expanden en número las células transfectadas y entonces se reimplantan en el paciente. En la transferencia *in vitro*, las células transformadas son células que se hacen crecer en cultivo, tales como células de cultivo tisular, y no células particulares de un paciente particular. Se transfectan estas "células de laboratorio", se seleccionan las células transfectadas y se expanden o bien para su implantación en un paciente o bien para otros usos.

35 La transferencia génica *in vivo* implica introducir el ADN en las células del paciente cuando las células están dentro del paciente. Los métodos incluyen el uso de transferencia génica mediada viralmente usando un virus no infeccioso para suministrar el gen en el paciente o la inyección de ADN desnudo en un sitio en el paciente y el ADN se capta por un porcentaje de células en las que el producto génico de proteína se expresa. Adicionalmente, los otros métodos descritos en el presente documento, tales como el uso de una "pistola génica", pueden usarse para la inserción *in vitro* de ADN de angiostatina o secuencias reguladoras de angiostatina.

40 Los métodos químicos de terapia génica pueden implicar un compuesto a base de lípidos, no necesariamente un liposoma, para transportar el ADN a través de la membrana celular. Las lipofectinas o citofectinas, iones positivos basados en lípidos que se unen a ADN cargado negativamente, producen un complejo que puede cruzar la membrana celular y proporcionar el ADN en el interior de la célula. Otro método químico usa endocitosis basada en receptor, que implica unir un ligando específico a un receptor de superficie celular y envolverlo y transportarlo a

través de la membrana celular. El ligando se une al ADN y todo el complejo se transporta al interior de la célula. El complejo ligando-gen se inyecta en el torrente sanguíneo y entonces las células diana que tienen el receptor se unirán específicamente al ligando y transportarán el complejo ligando-ADN al interior de la célula.

5 Muchas metodologías de terapia génica emplean vectores virales para insertar genes en células. Por ejemplo, se han usado vectores de retrovirus alterados en métodos *ex vivo* para introducir genes en linfocitos infiltrantes de tumor y periféricos, hepatocitos, células epidérmicas, miocitos u otras células somáticas. Estas células alteradas se introducen entonces en el paciente para proporcionar el producto génico a partir del ADN insertado.

10 También se han usado vectores virales para insertar genes en células usando protocolos *in vivo*. Para dirigir la expresión específica de tejido de genes foráneos, pueden usarse promotores o elementos reguladores de actuación en cis que se sabe que son específicos de tejido. Alternativamente, esto puede lograrse usando suministro *in situ* de ADN o vectores virales a sitios anatómicos específicos *in vivo*. Por ejemplo, se logró la transferencia génica a vasos sanguíneos *in vivo* implantando células endoteliales transducidas *in vitro* en sitios elegidos en paredes arteriales. El virus infectó las células circundantes que también expresaban el producto génico. Puede suministrarse un vector viral directamente al sitio *in vivo*, mediante un catéter por ejemplo, permitiendo así que sólo ciertas zonas se infecten con el virus, y proporcionando expresión génica específica de sitio, a largo plazo. También se ha demostrado la transferencia génica *in vivo* usando vectores de retrovirus en tejido mamario y tejido hepático mediante la inyección del virus alterado en vasos sanguíneos que conducen a los órganos.

20 Los vectores virales 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 adenoasociado, virus del herpes, SV 40, vaccinia y otros virus de ADN. Los vectores retrovirales murinos de replicación defectuosa son los vectores de transferencia génica más ampliamente utilizados. Los retrovirus de leucemia murina están compuestos por un ARN monocatenario complejo con una proteína central nuclear y enzimas polimerasas (pol), recubierto por un núcleo de proteína (gag) y rodeado por una envuelta de glicoproteína (env) que determina el intervalo de huésped. La estructura genómica de los retrovirus incluye los genes de gag, pol y env circundados por las repeticiones terminales largas en 5' y 3' (LTR). Los sistemas de vectores retrovirales se aprovechan del hecho de que un vector mínimo que contiene las LTR en 5' y 3' y la señal de empaquetamiento son suficientes para permitir el empaquetamiento, la infección y la integración del vector en células diana siempre que las proteínas estructurales virales se suministren *in trans* en la línea celular de empaquetamiento. Las ventajas fundamentales de los vectores retrovirales para transferencia génica incluyen infección y expresión génica eficaces en la mayoría de los tipos de células, integración precisa del vector de copia única en el ADN cromosómico de la célula diana y facilidad de manipulación del genoma retroviral.

35 El adenovirus está compuesto por ADN bicatenario, lineal complejo con proteínas centrales y rodeado con proteínas de la cápsida. Los avances en virología molecular han conducido a la capacidad de aprovecharse de la biología de estos organismos para crear vectores que pueden transducir secuencias genéticas novedosas en células diana *in vivo*. Los vectores basados en adenovirus expresarán el producto génico de péptidos a altos niveles. Los vectores adenovirales tienen altas eficacias de infectividad, incluso con bajos títulos de virus. Adicionalmente, el virus es completamente infectivo como virión libre de células de modo que no es necesaria la inyección de líneas celulares productoras. Otra ventaja potencial de los vectores adenovirales es la capacidad de lograr expresión a largo plazo de genes heterólogos *in vivo*.

45 Los métodos mecánicos de suministro de ADN incluyen vesículas de lípidos fusogénicos tales como liposomas u otras vesículas para la fusión de membranas, partículas lipídicas de lípidos catiónicos que incorporan ADN tales como lipofectina, transferencia de ADN mediada por polilisina, inyección directa de ADN, tal como microinyección de ADN en células germinales o somáticas, partículas recubiertas con ADN suministradas neumáticamente, tales como las partículas de oro usadas en una "pistola génica", y enfoques químicos inorgánicos tales como transfección con fosfato de calcio. Otro método, la terapia génica mediada por ligando, implica complejar el ADN con ligandos específicos para formar conjugados de ligando-ADN, para dirigir el ADN a un tejido o célula específica.

55 Se ha encontrado que la inyección de ADN de plásmido en células musculares produce un alto porcentaje de células que se transfectan y tienen expresión sostenida de genes marcadores. El ADN del plásmido puede integrarse o no en el genoma de las células. La no integración del ADN transfectado permitiría la transfección y expresión del producto génico de proteínas en tejidos no proliferativos, diferenciados terminalmente durante un periodo de tiempo prolongado sin temor a inserciones, deleciones o alteraciones mutacionales en el genoma mitocondrial o celular. 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 que se produzcan mutaciones en los genomas de las células receptoras. La no integración de ADN exógeno puede permitir la presencia de varios constructos de ADN exógeno diferentes dentro de una célula expresando todos los constructos diversos productos génicos.

65 Se usaron métodos de transferencia génica mediada por partículas por primera vez en la transformación de tejido vegetal. Con un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola génica", se genera una fuerza motriz para

acelerar partículas de alta densidad recubiertas con ADN (tales como oro o tungsteno) a una alta velocidad que permite la penetración en los órganos, tejidos o células diana. El bombardeo de partículas puede usarse en sistemas *in vitro*, o con técnicas *ex vivo* o *in vivo* para introducir ADN en células, tejidos u órganos.

5 La electroporación para transferencia génica usa una corriente eléctrica para hacer que las células o los tejidos sean susceptibles a la transferencia génica mediada por electroporación. Se usa un impulso eléctrico breve con una intensidad de campo dada para aumentar la permeabilidad de una membrana de tal manera que las moléculas de ADN pueden penetrar en las células. Esta técnica puede usarse en sistemas *in vitro*, o con técnicas *ex vivo* o *in vivo* para introducir ADN en células, tejidos u órganos.

10 Puede usarse transferencia génica mediada por portador *in vivo* para transfectar ADN foráneo en células. El complejo de portador-ADN puede introducirse convenientemente en fluidos corporales o el torrente sanguíneo y entonces dirigirse de manera específica de sitio al tejido u órgano diana en el cuerpo. Pueden usarse tanto liposomas como policones, tales como polilisina, lipofectinas o citofectinas. Pueden desarrollarse liposomas que son específicos de órgano o específicos de célula y por tanto el ADN foráneo transportado por el liposoma se captará por las células diana. Puede usarse inyección de inmunoliposomas que se dirigen a un receptor específico en ciertas células como método conveniente de inserción del ADN en las células que llevan el receptor. Otro sistema de portador que se ha usado es el sistema de conjugado de asialoglicoproteína/polilisina para transportar ADN a hepatocitos para transferencia génica *in vivo*.

20 El ADN transfectado también puede complejarse con otras clases de portadores de modo que el ADN se transporta a la célula receptora y entonces reside en el citoplasma o en el nucleoplasma. El ADN puede acoplarse a proteínas nucleares portadoras en complejos de vesículas específicamente diseñadas por ingeniería genética y transportarse directamente al núcleo.

25 Puede lograrse la regulación génica de la angiostatina administrando compuestos que se unen al gen de angiostatina, o regiones de control asociadas con el gen de angiostatina, o su correspondiente transcrito de ARN para modificar la tasa de transcripción o traducción. Adicionalmente, pueden administrarse células transfectadas con una secuencia de ADN que codifica para angiostatina a un paciente para proporcionar una fuente *in vivo* de angiostatina. Por ejemplo, pueden transfectarse células con un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para angiostatina. El término "vector" tal como se usa en el presente documento significa un portador que puede contener o asociarse con secuencias de ácido nucleico específicas, que funciona transportando las secuencias de ácido nucleico específicas al interior de una célula. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos y microorganismos infecciosos tales como virus, o vectores no virales tales como conjugados de ligando-ADN, liposomas, complejos de lípido-ADN. Puede ser deseable que una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN de angiostatina esté operativamente unida a una secuencia de control de la expresión para formar un vector de expresión que puede expresar angiostatina. Las células transfectadas pueden ser células derivadas del tejido normal del paciente, el tejido enfermo del paciente o pueden no ser células del paciente.

40 Por ejemplo, pueden transfectarse células tumorales extraídas de un paciente con un vector que puede expresar la proteína angiostatina de la presente invención, y reintroducirse en el paciente. Las células tumorales transfectadas producen niveles de angiostatina en el paciente que inhiben el crecimiento del tumor. Los pacientes pueden ser animales humanos o no humanos. También pueden transfectarse células mediante métodos químicos o físicos o sin vector conocidos en la técnica tales como electroporación, ionoporación o mediante una "pistola génica".  
45 Adicionalmente, puede inyectarse directamente ADN de angiostatina, sin la ayuda de un portador, en un paciente. En particular, puede inyectarse ADN de angiostatina en la piel, el músculo o la sangre.

50 El protocolo de terapia génica para transfectar angiostatina en un paciente puede ser o bien a través de integración del ADN de angiostatina en el genoma de las células, en minicromosomas, o bien como un constructo de ADN no replicante o que se replica por separado en el citoplasma o nucleoplasma de la célula. La expresión de angiostatina puede continuar durante un largo periodo de tiempo o puede reinyectarse periódicamente para mantener un nivel deseado de la proteína angiostatina en la célula, el tejido u órgano o un nivel sanguíneo determinado.

55 La angiostatina puede aislarse en una columna de HPLC C4 (véase la tabla 3). La proteína angiostatina se eluye a del 30 al 35% en un gradiente de acetonitrilo. En un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato de sodio en condiciones reductoras, la banda de proteína con actividad se eluía como un único pico a aproximadamente 38 kilodaltons.

60 Los inventores han mostrado que un tumor primario en crecimiento está asociado con la liberación al torrente sanguíneo de inhibidor(es) específico(s) de proliferación de células endoteliales, incluyendo angiostatina que pueden suprimir la angiogénesis dentro de una metástasis y de ese modo inhibir el crecimiento de la propia metástasis. La fuente de la angiostatina asociada con el tumor primario se desconoce. El compuesto puede producirse mediante degradación de plasminógeno por una proteasa específica, o podría producirse angiostatina mediante la expresión de un gen específico que codifica para angiostatina.

El fenotipo angiogénico de un tumor primario depende de la producción de péptidos angiogénicos en exceso de inhibidores de células endoteliales que elaboran células normales, pero se cree que están regulados por disminución durante la transformación a neoplasia. Aunque la producción de angiostatina puede estar regulada por disminución en una célula tumoral individual en relación con la producción por su tipo celular original, la cantidad total de inhibidor elaborado por todo el tumor puede ser suficiente para entrar en la circulación y suprimir el crecimiento endotelial en sitios remotos de micrometástasis. La angiostatina permanece en la circulación durante un tiempo significativamente más largo que el/los péptido(s) angiogénico(s) liberado(s) por un tumor primario. Por tanto, los péptidos angiogénicos parecen actuar localmente, mientras que la angiostatina actúa globalmente y circula por la sangre con una semivida relativamente larga. La semivida de la angiostatina es de aproximadamente 12 horas a 5 días.

Aunque sin desear restringirse a la siguiente hipótesis, se cree que cuando un tumor se convierte en angiogénico libera uno o más péptidos angiogénicos (por ejemplo aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GM-CSF, etc.), que actúan localmente, seleccionan como diana el endotelio en la vecindad de un tumor primario de una dirección extravascular, y no circulan (o circulan con una corta semivida). Estos péptidos angiogénicos deben producirse en una cantidad suficiente para vencer la acción del inhibidor de células endoteliales (inhibidores de la angiogénesis) para que un tumor primario siga expandiendo su población. Una vez que tal tumor primario está creciendo bien, continúa liberando inhibidores de células endoteliales a la circulación. Según esta hipótesis, estos inhibidores actúan de manera remota a una distancia del tumor primario, seleccionan como diana el endotelio capilar de una metástasis de una dirección intravascular y continúan circulando. Por tanto, justo en el momento en el que una metástasis remota podría comenzar a iniciar la angiogénesis, el endotelio capilar en su vecindad podría inhibirse por la angiostatina entrante.

Una vez que un tumor primario ha alcanzado un tamaño suficiente para provocar que se libere angiostatina de manera continua a la circulación, es difícil que un implante de tumor secundario (o una micrometástasis) inicien o aumenten su propia angiogénesis. Si un implante de tumor secundario (por ejemplo, en el espacio subcutáneo, o en la córnea, o de manera intravenosa en el pulmón) se produce poco después tras implantarse el tumor primario, el tumor primario no podrá suprimir el tumor secundario (porque la angiogénesis en el tumor secundario ya estará en marcha). Si se implantan dos tumores simultáneamente (por ejemplo, en lados opuestos), los inhibidores pueden tener un efecto inhibidor equivalente entre sí.

La angiostatina puede:

- (i) administrarse a animales o seres humanos que llevan tumores como terapia anti-angiogénica;
- (ii) monitorizarse en tejidos, orina o suero de animales o seres humanos como marcadores de pronóstico; y
- (iii) usarse como base para analizar suero y orina de pacientes con cáncer para detectar moléculas angiostáticas similares.

Se contempla que la angiostatina pueda aislarse de un fluido corporal como sangre u orina de pacientes o que la angiostatina pueda producirse mediante métodos de ADN recombinante o métodos químicos de péptidos sintéticos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Se conocen bien en la técnica métodos de purificación de proteínas y un ejemplo específico de un método para purificar angiostatina, y someter a ensayo su actividad inhibidora se proporciona en los ejemplos a continuación. El aislamiento de angiostatina endógena humana se logra usando técnicas similares.

Un ejemplo de un método de producción de angiostatina usando técnicas de ADN recombinante implica las etapas de (1) identificar y purificar la angiostatina tal como se trató anteriormente, y tal como se describe más completamente a continuación, (2) determinar la secuencia de aminoácidos N-terminal del inhibidor purificado, (3) generar de manera sintética cebadores oligonucleotídicos de ADN 5' y 3' para la secuencia de angiostatina, (4) amplificar la secuencia génica de angiostatina usando polimerasa, (5) insertar la secuencia amplificada en un vector apropiado tal como un vector de expresión, (6) insertar el vector que contiene el gen en un microorganismo u otro sistema de expresión que puede expresar el gen inhibidor, y (7) aislar el inhibidor producido de manera recombinante. Los vectores apropiados incluyen vectores de expresión virales, bacterianos y eucariotas (tales como levaduras). Las técnicas anteriores se describen más completamente en manuales de laboratorio tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" segunda edición por Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, 1989. La secuencia de ADN de plasminógeno humano se ha publicado (Browne, M.J., *et al.*, "Expression of recombinant human plasminogen and aglycoplasminogen in HeLa cells" Fibrinolysis vol.5 (4). 257-260, 1991).

El gen de la angiostatina puede aislarse de células o tejido (tal como células tumorales) que expresan altos niveles de angiostatina (1) aislando ARN mensajero del tejido, (2) usando transcriptasa inversa para generar la secuencia de ADN correspondientes y luego (3) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores apropiados para amplificar la secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de angiostatina activa.

Aún otro método de producción de angiotatina, o fragmentos biológicamente activos de la misma, es mediante síntesis de péptidos. Una vez que se encuentra un fragmento biológicamente activo de una angiotatina usando el sistema de ensayo descrito más completamente a continuación, puede secuenciarse, por ejemplo mediante métodos de secuenciación de péptidos automatizados. Alternativamente, una vez aislado el gen o la secuencia de ADN que codifica para angiotatina, por ejemplo mediante los métodos descritos anteriormente, la secuencia de ADN puede determinarse usando métodos de secuenciación automatizados o manuales bien conocidos en la técnica. La secuencia de ácido nucleico, a su vez, proporciona información referente a la secuencia de aminoácidos. Por tanto, si el fragmento biológicamente activo se genera mediante métodos específicos, tal como digestos trípticos, o si se secuencia el fragmento N-terminal, la secuencia de aminoácidos restante puede determinarse a partir de la correspondiente secuencia de ADN.

Una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos del péptido, el fragmento puede sintetizarse mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo por "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" E. Atherton y R.C. Sheppard, IRL Press, Oxford, Inglaterra. De manera similar, pueden sintetizarse múltiples fragmentos que posteriormente se unen entre sí para formar fragmentos más largos. Estos fragmentos de péptidos sintéticos pueden prepararse también con sustituciones de aminoácidos en ubicaciones específicas para someter a prueba la actividad agonista y antagonista *in vitro* e *in vivo*. Pueden usarse fragmentos de péptidos que tienen unión de alta afinidad a tejidos para aislar el receptor de angiotatina en columnas de afinidad. El aislamiento y la purificación del receptor de angiotatina es una etapa fundamental para dilucidar el mecanismo de acción de la angiotatina. El aislamiento de un receptor de angiotatina y la identificación de agonistas y antagonistas de la angiotatina facilitarán el desarrollo de fármacos para modular la actividad del receptor de angiotatina, la ruta final para la actividad biológica. El aislamiento del receptor permite la construcción de sondas de nucleótidos para monitorizar la ubicación y la síntesis del receptor, usando tecnología de hibridación y solución *in situ*. Además, puede aislarse el gen para el receptor de angiotatina, incorporarse en un vector de expresión y transfectarse en células, tales como células tumorales del paciente para aumentar la capacidad de un tipo celular, tejido o tumor para unirse a angiotatina e inhibir la angiogénesis local.

La angiotatina es eficaz en el tratamiento de enfermedades o procesos que están mediados por, o implican, angiogénesis. Se describe un método de tratamiento de una enfermedad mediada por angiogénesis con una cantidad eficaz de angiotatina, o un fragmento biológicamente activo de la misma, o combinaciones de fragmentos de angiotatina que tienen conjuntamente actividad anti-angiogénica, o agonistas y antagonistas de angiotatina. Las enfermedades mediadas por angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos; tumores de transmisión sanguínea tales como leucemias; metástasis tumoral; tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piógenos; artritis reumatoide; psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de placas; telangiectasia; artropatía hemofílica; angiofibroma; y granulación de heridas. La angiotatina es útil en el tratamiento de una enfermedad de estimulación excesiva o anómala de células endoteliales. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, adhesiones intestinales, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas, es decir, queloides. La angiotatina puede usarse como agente de control de nacimiento previniendo la vascularización requerida para la implantación del embrión. La angiotatina es útil en el tratamiento de enfermedades que tienen angiogénesis como consecuencia patológica tal como enfermedad por arañazo de gatos (*Rochele minalia quintosa*) y úlceras (*Helicobacter pylori*).

Los fragmentos de péptidos sintéticos de angiotatina tienen una variedad de usos. El péptido que se une al receptor de angiotatina con alta especificidad y aidez se marca radiactivamente y se emplea para la visualización y cuantificación de los sitios de unión usando técnicas de unión a membrana y autorradiográficas. Esta solicitud proporciona importantes herramientas de investigación y diagnósticas. El conocimiento de las propiedades de unión del receptor de angiotatina facilita la investigación de los mecanismos de transducción vinculados al receptor.

Además, el marcaje de péptidos de angiotatina con isótopos de vida corta permite la visualización de sitios de unión del receptor *in vivo* usando tomografía por emisión de positrones u otras técnicas radiográficas modernas para ubicar tumores con sitios de unión a angiotatina.

Las sustituciones de aminoácidos sistemáticas dentro de estos péptidos sintetizados producen antagonistas y agonistas peptídicos de alta afinidad para el receptor de angiotatina que potencian o disminuyen la unión de la angiotatina a su receptor. Tales agonistas se usan para suprimir el crecimiento de micrometástasis, limitando de ese modo la propagación del cáncer. Se aplican antagonistas para la angiotatina en situaciones de vascularización inadecuada, para bloquear los efectos inhibidores de la angiotatina y promover la angiogénesis. Por ejemplo, este tratamiento puede tener efectos terapéuticos para promover la cicatrización de heridas en diabéticos.

Se emplean péptidos de angiotatina para desarrollar columnas de afinidad para el aislamiento del receptor de angiotatina a partir de células tumorales cultivadas. Al aislamiento y la purificación del receptor de angiotatina le sigue la secuenciación de aminoácidos. Usando esta información, pueden identificarse y aislarse el gen o genes que codifican para el receptor de angiotatina. A continuación, se desarrollan secuencias de ácido nucleico clonadas

para su inserción en vectores que pueden expresar el receptor. Estas técnicas las conocen bien los expertos en la técnica. La transfección de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) para el receptor de angiostatina en células tumorales, y la expresión del receptor por las células tumorales transfectadas potencia la receptividad de estas células a angiostatina endógena o exógena y de ese modo se disminuye la tasa de crecimiento metastásico.

5 Agentes citotóxicos tales como ricina se unen a la angiostatina y fragmentos de péptidos de angiostatina de alta afinidad, proporcionando de ese modo una herramienta para la destrucción de células que se unen a angiostatina. Estas células pueden encontrarse en muchas ubicaciones, incluyendo pero sin limitarse a, micrometástasis y tumores primarios. Se infunden péptidos unidos a agentes citotóxicos de una manera diseñada para maximizar el suministro a la ubicación deseada. Por ejemplo, se suministran fragmentos de angiostatina de alta afinidad unidos a ricina a través de una cánula en vasos que irrigan el sitio diana o directamente en la diana. Tales agentes se suministran también de una manera controlada a través de bombas osmóticas acopladas a cánulas de infusión. Puede aplicarse conjuntamente una combinación de antagonistas de angiostatina con estimuladores de la angiogénesis para aumentar la vascularización del tejido. Este régimen terapéutico proporciona un medio eficaz de destrucción del cáncer metastásico.

La angiostatina puede usarse en combinación con otras composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, puede tratarse un tumor de manera convencional con cirugía, radiación o quimioterapia combinadas con angiostatina y entonces puede administrarse posteriormente angiostatina al paciente para extender el letargo de micrometástasis y para estabilizar e inhibir el crecimiento de cualquier tumor primario residual. Adicionalmente, se combinan angiostatina, fragmentos de angiostatina, antisuero de angiostatina, agonistas de receptores de angiostatina, antagonistas de receptores de angiostatina o combinaciones de los mismos, con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente una matriz de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Una matriz de liberación sostenida, tal como se usa en el presente documento, es una matriz compuesta por materiales, habitualmente polímeros, que se degradan mediante hidrólisis enzimática o ácido/base o mediante disolución. Una vez insertada en el cuerpo, sobre la matriz actúan enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige de manera deseable de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (poli(ácido láctico), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polilactida coglicolida (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 uno de o bien polilactida, poliglicolida o bien polilactida coglicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

La composición terapéutica que modula la angiogénesis de la presente invención puede ser un sólido, líquido o aerosol y puede administrarse mediante cualquier vía de administración conocida. Los ejemplos de composiciones terapéuticas sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación implantables. Las píldoras pueden administrarse por vía oral, las cremas terapéuticas pueden administrarse por vía tópica. Las unidades de dosificación implantables pueden administrarse localmente, por ejemplo en un sitio de tumor, o pueden implantarse para liberación sistémica de la composición terapéutica de modulación de la angiogénesis, por ejemplo por vía subcutánea. Los ejemplos de composición líquida incluyen formulaciones adaptadas para inyección por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraarterial y formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulación de aerosol incluyen una formulación de inhalador para su administración a los pulmones.

### Ejemplo 1

Elección de un sistema de animal-tumor en el que el crecimiento de la metástasis se inhibe mediante el tumor primario y se acelera tras la extirpación del tumor primario

Examinando una variedad de tumores murinos que pueden inhibir su propia metástasis, se seleccionó un carcinoma de pulmón de Lewis en el que el tumor primario inhibía lo más eficazmente la metástasis pulmonar. Se inyectaron a ratones macho de seis semanas de edad C57Bl6/J singénicos (dorso subcutáneo)  $1 \times 10^6$  células tumorales. Aparecieron por primera vez tumores visibles tras 3-4 días. Cuando los tumores tenían aproximadamente  $1500 \text{ mm}^3$  de tamaño, se aleatorizaron los ratones en dos grupos. Se extirpó completamente el tumor primario en el primer grupo y se dejó intacto en el segundo grupo tras una operación simulada. Aunque tumores de desde  $500 \text{ mm}^3$  hasta  $3000 \text{ mm}^3$  inhibieron el crecimiento de metástasis, el tumor primario más grande que pudo researse de manera segura con alta supervivencia y sin recidiva local tenía  $1500 \text{ mm}^3$ .

Tras 21 días, se sacrificaron todos los tumores y se les realizó la autopsia. En ratones con un tumor primario intacto, había cuatro +2 metástasis visibles, en comparación con cincuenta +5 metástasis en los ratones en los que el tumor se había extirpado ( $p < 0,0001$ ). Se confirmaron estos datos mediante el peso de los pulmones, que se correlaciona de manera estrecha con la carga tumoral, tal como se ha demostrado anteriormente. Hubo un aumento del 400% del

peso de los pulmones en húmedo en los ratones en los que se habían extirpado sus tumores en comparación con ratones en los que el tumor permanecía intacto ( $p < 0,0001$ ).

5 Este modelo experimental produjo datos reproducibles y el experimento descrito es reproducible. Este tumor se marca como "carcinoma de pulmón de Lewis-bajo metastásico" (LLC-bajo). El tumor también suprimía las metástasis en un patrón casi idéntico en ratones SCID, que son deficientes en linfocitos tanto B como T.

### Ejemplo 2

10 Aislamiento de una variante de tumor de carcinoma de pulmón de Lewis que es altamente metastásico, se extirpe o no el tumor primario

15 Una variante altamente metastásica de carcinoma de pulmón de Lewis surgió espontáneamente de la línea celular LLC-bajo del ejemplo 1 en un grupo de ratones y se ha aislado según los métodos descritos en el ejemplo 1 y se ha trasplantado repetidamente. Este tumor (LLC-alto) forma más de 30 metástasis pulmonares visibles esté presente o no el tumor primario.

### Ejemplo 3

20 Tamaño de las metástasis y tasa de proliferación de células tumorales dentro de las mismas. Efecto del tumor primario que inhibe las metástasis (LLC-bajo).

25 Se usaron ratones C57Bl6/J en todos los experimentos. Se inocularon ratones por vía subcutánea con células LLC-bajo, y 14 días más tarde se extirpó el tumor primario en la mitad de los ratones. A los 5, 10 y 15 días tras haberse extirpado el tumor, se sacrificaron los ratones. Se obtuvieron secciones histológicas de metástasis pulmonares. Ratones con un tumor primario intacto tenían micrometástasis en el pulmón que no estaban neovascularizadas. Estas metástasis estaban restringidas a un diámetro de 12-15 capas de células y no mostraron un aumento de tamaño significativo incluso 15 días tras la extirpación del tumor. En cambio, los animales en los que se había extirpado el tumor primario revelaron grandes metástasis vascularizadas tan sólo 5 días tras la operación. Estas metástasis experimentaron un aumento de volumen de 4 veces adicional para el día 15 tras la extirpación del tumor (tal como se refleja mediante el peso de los pulmones y la histología). Aproximadamente el 50% de los animales en los que se extirpó el tumor primario murieron de metástasis pulmonares antes del final del experimento. Todos los animales con un tumor primario intacto sobrevivieron al tumor al final del experimento.

35 Se determinó la tasa de replicación de células tumorales dentro de las metástasis contando núcleos teñidos con BrdU que se había inyectado previamente en los ratones. El alto porcentaje de células tumorales que incorporaban BrdU en metástasis pequeñas, avasculares de animales con un tumor primario intacto era equivalente a la incorporación de BrdU de células tumorales en las metástasis vascularizadas grandes de ratones de los que se había extirpado el tumor primario (figura 3). Este hallazgo sugiere que la presencia de un tumor primario no tiene efecto directo sobre la tasa de replicación de células tumorales dentro de una metástasis.

40 En la figura 3, el panel izquierdo muestra el índice de marcaje con BrdU de células tumorales en el pulmón en presencia o ausencia de un tumor primario. Antes de la tinción inmunohistoquímica, se permeabilizaron las secciones con HCl 0,2 M durante 10 minutos y se digirieron con proteinasa K 1  $\mu\text{g/ml}$  (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) en Tris-HCl 0,2 M,  $\text{CaCl}_2$  2 mM a 37°C durante 15 minutos. Se estimó el índice de marcaje contando el porcentaje de núcleos positivos a 250 aumentos. El panel derecho de la figura 3 representa un análisis del peso total de los pulmones de tumores con tumores primarios intactos o extirpados 5, 10 y 15 días tras la operación. Se sacrificaron los animales 6 horas tras la inyección intraperitoneal de BrdU (0,75 mg/ratón).

### 50 Ejemplo 4

Inhibición de la angiogénesis en metástasis pulmonares en presencia de un tumor primario intacto.

55 Para medir el grado de vascularización en metástasis pulmonares, se tiñeron tejidos con anticuerpos contra el factor de von Willebrand (un marcador específico endotelial, disponible de Dako Inc., Carpintería, CA). Las metástasis de animales con tumores intactos formaban un manguito delgado (8-12 capas de células tumorales) alrededor de vasos pulmonares existentes. Excepto por las células endoteliales del revestimiento de los vasos, ninguna o pocas células eran positivas para el factor de von Willebrand. En cambio, las metástasis pulmonares de animales 5 días tras la extirpación del tumor primario eran no sólo más grandes sino que también estaban infiltradas con brotes capilares que contenían células endoteliales que se teñían fuertemente para el factor de von Willebrand.

60 En el análisis inmunohistoquímico de la presencia de células endoteliales en metástasis pulmonares, una metástasis pulmonar con el tumor pulmonar primario intacto 19 días tras la inoculación, tenía un manguito de células tumorales alrededor de un microvaso preexistente en el pulmón. La metástasis estaba limitada a de 8 a 12 capas de células.

No había pruebas de neovascularización alrededor del microvaso, y no contenía ningún microvaso nuevo. Esto era típico del tamaño máximo de una metástasis preangiogénica avascular.

5 En un análisis inmunohistoquímico del tejido recogido cinco días tras researse el tumor primario (19 días tras la inoculación el tumor primario), la metástasis rodeaba un vaso preexistente en el pulmón. En cambio, en la muestra en la que el tumor primario no se reseó, el tumor estaba neovascularizado. Por tanto, un tumor primario intacto inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares en metástasis, pero la proliferación de células tumorales dentro de una metástasis no se ve afectada por el tumor primario.

10 **Ejemplo 5**

Un tumor primario inhibe la angiogénesis de un segundo tumor implantado en la córnea de ratón. El crecimiento de este segundo tumor se inhibe.

15 Se implantó un tumor de pulmón de Lewis de 0,25 a 0,5 mm<sup>2</sup> (LLC-bajo) en la córnea de ratón en el día 0. (Muthukkaruppan Vr., *et al.*, Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205:1416-1418, 1979) Se formó un tumor primario inoculando 1 x 10<sup>6</sup> células LLC-bajo por vía subcutánea en el dorso, o bien 4 o bien 7 días antes del implante corneal; o en el día del implante corneal; o 4 o 7 días tras el implante corneal. Los ratones control recibieron el implante corneal pero no el tumor subcutáneo. Otros ratones control recibieron el implante corneal y una  
20 inoculación de células tumorales LLC-alto en el dorso 4 días antes del implante corneal. Se evaluaron las córneas diariamente mediante estereomicroscopía con lámpara de hendidura para determinar el crecimiento del tumor corneal (medido mediante un micrómetro ocular) y para determinar el crecimiento de nuevos vasos capilares desde el borde del limbo corneal.

25 En ratones control que no llevaban un tumor subcutáneo primario, una mayoría de córneas (6/8) desarrollaron neovascularización de 6 a 7 días después de la implantación corneal y continuó hasta el día 10. Para el día 10, los tumores corneales vascularizados habían alcanzado aproximadamente un cuarto del volumen del ojo completo. En presencia del tumor LLC-bajo subcutáneo primario, los implantes corneales no se vascularizaban si el tumor primario estaba en su sitio al menos 4 días o más antes del implante corneal (tabla 1). En ausencia de neovascularización,  
30 los tumores corneales crecieron lentamente como discos delgados, blancos, avasculares dentro de la córnea.

Sin embargo, si el tumor primario no se implantaba hasta 4 días tras el implante corneal, las córneas se vascularizaban y crecían tumores corneales 3/3 a tasas similares que los controles que no llevaban tumor. En presencia del tumor LLC-alto subcutáneo primario, la mayoría de las córneas (2/3) desarrollaron neovascularización  
35 comenzando el día 7 tras la implantación corneal y continuó hasta el día 10. Para el día 10, los tumores corneales vascularizados habían alcanzado de nuevo aproximadamente un cuarto del volumen del ojo completo.

**Tabla 1.**

Inhibición de la angiogénesis tumoral en la córnea mediante un tumor subcutáneo primario. [Todos los tumores primarios son LLC-bajo excepto (*) que es LLC-alto].							
Día del implante ocular	0	0	0	0	0	0	0
Día del implante del tumor primario	-7	-4	-4*	0	ninguno	+4	+7
Número de ratones con nuevos vasos corneales en el día 10	2/10	0/9	2/3	2/3	6/8	3/3	2/3

40 Se esperaba que 0/10 córneas mostrasen neovascularización cuando se implantaba el tumor subcutáneo LLC-bajo primario 7 días antes del implante del tumor ocular (es decir, -7). Sin embargo, 2 de los tumores (2/10) se habían convertido en necróticos porque eran demasiado grandes (> 3 cm<sup>3</sup>).

45 **Ejemplo 6**

El tumor intacto primario inhibe la angiogénesis inducida por un implante subcutáneo secundario de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF.).

Aunque los experimentos descritos en los ejemplos V y VI muestran que un tumor primario inhibe la angiogénesis en una metástasis secundaria, estos estudios no revelan si el tumor primario: (i) inhibe la proliferación endotelial (o angiogénesis) directamente, o (ii) indirectamente regulando por disminución la actividad angiogénica de las células de tumor metastásico. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se indujo un foco de angiogénesis subcutánea mediante un implante de matrigel que contenía factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). (Passaniti A, *et al.*, A simple, quantitative method for assessing angiogenesis y anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.* 67:519, 1992).

Se inyectó Matrigel (un extracto de proteínas de la membrana basal), que contenía o bien 25 o bien 50 ng/ml de bFGF en presencia de heparina, por vía subcutánea en la superficie ventral de ratones que llevan tumores (LLC-bajo). Se sacrificaron los ratones 4 días más tarde y se midió la concentración de hemoglobina en el gel para cuantificar la formación de vasos sanguíneos. Se ha mostrado previamente que el número de nuevos vasos que entran en el matrigel se correlaciona con la concentración de hemoglobina (Folkman J., *Angiogenesis and its inhibitors* en "Important Advances in Oncology 1985", VT DeVita, S. Hellman y S. Rosenberg, editores, J.B. Lippincott, Filadelfia 1985). Se prepararon también algunos geles para el examen histológico. En ratones normales, los sedimentos de matrigel que contenían 50 ng/ml de bFGF eran completamente rojos. Estaban fuertemente invadidos por nuevos vasos capilares, y contenían 2,4 g/dl de hemoglobina. El matrigel que carecía de bFGF era translúcido y gris y contenía sólo 0,4 g/dl de hemoglobina (una diferencia de 6 veces). En cambio, el matrigel de ratones con un tumor primario contenía sólo 0,5 g/dl (figura 4).

**Ejemplo 7**

Transferencia de suero desde un animal que lleva tumores hasta un animal del cual se ha extirpado el tumor primario que suprime la metástasis

Se implantó en ratones carcinoma de pulmón de Lewis tal como se describió anteriormente. Tras 15 días, cuando los tumores eran de aproximadamente 1500 mm<sup>3</sup>, se aleatorizaron los ratones en cuatro grupos. Se sometieron tres grupos a resección quirúrgica completa del tumor primario; en un grupo se dejaron los tumores en su sitio (tras un procedimiento quirúrgico simulado). Los ratones de los tres grupos de resección recibieron entonces inyecciones intraperitoneales diarias de solución salina, suero de ratones normales que no llevaban tumores o suero de ratones con carcinomas de pulmón de Lewis de 1500 mm<sup>3</sup>. El grupo de ratones en los que se dejaron los tumores intactos recibió inyecciones de solución salina intraperitoneales. Se trataron todos los ratones durante 21 días, tras lo cual se sacrificaron los animales y se contaron las metástasis pulmonares (tabla 2).

**Tabla 2**

Tumor primario extirpado			Primario intacto		
Tratamiento (inyecciones intraperitoneales)	Solución salina	Suero de ratones normales	Suero de ratones que llevan tumores	Inyecciones de solución salina	
Número de metástasis pulmonares:	55±5	50±4	7±2	3±1	

Se confirmaron estos resultados mediante el peso de los pulmones.  $p = < 0,0001$  para la diferencia entre los dos grupos [(55 y 50)] frente a (7 y 3). Se han obtenido resultados similares usando angiostatina de la orina de animales que llevan tumores.

**Ejemplo 8**

Ensayo de células endoteliales capilares bovinas (BCE)

Sólo se usan células BCE entre los pasos 9 y 14. En el día 0, se recubren células BCE sobre placas de 24 pocillos gelatinizadas (1,5% de gelatina en PBS a 37°, 10% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas y después se aclaran con 0,5 ml de PBS) a una concentración de 12.500 células/pocillo. Se realizan recuentos celulares usando un hemocitómetro. Se recubren células en 500 µl de DMEM con el 10% de suero de ternero bovino inactivado por calor (56°C durante 20 minutos) y el 1% de glutamina-penicilina-estreptomicina (GPS).

Se exponen células BCE de la siguiente manera: se retiran los medios y se sustituyen por 250 µl de DMEM/5% de BCS/1% de GPS. Entonces se añade la muestra que va a someterse a prueba a los pocillos. (La cantidad varía dependiendo de la muestra que está sometiéndose a prueba). Se colocan las placas a 37°C/10% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 10 minutos. Se añaden 250 µl de DMEM/5% de BCS/1% de GPS con 2 ng/ml de bFGF a cada pocillo. Los medios finales son 500 µl de DMEM/5% de BCS/1% de GPS con 1 ng/ml de bFGF. Se devuelve la placa a una incubadora a 37°C/10% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.

En el día 4, se cuentan las células retirando el medio y después tripsinando todos los pocillos (0,5 ml de tripsina/EDTA) durante de 2 a 3 minutos. Entonces se transfieren las células suspendidas a viales de centelleo con 9,5 ml de Hemitall y se cuentan usando un contador Coulter. Una unidad de actividad es la cantidad de suero que contiene angiostatina que puede producir la mitad de la inhibición máxima proliferación endotelial capilar cuando se incuban células endoteliales en bFGF 1 ng/ml durante 72 horas.

**Ejemplo 9**

El suero de ratones que portan el tumor de pulmón de Lewis con baja metástasis (LLC-bajo) inhibe la proliferación de células endoteliales capilares in vitro.

Se estimularon células endoteliales capilares bovinas mediante factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF 1 ng/ml), en un ensayo de proliferación de 72 horas. El suero de ratones portadores de tumor añadido a estos cultivos inhibió la proliferación de células endoteliales de una manera dependiente de la dosis y reversible. El suero normal no era inhibidor (figura 5). La proliferación de células endoteliales se inhibió de una manera similar (con respecto a controles) mediante suero obtenido a partir de ratones SCID y ratones un/un portadores de tumor. Tras extirparse el tumor primario, la actividad de angiostatina desapareció del suero en 3-5 días.

El suero portador de tumor también inhibió las células endoteliales aórticas bovinas y las células endoteliales derivadas de un hemangioendotelioma de ratón espontáneo, (Obeso *et al.*, "Methods in Laboratory Investigation, A Hemangioendothelioma-derived cell line; Its use as a Model for the Study of Endothelial Cell Biology", Lab Invest., 63(2), págs. 259-269, 1990) pero no inhibió células de tumor de pulmón de Lewis, fibroblastos 3T3, células de músculo liso aórtico, epitelio de pulmón de visón, o fibroblastos de pulmón fetales humanos W138.

**Ejemplo 10**

El suero de ratones portadores de tumor de pulmón de Lewis (LLC-alto) que no inhibe las metástasis no inhibe la proliferación de células endoteliales capilares in vitro.

El suero de ratones portadores de un tumor primario de LLC-alto no inhibió significativamente la proliferación de células endoteliales capilares bobinas estimuladas mediante bFGF con respecto a controles. Además, cuando se sometió este suero a las dos primeras etapas de purificación (cromatografía con heparina-Sepharose y filtración en gel), no se encontró actividad de angiostatina en ninguna de las fracciones.

**Ejemplo 11**

Ascitis de carcinoma de pulmón de Lewis (baja metástasis), también genera suero de angiostatina.

Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de células tumorales ( $10^6$ ) de o bien LLC-bajo o bien LLC-alto, y una semana después, se obtuvieron 1-2 ml de ascitis hemorrágica de cada uno de 10-20 ratones. Se observó siembra tumoral mesentérica. Entonces se sacrificaron los ratones. Se obtuvo suero mediante punción cardiaca. También se obtuvo suero de ratones normales, no portadores de tumor, como control. Se centrifugaron suero y ascitis para extraer células, y se sometió el sobrenadante a ensayo con células endoteliales capilares bovinas estimuladas mediante bFGF (1 ng/ml) (véase el ejemplo IX). La ascitis que se originaba de ambos tipos tumorales estimuló una proliferación de células endoteliales capilares significativa (por ejemplo, proliferación del 100%) con respecto a controles tras 72 horas (figura 6). En cambio, el suero de los ratones con baja metástasis inhibió la proliferación de células endoteliales (inhibición hasta el 79% de controles). El suero de la línea con alta metástasis fue estimulante en un 200%.

Estos datos muestran que la ascitis de la línea con baja metástasis contiene una predominancia de estimulador de crecimiento endotelial con respecto a angiostatina. Esta condición es análoga a un tumor primario sólido. Además, aparece actividad de angiostatina en el suero, como si no tuviera oposición por la actividad estimulante. Este patrón es similar al tumor primario sólido (LLC-bajo). La ascitis del tumor con alta metástasis (LLC-alto) también parece contener una predominancia de estimulador de células endoteliales, pero no puede identificarse angiostatina en el suero.

**Ejemplo 12**

Fraccionamiento de angiostatina a partir de suero mediante cromatografía en columna y análisis de fracciones inhibitoras del crecimiento mediante SDS-PAGE.

Para purificar la(s) angiostatina(s), se combinó suero de ratones portadores de tumor. La actividad inhibitora, sometida a ensayo según el ensayo de actividad inhibitora *in vitro* descrito anteriormente, se cromatografió secuencialmente usando heparina-Sepharose, Biogel AO.5 mm agarosa, y varios ciclos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa C4. El SDS-PAGE de la fracción de HPLC que contenía actividad

inhibidora endotelial, reveló una banda diferenciada de  $M_r$  reducido aparente de 38.000 Dalton, que se purificó aproximadamente 1 millón de veces (véase la tabla 3) hasta una actividad específica de aproximadamente  $2 \times 10^7$ . En diferentes fases de la purificación, se sometieron a prueba fracciones combinadas con anticuerpos específicos para determinar la presencia de inhibidores endoteliales conocidos. No se encontraron factor de plaquetas 4, trombospondina, o factor de crecimiento transformante beta, en las fracciones parcialmente purificadas o purificadas.

Tabla 3

	Actividad específica (unidades*/mg)	Purificación en veces
Suero	1,69	1
Heparina Sepharose	14,92	8,8
Bio-gel AO.5m	69,96	41,4
HPLC/C4	$2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$

\*Una unidad de actividad es la cantidad de suero que contiene angiostatina que puede producir la mitad de la inhibición máxima de la proliferación endotelial capilar cuando se incuban células endoteliales en bFGF 1 ng/ml durante 72 horas.

### Ejemplo 13

Fraccionamiento de angiostatina a partir de orina mediante cromatografía en columna y análisis de fracciones inhibidoras del crecimiento mediante SDS-PAGE.

La purificación del/de los inhibidor(es) de células endoteliales a partir de suero se ve dificultada por el pequeño volumen de suero que puede obtenerse a partir de cada ratón y por la gran cantidad de proteína en el suero.

Se analizó orina de ratones portadores de tumor y se encontró que contiene un inhibidor de proliferación de células endoteliales que está ausente de la orina de ratones no portadores de tumor y de ratones con tumores LLC-alto. Se llevó a cabo la purificación de la actividad inhibidora de células endoteliales mediante la misma estrategia que se empleó para la purificación de suero (descrita anteriormente) (figura 7).

La figura 7 muestra la cromatografía en fase inversa C4 de orina o suero parcialmente purificado a partir de animales portadores de tumor. Se sometieron a ensayo todas las fracciones con células endoteliales capilares bovinas con bFGF en un ensayo de proliferación de 72 horas tal como se describe en el ejemplo IX. Se observó un pico de inhibición diferenciado que se eluía en ambos casos al 30 - 35% de acetonitrilo en la fracción 23. La electroforesis en gel SDS-gel de poliácridamida de la fracción inhibidora del tercer ciclo de cromatografía en fase inversa C4 de suero procedente de animales portadores de tumor mostró una única banda a aproximadamente 38.000 Dalton.

### Ejemplo 14

Caracterización de angiostatina circulante.

Se sometió a ensayo la inhibición endotelial según el procedimiento descrito en el ejemplo 9. Se aisló angiostatina en una columna Synchropak HPLC C4. (Synchrom, Inc. Lafayette, IN). Se eluyó el inhibidor a un gradiente del 30 al 35% de acetonitrilo. En un gel de electroforesis en gel de poliácridamida (PAGE) con dodecilsulfato de sodio en condiciones reductoras ( $\square$ -mercaptoetanol (5% v/v)), la banda de proteína con actividad se eluyó a 38 kilodaltons. En condiciones no reductoras, la proteína con actividad se eluyó a 28 kilodaltons. La actividad se encuentra en puntos similares tanto si la muestra inicial se aisló de orina como de suero. No se detectó actividad en ninguna otra banda.

La actividad asociada con las bandas se perdió cuando se calentó (100°C durante 10 minutos) o se trató con tripsina. Cuando se extrajo la banda con actividad con una mezcla de agua/cloroformo (1:1), sólo se encontró la actividad en la fase acuosa.

### Ejemplo 15

Purificación de fragmentos inhibidores de plasminógeno humano

Se obtuvo el sitio de unión a lisina I de plasminógeno de Sigma Chemical Company. La preparación es plasminógeno humano purificado tras la digestión con elastasa. El sitio de unión a lisina I obtenido de esta manera es una población de péptidos que contiene, en agregado, al menos las tres primeras estructuras de triple bucle (números 1 a 3) en la cadena A de plasmina (Kringle 1+2+3). (Sottrup-Jensen, L. *et al.* en *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*, Vol. 3, 191, Davidson, J.F. *et al.* eds. Raven Press, New York 1978 y Wiman, B., *et al.*, *Biochemica et Biophysica Acta*, 579, 142 (1979)). Se resuspendió el sitio de unión a lisina I de plasminógeno (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) en agua y se aplicó a una columna de fase inversa C4 que se había equilibrado con agua de calidad para HPLC/0,1% de TFA. Se eluyó la columna con un gradiente de agua/0,1% de

TFA a acetonitrilo/0,1% de TFA y se recogieron fracciones en tubos de polipropileno. Se evaporó una alícuota de cada uno en un evaporador Speed Vac, se resuspendió con agua, y se aplicó a BCE en un ensayo de proliferación. Se repitió este procedimiento dos veces para las fracciones inhibitoras usando un gradiente similar para la elución. La actividad inhibitora eluyó al 30-35% de acetonitrilo en la ejecución final de la columna C4. La SDS-PAGE de la fracción inhibitora reveló 3 bandas diferenciadas de 40, 42,5, y 45 kd de masa molecular reducida aparente. La SDS-PAGE en condiciones no reductoras reveló tres bandas de 30, 32,5, y 35 kd masa molecular respectivamente.

#### Ejemplo 16

##### 10 Extracción de actividad inhibitora a partir de SDS-PAGE

Las fracciones inhibitoras purificadas a partir de purificaciones basadas en plasminógeno humano se resolvieron mediante SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. Las zonas del gel correspondientes a bandas observadas en carriles circundantes cargados con las mismas muestras mediante tinción con plata se cortaron del gel y se incubaron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato a 4°C durante 12 horas en tubos de polipropileno. Se retiró el sobrenadante y se dializó dos veces frente a solución salina durante 6 horas (MWCO = 6-8000) y dos veces frente a agua destilada durante 6 horas. Se evaporó el dializado mediante centrifugación a vacío. Se resuspendió el producto en solución salina y se aplicó a células endoteliales capilares bovinas estimuladas mediante 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico en un ensayo de 72 horas. La proteína extraída de cada una de las tres bandas inhibió las células endoteliales capilares.

#### Ejemplo 17

##### 25 Estudios de tratamiento con fragmento de plasminógeno

Se implantaron carcinomas de pulmón de Lewis a ratones y se sometieron a resecciones cuando los tumores tenían 1500-2000 mm<sup>3</sup>. En el día de la operación, se aleatorizaron los ratones a 6 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneal diarias con los tres fragmentos inhibidores purificados de plasminógeno humano, plasminógeno humano completo, orina de animales portadores de tumor, orina de ratones normales, o solución salina. Un grupo de animales portadores de tumor que sólo tenía un procedimiento simulado se trató con inyecciones de solución salina. Inmediatamente tras la extirpación del tumor primario, los ratones reciben una inyección intraperitoneal de 24 µg (1,2 mg/kg/día/ratón) de los fragmentos de plasminógeno inhibidores como dosis de carga. Entonces reciben una inyección intraperitoneal diaria de 12 µg del fragmento inhibidor (0,6 mg/kg/día/ratón) durante la duración del experimento. Los ratones control reciben la misma dosis de la molécula de plasminógeno completo tras la extirpación del tumor. Para los tratamientos con orina, se filtra la orina de ratones normales o portadores de tumor, se dializa exhaustivamente, se liofiliza y después se resuspende en agua estéril para obtener una concentración de 250 veces. Se administra a los ratones 0,8 ml del concentrado de orina dializado, o bien de ratones portadores de tumor o bien de ratones normales, en dos inyecciones intraperitoneales en el día de la extirpación del tumor primario como dosis de carga. Entonces reciben inyecciones intraperitoneales diarias de 0,4 ml de la orina dializada y concentrada durante el transcurso del experimento. Se continuaron los tratamientos durante 13 días momento en el cual todos los ratones se sacrificaron y se les realizaron autopsias.

Los resultados del experimento se muestran en las figuras 8 y 9. La figura 8 muestra metástasis pulmonares superficiales tras el tratamiento de 13 días. Las metástasis pulmonares superficiales se refieren al número de metástasis observadas en los pulmones de los ratones en la autopsia. Se usó un estereomicroscopio para contar las metástasis. La figura 8 muestra el número medio de metástasis pulmonares superficiales que se contó y el error estándar de la media. Tal como se muestra, el grupo de ratones con el tumor primario presente no mostró metástasis. Los ratones en los que se reseccionó el tumor primario y se trataron con solución salina mostraron amplias metástasis. Los ratones tratados con el fragmento de plasminógeno derivado de seres humanos no mostraron metástasis. Los ratones tratados con el plasminógeno completo mostraron amplias metástasis lo que indica que la molécula de plasminógeno completo no tiene actividad inhibitora endotelial. Los ratones tratados con orina dializada y concentrada de ratones portadores de tumor no mostraron metástasis. Los ratones tratados con orina concentrada de ratones normales mostraron amplia metástasis. Cuando se midió el peso del pulmón, se obtuvieron resultados similares (figura 9).

#### Ejemplo 18

Secuencia de aminoácidos de angiostatina murina y humana.

La secuencia de aminoácidos de angiostatina aislada a partir de orina de ratón y angiostatina aislada a partir de la preparación del fragmento de sitio de unión a lisina I humana se determinó en un secuenciador de proteínas de Applied Biosystem modelo 477A. Se identificaron las fracciones de aminoácidos de feniltiohidantoina con un HPLC de ABI modelo 120A en línea. La secuencia de aminoácidos determinada a partir de la secuencia N-terminal y las digestiones tripticas de la angiostatina murina y humana indican que la secuencia de la angiostatina es similar a la secuencia que comienza en el número de aminoácido 98 del plasminógeno murino. Por tanto, la secuencia de

aminoácidos de la angiostatina es una molécula que comprende una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons según se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el número de aminoácido 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta. La secuencia de aminoácidos inicial de la angiostatina murina (SEQ ID NO: 2) se muestra en la figura 1. La longitud de la secuencia de aminoácidos puede ser ligeramente más larga o más corta que la mostrada en la figura 1.

El análisis de aminoácidos N-terminales y las digestiones tríplicas de la fracción activa de sitio de unión a lisina I humano (véase el ejemplo 15) muestran que la secuencia de la fracción comienza aproximadamente en el aminoácido 97 ó 99 del plasminógeno humano y la angiostatina humana es homóloga a la angiostatina murina. La secuencia de aminoácidos inicial de la angiostatina humana (que comienza en el aminoácido 98) se muestra en la figura 2, (SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de angiostatina murina y humana se compara en la figura 2 con las secuencias de aminoácidos internas correspondientes de plasminógeno de otras especies incluyendo plasminógeno porcino, bovino, y de mono Rhesus, indicando la presencia de angiostatina en esas especies.

### Ejemplo 19

Expresión de angiostatina humana en *E. coli*.

Se usó el vector pTrcHisA (Invitrogen) (figura 10) para obtener una transcripción regulada de alto nivel a partir del promotor *trc* para una eficacia de traducción potenciada de genes eucariotas en *E. coli*. La angiostatina se expresa fusionada a una cola de polihistidina de unión a níquel N-terminal para la purificación en una etapa usando resinas de afinidad a metales. El sitio de reconocimiento de escisión con enterocinasa en el péptido de fusión permite la retirada posterior del péptido de fusión de histidina N-terminal de la proteína recombinante purificada. Se encontró que la proteína angiostatina humana recombinante se unía a lisina; tiene reactividad cruzada con anticuerpos monoclonales específicos para las regiones kringle 1, 2 y 3, e inhibe la proliferación de células endoteliales impulsada por bFGF *in vitro*.

Para construir el inserto, se obtiene el fragmento génico que codifica para angiostatina humana a partir de ARNm de hígado humano que se somete a transcripción inversa y se amplifica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cebadores específicos. El producto de 1131 pares de bases codifica para los aminoácidos de 93 a 470 del plasminógeno humano. Se clonó el fragmento amplificado en el sitio XhoI/KpnI de pTrcHisA, y se transformó el constructo resultante en células huésped *E. coli* XL-1B (disponibles de Stratagene). Se transformó un clon de control que contenía el plásmido vector pTrcHisA solo también en células huésped *E. coli* XL-1B. Este clon se denominó el clon de control vector. Se purificaron ambos clones de manera idéntica tal como se describe a continuación.

Se seleccionaron colonias con expresión de la siguiente manera. Se hicieron crecer transferencias de colonias de *E. coli* transformadas con el gen que codifica para angiostatina en filtros de nitrocelulosa impregnados con IPTG y se recubrieron sobre una placa de agar LB. Tras la inducción por IPTG de la expresión, se lisaron las colonias sobre filtros de nitrocelulosa. Se bloquearon las transferencias de nitrocelulosa, se aclararon y se analizaron con sondas con dos anticuerpos monoclonales separados (AcM Dcd y Vap; cedido por S.G. McCance y F.J. Castellino, Universidad de Notre Dame) que reconocen conformaciones específicas de angiostatina. Se seleccionaron colonias con fuerte expresión reconocidas por los AcM.

Para identificar el tiempo óptimo hasta la expresión máxima, se recogieron células en diversos momentos antes y después de la inducción por IPTG y se expusieron a ciclos de congelación-descongelación repetidos, seguido por análisis con SDS-PAGE, inmunotransferencia y análisis con sondas con AcM Dcd y Vap.

A partir de esto, se seleccionó el clon pTrcHisA/HAS4. La inducción con IPTG fue durante 4 horas tras lo cual se recogió el sedimento celular y se resuspendió en Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, 5% de glicerol y 200 mg/ml de lisozima y se agitó durante 30 min. a 4°C. Se centrifugó la suspensión a 14.000 rpm durante 25 min. y se resuspendió el sedimento en Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, 5% de glicerol y 0,1% de DOC. Se agitó esta suspensión durante 1 h. a 4°C, y después se centrifugó a 14.000 rpm durante 25 min. La fracción de sobrenadante en esta etapa contiene angiostatina expresada. Se encontró que la angiostatina humana expresada por *E. coli* presentaba la propiedad física de la angiostatina nativa, que es la capacidad para unirse a lisina. Por tanto, la angiostatina expresada por *E. coli* se purificó en una columna de lisina-Sepharose (Farmacia o Sigma) en una única etapa. La elución de angiostatina de la columna fue con ácido épsilon-amino-n-caproico 0,2 M pH 7,5.

Tras estos experimentos, se realizó la ampliación a escala a lotes de fermentación de 10 l del clon pTrcHisA/HAS4. Se sedimentaron las células obtenidas a partir de esa inducción a escala ampliada y se resuspendieron en Tris 50 mM pH 7,5, se rompieron a 10.000 psi congelando tres veces a 10°C entre pasos. Se aclaró el lisado obtenido mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min. a 4°C, y se aisló la angiostatina expresada en lisina-Sepharose (figura 11).

Se dializó exhaustivamente angiostatina humana expresada por *E. coli* purificada frente a agua y se liofilizó. Se resuspendió la angiostatina humana expresada en medios (DMEM, 5% de BCS, 1% de gentamicina/penicilina/estreptomina) hasta una concentración estimada de 3 ug/ml, y se usó en ensayos de células endoteliales capilares bovinas (BCE) *in vitro*, tal como se describió en el ejemplo 8. De manera similar, se trató el clon de control que contiene el vector solo de manera idéntica al clon pTrcHisA/HAsH4. Se indujo con IPTG de manera idéntica, y se usó el lisado bacteriano para unirse a lisina, se eluyó con ácido amino-capróico 0,2 M, se dializó exhaustivamente y se liofilizó. También se resuspendió esta preparación de control en medios a una concentración estimada de 3 ug/ml. Se obtuvieron las muestras de angiostatina recombinante, y los controles a partir de diferentes lotes de inducción y fermentación así como ejecuciones de purificación separadas, y todas se codificaron en EntreMed, Maryland. Se realizaron ensayos de BCE con estas muestras codificadas de una manera enmascarada en el Children's Hospital, Boston.

Los resultados de los ensayos de BCE de angiostatina humana recombinante mostraron que la angiostatina humana expresada en *E. coli* inhibió la proliferación de células BCE debida a bFGF (usado a 1 ng/ml) (figura 12). La disolución madre de angiostatina recombinante en medios (a aproximadamente 3 ug/ml) se usó a una dilución de 1:5, 1:10 y 1:20. Se calculó la inhibición en porcentaje de la siguiente manera:

$$1 - \frac{\text{número de células con angiostatina} - \text{número de células en el día 0}}{\text{número de células con bFGF solo} - \text{número de células en el día 0}}$$

La inhibición en porcentaje de proliferación de células BCE fue comparable o superior a la de angiostatina derivada de plasminógeno a concentraciones similares. Los resultados de una ejecución repetida del ensayo de BCE se representan en la figura 13, en la que a una dilución de 1:5 de la disolución madre, la angiostatina recombinante dio inhibiciones en porcentaje similares a las obtenidas con angiostatina derivada de plasminógeno. La figura 13 muestra el sorprendente resultado de que la proteína angiostatina recombinante humana inhibe más del 60%, y hasta más del 75% de la proliferación de BCE en cultivo.

#### Ejemplo 20

La angiostatina mantiene la latencia de micrometástasis aumentando la tasa de apoptosis.

Tras la inoculación subcutánea en ratones C57 BL6/J de células de carcinoma de pulmón de Lewis ( $1 \times 10^6$ ), se desarrollaron tumores primarios de aproximadamente  $1,5 \text{ cm}^3$ . Se sometieron los animales o bien a extirpación quirúrgica del tumor primario o bien a cirugía simulada. A 5, 10 y 15 días tras la cirugía, se sacrificaron los ratones y se prepararon sus pulmones para el examen histológico. Los animales con tumores primarios resecados mostraron una proliferación masiva de micrometástasis en comparación con los controles sometidos a operación simulada (figura 14). Estos cambios estuvieron acompañados por un aumento significativo del peso del pulmón.

El análisis de la proliferación de células tumorales, según se mide mediante la captación de bromo-desoxiuridina (BrdU), no mostró diferencias entre animales con tumores primarios intactos o tumores resecados a los 5, 9 y 13 días, lo que indica que el aumento de la masa tumoral no podía explicarse por el aumento de la proliferación (figura 15). Por consiguiente, se examinó la muerte celular en estos animales. Se examinó la apoptosis, un proceso de muerte celular que depende de cambios en la expresión génica y representa la eliminación de células durante el desarrollo y en tejidos rápidamente proliferantes tales como el intestino delgado, marcando inmunohistoquímicamente ADN fragmentado con la técnica de desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Se determinó el índice apoptótico en cada momento de sacrificio. La extirpación de tumores primarios provocó un aumento estadísticamente significativo (de aproximadamente 3 a 4 veces) en el índice apoptótico en todos los momentos examinados (figura 15).

Se obtuvo evidencia de soporte tratando a los ratones con tumores primarios extirpados con un supresor exógeno de angiogénesis. Esta sustancia, TNP-1470 (O-cloroacetilcarbamoil-fumagilol, anteriormente denominado AGM-1470), es un análogo de fumagilina con actividad anti-angiogénica notificada. La inyección subcutánea de TNP-1470 (30 mg/kg cada dos días) produjo resultados que eran sorprendentemente similares a los descritos anteriormente para animales que tenían tumores primarios intactos. Esos animales presentaron un peso de pulmón inferior, un índice proliferativo equivalente y un aumento del índice apoptótico en comparación con controles a los que se les inyectó solución salina (figura 16).

Estos datos indican que las metástasis permanecen latentes cuando la proliferación de células tumorales se equilibra con una tasa equivalente de muerte celular. La extirpación del tumor primario provoca un rápido aumento en el crecimiento de metástasis, probablemente debido a la extirpación de inhibidores de angiogénesis (angiostatina) que controlan el crecimiento metastásico aumentando la apoptosis en células tumorales. Estos efectos son similares a los observados tras la extirpación de tumores primarios y administración de un inhibidor de angiogénesis exógeno. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que el tumor primario libera angiostatina que mantiene la latencia de la micrometástasis.

**Ejemplo 21**

Tratamiento de tumores primarios con angiostatina in vivo.

Se purificó angiostatina a partir de plasminógeno humano mediante digestión con elastasa limitada tal como se describió anteriormente en el ejemplo 15. Se resuspendió la angiostatina en solución salina tamponada con fosfato para su administración en ratones C57Bl6/J macho de seis semanas de edad. A los animales se les implantaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células tumorales o bien de carcinoma de pulmón de Lewis o bien de fibrosarcoma T241. El tratamiento con angiostatina se comienza tras cuatro días cuando los tumores tienen 80-160 mm<sup>3</sup> de tamaño. Los ratones recibieron inyecciones de angiostatina o bien en una única inyección de 40 mg/kg o bien en dos inyecciones de 80 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) o vía subcutánea (s.c.). Se sacrificaron los animales en diversos momentos tras el tratamiento que se extendieron hasta 19 días.

La angiostatina, administrada a una dosis diaria de 40 mg/kg i.p., produjo una inhibición altamente significativa del crecimiento de tumores primarios de T241 (figura 17). Este efecto inhibitorio sobre el crecimiento fue visiblemente evidente en el plazo de 2 días y aumentó de magnitud a lo largo del transcurso temporal del estudio. En el día 18, los ratones tratados con angiostatina tenían tumores que tenían aproximadamente el 38% del volumen de los controles a los que se les inyectó solución salina. Esta diferencia era estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ , prueba de la t de Student).

El tratamiento con angiostatina (dosis total de 80 mg/kg/día, administrada dos veces al día a 40 mg/kg i.p. o s.c.) también redujo significativamente la tasa de crecimiento de tumores primarios de LLC-LM (figura 17). Este efecto inhibitorio fue evidente a los 4 días y aumentó de magnitud en todos los momentos posteriores examinados. En el último día del experimento (día 19), los ratones tratados con angiostatina presentaban un volumen tumoral medio que tan sólo tenía el 20% de los controles a los que se les inyectó solución salina lo que era significativamente diferente ( $p < 0,001$ , prueba de la t de Student).

En otra serie de experimentos se administró angiostatina (50 mg/kg cada 12 h) a ratones a los que se les implantaron células de fibrosarcoma T241, carcinoma de pulmón de Lewis (LM) o sarcoma de células reticulares. Para cada tipo de célula tumoral, los ratones que recibieron angiostatina tenían un tamaño de tumor sustancialmente reducido. La figura 19 demuestra que para el fibrosarcoma T241, los ratones tratados con angiostatina tenían volúmenes tumorales medios que tan sólo eran el 15% de los ratones sin tratar en el día 24. La figura 20 demuestra que para carcinoma de pulmón de Lewis (LM), los ratones tratados con angiostatina tenían volúmenes tumorales medios que tan sólo eran el 13% de los ratones sin tratar en el día 24. La figura 21 demuestra que para el sarcoma reticular, los ratones tratados con angiostatina tenían volúmenes tumorales medios que tan sólo eran el 19% de los ratones sin tratar en el día 24. Los datos representan el promedio de 4 ratones en cada punto de tiempo.

Estos resultados demuestran que la angiostatina es un inhibidor extremadamente potente del crecimiento de tres tumores primarios diferentes *in vivo*.

**Ejemplo 22**

Tratamiento de tumores primarios derivados de células humanas en ratones con angiostatina in vivo.

Se estudió el efecto de angiostatina sobre dos líneas de células tumorales humanas, PC-3 de carcinoma de próstata humano y MDA-MB de carcinoma de mama humano. A ratones SCID inmunodeficientes se les implantaron células tumorales humanas, y se trataron los ratones con 50 mg/kg de angiostatina cada 12 horas esencialmente tal como se describió en el ejemplo 21. Los resultados demuestran que la proteína angiostatina de la presente invención es un potente inhibidor del crecimiento de células tumorales humanas. La figura 22 muestra que para PC-3 de carcinoma de próstata humano, los ratones tratados con angiostatina tenían tan sólo el 2% del volumen tumoral medio en comparación con los ratones de control sin tratar en el día 24. La figura 23 muestra que para MDA-MB de carcinoma de mama humano, los ratones tratados con angiostatina tenían tan sólo el 8% del volumen tumoral medio en comparación con los ratones de control sin tratar en el día 24.

**Ejemplo 23**

Terapia génica – efecto de transfección del gen de angiostatina sobre el volumen tumoral.

Se generó usando PCR una secuencia de ADN de 1380 pares de bases para la angiostatina derivada de ADNc de plasminógeno de ratón (obtenido de la colección americana de cultivos tipo (ATCC)), que codificaba para los aminoácidos 1 – 460 de plasminógeno de ratón, y se insertó en un vector de expresión. Se transfectó el vector de expresión en células de fibrosarcoma T241 y se implantaron las células transfectadas en ratones. Los ratones de control recibieron o bien células T241 no transfectadas, o bien células T241 transfectadas sólo con el vector (es decir células transfectadas que no expresan angiostatina). En el experimento se usaron tres clones de células

transfectadas que expresaban angiostatina. Se determinó el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo. Los resultados muestran la sorprendente y drástica reducción en el volumen tumoral medio en ratones para los clones de células que expresan angiostatina en comparación con las células de control no transfectadas y sin expresión.

5 La secuencia de ADN de ratón que codifica para la proteína angiostatina de ratón se deriva de ADNc de plasminógeno de ratón. La angiostatina de ratón abarca las regiones kringle de plasminógeno 1-4 de ratón. El esquema para la construcción de este clon se muestra en la figura 24.

10 Se transfectaron clones de proteína angiostatina de ratón en células de fibrosarcoma T241 usando el sistema de transfección LIPOFECTIN™ (disponible de Life Technologies, Gaithersburg, MD). El reactivo LIPOFECTIN™ es una formulación de liposoma 1:1 (p/p) del lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamonio (DOTMA), y dioleoil-fosfotidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada en membrana.

El procedimiento para la transfección transitoria de células es tal como sigue:

15 1. Se hacen crecer células T241 en placas de cultivo tisular de 60 cm<sup>2</sup>, sembradas a  $\approx 1-2 \times 10^5$  células en 2 ml del medio de crecimiento apropiado complementado con suero.

20 2. Se incuban las células a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> hasta que las células son confluentes al 40-70%. Se tardará habitualmente 18-24 h, pero el tiempo variará entre los tipos de células. La confluencia de las células tumorales T241 fue de aproximadamente el 70%.

3. Se preparan las siguientes disoluciones en tubos estériles de 12 x 75 mm:

25 disolución A: para cada transfección, se diluyen 5 µg de ADN en 100 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM I libre de suero (disponible de Life Technologies) (también puede usarse agua desionizada de calidad para cultivo tisular).

disolución B: para cada transfección, se diluyen 30 µg de LIPOFECTIN en 100 µl medio OPTI-MEM.

30 4. Se combinan las dos disoluciones, se mezclan suavemente, y se incuban a temperatura ambiente durante 10-15 min.

5. Se lavan las células dos veces con medio libre de suero.

35 6. Para cada transfección, se añaden 0,8 ml de medio libre de suero a cada tubo que contiene los complejos reactivo LIPOFECTIN™-ADN. Se mezcla suavemente y se recubre el complejo sobre células.

7. Se incuban las células durante aproximadamente 12 h a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

40 8. Se sustituye el medio que contiene ADN por 1 mg/ml de medio de selección que contiene suero y se incuban las células a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante un total de 48-72 h.

45 9. Se someten a ensayo los extractos celulares para determinar la actividad génica a 48-72 h tras la transfección.

50 Las células transfectadas pueden someterse a ensayo para determinar la expresión de proteína angiostatina usando anticuerpos específicos de angiostatina. Alternativamente, tras aproximadamente 10-14 días, aparecieron colonias resistentes a G418 en las células T241 transfectadas con CMV-angiostatina. Además, se observaron varios clones en los clones transfectados con vector solo pero no en los clones sin transfectar. Se seleccionaron los clones resistentes a G418 para determinar su expresión de angiostatina, usando un método de inmunofluorescencia.

55 De manera interesante, el crecimiento celular *in vitro* de células T241 y células de pulmón de Lewis transfectadas con angiostatina no se inhibió ni se vio afectado adversamente de otro modo, tal como se muestra en las figuras 25 y 26.

60 La figura 27 representa los resultados del experimento de transfección. Los tres clones transfectados de T241 que expresaban angiostatina produjeron volúmenes tumorales medios en ratones que estaban sustancialmente reducidos con respecto al volumen tumoral en ratones de control. El volumen tumoral medio de los ratones en los que se implantó el clon 37 tan sólo era el 13% del control, mientras que los volúmenes tumorales del clon 31 y el clon 25 tan sólo eran el 21% y el 34% de los volúmenes tumorales del control, respectivamente. Estos resultados demuestran que las secuencias de ADN que codifican para angiostatina pueden transfectarse en células, que las secuencias de ADN transfectadas pueden expresar la proteína angiostatina por las células que reciben el implante, y que la angiostatina expresada funciona *in vivo* para reducir el crecimiento tumoral.

65

**Ejemplo 24**

Localización del sitio *in vivo* de expresión de la angiostatina

- 5 Para localizar el sitio *in vivo* de expresión de la proteína angiostatina, se analizó el ARN total de diversos tipos de células, células de carcinoma de pulmón de Lewis (ratón), fibrosarcoma T241 (ratón), y células de linfoma de Burkitt (ser humano), tanto de tumor reciente como de cultivo celular tras varios pasos, para determinar la presencia de transcritos de angiostatina. En análisis de transferencia de tipo Northern de las muestras mostró una ausencia de cualquier señal de hibridación con la secuencia de todas las muestras excepto la de ARN de hígado de ratón normal que mostró una única señal de aproximadamente 2,4 kb correspondiente a plasminógeno de ratón. El análisis de transferencia de tipo Northern de muestras humanas mostró una ausencia de cualquier señal de hibridación con la secuencia de angiostatina humana de todas las muestras excepto la de ARN de hígado humano normal que mostró una única señal de aproximadamente 2,4 kb correspondiente a plasminógeno humano.
- 10
- 15 Un análisis de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) mostró una ausencia de cualquier producto de todas las muestras analizadas con sondas con secuencias de angiostatina de ratón excepto la de hígado de ratón normal. Un análisis de RT-PCR mostró una ausencia de cualquier producto de todas las muestras humanas analizadas con sondas con secuencias de angiostatina humana excepto la de hígado humano normal (tamaño esperado de 1050 pb para ratón y 1134 pb para ser humano).
- 20
- 25 Por tanto, parece que no se producen transcritos de angiostatina de ratón (suponiendo una identidad con los aminoácidos de 97 a 450 de plasminógeno de ratón) por ninguna de las muestras de ratón anteriores y no se producen transcritos de angiostatina humana (suponiendo una identidad con los aminoácidos de 93 a 470 de plasminógeno humano) por las muestras humanas anteriores. Las señales positivas obtenidas en hígado de ratón/humano normales proceden de la hibridación con plasminógeno.

**Ejemplo 25**

Expresión de angiostatina en levadura

- 30 Se clonó el fragmento de gen que codifica para los aminoácidos de 93 a 470 de plasminógeno humano en el sitio XhoI/EcoRI de pHIL-SI (Invitrogen) lo que permite la expresión secretada de proteínas usando la señal de secreción PHO1 en la levadura *Pichia pastoris*. De manera similar, se clonó el fragmento de gen que codifica para los aminoácidos de 93 a 470 de plasminógeno humano en el sitio SnaBI/EcoRI de pPIC9 (Invitrogen) lo que permite la expresión secretada de proteínas usando la señal de secreción de factor  $\alpha$  en la levadura *Pichia pastoris*. Las proteínas angiostatina humana expresadas en estos sistemas tendrán muchas ventajas con respecto a las expresadas en *E. coli* tales como procesamiento de proteína, plegamiento de proteína y modificación postraduccional incluyendo la glicosilación.
- 35
- 40 La expresión de genes en *P. pastoris* se describe en Sreekrishna, K. *et al.* (1988) High level expression of heterologous proteins in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. J. Basic Microbiol. 29 (4): 265-278, y Clare, J.J. *et al.* (1991) Production of epidermal growth factor in yeast: High-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies, Gene 105:205-212.

**Ejemplo 26**

Expresión de proteínas angiostatina en plantas y animales transgénicos

- 50 Se crean animales transgénicos tales como de la familia bovina o porcina que expresan el transcrito génico de angiostatina. El animal transgénico expresa la proteína angiostatina por ejemplo en la leche de estos animales. Adicionalmente, se construyen plantas transgénicas comestibles que expresan el transcrito génico de angiostatina. La construcción de animales transgénicos que expresan ADN foráneo se describe en Smith H. Phytochrome transgenics: functional, ecological and biotechnical applications, Semin. Cell. Biol. 1994 5(5):315-325.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: The Children's Medical Center Corporation  
(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Angiostatina y método de uso  
10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 812  
(B) TIPO: péptido  
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

ES 2 370 155 T3

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

ES 2 370 155 T3

	215		220		225
Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu					
	230		235		240
Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu					
	245		250		255
Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser					
	260		265		270
Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly					
	275		280		285
Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser					
	290		295		300
Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro					
	305		310		315
Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu					
	320		325		330
Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu					
	335		340		345
Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln					
	350		355		360
Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu Glu Gln Thr Pro Val Val Gln					
	365		370		375
Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser					
	380		385		390
Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe					
	395		400		405
Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly					
	410		415		420
Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro					
	425		430		435
Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn					
	440		445		450
Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu Pro					
	455		460		465
Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp					
	470		475		480
Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val					
	485		490		495
Thr Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro					

ES 2 370 155 T3

	500		505		510
His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp					
	515		520		525
Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly					
	530		535		540
Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys					
	545		550		555
Asp Ile Pro Leu Cys Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys					
	560		565		570
Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly					
	575		580		585
Cys Val Ala Asn Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg					
	590		595		600
Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala					
	605		610		615
Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Ser					
	620		625		630
Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Glu Glu Tyr					
	635		640		645
Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val Ala Lys Leu Ile					
	650		655		660
Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Arg					
	665		670		675
Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser					
	680		685		690
Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr Gly					
	695		700		705
Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu					
	710		715		720
Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu					
	725		730		735
Tyr Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln					
	740		745		750
Leu Ala Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro					
	755		760		765
Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr					
	770		775		780
Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr					



ES 2 370 155 T3

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

ES 2 370 155 T3

	200		205		210
Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn					
	215		220		225
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr					
	230		235		240
Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys					
	245		250		255
Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro					
	260		265		270
Glu Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly					
	275		280		285
Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys					
	290		295		300
Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr					
	305		310		315
Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg					
	320		325		330
Asn Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp					
	335				

(4) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 339

(B) TIPO: péptido

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

ES 2 370 155 T3

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

ES 2 370 155 T3

	95		100		105									
Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His
	110		115		120									
Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Asn
	125		130		135									
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
	140		145		150									
Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys
	155		160		165									
Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys
	170		175		180									
Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Asn	Val	Ala	Val	Thr	Val	Ser
	185		190		195									
Gly	His	Thr	Cys	Gln	His	Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	His	Thr	His
	200		205		210									
Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Asn
	215		220		225									
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Cys	His	Thr
	230		235		240									
Thr	Asn	Ser	Gln	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys
	245		250		255									
Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro
	260		265		270									
Pro	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Asp	Cys	Tyr	His	Gly	Asp	Gly
	275		280		285									
Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Lys
	290		295		300									
Cys	Gln	Ser	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Gln	Lys	Thr
	305		310		315									
Pro	Glu	Asn	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg
	320		325		330									
Asn	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Gly	Pro	Trp						
	335													

(5) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 339

(B) TIPO: péptido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

ES 2 370 155 T3

Val	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg
1				5					10					15
Gly	Thr	Met	Ser	Lys	Thr	Arg	Thr	Gly	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp
				20					25					30
Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	His
				35					40					45
Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn
				50					55					60
Asp	Gly	Gln	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Glu	Arg
				65					70					75
Phe	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	Asp	Glu	Cys	Met	His
				80					85					90
Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser
				95					100					105
Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His
				110					115					120
Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Asn
				125					130					135
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
				140					145					150
Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys
				155					160					165
Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys
				170					175					180
Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Asp	Val	Ala	Val	Thr	Val	Ser
				185					190					195
Gly	His	Thr	Cys	His	Gly	Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	His	Thr	His
				200					205					210
Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Asn
				215					220					225
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Lys	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr
				230					235					240
Thr	Asn	Ser	Gln	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys
				245					250					255
Glu	Ser	Ser	Pro	Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Leu	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro
				260					265					270
Pro	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Glu	Cys	Tyr	His	Gly	Asp	Gly



ES 2 370 155 T3

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

ES 2 370 155 T3

	170		175		180
Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Ala Ser					
	185		190		195
Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro His Lys His					
	200		205		210
Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn					
	215		220		225
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr					
	230		235		240
Thr Asp Ser Glu Val Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys					
	245		250		255
Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Glu His Leu Asp Ala Pro Val Pro					
	260		265		270
Pro Glu Gln Thr Pro Val Ala Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly					
	275		280		285
Glu Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys					
	290		295		300
Cys Gln Ser Trp Val Ser Met Thr Pro His Arg His Glu Lys Thr					
	305		310		315
Pro Gly Asn Phe Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg					
	320		325		330
Asn Pro Asp Ala Asp Lys Ser Pro Trp					
	335				

(7) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 339

(B) TIPO: péptido

10

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

ES 2 370 155 T3

Ile	Tyr	Leu	Leu	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Gln	Thr	Tyr	Arg
1				5					10					15
Gly	Thr	Thr	Ala	Glu	Thr	Lys	Ser	Gly	Val	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp
				20					25					30
Ser	Ala	Thr	Ser	Pro	His	Val	Pro	Lys	Phe	Ser	Pro	Glu	Lys	Phe
				35					40					45
Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn
				50					55					60
Asp	Glu	Asn	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Asp	Lys	Arg

ES 2 370 155 T3

	65		70		75									
Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	Asp	Lys	Cys	Met	His
	80		85		90									
Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Ala	Lys	Thr	Met	Ser
	95		100		105									
Gly	Arg	Asp	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His
	110		115		120									
Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Met	Asn
	125		130		135									
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
	140		145		150									
Thr	Asp	Pro	Gln	Lys	Arg	Trp	Glu	Phe	Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys
	155		160		165									
Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Lys	Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys
	170		175		180									
Gly	Thr	Gly	Lys	Asn	Tyr	Gly	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Glu	Ser
	185		190		195									
Gly	His	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Ser	Glu	Gln	Thr	Pro	His	Lys	His
	200		205		210									
Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Glu	Glu	Asn
	215		220		225									
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Lys	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr
	230		235		240									
Thr	Asn	Ser	Glu	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Thr	Ile	Pro	Ser	Cys
	245		250		255									
Glu	Ser	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Glu	Arg	Met	Asp	Val	Pro	Val	Pro
	260		265		270									
Pro	Glu	Gln	Thr	Pro	Val	Pro	Gln	Asp	Cys	Tyr	His	Gly	Asn	Gly
	275		280		285									
Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Gly	Arg	Lys
	290		295		300									
Cys	Gln	Ser	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Leu	Lys	Thr
	305		310		315									
Pro	Glu	Asn	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg
	320		325		330									
Asn	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser	Pro	Trp						
	335													

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína denominada angiostatina, teniendo la proteína un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons tal como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y teniendo una secuencia de aminoácidos que comienza en aproximadamente el número de aminoácido 98 del plasminógeno, o teniendo una secuencia de aminoácidos de regiones kringle de plasminógeno 1 hasta 3 y parte de kringle 4, caracterizado porque la proteína tiene actividad anti-angiogénica, en la que el vector es un vector viral o un vector no viral y puede expresar angiostatina cuando está presente en una célula.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizado porque la angiostatina codificada que tiene actividad anti-angiogénica tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el vector es un plásmido.
- 20 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la proteína es un fragmento de plasminógeno humano, plasminógeno murino, plasminógeno bovino, plasminógeno de mono Rhesus o plasminógeno porcino.
- 25 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la proteína tiene los primeros 339 aminoácidos de su secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.
- 30 6. Composición que comprende un vector viral o un vector no viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un fragmento de plasminógeno que tiene actividad anti-angiogénica que contiene al menos las regiones kringle de plasminógeno 1 hasta 3, caracterizado porque el fragmento de plasminógeno es un fragmento de plasminógeno humano obtenible mediante digestión de plasminógeno con elastasa.
- 35 7. Composición según cualquiera de la reivindicación 1 ó 2 o las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque el vector es un vector viral seleccionado de un grupo que consiste en un vector de retrovirus, un vector de poliovirus, un vector de virus Sindbis, un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector de virus del herpes, un vector de SV 40 y un vector de virus vaccinia.
- 40 8. Composición según la reivindicación 7, caracterizado porque el vector es un vector de retrovirus o un vector de adenovirus.
- 45 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la composición es para uso terapéutico.
- 50 10. Composición según la reivindicación 6, caracterizado porque la composición es para uso terapéutico.
- 55 11. Composición según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la composición se usa en un método para inhibir la angiogénesis en un ser humano o un animal.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la composición se usa en un método para tratar un proceso o una enfermedad que está mediada por la angiogénesis.
14. Composición según la reivindicación 13, caracterizado porque el proceso o la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hemangioma, tumores sólidos, tumores de transmisión sanguínea, leucemia, metástasis, telangiectasia, psoriasis, esclerodermia, granuloma piógeno, angiogénesis miocárdica, enfermedad de Crohn, neovascularización de placas, síntomas colaterales coronarios, síntomas colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis de extremidades isquémicas, enfermedades corneales, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, artritis, neovascularización diabética, degeneración macular, cicatrización de heridas, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con *Helicobacter*, fracturas, queloides, vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, menstruación, placentación y fiebre por arañazo de gato.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la composición se usa en un método para tratar o para reprimir el crecimiento de tumores en un ser humano o un animal.

FIGURA 1

Secuencia de plasminógeno de ratón:

```

met asp his lys glu val ile leu leu phe leu leu leu leu lys
pro gly gln gly asp ser leu asp gly tyr ile ser thr gln gly
ala ser leu phe ser leu thr lys lys gln leu ala ala gly gly
val ser asp cys leu ala lys cys glu gly glu thr asp phe val
cys arg ser phe gln tyr his ser lys glu gln gln cys val ile
met ala glu asn ser lys thr ser ser ile ile arg met arg asp
val ile leu phe glu lys arg val tyr leu ser glu cys lys thr
gly ile gly asn gly tyr arg gly thr met ser arg thr lys ser
gly val ala cys gln lys trp gly ala thr phe pro his val pro
asn tyr ser pro ser thr his pro asn glu gly leu glu glu asn
tyr cys arg asn pro asp asn asp glu gln gly pro trp cys tyr
thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asn ile pro glu
cys glu glu glu cys met tyr cys ser gly glu lys tyr glu gly
lys ile ser lys thr met ser gly leu asp cys gln ala trp asp
ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro
ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu
pro arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu
tyr cys asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro pro ser
pro thr tyr gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly
thr val ser val thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser
glu gln thr pro his arg his asn arg thr pro glu asn phe pro
cys lys asn leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp gly glu
thr ala pro trp cys tyr thr thr asp ser gln leu arg trp glu
tyr cys glu ile pro ser cys glu ser ser ala ser pro asp gln
ser asp ser ser val pro pro glu glu gln thr pro val val gln
glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr arg gly thr ser ser
thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp ala ala met phe
pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro asp ala gly
leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys gly pro
trp cys tyr thr thr asp pro ser val arg trp glu tyr cys asn
leu lys arg cys ser glu thr gly gly ser val val glu leu pro
thr val ser gln glu pro ser gly pro ser asp ser glu thr asp
cys met tyr gly asn gly lys asp tyr arg gly lys thr ala val
thr ala ala gly thr pro cys gln gly trp ala ala gln glu pro
his arg his ser ile phe thr pro gln thr asn pro arg ala asp
leu glu lys asn tyr cys arg asn pro asp gly asp val asn gly
pro trp cys tyr thr thr asn pro arg lys leu tyr asp tyr cys
asp ile pro leu cys ala ser ala ser phe glu cys gly lys
pro gln val glu pro lys lys cys pro gly arg val val gly gly
cys val ala asn pro his ser trp pro trp gln ile ser leu arg
thr arg phe thr gly gln his phe cys gly gly thr leu ile ala
pro glu trp val leu thr ala ala his cys leu glu lys ser ser
arg pro glu phe tyr lys val ile leu gly ala his glu glu tyr
ile arg gly leu asp val gln glu ile ser val ala lys leu ile
leu glu pro asn asn arg asp ile ala leu leu lys leu ser arg
pro ala thr ile thr asp lys val ile pro ala cys leu pro ser

```

pro asn tyr met val ala asp arg thr ile cys tyr ile thr gly  
trp gly glu thr gln gly thr phe gly ala gly arg leu lys glu  
ala gln leu pro val ile glu asn lys val cys asn arg val glu  
tyr leu asn asn arg val lys ser thr glu leu cys ala gly gln  
leu ala gly gly val asp ser cys gln gly asp ser gly gly pro  
leu val cys phe glu lys asp lys tyr ile leu gln gly val thr  
ser trp gly leu gly cys ala arg pro asn lys pro gly val tyr  
val arg val ser arg phe val asp trp ile glu arg glu met arg  
asn asn

FIGURA 2

RATÓN

SER HUMANO

MONO RHESUS

PORCINO

BOVINO

```

val tyr leu ser glu cys lys thr gly ile gly asn gly tyr arg gly
val tyr leu ser glu cys lys thr gly asn gly lys asn tyr arg gly
val tyr leu ser glu cys lys thr gly asn gly lys asn tyr arg gly
ile tyr leu ser glu cys lys thr gly asn gly lys asn tyr arg gly
ile tyr leu leu glu cys lys thr gly asn gly gln thr tyr arg gly

thr met ser arg thr lys ser gly val ala cys gln lys trp gly ala
thr met ser lys thr lys asn gly ile thr cys gln lys trp ser ser
thr met ser lys thr arg thr gly ile thr cys gln lys trp ser ser
thr thr ser lys thr lys ser gly val ile cys gln lys trp ser val
thr thr ala glu thr lys ser gly val thr cys gln lys trp ser ala

thr phe pro his val pro asn tyr ser pro ser thr his pro asn glu
thr ser pro his arg pro arg phe ser pro ala thr his pro ser glu
thr ser pro his arg pro thr phe ser pro ala thr his pro ser glu
ser ser pro his ile pro lys tyr ser pro glu lys phe pro leu ala
thr ser pro his val pro lys phe ser pro glu lys phe pro leu ala

gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp glu gln gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp pro gln gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp gly gln gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp glu lys gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp glu asn gly

pro trp cys tyr thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asn
pro trp cys tyr thr thr asp pro glu lys arg tyr asp tyr cys asp
pro trp cys tyr thr thr asp pro glu glu arg phe asp tyr cys asp
pro trp cys tyr thr thr asp pro glu thr arg phe asp tyr cys asp
pro trp cys tyr thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asp

ile pro glu cys glu glu glu cys met tyr cys ser gly glu lys tyr
ile leu glu cys glu glu glu cys met his cys ser gly glu asn tyr
ile pro glu cys glu asp glu cys met his cys ser gly glu asn tyr
ile pro glu cys glu asp glu cys met his cys ser gly glu his tyr
ile pro glu cys glu asp lys cys met his cys ser gly glu asn tyr

glu gly lys ile ser lys thr met ser gly leu asp cys gln ala trp
asp gly lys ile ser lys thr met ser gly leu glu cys gln ala trp
asp gly lys ile ser lys thr met ser gly leu glu cys gln ala trp
glu gly lys ile ser lys thr met ser gly ile glu cys gln ser trp
glu gly lys ile ala lys thr met ser gly arg asp cys gln ala trp
    
```

asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro  
 asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro  
 asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro  
 gly ser gln ser pro his ala his gly tyr leu pro ser lys phe pro  
 asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro

ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu pro  
 asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp arg glu leu  
 asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro  
 asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro  
 asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro

arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu tyr cys  
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys  
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys  
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu phe cys  
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro gln lys arg trp glu phe cys

asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro pro ser pro thr tyr  
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr  
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr  
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro thr ser gly pro thr tyr  
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro lys tyr

gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val  
 gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asn val ala val  
 gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asp val ala val  
 gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val  
 gln cys leu lys gly thr gly lys asn tyr gly gly thr val ala val

thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his  
 thr val ser gly his thr cys gln his trp ser ala gln thr pro his  
 thr val ser gly his thr cys his gly trp ser ala gln thr pro his  
 thr ala ser gly his thr cys gln arg trp ser ala gln ser pro his  
 thr glu ser gly his thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his

arg his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu  
 thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu  
 thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu  
 lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu  
 lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu

asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr  
 asn tyr cys arg asn pro asp gly lys arg ala pro trp cys his thr  
 asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr  
 asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr  
 asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr

thr asp ser gln leu arg trp glu tyr cys glu ile pro ser cys glu  
 thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys asp  
 thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys glu  
 thr asp ser glu val arg trp asp tyr cys lys ile pro ser cys gly  
 thr asn ser glu val arg trp glu tyr cys thr ile pro ser cys glu  
  
 ser ser ala ser pro asp gln ser asp ser ser val pro pro glu glu  
 ser ser pro val ser thr glu gln leu ala pro thr ala pro pro glu  
 ser ser pro val ser thr glu pro leu asp pro thr ala pro pro glu  
 ser ser thr thr ser thr glu his leu asp ala pro val pro pro glu  
 ser ser pro leu ser thr glu arg met asp val pro val pro pro glu  
  
 gln thr pro val val gln glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr  
 leu thr pro val val gln asp cys tyr his gly asp gly gln ser tyr  
 leu thr pro val val gln glu cys tyr his gly asp gly gln ser tyr  
 gln thr pro val ala gln asp cys tyr arg gly asn gly glu ser tyr  
 gln thr pro val pro gln asp cys tyr his gly asn gly gln ser tyr  
  
 arg gly thr ser ser thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp  
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp  
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp  
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp  
  
 ala ala met phe pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro  
 ser ser met thr pro his arg his gln lys thr pro glu asn tyr pro  
 ser ser met thr pro his trp his glu lys thr pro glu asn phe pro  
 val ser met thr pro his arg his glu lys thr pro gly asn phe pro  
 ser ser met thr pro his arg his leu lys thr pro glu asn tyr pro  
  
 asp ala gly leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys  
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys  
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys  
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys  
  
 gly pro trp  
 gly pro trp  
 gly pro trp  
 ser pro trp  
 ser pro trp

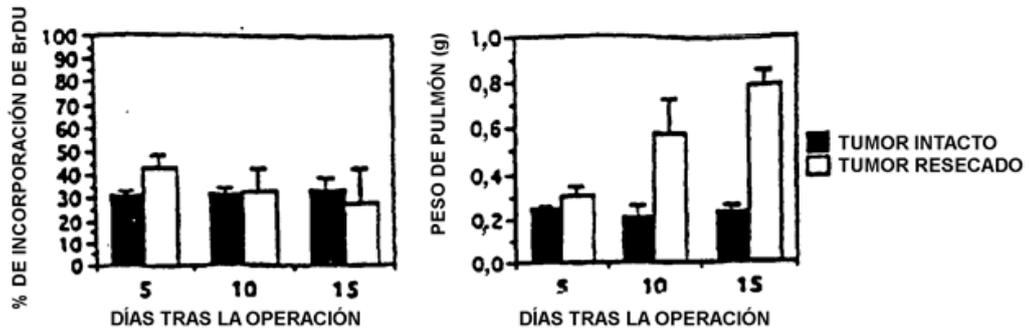


FIGURA 3A

FIGURA 3B

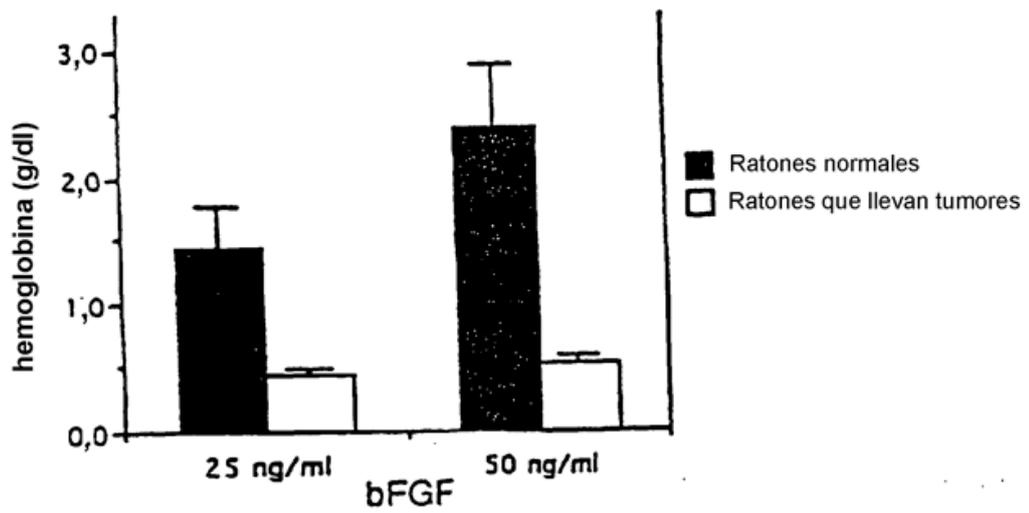


FIGURA 4

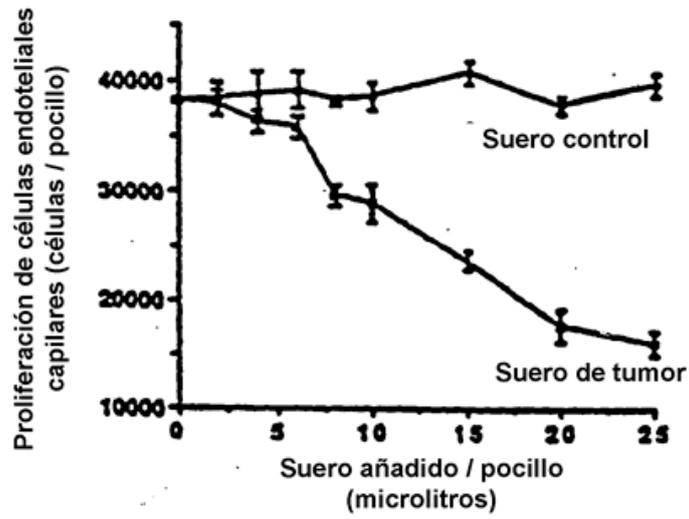


FIGURA 5

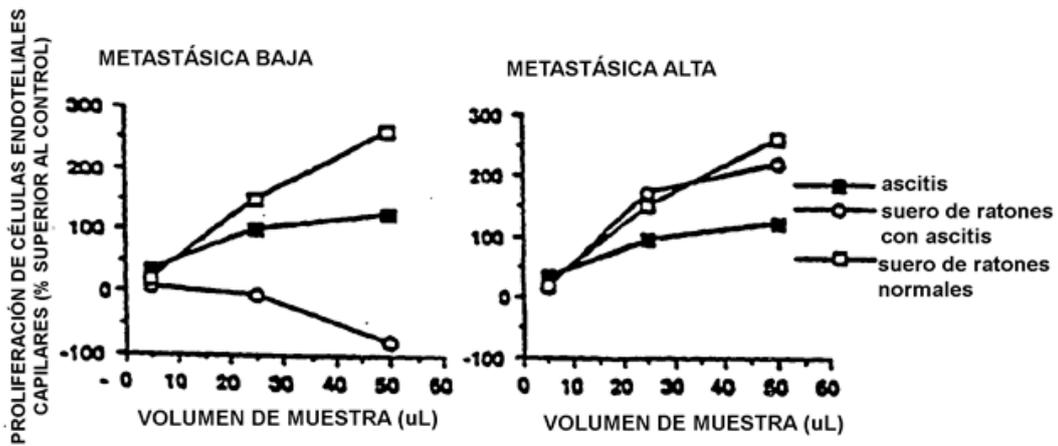


FIGURA 6A

FIGURA 6B

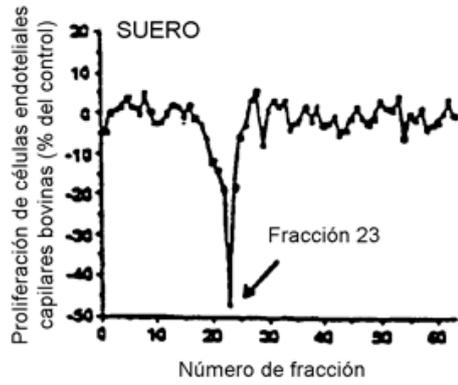


FIGURA 7A

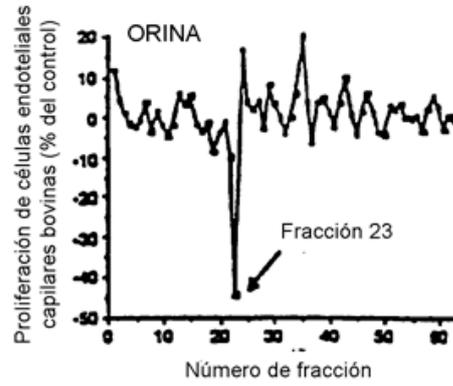


FIGURA 7B

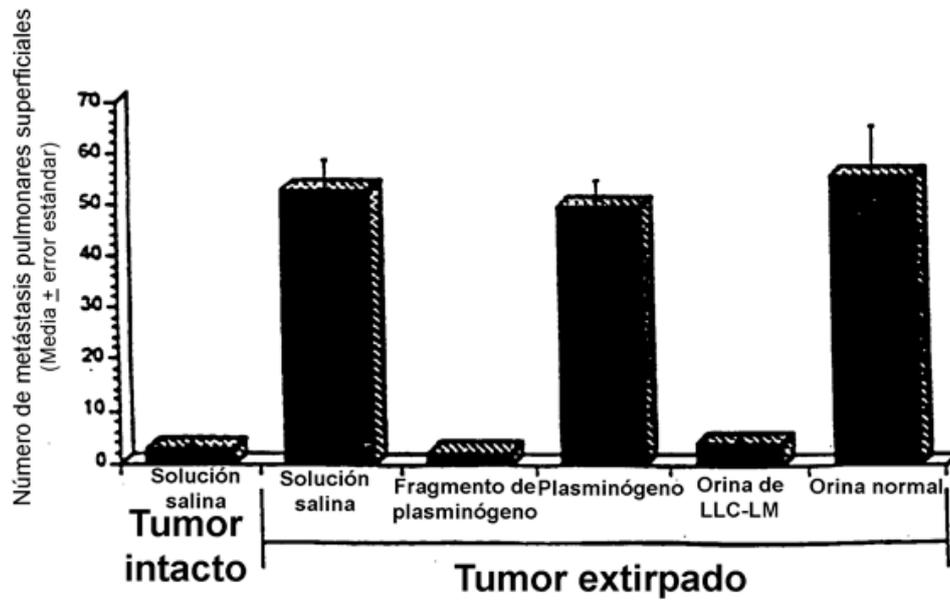


FIGURA 8

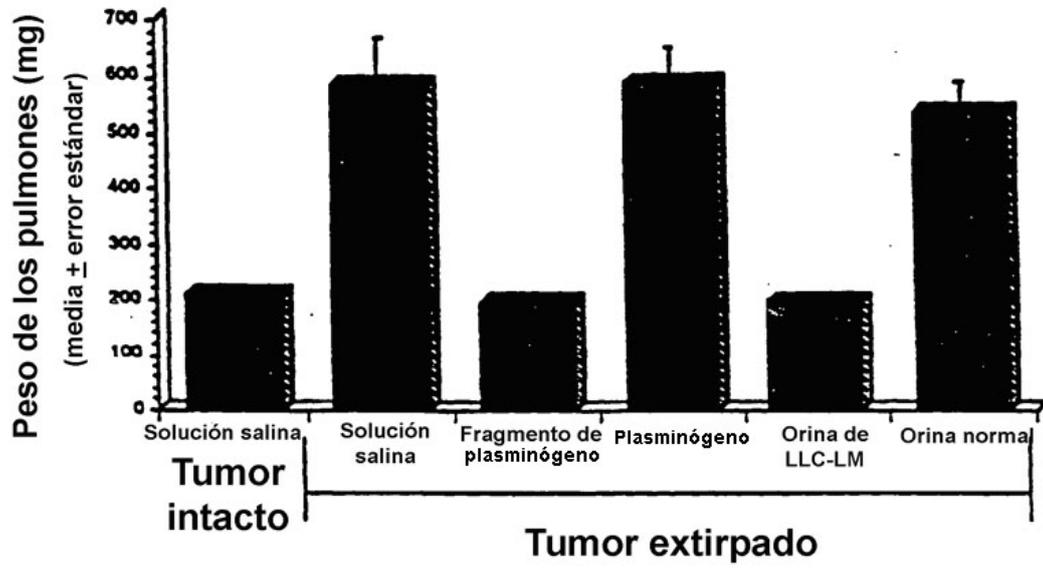


FIGURA 9

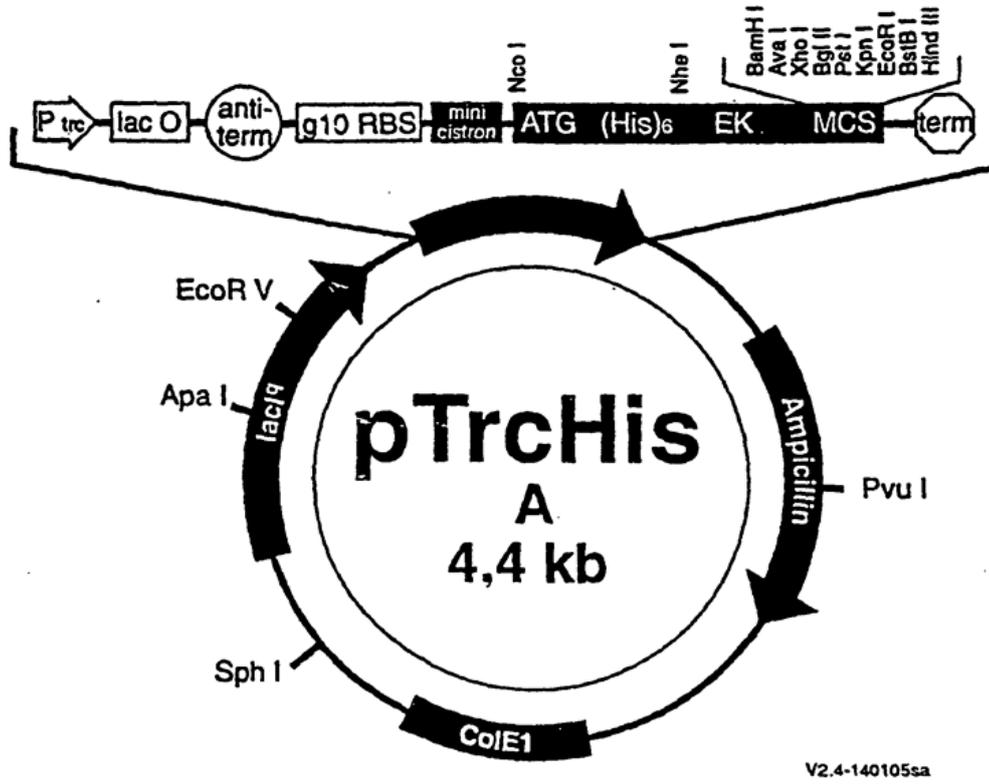
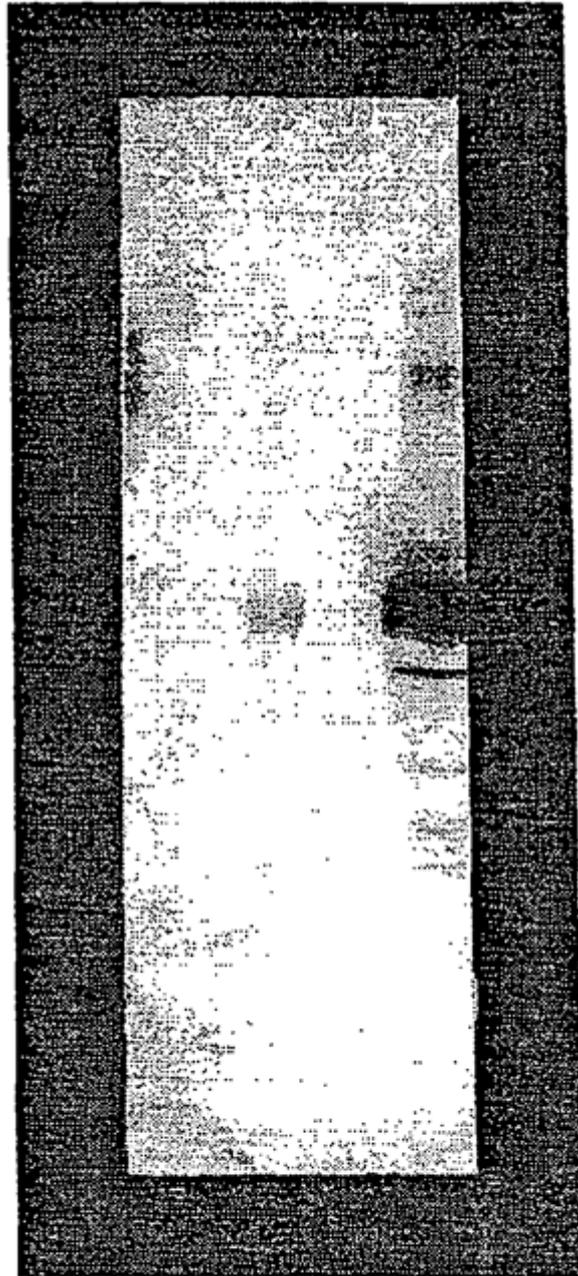


FIGURA 10



**FIGURA 11**

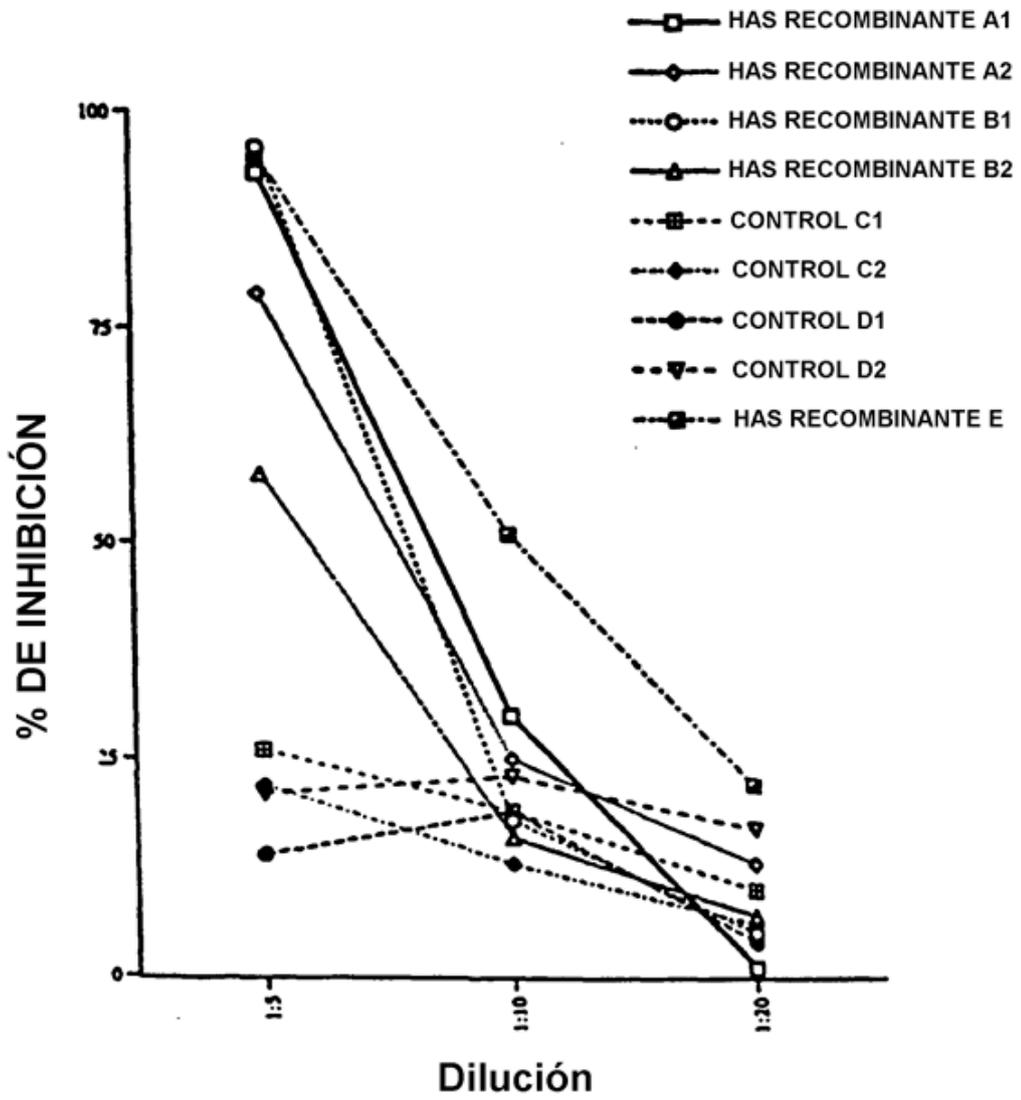


FIGURA 12

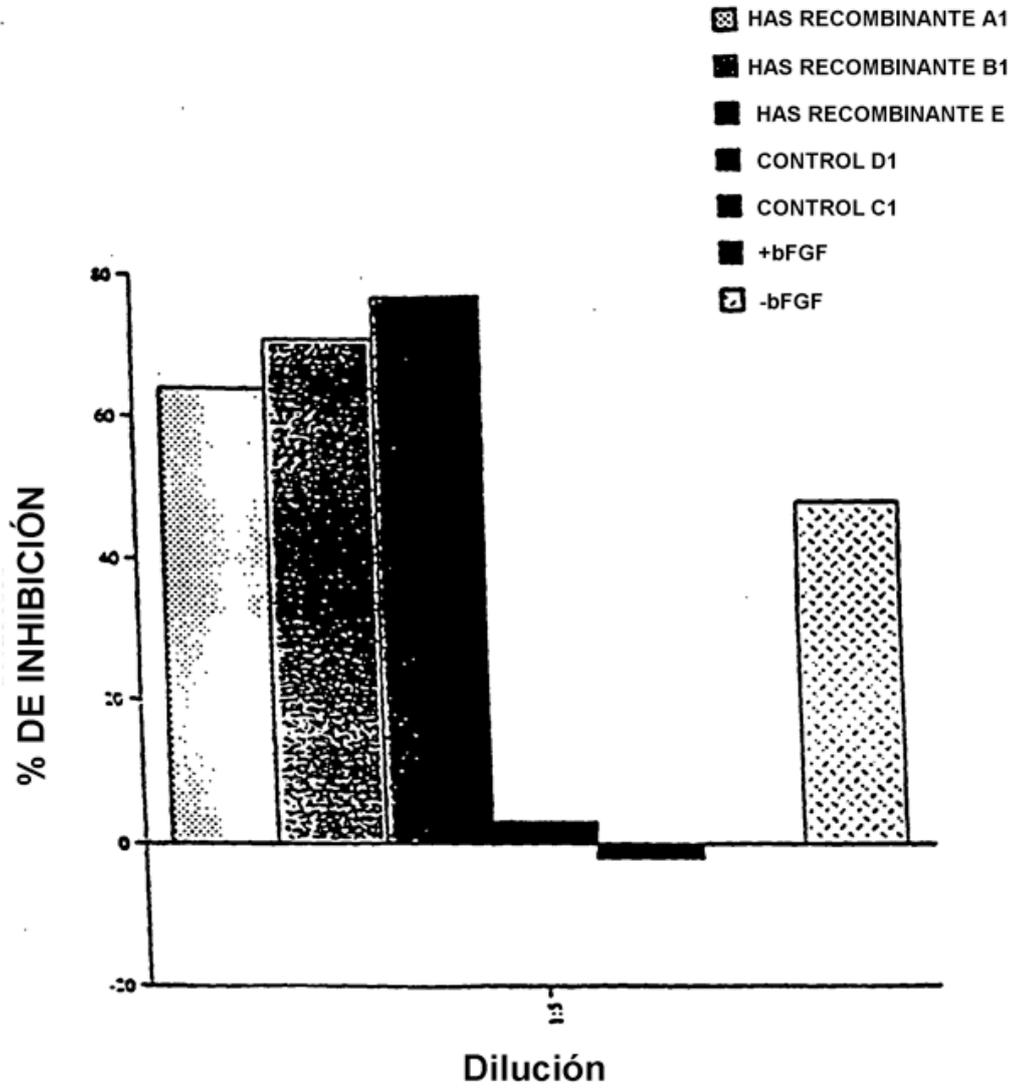


FIGURA 13

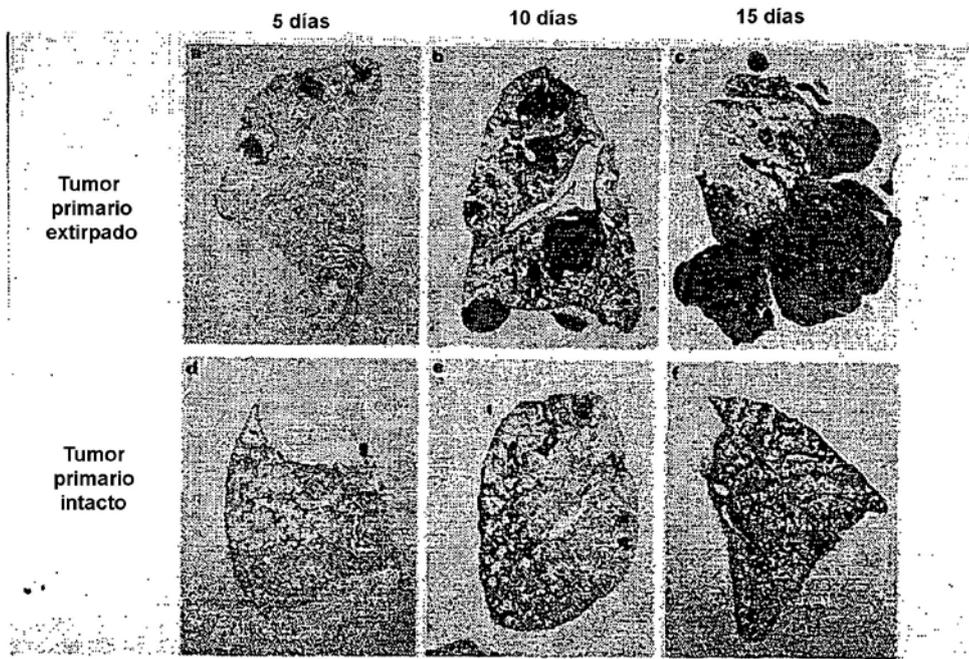


FIGURA 14

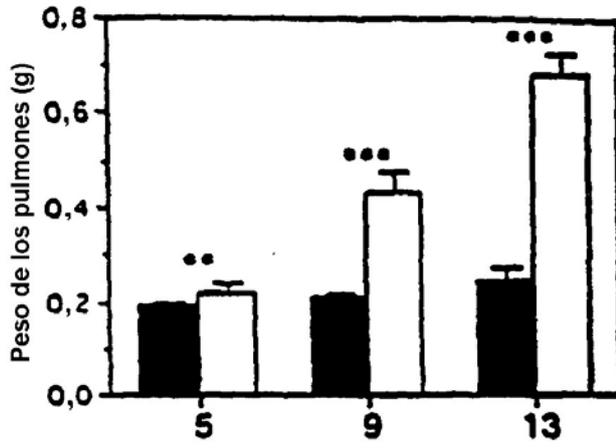


FIGURA 15A

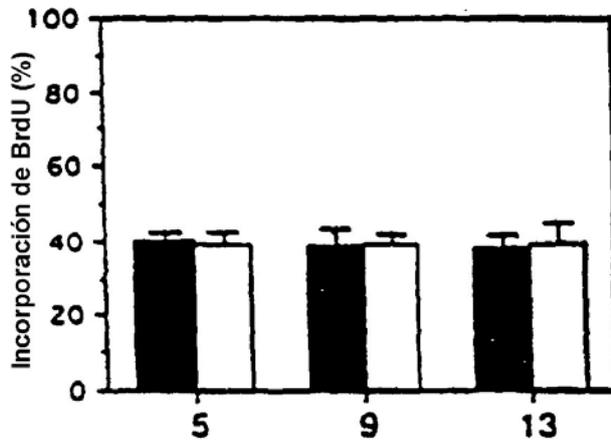


FIGURA 15B

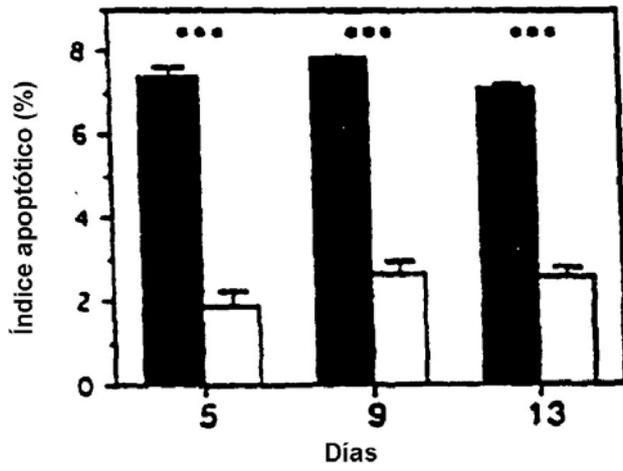


FIGURA 15C

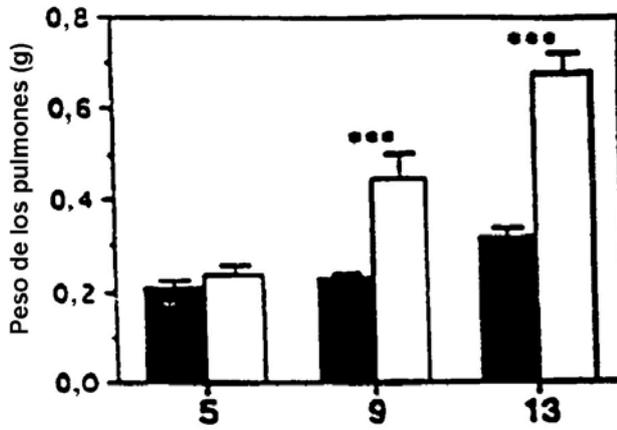


FIGURA 16A

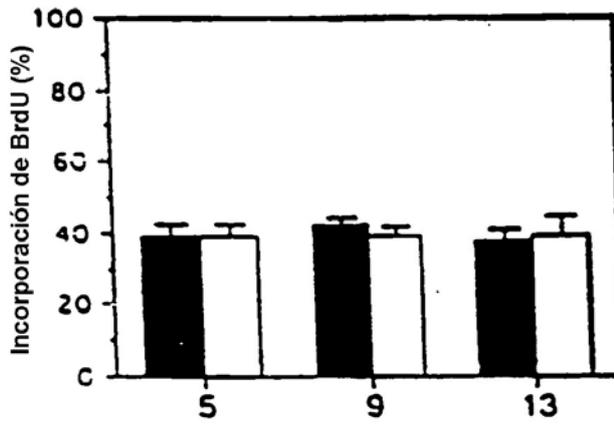


FIGURA 16B

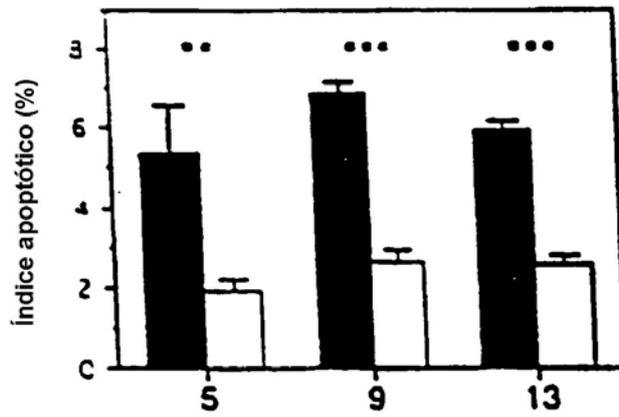


FIGURA 16C

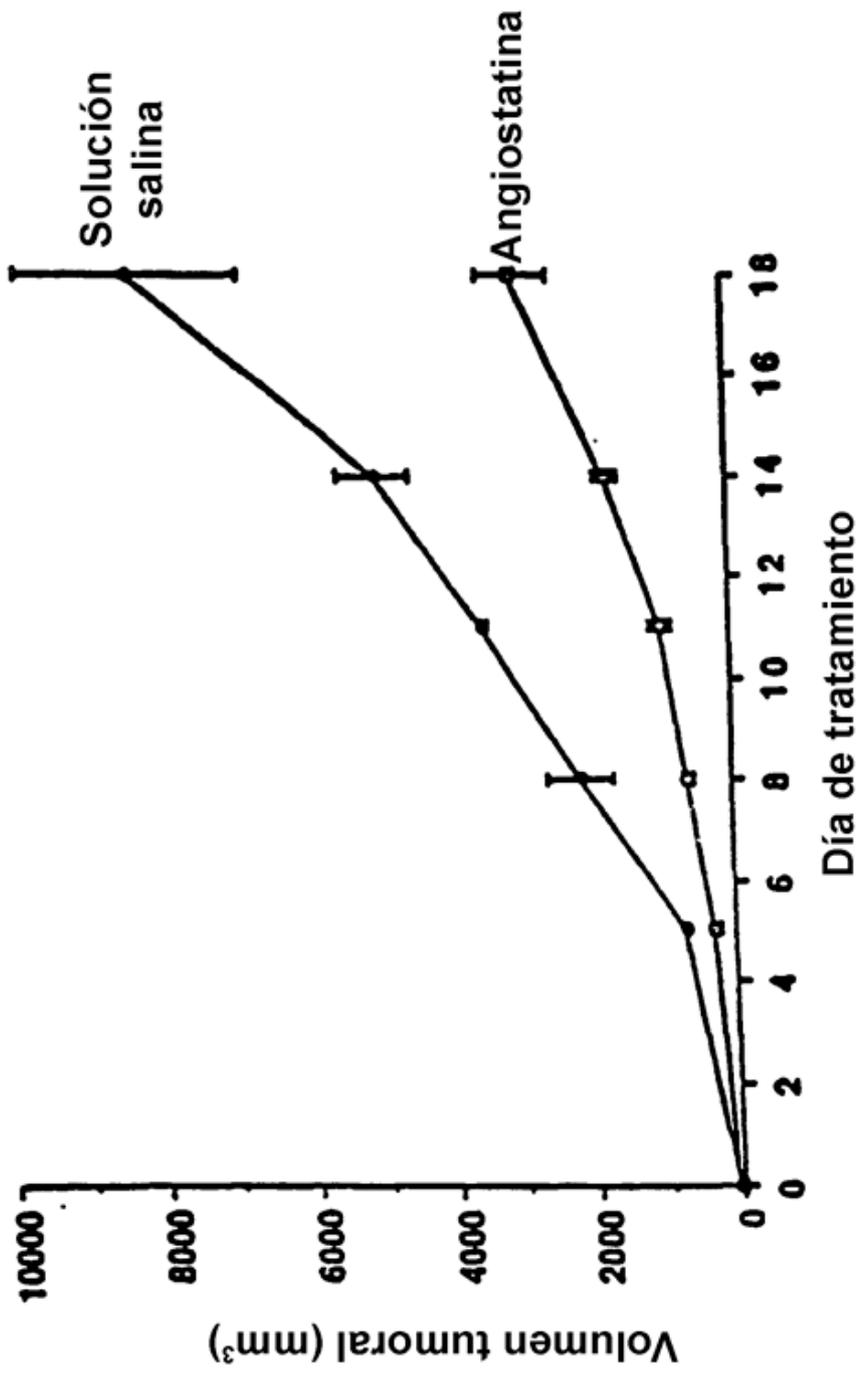


FIGURA 17

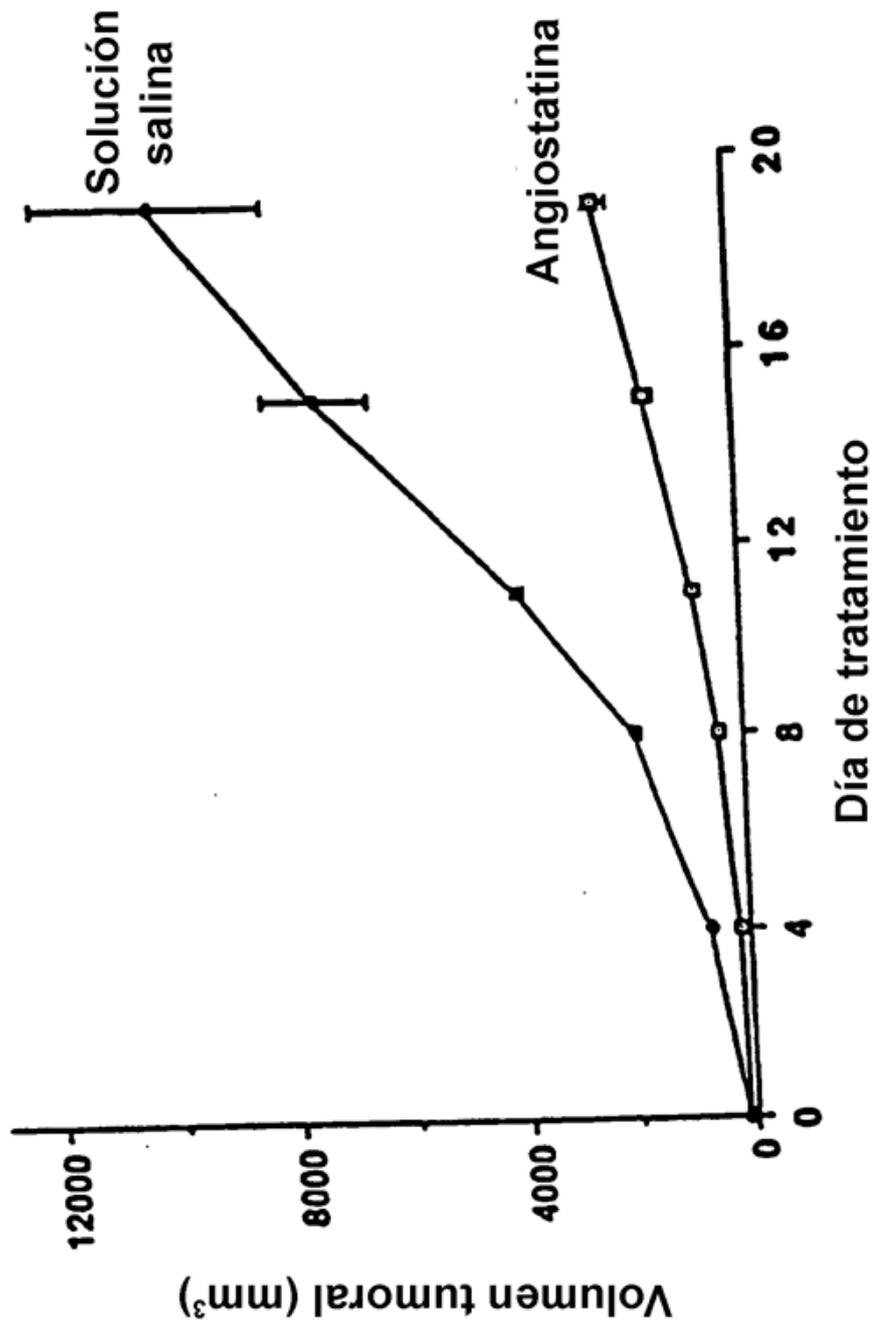


FIGURA 18

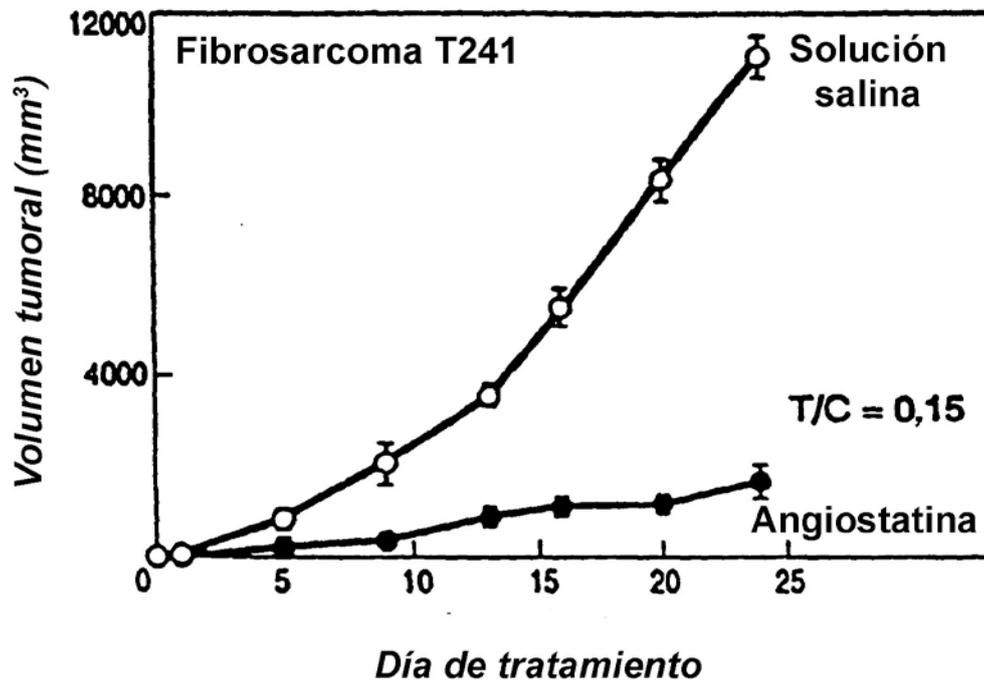


FIGURA 19

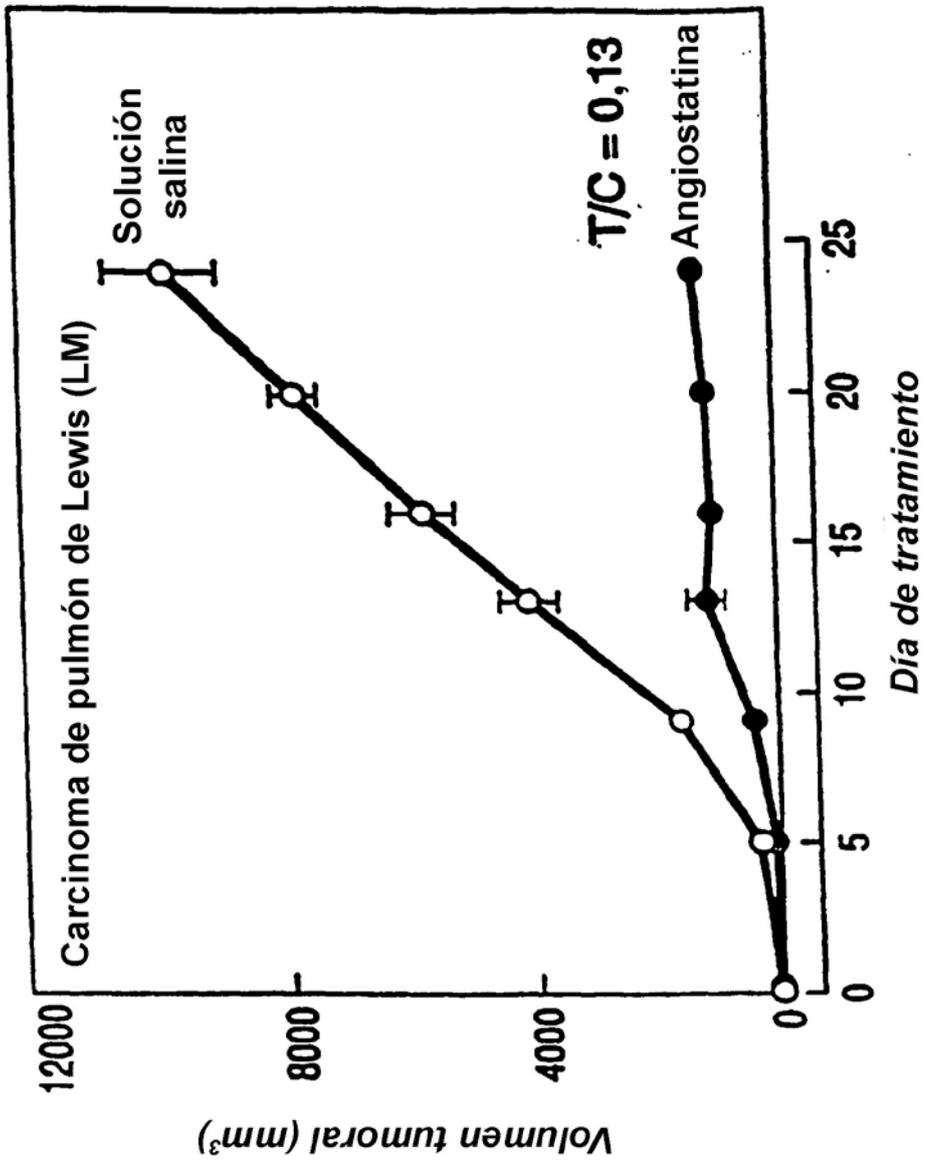


FIGURA 20

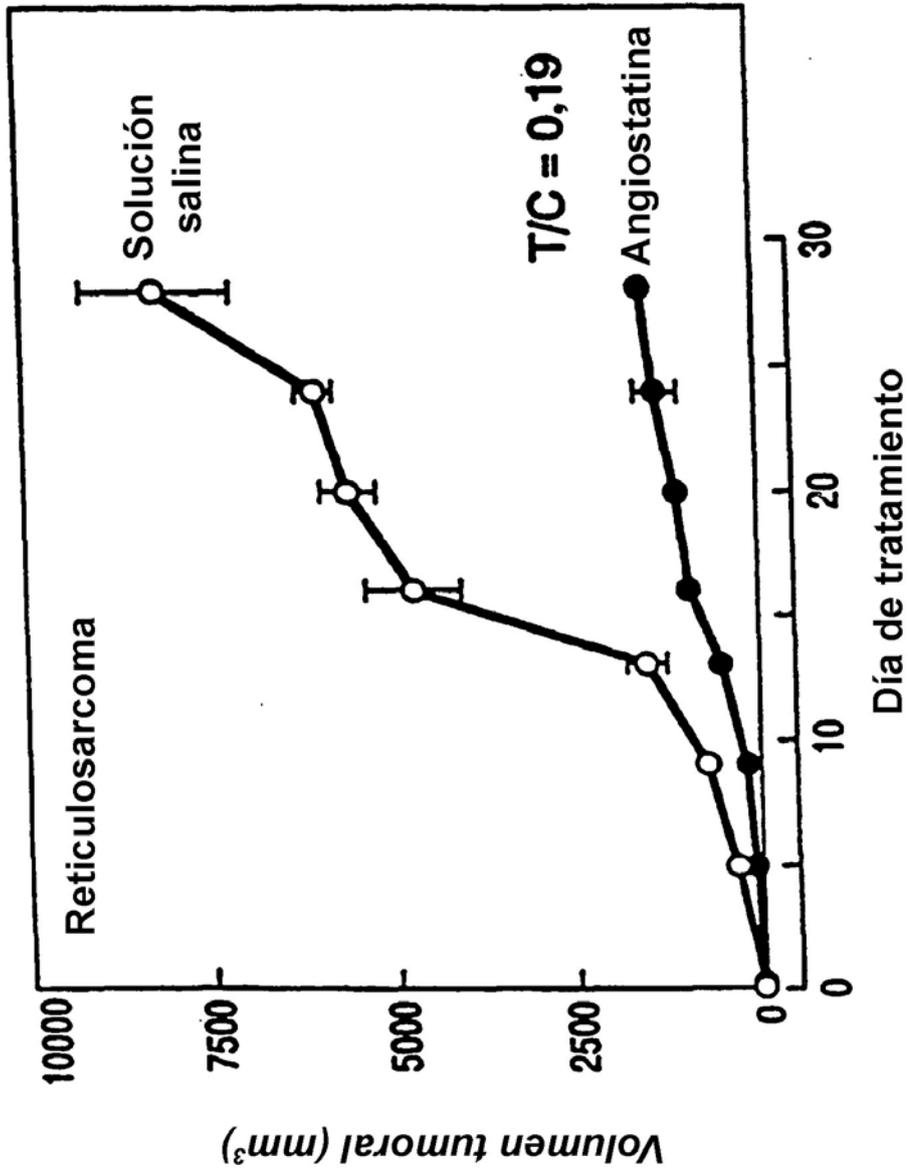


FIGURA 21

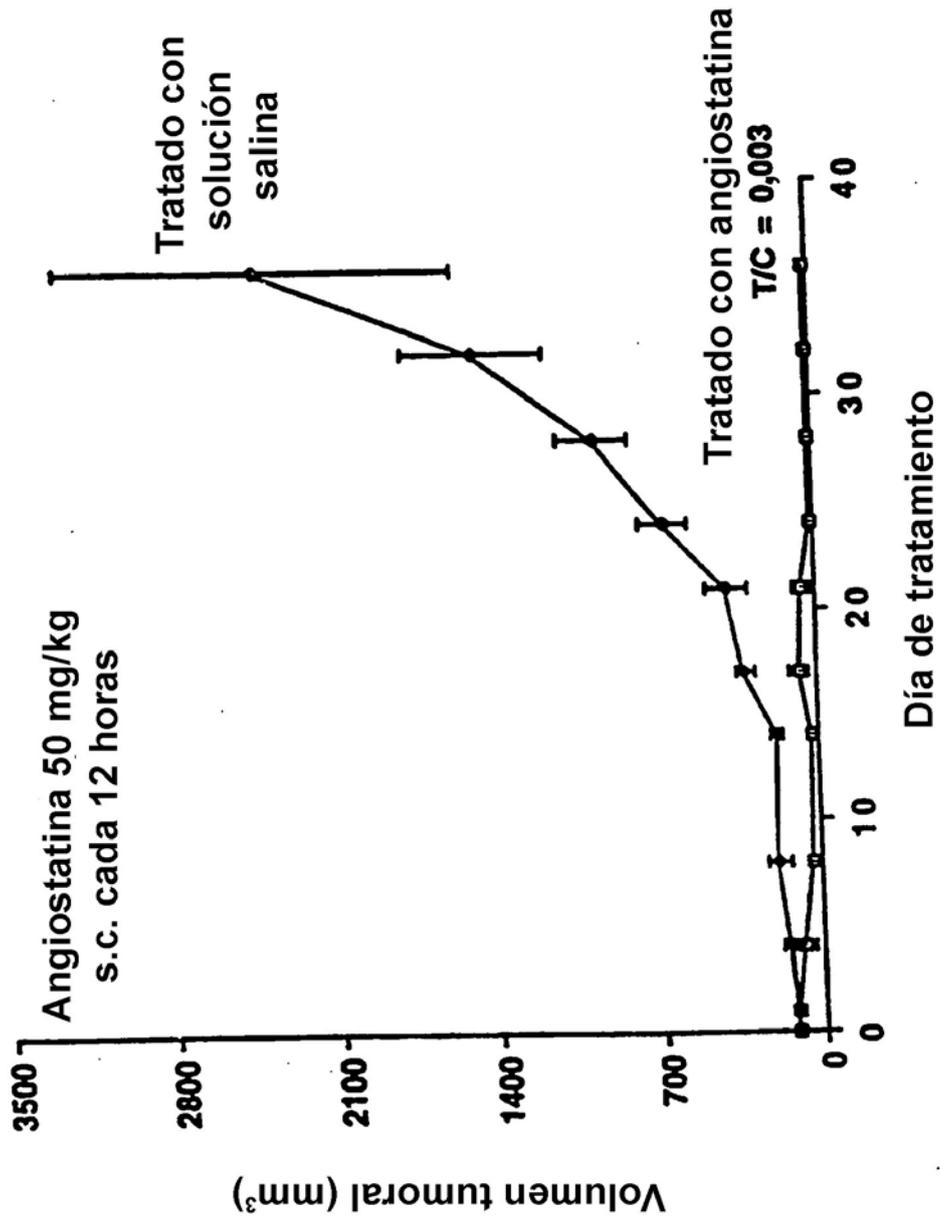


FIGURA 22

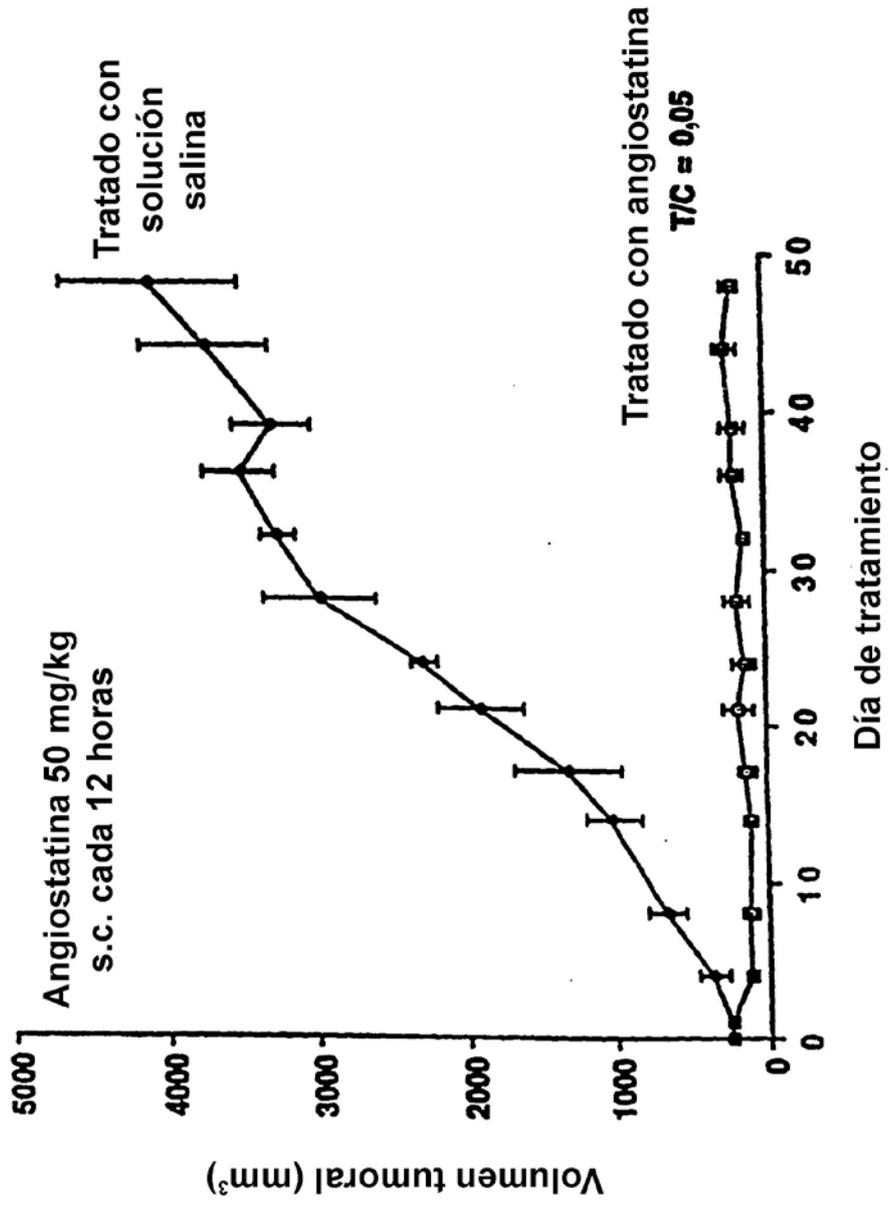


FIGURA 23

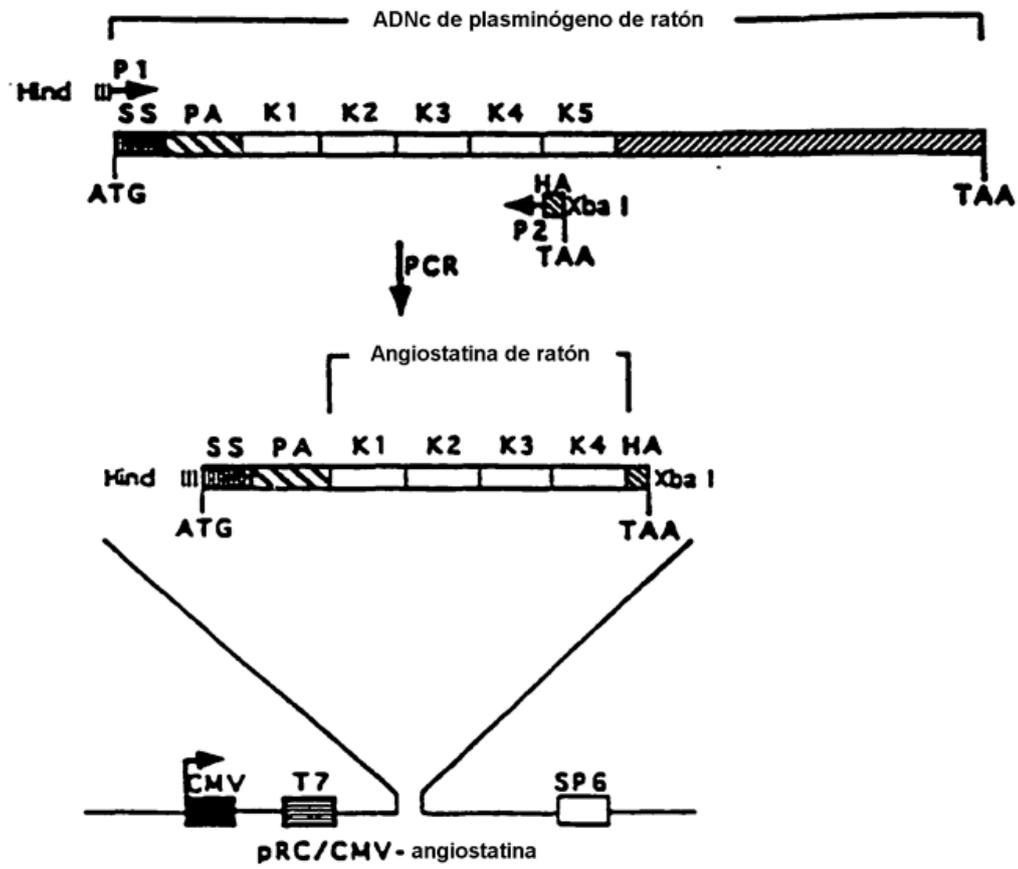


FIGURA 24

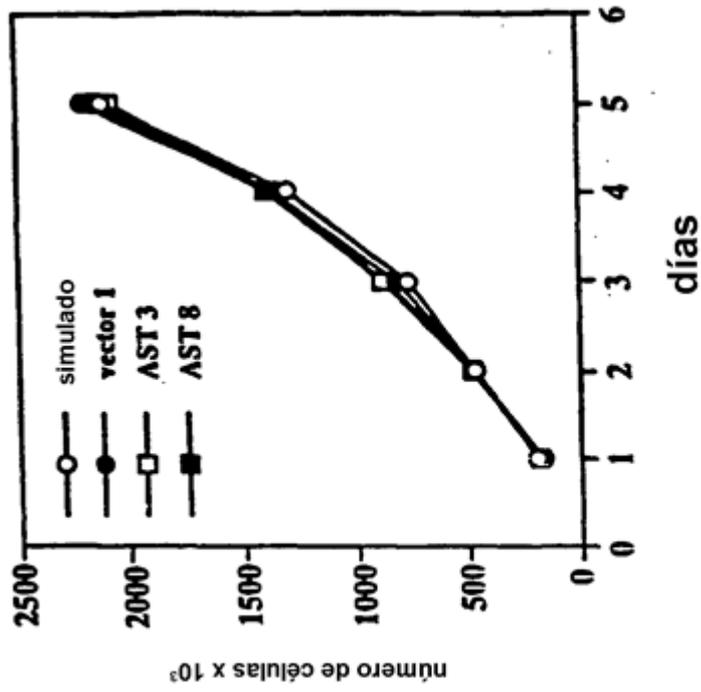


FIGURA 25B

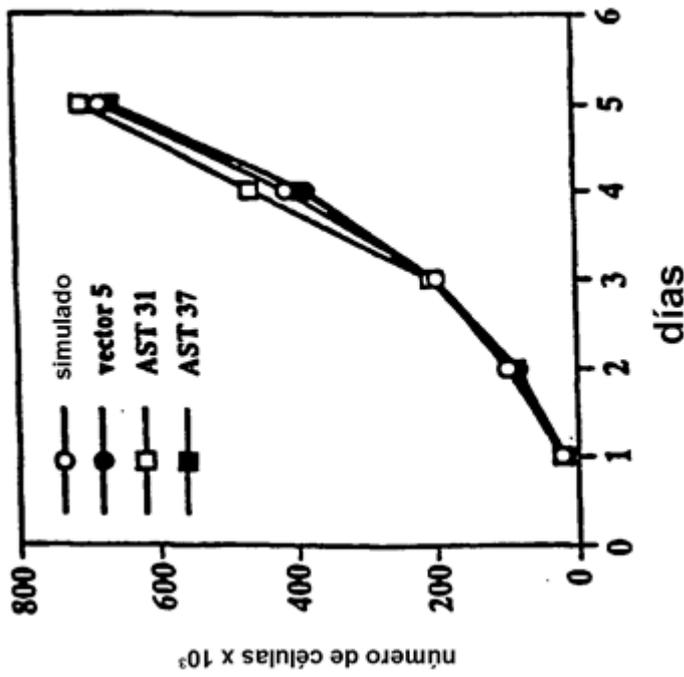


FIGURA 25A

FIGURA 26A

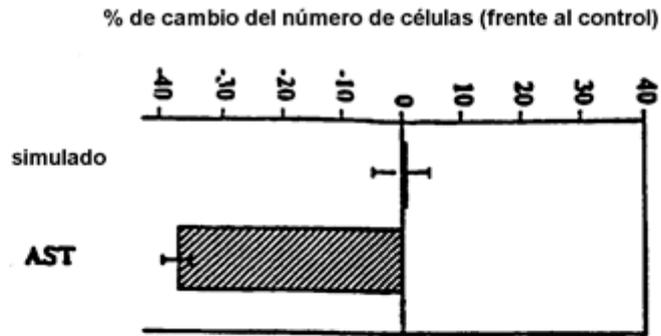


FIGURA 26B

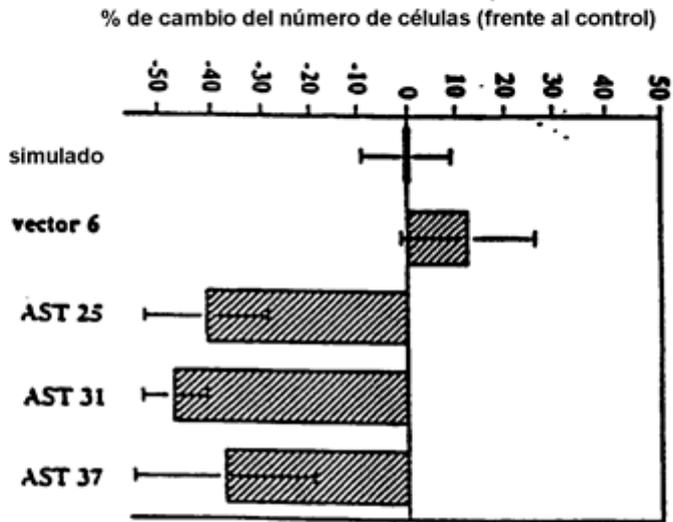
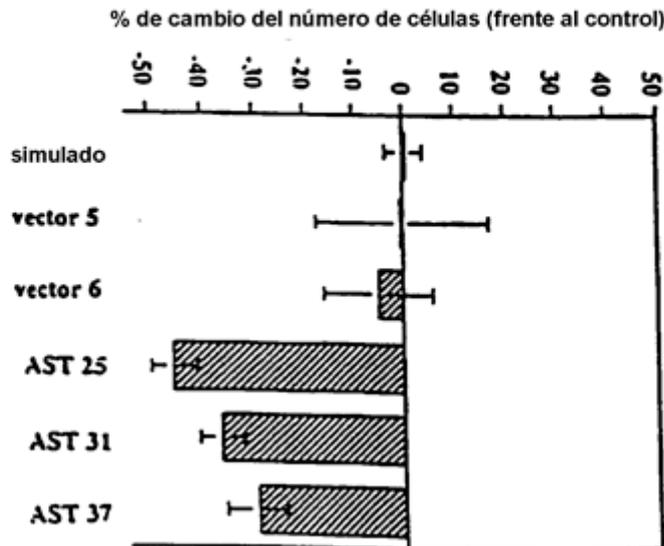


FIGURA 26C



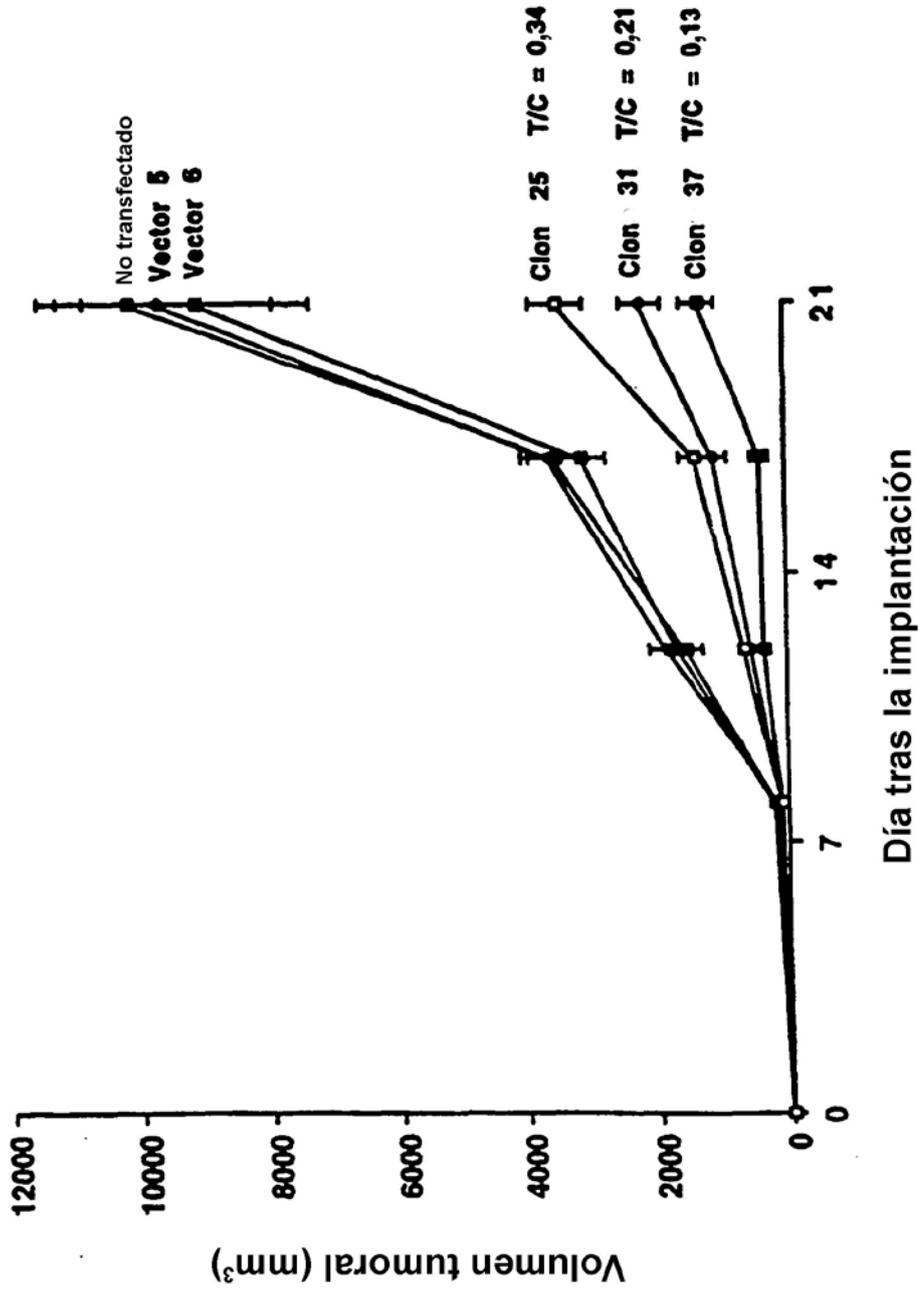


FIGURA 27