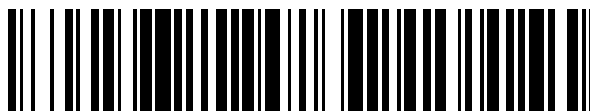


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 763**

51 Int. Cl.:  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 38/45** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07020078 .7**  
96 Fecha de presentación: **22.12.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1905457**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden Src y/o Yes y su utilización**

30 Prioridad:  
**22.12.1999 US 470881**  
**29.03.2000 US 538248**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.06.2012**

73 Titular/es:  
**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**  
**10550 NORTH TORREY PINES ROAD**  
**LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:  
**Cheresh, David A.;**  
**Eliceiri, Brian y**  
**Paul, Robert**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 383 763 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden Src y/o Yes y su utilización.

5 **Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

La presente invención reivindica prioridad a la patente US nº 09/470.881 presentada el 22 de diciembre de 1999, y nº 09/538.248 presentada el 29 de marzo de 2000, reivindicando ambas prioridad a la solicitud de patente internacional nº PCT/US99/11780, que designa a los Estados Unidos de América y fue presentada el 28 de mayo de 1999, que reivindica prioridad a la solicitud provisional US para la patente nº de serie nº 60/087.220 registrada el 29 de mayo de 1998.

**Declaración de los derechos gubernamentales**

15 Parte del trabajo dado a conocer se ha respaldado en parte con subvenciones del NIH en nombre de los Estados Unidos de América. Por consiguiente, el gobierno de los Estados Unidos de América puede tener determinados derechos sobre la presente invención.

**Campo técnico**

20 La presente invención se refiere en general al ámbito de la medicina y se refiere específicamente a composiciones destinadas a modular e inhibir la permeabilidad vascular (VP).

**Antecedentes**

25 La angiogénesis es un proceso de vascularización de los tejidos que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un tejido y al que se hace asimismo referencia como neovascularización. El proceso está mediado por la infiltración de células endoteliales y células de músculo liso. Se cree que el proceso procede en una de tres formas: los vasos pueden brotar de un vaso preexistente, el nuevo desarrollo de vasos puede originarse a partir de células precursoras (vasculogénesis), o se pueden ensanchar en diámetro pequeños vasos ya existentes. [Blood *et al. Bioch. Biophys. Acta.* 1032:89-118 (1990)]. Para que tenga lugar la angiogénesis, las células endoteliales deben primero degradar y cruzar la membrana basal de los vasos de modo semejante al utilizado por las células tumorales durante la invasión y la generación de metástasis. La angiogénesis generalmente no se produce en los adultos o en los tejidos maduros, aunque si tiene lugar durante la cicatrización y el ciclo de crecimiento del corpus luteum. Ver por ejemplo Moses *et al.*, [*Science*, 248:1408-1410 (1990)].

Mientras que la angiogénesis es un proceso importante en el crecimiento neonatal, también es importante en la cicatrización y es un factor en la patogénesis de gran número de patologías clínicas que comprenden la inflamación tisular, artritis, crecimiento tumoral, retinopatía diabética, degeneración macular por neovascularización de la retina, y trastornos semejantes. Estas manifestaciones clínicas asociadas a la angiogénesis se refieren como enfermedades angiogénicas. [Folkman *et al.*, *Science*, 235:442-447 (1987)].

Se ha propuesto que la inhibición de la angiogénesis podría ser una terapia de utilidad con el fin de restringir el crecimiento tumoral. Se ha propuesto la inhibición de la angiogénesis mediante (1) la inhibición de la liberación de "moléculas angiogénicas" tales como el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), (2) la neutralización de las moléculas angiogénicas, tal como mediante la utilización de anticuerpos antiβbFGF, (3) la utilización de inhibidores del receptor de la vitronectina  $\alpha_v\beta_3$  y (4) la inhibición de la respuesta de las células endoteliales a los estímulos angiogénicos. Esta última estrategia ha recibido atención, Folkman *et al.*, [*Cancer Biology*, 3:89-96 (1992)], han descrito múltiples inhibidores de la respuesta de las células endoteliales, que comprenden inhibidor de la colágena, inhibidores del reemplazo de la membrana basal, esteroides angiostáticos, inhibidores de la angiogénesis derivados de hongos, factor 4 de las plaquetas, trombospondina, fármacos artríticos tales como la D-penicilina y el tiomalato de oro, análogos de la vitamina D<sub>3</sub>, interferón  $\alpha$  y similares, que se pueden utilizar con el fin de inhibir la angiogénesis. Para más inhibidores de la angiogénesis propuestos, [ver Blood *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1032:89-118 (1990), Moses *et al.*, *Science*, 248:1408-1410 (1990), Ingber *et al.*, *Lab. Invest.*, 59:44-51 (1988), y las patentes US nº 5.092.885, nº 5.112.946, nº 5.192.744, nº 5.202.352, nº 5.753.230 y nº 5.766.591]. Sin embargo, ninguno de los inhibidores de la angiogénesis descritos en las referencias anteriores implica las proteínas Src.

Se ha informado anteriormente de que la angiogénesis depende de la interacción entre las integrinas vasculares y las proteínas de la matriz extracelular. Brooks *et al.*, [*Science*, 264:569-571(1994)]. Además, se ha informado de que la muerte celular programada (apoptosis) de las células vasculares angiogénicas se inicia mediante la interacción, que se inhibiría mediante ciertos antagonistas de la integrina vascular  $\alpha_v\beta_3$ . [Brooks *et al.*, *Cell*, 79:1157-1164 (1994)]. Más recientemente, se ha informado de que la unión de la metaloproteínasa-2 de matriz (MMP-2) al receptor de la vitronectina ( $\alpha_v\beta_5$ ) se puede inhibir mediante la utilización de antagonistas de la  $\alpha_v\beta_5$  inhibiendo así la función enzimática de la proteínasa. [Brooks *et al.*, *Cell*, 85:683-693 (1996)]. Las integrinas  $\alpha_v$  se han identificado como componentes importantes de la supervivencia de las células endoteliales en los vasos sanguíneos angiogénicos. Los antagonistas de las integrinas específicos de la integrina  $\alpha_v$  bloquean las sendas angiogénicas inducidas por factores

de crecimiento discretos. Por ejemplo, la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se bloquea mediante los antagonistas de la integrina  $\alpha_v\beta_5$ , mientras que la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) se bloquea mediante los antagonistas de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

5 El sistema vascular cerebral está caracterizado porque presenta una barrera hematoencefálica muy restrictiva que prohíbe la extravasación de pequeñas moléculas en los tejidos cerebrales circundantes. La naturaleza de la barrera hematoencefálica de los mamíferos ha recibido atención específica en los estudios farmacológicos, ya que debido a la elevada restrictividad de la barrera hematoencefálica, evita rutinariamente el paso de muchos fármacos del sistema vascular al tejido cerebral. La presente invención implica el inesperado descubrimiento de que la VP, tal como se mide mediante el escape vascular de sangre, se puede modular mediante Src o Yes. Además, la VP ha sido asociada a la angiogénesis y otras patologías. El incremento en la permeabilidad vascular inducida por la inflamación está asociado con edema e hinchazón.

15 La necesidad de actividad de tirosina quinasa Src para la angiogénesis inducida por VEGF, pero no por bFGF, demostró la existencia de una diferencia significativa en la regulación y en las señales de activación entre estas sendas, tanto en los modelos de embrión de pollo como de ratón [Eliceiri *et al.*, *Molecular Cell*, 4:915-924 (1999)].

20 Los cambios en la permeabilidad vascular debidos a las señales angiogénicas de las células tumorales han proporcionado un modelo para examinar las sendas de señalización relacionadas con el cáncer, sin embargo, la permeabilidad vascular debida al daño, la enfermedad u otros traumas de los vasos sanguíneos es la causa principal de pérdida vascular y edema asociada con el daño tisular. Por ejemplo, la enfermedad cerebrovascular asociada con el accidente cerebrovascular (CVA) u otro daño vascular en el cerebro o tejido espinal son las causas más comunes de trastorno neurológico y una de las principales fuentes de discapacidad. Típicamente, el daño del tejido cerebral o espinal en la región de un CVA implica la pérdida vascular y/o el edema. Típicamente, el CVA puede comprender 25 daño causado por isquemia cerebral, interrupción del flujo sanguíneo normal al cerebro; la insuficiencia cerebral debida a perturbaciones transitorias en el flujo; infarto, debido a embolismo o trombosis de las arterias craneales internas o externas; hemorragia y malformaciones arteriovenosas. La embolia isquémica y la hemorragia cerebral pueden ocurrir súbitamente y el impacto del incidente refleja generalmente la zona dañada del cerebro. [ver el Manual Merk, 16<sup>a</sup> ed. Capítulo. 123, (1992)].

30 Además del CVA, las infecciones o enfermedades del sistema nervioso central (SNC) también pueden afectar los vasos sanguíneos del cerebro y la columna espinal y pueden implicar inflamación y edema, tal como por ejemplo la meningitis bacteriana, encefalitis vírica y la formación de abscesos cerebrales. [ver el Merk Manual, 16<sup>a</sup> ed., Capítulo 125, (1992)]. Los trastornos sistémicos también pueden debilitar los vasos sanguíneos y conducir a la pérdida vascular y edema, tal como la diabetes, trastornos de riñón, aterosclerosis y semejantes. Por consiguiente, la pérdida vascular y el edema son patologías críticas, diferentes e independientes del cáncer, que necesitan 35 intervención terapéutica específica efectiva en asociación con una multiplicidad de heridas, traumas o enfermedades.

40 Se ha descubierto que la inhibición selectiva de la actividad de la familia Src de tirosina quinasa reduce el daño o trauma asociado al incremento de VP en los tejidos y produce una disminución de la patología relacionada con la pérdida y/o edema de los vasos sanguíneos.

### Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a la modulación de la permeabilidad vascular (VP) mediante la tirosina quinasa Src, a la que se hace referencia asimismo genéricamente en la presente memoria como Src, o la tirosina quinasa Yes, a la que se hace referencia genéricamente en la presente memoria como Yes, o mediante la inhibición selectiva de la actividad de la tirosina quinasa de la familia Src.

50 Por lo tanto, un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende proteínas tirosina quinasa Src y Yes junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 En composiciones que comprenden proteínas quinasa Src y Yes activas, la modulación esperada es una potenciación o un aumento de la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos en un tejido diana. Cuando la proteína Src deseada es una quinasa activa, una Src preferida es la Src-A. Otra proteína Src activa preferida es una en la que el residuo de aminoácido en la posición 527 de la proteína Src es cualquier residuo de aminoácido excepto tirosina, serina o treonina. La proteína Yes activa preferida presentará la actividad quinasa de la Yes humana de tipo silvestre, tal como ésta o la proteína Yes-1. Otra Yes activa preferida es una en la que la quinasa que inactiva el sitio de fosforilación de la proteína Yes es mutada para suprimir o minimizar la inactivación de la fosforilación, similar a una mutación del residuo de aminoácido 527 de Src para cualquier residuo de aminoácido excepto la tirosina, la serina o la treonina.

65 Cuando la composición comprende proteínas Src y Yes que son proteínas quinasa inactivas, la modulación esperada es una inhibición o disminución de la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos en el tejido diana. Cuando la proteína Src deseada es una proteína inactiva, una Src preferida es la Src 251. Otra Src inactiva preferida

es la Src K295M. Una proteína Yes inactiva preferida presentará una actividad quinasa disminuida en comparación con la proteína de tipo silvestre.

5 Otro aspecto de la invención reivindicada es una composición farmacéutica que comprende una proteína tirosina  
 10 quinasa Yes inactiva o una mezcla de proteínas tirosina quinasa Src y Yes inactivas para su utilización en un  
 procedimiento para la modulación de la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico y que  
 comprende poner en contacto dicho tejido con una cantidad moduladora de la VP terapéuticamente eficaz de dicha  
 15 composición farmacéutica, en la que el estado patológico es seleccionado de entre el grupo constituido por daños  
 inducidos por accidente cerebrovascular, crecimiento de tumores, infarto de miocardio, arteriosclerosis, edema  
 cerebral, traumatismo o enfermedad cerebrovascular, artritis reumatoide, retinoptía diabética, artritis, enfermedades  
 inflamatorias, reumatismo articular crónico y psoriasis, restenosis, hemorragia cerebral, traumatismo cerebral y  
 20 espinal, lesión espinal y cerebral inducida por hipoxia, trastornos inflamatorios del SNC, infecciones virales o  
 bacterianas del SNC, trastornos autoinmunitarios, enfermedades con un aumento crónico en la permeabilidad de la  
 barrera hematoencefálica, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), y formación de metástasis.

15 Otro aspecto de la invención reivindicada es una composición farmacéutica que comprende una proteína tirosina  
 quinasa Yes activa o una mezcla de proteínas tirosina quinasa Src y Yes activas para su utilización en un  
 procedimiento para modular la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico y que  
 20 comprende poner en contacto dicho tejido con una cantidad moduladora de la VP terapéuticamente eficaz de dicha  
 composición farmacéutica, en la que el estado patológico es seleccionado de entre el grupo constituido por  
 miembros isquémicos y heridas crónicas.

25 Otro aspecto de la invención reivindicada es una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la  
 tirosina quinasa de la familia Src para su utilización en un procedimiento para mejorar el daño tisular relacionado con  
 el edema o la fuga vascular que comprende poner en contacto dicho tejido con una cantidad moduladora de la  
 permeabilidad vascular de dicha composición farmacéutica, en la que el inhibidor de la tirosina quinasa de la familia  
 Src es seleccionado de entre el grupo constituido por una proteína Yes inactiva, una mezcla de una proteína Src  
 30 inactiva y una proteína Yes inactiva, y una mezcla de una proteína Yes inactiva y/o una proteína Src inactiva junto  
 con un inhibidor químico seleccionado de entre PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146, y  
 geldanamicina.

35 Otro aspecto de la invención reivindicada es un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una  
 composición farmacéutica contenida en el interior de dicho material de envasado, en el que dicha composición  
 farmacéutica puede modular la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico, en el que  
 dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha composición farmacéutica puede ser  
 utilizada para tratar estados patológicos modulando la permeabilidad vascular, y en el que dicha composición  
 40 farmacéutica comprende una proteína Yes y proteína Src tirosina quinasa, en un vehículo farmacéuticamente  
 aceptable.

40 Otro aspecto de la invención reivindicada es un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una  
 composición farmacéutica contenida en el interior de dicho material de envasado, en el que dicha composición  
 farmacéutica puede modular la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico, en el que  
 dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha composición farmacéutica puede ser  
 utilizada para el tratamiento de estados patológicos modulando la permeabilidad vascular, y en el que dicha  
 45 composición farmacéutica comprende una proteína tirosina quinasa Yes, en un vehículo farmacéuticamente  
 aceptable.

50 Otro aspecto de la invención reivindicada es un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una  
 composición farmacéutica contenida en el interior de dicho material de envasado, en el que dicha composición  
 farmacéutica puede modular el aumento de la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico,  
 en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha composición farmacéutica  
 puede ser utilizada para el tratamiento de los estados patológicos asociados al edema o la fuga vascular, y en el que  
 dicha composición farmacéutica comprende un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src y un vehículo  
 55 farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de la de la tirosina quinasa de la familia Src es seleccionado de  
 entre el grupo constituido por una proteína Yes inactiva, una mezcla de una proteína Src inactiva y una proteína Yes  
 inactiva, y una mezcla de una proteína Yes inactiva y/o proteína Src inactiva junto con un inhibidor químico  
 seleccionado de entre PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146, y geldanamicina.

60 Está previsto que una mezcla de proteína Yes y Src pueda combinar formas activas e inactivas de la proteína,  
 dependiendo del nivel de modulación deseado, y el efecto coordinado sobre la angiogénesis y la VP deseado, según  
 la enseñanza de la presente invención.

65 Una composición que proporciona la proteína Src o Yes puede contener proteína purificada, fragmentos  
 biológicamente activos de proteína natural, proteínas de fusión o fragmentos de proteínas o proteínas Src p Yes  
 producidas de manera recombinante o sus mezclas.

Cuando la proteína Src o Yes es inactiva o se inhibe, la modulación es la inhibición de VP. Cuando la proteína Src o Yes es activa o se activa, la modulación es la potenciación de VP.

5 Cuando el efecto modulador terapéutico efectivo de VP deseado es un incremento o potenciación de VP, se contempla que se pueden administrar formas activas de la proteína Src y/o Yes.

10 El tejido que se debe tratar puede ser un tejido cualquiera en el que se desea la modulación de VP. El tratamiento terapéutico se logra poniendo en contacto el tejido diana con una cantidad efectiva de la composición moduladora, y se permite tiempo de contacto suficiente para que los componentes proteicos de la composición farmacéutica penetren en el tejido diana. Con el fin de inhibir VP, es de utilidad tratar el tejido enfermo en el que tiene lugar el efecto negativo de la pérdida vascular. Los tejidos ejemplificativos comprenden tejido inflamado, tejidos asociados a infarto, infarto de miocardio u otros bloqueos del flujo normal, tejidos que sufren restenosis y tejidos semejantes.

15 Con el fin de potenciar, es de utilidad tratar a los pacientes con extremidades isquémicas con pobre circulación en las extremidades debida a diabetes u otros trastornos, o con el fin de potenciar la administración de fármacos en el cerebro a través de la barrera hematoencefálica. También se pueden tratar los pacientes con heridas crónicas que no cicatrizan y por consiguiente se podrían beneficiar de un incremento en la proliferación de las células vasculares y la neovascularización modulada por VP.

20 Cuando el artículo de fabricación está envasado para indicar un efecto modulador de la VP potenciador, Src y Yes se encuentran en la forma activa. Una Src activa preferida es la proteína Src-A. Otra proteína Src activa preferida es una en la que el residuo aminoácido en la posición 527 de la proteína Src es cualquier residuo aminoácido excepto la tirosina, la serina o la treonina.

25 Una Src inactiva preferida es la proteína Src 251. Otra proteína Src inactiva preferida es la Src K295M.

30 El daño tisular relacionado a la pérdida vascular y/o el edema asociado a los cambios negativos en la permeabilidad vascular se puede reducir mediante un inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas. Con este fin, es administrada una cantidad moduladora de la permeabilidad vascular de un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src a un tejido que requiera dicho tratamiento. El daño tisular debido a la pérdida vascular o al edema se puede reducir de este modo.

35 Cualquier patología que implique un incremento nocivo en la permeabilidad vascular inducido por una herida y el daño tisular debido a la pérdida vascular o al edema se puede tratar según la presente invención. Dichos eventos patológicos pueden incluir trauma de los vasos sanguíneos tal como una ligación física, bloqueo, separación, oclusión, trauma y semejantes.

40 Otros eventos patológicos sistémicos tales como aterosclerosis, retinopatía diabética, enfermedad inflamatoria debida a infección por agentes microbianos, artritis y semejantes se tratan también adecuadamente por la invención.

45 La presente invención es de utilidad con el fin de tratar la enfermedad cerebrovascular o el trauma mediante la disminución del daño tisular debido al incremento de la pérdida vascular y/o el edema asociado a este. En particular, la presente invención es de utilidad para reducir el daño tisular asociado a la inducción de la permeabilidad vascular inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y mediada por Src. Sin embargo, la presente invención no queda limitada al incremento en la permeabilidad vascular inducido por VEGF, y también es apropiada con el fin modular el incremento en la permeabilidad vascular mediado por la familia Src de tirosina quinasas en respuesta a otras señales reguladoras.

50 En particular, mediante la inhibición de la tirosina quinasa Src, (también referida genéricamente en la presente memoria como Src), y la tirosina quinasa Yes, próximamente relacionada, (también referida genéricamente en la presente memoria como Yes), se puede modular el tejido tratado específicamente con el fin de inhibir en el mismo el incremento en la permeabilidad vascular asociado al daño o la enfermedad.

55 Un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src adecuada en el contexto de la presente invención es un inhibidor químico seleccionado de entre el grupo constituido por PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146, y geldamicina. Otros inhibidores químicos de las tirosina quinasas de la familia Src resultan asimismo apropiadas para la utilización en la invención.

60 La permeabilidad vascular en el tejido puede ser asimismo modulada administrando al tejido un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src que es un inhibidor proteico, tal como una proteína Src inactiva com Src K295M o Src 251, o una proteína Yes inactiva, o una proteína quinasa Src de extremo C activa (CSK).

65 Un artículo de fabricación según la presente invención puede comprender como parte de la composición farmacéutica un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src que es un inhibidor químico. En particular, un inhibidor químico preferido de la tirosina quinasa de la familia Src se selecciona de entre el grupo constituido por PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146 y Geldanamicina, o compuestos con una actividad

inhibidora similar de Src. Un inhibidor muy preferido es PP1.

Los artículos de fabricación pueden incluir una o más composiciones farmacéuticas que contienen inhibidores de la tirosina quinasa de la familia Src terapéuticos, o cantidades subterapéuticas de más de un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src, en un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de los artículos de fabricación de la invención pueden comprender mezclas de una o más cantidades moduladoras de la VP efectivas subterapéuticamente de un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src, que actúan conjuntamente para proporcionar un efecto reductor de la VP sobre el tejido tratado. La composición farmacéutica del artículo de fabricación puede variar dependiendo del efecto modulador deseado, y el etiquetado del envasado variará de manera correspondiente asimismo.

La composición farmacéutica del artículo de fabricación puede oscilar dependiendo del efecto modulador o inhibidor deseado y el envasado y etiquetado cambiará también en consecuencia.

### Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que comprenden una parte de la presente publicación:

La Fig. 1 es una secuencia de ADNc de c-Src de pollo que consiste en la secuencia codificante completa sin los intrones tal como describen Takeya *et al.*, *Cell*, 32:881-890 (1983). La secuencia se encuentra disponible a través del Número de Ascensión J0084 del GenBank. La secuencia comprende 1759 nucleótidos con la parte que codifica la proteína comenzando y terminando en las posiciones 112 y 1713, respectivamente (SEC ID n°:2).

La Fig. 2 es la secuencia de residuos de aminoácidos del c-Src de pollo codificada por la secuencia mostrada en la Fig. 1 (SEC ID n°:3).

La Fig. 3 es una secuencia de ADNc de c-Src humano que fue inicialmente descrita por Braeuninger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10411-10415 (1991). La secuencia se encuentra disponible mediante el Número de Ascensión X59932 X71157 del GenBank. La secuencia comprende 2178 nucleótidos con la parte que codifica proteína comenzando y terminando en las posiciones de nucleótidos 134 y 1486, respectivamente (SEC ID n°:4).

La Fig. 4 es la secuencia de residuos de aminoácido codificada por el c-Src humano con la secuencia codificante mostrada en la Fig. 3 (SEC ID n°:5).

La Fig. 5 ilustra la activación de Src endógeno por bFGF o VEGF tal como se describe en el Ejemplo 4. La parte superior de la figura muestra el resultado de un ensayo *in vitro* de quinasa con el incremento en la activación del c-Src endógeno por bFGF y VEGF. La parte inferior de la figura es la transferencia del ensayo de quinasa detectado con un anticuerpo antiSrc como control de carga para el contenido equivalente de Src y IgG.

La Fig. 6 ilustra el efecto de la expresión del gen c-Src A mediada por retrovirus del sobre la angiogénesis en CAM de pollo tal como se describe en el Ejemplo 4. Se expusieron CAM de pollo de nueve días a retrovirus RCAS-Src A (c-Src mutado activo) o control RCAS-GFP (proteína verde fluorescente; una proteína fluorescente trazadora) o a tampón durante 72 horas. El nivel de angiogénesis se cuantificó como se indica en la Fig. 6A con microfotografías representativas (4X) en la Fig. 6B correspondientes a cada uno de los tratamientos, tomadas con un microscopio estereoscópico.

La Fig. 7 ilustra la expresión retroviral de c-Src A en la activación de la fosforilación de la quinasa MAP vascular. La Fig. 7A muestra extractos de tejido de CAM de pollos de 10 días que han sido expuestos a VEGF o PMA durante 30 minutos o infectados con retrovirus c-Src A durante 48 horas. NT se refiere a "sin tratamiento". Se inmunoprecipitó Src de cantidades equivalentes de extracto de proteína total y se sometió a un ensayo de quinasa con complejo inmune *in vitro* utilizando una proteína de fusión FAK-GST como sustrato, sometido a electroforesis y transferido a nitrocelulosa. Se midieron también alícuotas del anterior homogeneizado total de tejido para determinar fosforilación de ERK endógena mediante inmunotransferencia, mediante un anticuerpo antifosfo-ERK. La Figura 7B muestra CAM de 10 días de vida que han sido infectadas con RCAS simulado o RCAS que comprendía Src A. Después de dos días, se disecaron las CAM, se criopreservaron en OCT y se seccionaron a 4 µm. Las secciones se inmunotifieron con un anticuerpo antiERK fosforilado (New England Biolabs), se lavaron y se detectaron con un anticuerpo secundario de cabra anticonejo conjugado a FITC. Las imágenes de fluorescencia se capturaron con una cámara de CCD enfriado (Princeton Inst.).

La Fig. 8 ilustra el requerimiento selectivo de actividad Src durante la angiogénesis inducida por VEGF, pero no inducida por bFGF. Se expusieron CAM de pollos de 9 días a retrovirus RCAS-Src 251 o RCAS-GFP control o a tampón durante 20 horas y a continuación se incubaron durante 72 horas adicionales en presencia o ausencia de bFGF o VEGF. El nivel de angiogénesis se cuantificó (Fig. 8A) tal como se describió anteriormente, y se tomaron microfotografías (6x) con un estereomicroscopio tal como se muestra en la Fig. 8B. La Fig. 8C muestra una transferencia explorada mediante un anticuerpo antiSrc con el fin de confirmar la expresión de Src 251 en las células

transfectadas en comparación con tratamientos simulados.

La Fig. 9 ilustra los resultados de la administración de retrovirus de RCAS-*Src* 251 a tumores humanos. La Fig. 9A es una microfotografía que muestra un fragmento de tumor de meduloblastoma humano infectado con RCAS-GFP (RCAS-Proteína Verde Fluorescente) que expresa GFP exclusivamente en los vasos sanguíneos del tumor (flechas) según se detecta mediante secciones ópticas con un microscopio confocal láser de barrido Bio Rad (barra = 500  $\mu$ m). La Fig. 9B describe los datos de tumores tratados mediante aplicación tópica de retrovirus, que se dejaron crecer durante entre 3 ó 6 días después de los cuales se extrajeron y se determinaron los pesos en húmedo. Los datos se expresan como el cambio medio en peso tumoral (desde el peso inicial del tumor de 50 mg)  $\pm$  SEM de 2 réplicas. La Fig. 9C describe en microfotografías representativas tumores de meduloblastoma extraídos quirúrgicamente de embriones (barra = 350  $\mu$ m). Los paneles inferiores son vistas amplificadas de cada tumor mostrando en detalle la vascularidad de cada tumor (barra = 350  $\mu$ m). Las flechas indican la destrucción de vasos sanguíneos en tumores tratados con RCAS-*Src* 251.

La Fig. 10 es un diagrama ilustrativo de un mapa de restricción de la construcción de vector RCASBP (RCAS) (SEC ID n°:1).

La Fig. 11 describe la secuencia codificada de residuos de aminoácidos de la proteína c-Yes humana mediante una representación de los aminoácidos con una sola letra (SEC ID n°:8).

La Fig. 12 describe la secuencia de ácido nucleico del un ADNc que codifica la proteína c-Yes humana. La secuencia es accesible mediante el número de acceso M15990 del GenBank. La secuencia comprende 4517 nucleótidos con la parte que codifica la proteína comenzando y terminando en las posiciones de nucleótidos 208 y 1839 respectivamente, y que se traduce en la secuencia de aminoácidos descrita en la Fig. 11 (SEC ID n°:7).

La Fig. 13 describe los resultados de la administración retroviral de *Src* 251 y CSK en un modelo de angiogénesis subcutánea murina. La Fig. 13A ilustra los resultados de inmunotransferencia con el fin de detectar expresión de flk. La Fig. 13B ilustra los resultados de inmunotransferencia de un ensayo de flk bajo condiciones de estimulación mediante VEGF y bFGF. La Fig. 13c es una gráfica del número de vasos sanguíneos CD34 positivos (promedio de campos al azar por triplicado a 20x) mediante tratamiento de estimulación con VEGF y bFGF en presencia de GFP, *Src* 251 o retrovirus CSK.

La Fig. 14 ilustra los resultados de un ensayo Miles modificado para VP de VEGF en la piel de ratones deficiente en *Src*, *fyn* y *Yes*. La Fig. 14A comprende fotografías de orejas tratadas. La Fig. 14B comprende gráficas de resultados experimentales de estimulación de múltiples ratones deficientes. La Fig. 14C representa gráficamente la cantidad de colorante azul de Evan extraído mediante el tratamiento.

La Fig. 15 es una gráfica que describe el tamaño relativo de infarto en ratones tratados de tipo *Src* +/-, *Src* -/-, silvestre (wt) y PP1. El tratamiento con PP1 consistió en 1,5 mg/kg peso corporal.

La Fig. 16 describe rastreos secuenciales de MRI de cerebros de ratón control y tratado con PP1 mostrando menos infarto cerebral en los animales tratados con PP1 (derecha) que en los animales control (izquierda).

## Descripción detallada de la invención

### A. Definiciones

Residuo de aminoácido: un aminoácido generado mediante digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en su enlace peptídico. Los residuos de aminoácido descritos en la presente memoria son preferentemente las formas isoméricas "L". Sin embargo, se pueden sustituir residuos en forma de isómeros "D" por residuos de aminoácido-L, siempre y cuando el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura estándar de polipéptidos (descrita en *J. Biol Chem.* 243:3552-59 (1969) y adoptada en 37 CFR §1,822 (b) (2)).

Se debe subrayar que todas las secuencias de residuos de aminoácido se representan en la presente memoria mediante fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha corresponde con la dirección convencional de amino terminal a carboxiterminal. Además, se debe subrayar que un guión al principio o final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a otra secuencia de uno o más residuos de aminoácido.

Polipéptido: se refiere a una serie lineal de residuos de aminoácido conectados unos a otros mediante enlaces peptídicos entre el grupo  $\alpha$ -amino y el grupo carboxí de residuos de aminoácidos contiguos.

Péptido: tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una serie lineal de no más de aproximadamente 50 residuos de aminoácido conectados uno a otro como en un polipéptido.

Péptido cíclico: se refiere a un compuesto con estructura de anillo heteroatómico que comprende múltiples enlaces amídicos como en un polipéptido típico. El péptido cíclico puede ser homodético "cabeza a cola", péptido ciclado en el que el extremo N-amino de un péptido lineal ha formado un enlace amida con el carboxilato c-terminal del péptido lineal, o puede comprender una estructura de anillo en la que el polímero es heterodético y comprende enlaces amida y/o otros enlaces para cerrar el anillo, tales como puentes disulfuro, tioésteres, tioamidas, guanidino y enlaces semejantes.

Proteína: se refiere a una serie lineal de más de 50 residuos de aminoácido unidos uno a otro como en un polipéptido.

Proteína de fusión: Se refiere a un polipéptido que comprende por lo menos dos dominios de polipéptido operacionalmente unidos mediante un enlace peptídico típico ("fusionados"), en el que los dos dominios corresponden a péptidos que no se encuentran naturalmente fusionados.

Péptido sintético: se refiere a una cadena de residuos de aminoácido químicamente producida unidos mediante enlaces peptídicos que se encuentra libre de proteínas naturales y fragmentos de las mismas.

### B. Consideraciones generales

La presente invención se refiere en general a: (1) el descubrimiento de que la VP inducido por VEGF está específicamente mediado por las proteínas tirosina quinasas Src y Yes y que se puede modular la VP proporcionando proteínas Src y Yes tanto activas como inactivas con el fin de potenciar o inhibir la angiogénesis, respectivamente; (2) el descubrimiento adicional de que la pérdida vascular y/o el edema asociado con el trauma, el incremento en la permeabilidad vascular relacionado a la enfermedad o la herida se puede modular específicamente y reducir mediante la inhibición de la actividad tirosina quinasa de la familia Src; (3) el descubrimiento de que la administración *in vivo* de un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src disminuye el daño tisular debido al incremento en la permeabilidad vascular resultante de las enfermedades o las heridas, no asociado al cáncer o la angiogénesis.

Este descubrimiento es importante debido a la función que tiene la permeabilidad vascular en una multiplicidad de procesos de enfermedad y en asociación con la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos. Cuando un tejido asociado a un trastorno necesita angiogénesis para el crecimiento del tejido, es deseable inhibir la angiogénesis y de este modo inhibir el crecimiento del tejido enfermo. La angiogénesis se puede inhibir más eficazmente mediante la inhibición simultánea de la VP. Cuando el tejido dañado necesita angiogénesis para su crecimiento y cicatrización, es deseable potenciar o promover la VP y así, la angiogénesis, y de este modo promocionar la cicatrización del tejido y su crecimiento.

Cuando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es la causa de, o contribuye a, la patología asociada a un tejido enfermo, la inhibición de la VP y de este modo la angiogénesis, reducirá los efectos negativos de la enfermedad. Mediante la inhibición de la VP asociada a la angiogénesis, se puede intervenir en la enfermedad, disminuir los síntomas y en algunos casos curar la enfermedad.

En ciertos casos, es deseable un incremento de la VP con el fin de incrementar la eficacia de la administración de fármacos por vía de administración sistémica. La barrera hematoencefálica es un término utilizado para describir la ajustada regulación de la VP, y por tanto el mínimo acceso de incluso moléculas pequeñas al cerebro desde la circulación. La capacidad de modular selectivamente y específicamente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica mediante la modulación de la VP de los vasos sanguíneos implicados permitirá la administración de fármacos que de otro modo no podrán pasar a través de la circulación al tejido cerebral.

De modo semejante, muchas patologías inducidas por la embolia y el heridas está instigado por el rápido incremento de la VP, y en consecuencia, la capacidad de modular la VP específicamente permitirá tratamientos nuevos y efectivos destinados a reducir los efectos negativos del infarto.

La terapia descrita en la presente memoria es efectiva en parte porque es altamente efectiva para la VP y no para otros procesos biológicos.

La presente invención se refiere, en parte, al descubrimiento de que la angiogénesis está mediada por la proteína tirosina quinasa Src, y que la angiogénesis se puede modular mediante la administración de proteínas Src activas o inactivas destinadas a potenciar o inhibir la angiogénesis, respectivamente.

Este descubrimiento es importante debido a la función que la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, tiene en una multiplicidad de procesos de enfermedad. Cuando el tejido asociado a una enfermedad necesita angiogénesis para el crecimiento del tejido, es deseable inhibir la angiogénesis y de este modo inhibir el crecimiento del tejido enfermo. Cuando el tejido dañado necesita angiogénesis para el crecimiento del tejido y la curación, es deseable potenciar o promover la angiogénesis y de este modo promover la curación del tejido y el crecimiento.



5 Cuando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es la causa de, o contribuye a, la patología asociada a un tejido enfermo, la inhibición de la angiogénesis reducirá los efectos dañinos del tejido. Mediante la inhibición de la angiogénesis, se puede intervenir en la enfermedad, reducir los síntomas y en algunos casos curar la enfermedad.

10 Los ejemplos de tejidos asociados a enfermedades y neovascularización que se beneficiarían de la modulación inhibitoria de la angiogénesis comprenden la artritis reumatoide, retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias, restenosis y semejantes. Cuando es necesario el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es necesario para apoyar el crecimiento de los tejidos nocivos, la inhibición de la angiogénesis reducirá el aporte sanguíneo a tejido y de este modo contribuirá a reducir la masa de tejido que depende del aporte sanguíneo. Los ejemplos comprenden el crecimiento de los tumores en los que la neovascularización es una necesidad continua para que el tumor crezca más allá de pocos milímetros de grosor y para el establecimiento de tumores sólidos y metástasis.

15 Cuando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos se cree que contribuye a curar un tejido, la potenciación de la angiogénesis asistirá en la curación. Los ejemplos comprenden el tratamiento de los pacientes con extremidades isquémicas en las que hay una circulación deficiente en la extremidad debida a diabetes u otros trastornos. También se contemplan pacientes con heridas crónicas que no se curan y por consiguiente podrían beneficiarse de un incremento en la proliferación de las células vasculares y en la neovascularización.

20 La terapia descrita en la presente memoria es efectiva en parte debido a que es muy selectiva para la angiogénesis y no para otros procesos biológicos.

25 Tal como se describió anteriormente, la angiogénesis comprende una multiplicidad de procesos que implican neovascularización del un tejido, lo que comprende brote, vasculogénesis, o agrandamiento de los vasos, estando todos estos procesos angiogénicos afectados por la proteína Src. Con excepción de la curación de las heridas traumáticas, la formación de corpus luteum y la embriogénesis, se cree que la mayoría de los procesos angiogénicos están asociados con procesos de enfermedad y por consiguiente la terapia descrita en la presente memoria es selectiva para la enfermedad y no tiene efectos secundarios negativos.

30 La presente invención se refiere también, en parte, al descubrimiento de que la pérdida vascular y/o el edema asociado al trauma, el incremento de la permeabilidad vascular relacionado con la enfermedad o la herida, se puede modular específicamente y reducir mediante la inhibición de la actividad tirosina quinasa de la familia Src. En particular, la presente invención se refiere al descubrimiento de que la administración *in vivo* de un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src disminuye el daño tisular debido a enfermedad- o al incremento en la permeabilidad vascular relacionado con las heridas, que no está asociado con el cáncer o la angiogénesis.

35 Mientras que la administración de un inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src modula el incremento de la VP inducido por VEGF, la inhibición específica de la actividad quinasa de la familia Src disminuye el daño al tejido circundante debido a la pérdida vascular y/o el edema, sin embargo, se activa la señal de quinasa de la familia Src.

40 La permeabilidad vascular está implicada en una multiplicidad de procesos de enfermedad independientemente de cualquier asociación directa con la angiogénesis. Por ejemplo, muchas patologías y daños inducidos por la apoplejía son consecuencia del rápido incremento en la VP debido al trauma de los vasos sanguíneos y por consiguiente la capacidad de modular específicamente la VP permitirá tratamientos nuevos y efectivos destinados a reducir los efectos negativos de la apoplejía.

45 Los ejemplos de tejidos asociados con enfermedad o daño inducido por pérdida vascular y/o edema que se beneficiarían de una modulación inhibitoria específica utilizando un inhibidor de la quinasa de la familia Src comprenden la artritis reumatoide, retinopatía diabética, enfermedad inflamatoria, restenosis y semejantes.

50 El trauma a la cabeza o espina dorsal y otros accidentes cerebrovasculares causados típicamente por eventos isquémicos o hemorrágicos, son una de las causas principales de trastornos neurológicos y daños relacionados. El edema cerebral o la pérdida vascular resultante de tales heridas, son patologías que amenazan la vida y producen daño sistémico y diseminado en el cerebro y la espina dorsal (sistema nervioso central; SNC) y la capacidad de modular específicamente los efectos perjudiciales en los tejidos debidos a la pérdida vascular y el edema en tales casos es de gran utilidad.

55 Las infecciones del SNC, meningitis, cerebritos, encefalitis, pueden producir patologías negativas que comprenden edema cerebral. El tratamiento de la infección subyacente se puede suplir con una terapia específica destinada a reducir la pérdida vascular o el edema.

60 Se ha publicado que la neutralización sistémica de la proteína VEGF utilizando una proteína de fusión receptor de VEGF-IgG reduce el tamaño del infarto después de una isquemia cerebral, este efecto se atribuyó a la reducción de la permeabilidad vascular mediada por VEGF. N. van Bruggen *et al.*, *J. Clin. Inves.* 104:1613-1620 (1999). Sin embargo, el VEGF no es el mediador crítico del incremento en la permeabilidad vascular que se ha descubierto que es Src.

Otras enfermedades o trastornos en los que está implicado el incremento en la permeabilidad vascular mediado por Src y son por consiguiente dianas adecuadas para el tratamiento mediante las composiciones de la presente invención pueden comprender: hemorragia cerebral, trauma cerebral y espinal, daño cerebral y espinal inducido por hipoxia, trastornos inflamatorios del SNC; infecciones víricas o bacterianas (por ejemplo, meningitis, encefalopatía VIH), trastornos autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple); enfermedades con un incremento crónico de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (por ejemplo, Morbos Alzheimer); como agente protector en los tratamientos quirúrgicos en los que se necesita una interrupción temporal de la perfusión u oxigenación del tejido; síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA); artritis reumatoide y retinopatía diabética.

C. Proteínas tirosina quinasa de la familia Src

Una proteína tirosina quinasa de utilización en la presente invención puede oscilar según la utilización que se pretende. Los términos "proteína Src" o "Src" se refieren colectivamente a las múltiples formas de la proteína tirosina quinasa Src descritas en la presente memoria, tanto en formas activas como en formas inactivas. Los términos "proteína Yes" o "Yes" se refieren colectivamente a las múltiples formas de la proteína tirosina quinasa Yes descritas en la presente memoria, tanto en formas activas como en formas inactivas. Además, en el contexto de la descripción, se hace también referencia a genes o secuencias genéticas de ácidos nucleicos que codifican Src o Yes. El término "familia Src" se refiere al grupo de tirosina quinasa que están relacionadas en función y secuencia de aminoácidos a Src.

Una "proteína Src activa" se refiere a una cualquiera de entre una multiplicidad de formas de proteína Src que potencia la angiogénesis o la VP. Una "proteína Yes activa" se refiere a una cualquiera de entre una multiplicidad de formas de proteína Yes que potencia VP. Los ensayos destinados a medir la potenciación de la angiogénesis o la VP se describen en la presente memoria, y no se consideran limitantes. Una proteína se considera activa si el nivel de angiogénesis o VP es por lo menos superior al 10% superior, preferentemente 25% o superior, y más preferentemente 50% o superior a un nivel control en el que no se añade proteína al sistema de ensayo.

El ensayo preferido para medir la potenciación de la angiogénesis es el ensayo CAM que utiliza vectores víricos RCAS tal como se describe en los Ejemplos en los que el índice de angiogénesis se calcula contando puntos de bifurcación.

Un ensayo preferido para la medición de la potenciación de VP es el ensayo de Miles utilizando colorante azul de Evan en ratones tal como se describe en los Ejemplos, en los que se mide VP mediante la cantidad de colorante azul de Evan que se escapa de los vasos sanguíneos.

Una proteína Src o Yes activa preferida muestra también actividad de tirosina quinasa. Las proteínas Src o Yes extremadamente activas se describen en los ejemplos e incluyen Src-A y Yes-1.

Una proteína "proteína Src inactiva" se refiere a una de entre una multiplicidad de formas de la proteína Src que inhibe la angiogénesis o VP. Una "proteína Yes inactiva" se refiere a una de entre una multiplicidad de formas de la proteína Yes que inhibe VP. Los ensayos para medir la inhibición del incremento de la VP se describen en la presente memoria, y no se deben considerar como limitativos. Una proteína Src se considera inactiva si el nivel de angiogénesis es por lo menos 10% inferior, preferentemente 25% inferior y más preferentemente 50% inferior que un nivel control en el que no se ha añadido Src exógeno al sistema de ensayo.

Una proteína Src o Yes se considera inactiva si el nivel de VP es por lo menos el mismo que, o 10% inferior, preferentemente 25% inferior y más preferentemente 50% inferior que un nivel control en el que no se ha añadido Src o Yes exógeno al sistema de ensayo.

Un ensayo preferido destinado a medir la inhibición de la angiogénesis es el ensayo CAM que utiliza vectores víricos RCAS tal como se describe en los Ejemplos en los que el índice de angiogénesis se calculó contando puntos de bifurcación.

Un ensayo preferido para medir la inhibición de VP es el ensayo de Miles utilizando colorante azul de Evan en ratones tal como se describe en los Ejemplos, en el que se mide VP por la cantidad de colorante azul de Evan que se escapa de los vasos sanguíneos.

Una proteína Src o Yes inactiva preferida muestra también una actividad tirosina quinasa reducida. Las proteínas Src inactivas ejemplares se describen en los Ejemplos e incluyen Src-251 y Src K295M.

Una proteína Src de utilidad en la presente invención se puede producir mediante una multiplicidad de procedimientos que comprenden el aislamiento de una fuente natural que comprende tejido, producción mediante expresión de ADN recombinante y purificación y semejantes.

Un gen que codifica una proteína Src o Yes se puede preparar mediante una multiplicidad de procedimientos

conocidos en la materia y la invención no se debe considerar como limitativa en este aspecto. Por ejemplo, es bien conocido que la historia natural de Src comprende una multiplicidad de homólogos de especies mamíferas, aves, víricas y semejantes y el gen se puede clonar fácilmente utilizando procedimientos de clonación de ADNc, a partir de cualquier tejido que exprese la proteína. Una Src preferida para utilización en la presente invención es una proteína celular, tal como los homólogos mamíferos o de aves referidos como c-Src. La c-Src humana es particularmente preferida. Una Yes preferida para utilización en la presente invención es una proteína celular humana, c-Yes. La c-Yes-1 humana que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Fig. 11 es particularmente preferida. La proteína Yes-1 de la Fig. 11 está codificada en el segmento de secuencia de ácido nucleí mostrado en la Fig. 12 y se identifica como el segmento del dominio codificante.

#### D. Moléculas de ADN recombinante y sistemas de expresión para la expresión de las proteínas Src o Yes

Es descrita en la presente memoria una multiplicidad de secuencias de nucleótidos que puede ser utilizada para expresar la proteína Src o Yes. Estas secuencias comprenden secuencias que codifican una proteína Src de utilidad en la presente invención y múltiples segmentos de ADN, moléculas de ADN (ADNr) recombinante y vectores contruidos para la expresión de proteína Src. Estas secuencias también comprenden secuencias que codifican una proteína Yes de utilidad en la presente invención y múltiples segmentos de ADN, moléculas de ADN recombinante (ADNr) y vectores contruidos para la expresión de proteína Yes.

Las moléculas de ADN (segmentos) pueden por consiguiente comprender secuencias que codifican genes estructurales completos, fragmentos de genes estructurales o combinaciones de genes y unidades de transcripción tal como se describe a continuación en la presente memoria.

Un segmento de ADN preferido es una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Src o Yes o las dos tal como se definen en la presente memoria o fragmentos biológicamente activos de las mismas.

La secuencia de residuos de aminoácido y la secuencia de nucleótidos de las Src y Yes preferidas se describe en los Ejemplos.

Un segmento de ADN preferido codifica una secuencia de residuos de aminoácido sustancialmente igual a, y preferentemente comprendiendo esencialmente una secuencia de residuos de aminoácido o parte de la misma correspondiente a una proteína Src o Yes descrita en la presente memoria. Los segmentos representativos y preferidos de ADN se describen adicionalmente en los Ejemplos.

La secuencia de residuos de aminoácidos de una proteína o polipéptido está directamente relacionada, a través del código genético, a la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) del gen estructural que codifica la proteína. Así, un gen estructural o un segmento de ADN se puede definir en términos de la secuencia de residuos de aminoácido, es decir, proteína o polipéptido, que codifica.

Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia. Es decir, por la mayoría de los aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas, más de un triplete de nucleótidos codificante (codon) puede codificar o designar un residuo de aminoácido en particular. Por consiguiente, una multiplicidad de diferentes secuencias de nucleótidos puede codificar una secuencia de residuos de aminoácido particular. Tales secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes ya que pueden resultar en la producción de la misma secuencia de residuos de aminoácido en todos los organismos. Ocasionalmente, se puede incorporar en una secuencia determinada de nucleótidos una variante metilada de purina o pirimidina. Sin embargo, dicha metilación no afecta la codificación en modo alguno.

Un ácido nucleico es un polinucleótido cualquiera o fragmento de ácido nucleico, ya sea un polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, es decir, ARN o ADN, o análogo de los mismos. En una forma de realización preferida, una molécula de ácido nucleico se encuentra en forma de un segmento doble de ADN, es decir un segmento de ADN, aunque para ciertas metodologías de biología molecular es preferido el ADN o ARN de cadena simple.

Los segmentos de ADN se producen mediante múltiples procedimientos que comprenden procedimientos de química sintética y estrategias recombinantes, preferentemente mediante clonación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los segmentos de ADN que codifican partes de una proteína Src se pueden sintetizar fácilmente mediante procedimientos químicos, por ejemplo, el procedimiento de fosfodiéster de Matteucci *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185-3191 (1981) o mediante procedimientos de síntesis automatizados. Además, los segmentos de ADN mayores se pueden preparar fácilmente mediante procedimientos bien conocidos, tales como la síntesis de un grupo de oligonucleótidos que definen el segmento de ADN, seguido de la hibridación y ligación de los oligonucleótidos con el fin de construir el segmento completo. Los procedimientos alternativos comprenden el aislamiento del segmento preferido de ADN mediante PCR utilizando un par de oligonucleótidos cebadores sobre una genoteca de ADNc que se considera contiene miembros que codifican la proteína Src.

Desde luego, mediante síntesis química se puede realizar cualquier modificación simplemente sustituyendo las bases adecuadas por las que codifican la secuencia nativa de residuos de aminoácido. Este procedimiento es bien

conocido y se puede aplicar con facilidad a la producción de las múltiples diferentes proteínas Src “modificadas” descritas en la presente memoria.

5 Además, los segmentos de ADN que comprenden esencialmente genes estructurales que codifican una proteína Src o Yes se pueden modificar a continuación, por mutagénesis dirigida o al azar, con el fin de introducir cualquier sustitución deseada.

1. Clonando un gen Src o Yes

10 Un gen Src o Yes se puede clonar a partir de una fuente adecuada de ADN genómico o ARN mensajero (ARNm) mediante una multiplicidad de procedimientos bioquímicos. La clonación de estos genes se puede realizar según los procedimientos generales descritos en los Ejemplos y conocidos en la materia.

15 Las fuentes de ácidos nucleicos para la clonación de un gen Src o Yes pueden comprender ADN genómico o ARN mensajero (ARNm) en forma de una librería de ADNc, a partir de un tejido que se cree expresa dichas proteínas. Un tejido preferido es el tejido de pulmón humano, aunque se puede utilizar cualquier otro tejido adecuado.

20 Un procedimiento preferido de clonación implica la preparación de una librería de ADNc utilizando procedimientos estándar y el aislamiento de la secuencia de nucleótidos que codifica Src o Yes mediante amplificación por PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos apareados basados en la secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención. Por el contrario, los clones de ADNc deseados se pueden identificar y aislar de la librería de ADNc o genómica mediante procedimientos convencionales de hibridación de ácidos nucleicos utilizando una sonda de hibridación a base de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria. Otros procedimientos de aislamiento y clonación de los ácidos nucleicos que codifican Src o Yes son fácilmente aparentes a los expertos en la materia.

2. Transferencia génica y/o vectores de expresión

30 Es descrita en la presente memoria una molécula de ADN recombinante (ADNr) que comprende un segmento de ADN que codifica una proteína Src o Yes, o las dos. Un ADNr expresable se puede producir mediante la unión funcional (en el registro, expresable) de un vector a un segmento de ADN que codifican Src o Yes. Por consiguiente, una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN híbrida que comprende por lo menos dos ácidos nucleicos con secuencias de nucleótidos no encontradas juntas normalmente en la naturaleza.

35 La selección del vector al que se une funcionalmente el segmento de ADN depende directamente, como es bien conocido en la materia, de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, expresión de proteína y las células huésped que se deberán transformar. Consideraciones típicas en la técnica de la construcción de moléculas de ADN recombinante. Un vector puede por lo menos dirigir la replicación y preferentemente también la expresión, de un gen estructural comprendido en los segmentos de ADN del vector, al que se encuentra funcionalmente unido.

40 Cuando un vector de expresión comprende tanto una secuencia de ácido nucleico de Src como de Yes expresables, los dos genes se pueden regular mediante los mismos elementos reguladores corriente arriba del primer gen, o cada uno se puede regular individualmente por elementos reguladores diferentes.

45 Tanto los vectores de expresión procariótica como eucariótica son familiares para los expertos en la materia de la construcción de vectores y han sido descritos por Ausebel *et al.*, en *Current Protocols In Molecular Biology*, Wiley and Sons, New York (1993) y por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989). Estas referencias también describen muchos de los procedimientos de ADN recombinante a los que se hace referencia en la presente memoria.

50 En una forma de realización, un vector comprende un replicón procariótico, es decir, una secuencia de ADN con la capacidad de dirigir replicación autónoma y el mantenimiento extracromosómico de la molécula de ADN recombinante en una célula huésped procariótica, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con éste. Tales replicones son bien conocidos en la materia. Además, estas formas de realización que comprenden replicones procarióticos comprenden también un gen cuya expresión proporciona resistencia a fármacos al huésped bacteriano transformado con éstos. Los genes bacterianos típicos de resistencia a fármacos comprenden los que confieren resistencia a la ampicilina o tetraciclina.

60 Los vectores que comprenden un replicón procariótico también pueden comprender un promotor procariótico que puede dirigir la expresión (transcripción y translación) de un gen estructural en una célula huésped bacteriana, tal como *E. coli*. transformada con éstos. Un promotor es una elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de ARN polimerasa y que tenga lugar la transcripción. Las secuencias de promotores compatibles con los huéspedes bacterianos se administran típicamente en vectores de plásmido que comprenden lugares de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN. Típicos de tales vectores de plásmido son pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 disponibles de Biorad Laboratories (Richmond, CA), pRSET disponible de Invitrogen (San Diego, CA) y pPL y pKK223 disponibles de Pharmacia (Piscataway, N.J.).

Los vectores de expresión compatibles con las células eucarióticas, preferentemente los compatibles con las células de vertebrados, se pueden utilizar también con el fin de formar moléculas de ADN recombinante. Los vectores de expresión eucariótica son bien conocidos en la materia y se encuentran disponibles de una multiplicidad de fuentes comerciales. Típicamente, tales vectores se proporcionan con lugares de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Entre tales vectores son típicos pSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, #31255), pRc/CMV (Invitrogen, Inc.), el vector preferido descrito en los Ejemplos y los vectores de expresión eucariótica similares.

Un sistema de expresión génica preferido comprende un componente para la administración de genes, es decir, la capacidad de administrar genes al tejido de interés. Los vectores adecuados son vectores "infecciosos" tales como los virus de ADN recombinante, vectores adenovíricos o vectores retrovíricos que están diseñados con el fin de expresar la proteína deseada y tiene características que permiten la infección de tejidos diana preseleccionados. La aplicación de virus del sarcoma aviar competente en replicación (RCAS) descrito en la presente memoria es particularmente preferida.

Se pueden diseñar sistemas celulares de mamífero que utilizan virus recombinantes o elementos víricos con el fin de dirigir la expresión. Por ejemplo, cuando se utilizan vectores de expresión adenovíricos, la secuencia codificante de un polipéptido se puede ligar a un complejo de control de la transcripción/traslación adenovírico, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia directora tripartita. Este gen quimérico se puede insertar a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma del virus (por ejemplo, la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante viable que puede expresar el polipéptido en el huésped infectado (por ejemplo, ver Logan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3655-3659 (1984)). Por el contrario, el promotor de 7,5K del virus vaccinia, (por ejemplo, ver Mackett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7415-7419 (1982); Mackett *et al.*, *J. Virol.*, 49:857-864 (1984); Panicali *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4927-4931 (1982)). De particular interés son los vectores a base de virus de papiloma bovino que tiene la capacidad de replicarse como un elemento extracromosómico (Sarver *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1:486 (1981)). Poco después de la entrada de este ADN en las células diana, el plásmido se replica produciendo hasta entre 100 y 200 copias por célula. La transcripción del ADNc insertado no necesita la integración del plásmido en el cromosoma del huésped, produciendo así un nivel elevado de expresión. Mediante la inclusión de un marcador seleccionable, tal como el gen neo, en el plásmido se pueden utilizar estos vectores para expresar establemente. Por el contrario, se puede modificar el genoma retrovírico con el fin de utilizarlo como un vector que puede introducir y dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en las células huésped (Cone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:6349-6353 (1984)). También se puede alcanzar un elevado nivel de expresión utilizando promotores inducibles, que comprenden, sin quedar limitado a ellos, el promotor de la metalotionina IIA y el promotor de choque térmico.

Recientemente, se ha estudiado la supervivencia a largo plazo en estudios de terapia génica en animales desnudos portadores de cáncer de ovario humano comparando el promotor de citomegalovirus (CMV) con el del sarcoma de Rous (RSV) controlando la timidina quinasa (TK). La eficacia en matar células de la terapia génica mediada por adenovirus con el gen TK del virus herpes simples dirigido por el promotor CMV se descubrió que resultó entre 2 y 10 veces más eficaz que la terapia controlada por RSV (Tong *et al.*, *Hybridoma*, 18(1):93-97 (1999)). También se ha descrito el diseño de promotores quiméricos para las aplicaciones de terapia génica, que necesitan niveles de expresión bajos seguido de una expresión inducible a nivel elevado (Suzuki *et al.*, *Human Gene Therapy*, 7:1883-1893).

Para la producción a largo plazo y nivel elevado de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. En lugar de utilizar vectores de expresión que comprenden orígenes de replicación víricos, las células huésped se pueden transformar con un ADNc controlado mediante los elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, secuencias promotoras y amplificadoras, terminadores de la transcripción, lugares de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tal como se mencionó anteriormente, el marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren el plásmido establemente en sus cromosomas y crezca formando colonias que a su vez se pueden clonar y expandir en líneas celulares.

Por ejemplo, después de la introducción de un ADN foráneo, se puede permitir que las células modificadas crezcan durante entre 1 y 2 días en un medio enriquecido y a continuación cambiarlas a un medio selectivo. Se puede utilizar una multiplicidad de sistemas de selección, que comprenden, aunque no son limitantes, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simples (Wigler *et al.*, *Cell*, 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa [Szybalska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 48:2026 (1962)] y adenina fosforibosiltransferasa [Lowy *et al.*, *Cell*, 22:817 (1980)], que se pueden utilizar en células tk<sup>-</sup>, hgprt<sup>-</sup> o aprt<sup>-</sup> respectivamente. También se pueden utilizar genes que confieren resistencia a antimetabolitos como la base de la selección; por ejemplo los genes dhfr, que confieren resistencia al metotrexato [Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:3567 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78:1527 (1981); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico [Mulligan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78:2072 (1981); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981) e hgro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, *Gene*, 30:147 (1984)]. Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, es decir trpB, que permite a las células utilizar

indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina [Hartman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:804 (1988)]; y ODC (ornitín decarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitín decarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO [McConlogue L., en *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed., (1987)].

Los principales vectores contemplados en la terapia génica humana son derivados de origen retroviral. [Wilson, *Clin. Exp. Immunol.*, 107(Sup.1):31-32 (1997); Bank *et al.*, *Bioessays*, 18(12):999-1007 (1996); Robbins *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 80(1):35-47 (1998)]. El potencial terapéutico de la transferencia génica y la terapia antisentido ha estimulado el desarrollo de muchos sistemas de vectores destinados a tratar múltiples tejidos [sistema vascular, Stephan *et al.*, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 11(2):97-110 (1997), Feldman *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 35(3):391-404 (1997); Feldman *et al.*, *Cardiovas. Res.*, 35(3):391-404 (1997); Vassalli *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 35(3):459-69 (1997); Baek *et al.*, *Circ. Res.*, 82(3):295-305 (1998); kidney, Lien *et al.*, *Kidney Inte. Suppl.*, 61:S85-8 (1997); liver, Ferry *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(14):1975-81 (1998); muscle, Marshall *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8(3):360-5 (1998)]. Además de estos tejidos, una diana crítica en la terapia génica humana es el cáncer, como tumor propiamente, o tejido asociado [Runnebaum, *Anticancer Res.*, 17(4B):2887-90 (1997); Spear *et al.*, *J. Neurovirol.*, 4(2):133-47 (1998)].

Los ejemplos específicos de sistemas de vectores para terapia génica vírica se describen a continuación. La administración de genes mediante retrovirus ha sido revisada recientemente por Federspiel y Hughes [*Methods in Cell Biol.*, 52:179-214 (1998)] que describe en particular la familia retroviral del virus de leucosis aviar (ALV) [Federspiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:4931 (1996); Federspiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:11241 (1994)]. Svoboda [Gene, 206:153-163 (1998)] describe vectores retrovirales, que comprenden ALV y el virus de la leucemia murina (MLV).

Los sistemas de expresión con retrovirus/adenovirus modificados se pueden adaptar fácilmente. Por ejemplo, los sistemas de virus de la leucemia murina (MLV) han sido revisados por Karavanas *et al.*, *Crit. Rev. In Oncology/Hematology*, 28:7-30 (1998). Los sistemas de expresión de adenovirus han sido revisados por Von Seggern y Nemerow en *Gene Expression Systems* (ed. Fernandez & Hoeffler, Academic Press, San Diego, CA, 1999, Cap.5, pp 112-157).

Se ha demostrado que los sistemas de expresión de proteínas tienen una utilización efectiva tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, se ha descrito la eficiente transferencia génica a los carcinomas de célula escamosa humanos mediante el vector de amplicon de virus del herpes simple (HSV) tipo 1, [Carew *et al.*, *Am. J. Surg.*, 176:404-408 (1998)]. El virus del herpes simplex ha sido utilizado en la transferencia génica al sistema nervioso [Goins, *et al.*, *J. Neurovirol.*, 3 (sup.1):S80-8 (1997)]. Se han ensayado vectores suicidas dirigidos utilizando HSV-TK en tumores sólidos [Smiley *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 8(8):965-77 (1997)]. El vector de virus herpes simple tipo 1 ha sido utilizado en la terapia génica del cáncer en células de carcinoma de colon [Yoon *et al.*, *Ann. Surg.*, 228(3):366-74 (1998)]. Se han desarrollado vectores híbridos con el fin de extender la duración del tiempo de transfección, comprendiendo HSV/AAV (virus adeno asociado) para el tratamiento de los hepatocitos [Fraefel *et al.*, *Mol. Med.*, 3(12):813-825 (1997)].

El virus vaccinia ha sido desarrollado para la terapia génica humana debido a que tiene un genoma grande [Peplinski *et al.*, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 7(3):575-88 (1998)]. Se ha descrito un virus de vaccinia sin timidina quinasa que expresa purinnucleósido pirofosforilasa para ser utilizado como un vector de terapia génica dirigido a tumores [Puhlman *et al.*, *Human. Gene Therapv.*, 10:649-657 (1999)].

Se ha descrito el virus adenoasociado 2 (AAV) para ser utilizado en la terapia génica humana, sin embargo AAV necesita un virus de apoyo (tal como un adenovirus o un virus de herpes) para que se replique y empaquete óptimamente en las células de mamífero [Snoeck *et al.*, *Exp. Nephrol.*, 5(6):514-20 (1997); Rabinowitz *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):470-5 (1998)] Sin embargo, se ha descrito el empaquetamiento *in vitro* de un AAV recombinante infeccioso, haciendo que este sistema sea mucho más prometedor [Ding *et al.*, *Gene Therapy*, 4:1167-1172 (1997)]. Se ha demostrado que la transferencia de ADNc de receptor ecotrópico del retrovirus mediada por el AAV permite la transducción ecotrópica retroviral de células humanas primarias y establecidas [Qing *et al.*, *J. Virolgoy*, 71(7):5663-5667 (1997)]. Se ha demostrado la terapia génica del cáncer utilizando un vector AAV que expresa p53 tipo silvestre humano [Qazilbash *et al.*, *Gene Therapy*, 4:675-682 (1997)]. También se ha demostrado la transferencia génica en células vasculares utilizando vectores AAV [Maeda *et al.*, *Cardiovascular Res.*, 35:514-521 (1997)]. Se ha demostrado que AAV es un vector adecuado para la terapia génica dirigida al hígado [Xiao *et al.*, *J. Virol.* 72(12):10222-6 (1998)]. La utilización de vectores AAV se ha demostrado en la terapia génica del tejido cerebral y del sistema nervioso central [Chamberlin *et al.*, *Brain Res.*, 793(1-2):167-75 (1998); During *et al.*, *Gene Therapy*, 5(6):820-7(1998)]. También se han comparado los vectores AAV con los vectores de adenovirus (AdV) en la terapia génica del pulmón y la transferencia a las células epiteliales fe la fibrosis quística [Teramoto *et al.*, *J. Virol.* 72(11):8904-12 (1998)]

Sistemas de vectores quiméricos Adv/retrovirales de terapia génica que incorporan las cualidades útiles de cada uno de los virus con el fin de crear un AdV no integrativo que resulta funcionalmente integrativo mediante la generación intermedia de una célula productora de retrovirus [Feng *et al.*, *Nat. Biotechnology* 15(9):866-70 (1997); Bilbao *et al.*,

FASEB J., 11(8):624-34 (1997)]. Esta poderosa nueva generación de vectores de terapia génica se ha adaptado a la terapia génica dirigida al cáncer [Bilbao *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 451:365-74 (1998)]. Una sola inyección de AdV que expresa p53 inhibió el crecimiento de nódulos tumorales subcutáneos de células de cáncer de próstata [Asgari *et al.*, *Int. J. Cancer*, 71(3):377-82 (1997)]. Se ha descrito la transferencia génica mediada por AdV del tipo silvestre de p53 en pacientes con carcinoma de pulmón de célula pequeña avanzado [Schuler *et al.*, *Human Gene Therapy*, 9:2075-2082 (1998)]. El mismo cáncer ha sido el sujeto de terapia sustitutiva del gen p53 mediada por vectores AdV [Roth *et al.*, *Semin. Oncol.*, 25(3 Suppl. 8):33-7 (1998)]. También se ha descrito que la transferencia génica de p53 mediada por AdV inhibe la diferenciación de las células endoteliales y la angiogénesis *in vivo* [Riccioni *et al.*, *Gene Ther.*, 5(6):747-54 (1998)]. También se ha descrito la expresión del antígeno de melanoma gp75 mediada por adenovirus como inmunoterapia contra el melanoma metastático [Hirschowitz *et al.*, *Gene Therapy*, 5:975-983 (1998)]. Los AdV facilitan la infección de las células humanas con retrovirus ecotrópicos e incrementa la eficacia de la infección con retrovirus [Scott-Taylor *et al.*, *Gene Ther.*, 5(5):621-9 (1998)]. Los vectores AdV se han utilizado en la transferencia de genes a las células musculares lisas vasculares [Li *et al.*, *Chin. Med. J. (Engl.)*, 110(12):950-4 (1997), a células de carcinoma de célula escamosa [Goebel *et al.*, *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 119(4):331-6 (1998), células de cáncer de esófago [Senmaru *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(3):366-71 (1998), células mesagiales [Nahman *et al.*, *J. Investig. Med.* 46(5):204-9 (1998), células gliales [Chen *et al.*, *Cancer Res.*, 58(16):3504-7 (1998)] y a las articulaciones de los animales [Ikeda *et al.*, *J. Rheumatol.*, 25(9):1666-73 (1998)]. Más recientemente, se ha demostrado transferencia génica pericardial mediada por AcV a base de catéter [March *et al.*, *Clin. Cardiol.*, 22(1 suppl. 1):123-9 (1999)]. La manipulación del sistema AdV con los elementos genéticos de control adecuados permite la expresión génica *in vivo* en diana regulable mediada por AdV [Burcin *et al.*, *PNAS (USA)*, 96(2):355-60 (1999)].

Se han desarrollado vectores de alfavirus para aplicaciones de terapia génica humana, con líneas celulares empaquetadoras adecuadas para la transformación con casetes de expresión adecuados para la utilización con vectores derivados de virus Sindbis y virus Semliki Forest [Polo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:4598-4603 (1999)]. También se han desarrollado sistemas a base de replicones de ARN de flavivirus nocitopáticos [Varnavski *et al.*, *Virology* 255(2):366-75 (1999)] Se han utilizado vectores de virus sinbis con el gen suicida HSIV-TK para dirigir específicamente a células tumorales [Iijima *et al.*, *Int. J. Cancer*, 80(1):110-8 (1998)].

Los vectores retrovirales a base de virus espumoso humano (HFV) también son prometedores como vectores de terapia génica [Trobridge *et al.*, *Human Gene Therapy*, 9:2517-2525 (1998)]. Se han diseñado vectores de virus espumoso para terapia génica suicida [Nestler *et al.*, *Gene Ther.*, 4(11):1270-7 (1997)]. También se han utilizado citomegalovirus murino recombinante y sistemas de promotores como vectores de elevado nivel de expresión [Manning *et al.*, *J. Virol. Meth.*, 73(1):31-9 (1998); Tong *et al.*, *Hybridoma*, 18(1):93-7 (1998)].

Se ha posibilitado la administración de genes a células no replicantes mediante la generación de vectores a base de virus Sendai [Nakanishi *et al.*, *J. Controlled Release*, 54(1):61-8 (1998)].

En otros esfuerzos para permitir la transformación de células somáticas no replicantes, se han explorado los vectores lentivíricos. Se ha descrito la terapia génica de la fibrosis quística utilizando vectores basados en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) deficientes en la replicación [Goldman *et al.*, *Human Gene Therapy*, 8:2261-2268 (1997)]. También se ha demostrado la expresión sostenida de genes administrados en el hígado y músculo mediante vectores lentivíricos [Kafri *et al.*, *Nat. Genet.*, 17(3):314-7 (1997)]. Sin embargo, la preocupación por la seguridad predomina y el desarrollo de vectores mejorados procede rápidamente [Kim *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):994-1004 (1998)]. El examen del LTR de VIH y Tat produjo información importante sobre la organización del genoma para el desarrollo de vectores [Sadaie *et al.*, *J. Med. Virol.*, 54(2):118-28 (1998)]. Por consiguiente en la actualidad se conocen mejor los requerimientos genéticos para un vector efectivo a base de VIH [Gasmi *et al.*, *J. Virol.*, 73(3):1828-34 (1999)]. Se han descrito vectores autoinactivantes, o las líneas celulares empaquetadoras condicionales [por ejemplo Zuffery *et al.*, *J. Virol.*, 72(12):9873-80 (1998); Miyoshi *et al.*, *J. Virol.*, 72(10):8150-7 (1998); Dull *et al.*, *J. Virol.*, 72(11):8463-71 (1998) y Kaul *et al.*, *Virology*, 249(1):167-74 (1998)]. Se ha demostrado la eficaz transducción de linfocitos humanos y células CD34+ por vectores VIH [Douglas *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6):935-45 (1999); Miyoshi *et al.*, *Science* 283(5402):682-6 (1999)]. Se ha descrito la transducción eficiente de células humanas no replicantes mediante vectores lentivíricos de la inmunodeficiencia felina (FIV), que minimizan las preocupaciones sobre la seguridad en la utilización de vectores a base de VIH [Poeschla *et al.*, *Nature Medicine*, 4(3):354-357 (1998)]. Se ha demostrado la infección productiva de las células mononucleares de la sangre humana mediante los vectores FIV [Johnston *et al.*, *J. Virol.*, 73(3):2491-8 (1999)].

Mientras que los vectores son difíciles de manejar y su capacidad para insertar ADN es limitada, estas limitaciones y desventajas se han afrontado. Por ejemplo, además de las líneas celulares empaquetadoras de virus simplificadas, se han desarrollado vectores Minivíricos, derivados del virus del herpes humano, virus herpes símples tipo 1 (HSV-1) y del virus Epstein-Barr (EBF) con el fin de simplificar la manipulación del material genético y generar vectores víricos [Wang *et al.*, *J. Virology*, 70(12):8422-8430 (1996)]. Se han demostrado anteriormente plásmidos adaptadores destinados a simplificar la inserción de ADN foráneo en los vectores retrovirales independientes de ayudantes [*J. Virology* 61(10):3004-3012 (1987)].

Los vectores víricos no son los únicos medios para efectuar la terapia génica, ya que se han descrito múltiples vectores no víricos. Se ha demostrado que un vector dirigido no vírico de administración de genes a base de la

utilización de un poliplex de Factor de Crecimiento Epidémico/ADN (EGF/DNA) produce administración de genes eficiente y específica [Cristiano, *Anticancer Res.*, 18:3241-3246 (1998)]. Se ha demostrado terapia génica del sistema vascular y del SNC utilizando liposomas catiónicos [Yang *et al.*, *J. Neurotrauma*, 14(5):281-97 (1997)]. También se ha logrado terapia génica transitoria de la pancreatitis utilizando liposomas catiónicos [Denham *et al.*, *Ann. Surg.*, 227(6):812-20 (1998)]. Se ha demostrado la efectividad de un complejo de vector/ADN a base de quitosano destinado a la administración de genes [Erbacher *et al.*, *Pharm. Res.*, 15(9):1332-9 (1998)]. Se ha descrito un vector no vírico para la administración de ADN a base de un sistema terplex [Kim *et al.*, 53(1-3):175-82 (1998)]. Se han utilizado complejos de liposomas recubiertos de partículas víricas con el fin de efectuar transferencia génica [Hirai *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241(1):112-8 (1997)].

Se ha demostrado la terapia génica mediante la inyección directa en el tumor de vectores T7 no víricos codificantes del gen de la timidina quinasa [Chen *et al.*, *Human Gene Therapy*, 9:729-736 (1998)]. La preparación de ADN de plásmido es importante para la transferencia génica mediante inyección directa [Horn *et al.*, *Hum. Gen Ther.*, 6(5):656-73 (1995)]. Se han adaptado vectores plasmídicos modificados específicamente para la inyección directa [Hartikka *et al.*, *Hum. Gene Therapy*, 7(10):1205-17 (1996)].

Así, en la materia es conocida una amplia multiplicidad de vectores de transferencia génica/terapia génica y construcciones. Mediante la adecuada manipulación, utilizando procedimientos de ADN recombinante/biología molecular, con el fin de insertar Src o Yes, o los dos, funcionalmente unidos (tanto activos como inactivos) al vector de expresión/administración seleccionado, se pueden generar múltiples vectores equivalentes.

#### E. Modulación de la permeabilidad vascular (VP)

La presente invención proporciona una composición para su utilización en un procedimiento para la modulación de la permeabilidad vascular (VP) de los vasos sanguíneos en un tejido asociado con un proceso de enfermedad o trastorno y de este modo efectúa los eventos en el tejido que depende de VP. Generalmente, el procedimiento comprende administrar al tejido, asociado con un proceso de enfermedad o trastorno, una composición que comprende una cantidad moduladora de VP de una proteína Yes o ambas proteínas Yes y Src.

Tal como se describe en la presente memoria, uno cualquiera de entre una multiplicidad de tejidos u órganos que comprenden tejidos organizados, pueden ser un lugar de VP en estados de enfermedad que comprenden cerebro, piel, músculo, intestino, tejido conectivo, articulaciones, huesos y similares en los que se encuentran vasos sanguíneos.

El paciente tratado en la presente invención en sus múltiples formas de realización es deseablemente un paciente humano, aunque se entiende que los principios de la presente invención indican que la invención es efectiva en todos los mamíferos, que se pretende sean incluidos en el término "paciente". En este contexto, se entiende que mamífero comprende cualquier especie en la que sea deseable el tratamiento del tejido asociado con enfermedades que implican angiogénesis, particularmente especies mamíferas agrícolas y domésticas.

Así, el procedimiento comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición fisiológicamente tolerable que contiene una proteína Yes, o ambas proteínas Yes y Src.

Los intervalos de dosificación para la administración de una proteína Src o Yes dependen de la forma de la proteína, y su potencia, como se describe adicionalmente en la presente memoria, y son cantidades suficientemente grandes para producir el efecto deseado en las que la VP y los síntomas patológicos mediados por la VP son mejorados. La dosificación no debería ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardiaca congestiva, y similares. Generalmente, la dosificación puede variar con la edad, estado, sexo y alcance de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por un experto en la materia. La dosificación se puede ajustar también mediante el médico particular en caso de complicación.

Una cantidad terapéuticamente efectiva moduladora de VP es la cantidad de proteína Src o Yes o una mezcla de las mismas, suficiente para producir una modulación medible de VP en el tejido que se está tratando, es decir, una cantidad moduladora de VP. La modulación de VP se puede medir mediante ensayos tal como se describe en la presente memoria o mediante otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. La modulación de VP se puede medir mediante el ensayo de Miller, tal como se describe en la presente memoria o mediante otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

La proteína Src o Yes se puede administrar parenteralmente mediante inyección o mediante una infusión gradual durante el tiempo. Aunque se puede acceder al tejido que se debe tratar en el cuerpo mediante administración sistémica y por consiguiente frecuentemente se trata mediante la administración intravenosa de las composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de administración cuando existe la posibilidad de que el tejido a que se dirige contenga la molécula a la que se dirige. Por consiguiente, las composiciones de la presente invención se pueden administrar intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracavidad, transdermalmente y se pueden administrar mediante medios peristálticos.



- 5 Las composiciones terapéuticas que contienen una proteína Src o Yes se pueden administrar convencionalmente intravenosamente, mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término "dosis unitaria" cuando se utiliza en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente necesario; es decir, vehículo o vehículos.
- 10 En una forma de realización preferida el reactivo se administra en una dosis única intravenosamente. La administración localizada se puede lograr mediante la inyección directa o aprovechando compartimentos anatómicos aislados, aislando la microcirculación de sistemas de órganos diana, reperfusión en un sistema circulante o la oclusión temporal basada en catéter de las regiones diana del sistema vascular asociado al tejido enfermo.
- 15 Las composiciones se administran de un modo compatible con las formulaciones de dosis y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad que se debe administrar y el programa dependen del sujeto que se debe tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo que se necesita administrar dependen del criterio del médico y son características de cada individuo. Sin embargo, en la presente memoria se dan a conocer los ámbitos de dosis adecuados para las aplicaciones sistémicas y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados de administración también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una ó más horas por inyección u otra forma de administración. Por el contrario, se contempla una infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la sangre dentro de los rangos especificados para las terapias *in vivo*.
- 20 Existe una multiplicidad de enfermedades en las que la inhibición de la angiogénesis se cree que es importante, a las que se hace referencia como enfermedades angiogénicas, que comprenden aunque sin resultar limitativo, los trastornos inflamatorios tales como la inflamación inmune y no inmune, el reumatismo articular crónico y la psoriasis, los trastornos asociados a la invasión oportuna o inoportuna de los vasos sanguíneos tales como la retinopatía diabética, el glaucoma neovascular, la restenosis, proliferación capilar en la placa aterosclerótica y osteoporosis y los trastornos asociados al cáncer, tales como los tumores sólidos, metástasis de los tumores sólidos, angiofibromas, fibroplasia retrolental, hemangiomas, sarcoma de Kaposi y cánceres semejantes que necesitan de la neovascularización para apoyar el crecimiento tumoral.
- 25 De manera similar, la permeabilidad vascular es un componente importante de la angiogénesis, por méritos propios asociada a patologías nocivas. Por ejemplo el daño debido a la permeabilidad vascular inducida por la apoplejía dispara el daño relacionado a la inflamación.
- 30 Así, los procedimientos que inhiben la permeabilidad vascular en los tejidos asociados a una enfermedad reducen los síntomas de la enfermedad y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a curar la enfermedad. En una forma de realización, la presente invención contempla la inhibición de la permeabilidad vascular, en sí, en un tejido asociado a una enfermedad. En una forma de realización, la presente invención contempla la inhibición de la permeabilidad vascular, en sí, en un tejido asociado al trastorno. La extensión de la permeabilidad vascular en el tejido y por consiguiente la extensión de la inhibición lograda se puede valorar mediante múltiples procedimientos.
- 35 Así, en una forma de realización relacionada, un tejido que se debe tratar es un tejido inflamado y la permeabilidad que se debe inhibir es debida a la estimulación por VEGF. En esta clase el procedimiento contempla la inhibición de VP en un tejido artrítico, tal como en un paciente con reumatismo articular crónico, en tejidos inmunes o no inmunes inflamados, en tejido psoriático y semejantes.
- 40 En otra forma de realización relacionada, el tejido que se debe tratar es un tejido retiniano de un paciente con una enfermedad retiniana tal como retinopatía diabética, degeneración macular o glaucoma neovascular y la VP que se debe inhibir es la VP del tejido retiniano en el que hay neovascularización del tejido retiniano.
- 45 Los procedimientos son también particularmente efectivos contra la formación de metástasis porque (1) su formación necesita la vascularización del tumor primario de tal modo que las células cancerosas puedan dejar el tumor primario y (2) su establecimiento en lugares secundarios necesita neovascularización para apoyar el crecimiento de las metástasis.
- 50 En una forma de realización relacionada, la presente invención contempla la práctica junto con otras terapias tales como la quimioterapia convencional dirigida contra los tumores sólidos y con el fin de controlar el establecimiento de metástasis. La administración de inhibidor de VP se realiza típicamente durante o después de la quimioterapia, aunque resulta preferido inhibir VP después de un régimen de quimioterapia cuando el tejido tumoral está tratando de respondiendo al asalto tóxico mediante la inducción de VP con el fin de recuperar el aporte de sangre y nutrientes al tejido tumoral. Además, es posible administrar los procedimientos de inhibición de la permeabilidad vascular después de la cirugía en la que se han extraído los tumores sólidos como profilaxis contra las metástasis.
- 55
- 60
- 65

En la medida que la presente invención se aplica a la inhibición de la permeabilidad vascular implicada en la metástasis, la presente invención también se puede aplicar a la inhibición de la formación de metástasis y a la regresión de los tumores establecidos.

5 La restenosis es un proceso de migración y proliferación de las células de músculo liso (SMC) en el tejido en el lugar de angioplastia coronaria transluminal percutánea que dificulta el éxito de la angioplastia. La migración y proliferación de las SMC durante la restenosis se puede considerar un proceso de VP que se inhibe según la presente invención. Por consiguiente la presente invención también contempla la inhibición de la restenosis mediante la inhibición de la permeabilidad vascular en pacientes después de los procedimientos de angioplastia. Con el fin de inhibir la restenosis, la tirosina quinasa inactivada se administra típicamente después del procedimiento de angioplastia debido a que la pared los vasos coronarios corre el riesgo de restenosis, típicamente durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 28 días, y más típicamente durante aproximadamente los primeros 14 días siguientes al procedimiento.

15 La composición de la presente invención se puede utilizar en un procedimiento destinado a inhibir la permeabilidad vascular en un tejido asociado a una enfermedad, y por consiguiente también con el fin de practicar el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la permeabilidad vascular, que comprende poner en contacto un tejido en el cual está teniendo lugar el incremento de la permeabilidad vascular o corre el riesgo de que ocurra, con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína Yes inactivada o una proteína Src y Yes inactivada.

En los casos en los que resulta deseable promover o potenciar la VP, resulta útil la administración de una proteína Yes activa o una proteína Yes y Src activa al tejido. Las vías y ritmo de administración son comparables a los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria para la inhibición.

25 Por ejemplo, se contempla la manipulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con el fin de modular el acceso de los fármacos al tejido cerebral. El incremento de la permeabilidad vascular de la barrera hematoencefálica permitirá que los fármacos, que normalmente no cruzarían la barrera, penetren en el tejido cerebral.

30 Puede resultar deseada la modulación refinada de la angiogénesis junto con la VP, y por lo tanto puede ser administrada una mezcla de formas activa e inactiva de la proteína Src o la proteína Yes.

35 La inhibición o potenciación de la angiogénesis claramente tienen lugar entre 5 y 7 días después de la puesta en contacto inicial con la composición terapéutica de los ejemplos. De manera similar, la modulación de la VP puede tener lugar en un marco temporal semejante. Los efectos pueden tener lugar en un período de tiempo corto después de la administración de la composición terapéutica. Los factores temporales limitantes comprenden la velocidad de absorción por el tejido, la adquisición temporal, la traslocación de la proteína o la traducción del ácido nucleico (dependiendo del agente terapéutico) y la dirección de la proteína. Así, los efectos moduladores de la VP pueden tener lugar en tan poco tiempo como una hora desde el momento de la administración. También se puede administrar una exposición adicional o más prolongada a proteína Src y/o Yes inactiva, utilizando las condiciones adecuadas. Así, se pueden diseñar una multiplicidad de marcos temporales deseados mediante la modificación de tales parámetros.

45 El procedimiento también comprende la administración a un tejido asociado al proceso de enfermedad o al vaso sanguíneo dañado o al trastorno traumático, una composición que comprende un inhibidor de una tirosina quinasa de la familia Src. Un inhibidor de las tirosina quinasa de la familia Src puede ser un inhibidor Src químico, un inhibidor Src proteico, o un inhibidor Src ácido nucleico.

50 Los ejemplos de los inhibidores de las tirosina quinasa de la familia Src comprenden, pero sin resultar limitados, PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146, Geldanamicina y semejantes.

55 PP1 (Biomol, licenciado por Pfizer), fue el inhibidor sintético de Src utilizado en estos estudios. PP1 es parte de la familia de inhibidores de Src pertenecientes a las pirazolopirimidinas. Otros inhibidores sintéticos comprenden PP2 (Calbiochem, licenciado a Pfizer) que tiene una estructura relacionada a PP1 y también es conocido que bloquea la actividad de la familia de las quinasa Src [Hanke *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271(2):695-701 (1996)]. Otros inhibidores específicos de las quinasa Src comprenden PD173955 [Moasser *et al.*, *Cancer Res.* 59:6145-6152 (1999); Parke Davis] del que se ha publicado la estructura. PD162531 [Owens *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 11:51-64 (2000)] también es un inhibidor específico de la quinasa Src de Parke Davis pero la estructura no está disponible en la literatura. La Geldanamicina es también un inhibidor de la quinasa Src, disponible de Life Technologies. Radicol, comercializado por diferentes empresas (por ejemplo, Calbiochem, RBI, Sigma) es una lactona macrolítica antibiótica antifúngica que también funciona como un inhibidor no específico de las proteínas tirosina quinasa y se ha demostrado que inhibe la actividad quinasa Src. Los inhibidores químicos preferidos son PP1 y PP2 o similares, el inhibidor químico más preferido es PP1.

65 Los inhibidores adicionales de la tirosina quinasa de la familia Src adecuados se pueden identificar y caracterizar

utilizando los ensayos estándares conocidos en la materia. Por ejemplo se han realizado cribados de compuestos químicos para encontrar inhibidores potentes y selectivos de Src u otras tirosina quinasas y han resultado en la identificación de entidades químicas de utilidad para una inhibición potente de la familia Src de tirosina quinasas.

5 Por ejemplo, los catecoles han sido identificados como elementos que se unen a una multiplicidad de inhibidores de la tirosina quinasa derivados de productos naturales y se han encontrado en compuestos seleccionados mediante selección combinatoria dirigida a diana de inhibidores selectivos de c-Src [Maly, D.J., *et al.*, "Combinatorial target-guided ligand assembly: identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors" *PNAS (USA)*, 97(6):2419-2424 (2000)]. El cribado a base de química combinatoria de compuestos candidatos inhibidores, utilizando entidades que  
10 es conocido que son importantes en la inhibición de Src como punto de partida, es un medio importante y potente para aislar y caracterizar otros inhibidores químicos de la familia de tirosina quinasas Src.

Sin embargo, incluso se puede utilizar una cuidadosa selección de elementos con potencial para unirse, basada en el potencial para imitar una gama amplia de funciones presentes en los polipéptidos y ácidos nucleicos con el fin de  
15 realizar cribados combinatorios de inhibidores activos. Por ejemplo, las librerías de O-metiloximas son particularmente adecuadas para esta tarea, ya que la librería es de fácil preparación mediante la condensación de O-metilhidroxilamina con cualquiera de entre un elevado número aldehídos comercialmente disponibles. La formación de O-alquiloxima es compatible con una elevada gama de funcionalidades también estables a pH fisiológico [Malay *et al.*, *supra*].

20 Tal como se describe, los inhibidores de la familia de quinasas Src adecuados comprenden también una cantidad, inhibidora de VP, de una proteína Src o Yes inactiva, o mezclas de éstas.

25 Otros inhibidores de la familia de quinasas Src adecuados comprenden CSK, o vectores de ácido nucleico que expresan cantidades inactivantes de CSK.

Tal como se describe en la presente memoria, uno cualquiera de entre una multiplicidad de tejidos, u órganos que comprenden tejidos organizados, puede ser un lugar de VP en condiciones de enfermedad, que comprende cerebro,  
30 piel, músculo, intestino, tejido conectivo, articulaciones, huesos y tejidos semejantes en los que se encuentran vasos sanguíneos.

El paciente que se pueden tratar según la presente invención es deseablemente un paciente humano, aunque se debe entender que los principios de la presente invención indican que el tratamiento es efectivo con respecto a todos los mamíferos. En este contexto, se entiende que un mamífero comprende cualquier especie de mamífero en la que  
35 el tratamiento de pérdida vascular o daño tisular asociado a edema resulte deseable, en particular especies de mamíferos agrícolas y domésticos.

Los intervalos de dosis para administración de inhibidores químicos de la familia de tirosina quinasas Src, tales como PP1 se pueden encontrar comprendidos entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 10  
40 mg/kg peso corporal o el límite de solubilidad del agente activo en el vehículo farmacéutico. Preferentemente, las dosis típicas pueden comprender entre aproximadamente 1 mg/kg peso corporal y aproximadamente 9 mg/kg peso corporal. Dosis inferiores, tales como entre 0,1 mg/kg peso corporal y aproximadamente 1 mg/kg peso corporal se pueden optimizar en múltiples administraciones con el fin de tratar trastornos crónicos. Las dosis típicas en el tratamiento de las afecciones agudas menos graves, de fácil acceso y en las que la vía de administración es más  
45 directa, pueden comprender entre aproximadamente 1 mg/kg peso corporal y aproximadamente 3 mg/kg peso corporal. Dependiendo de la gravedad del daño, su lugar o la ruta de administración, se puede utilizar una dosis más elevada comprendida entre aproximadamente 3 mg/kg peso corporal y 10 mg/kg peso corporal (o el límite de solubilidad del agente en el vehículo farmacéutico) cuando se encuentra una herida más grave, de acceso difícil, o en la que la administración solo puede tener lugar mediante una vía indirecta.

50 En el caso de una herida aguda o trauma, es mejor administrar el tratamiento lo antes posible después de producirse el incidente. Sin embargo, el tiempo para la administración efectiva de inhibidores de la familia de tirosina quinasas Src puede estar comprendido entre aproximadamente las 48 horas desde el comienzo del daño o trauma, en el caso de accidentes agudos. Se prefiere que la administración tenga lugar en las 24 horas desde el comienzo, siendo mejor en las 12 horas, y resulta más preferido que la administración tenga lugar en las 6 horas desde el comienzo. La administración después de 48 horas del comienzo de la herida puede ser adecuada para reducir el daño tisular adicional debido a una pérdida vascular o un edema posteriores, sin embargo, el efecto sobre el daño tisular inicial puede quedar muy reducido.

60 Cuando se realiza una administración profiláctica con el fin de evitar la pérdida vascular o edema asociados con los procedimientos quirúrgicos, o realizada en vista de un criterio diagnóstico de predisposición, la administración puede tener lugar antes de cualquier incremento real de la VP, o durante dicho evento causante del incremento de la VP. Con el fin de tratar los trastornos crónicos que conducen a un incremento de VP y la pérdida vascular asociada o edema, la administración de inhibidores activos de la familia Src de tirosina quinasas se puede realizar mediante un  
65 régimen de dosis continuo.

5 Los intervalos de dosificación para la administración de una proteína Yes o Src inactiva, o una proteína CSK inactiva, dependen de la forma de la proteína, y su potencia, como se describe adicionalmente en la presente memoria, y son cantidades suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que la VP y los síntomas patológicos mediados por la VP son mejorados. La dosificación no debería ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, y similares.

10 Una cantidad moduladora de VP terapéuticamente efectiva es una cantidad de proteína Src o Yes inactiva o CSK activa suficiente para producir una modulación medible de VP en el tejido que se está tratando, es decir, una cantidad moduladora de VP. La modulación de VP se puede medir mediante ensayos tal como se describe en la presente memoria, o mediante otros procedimientos conocidos en la materia. La modulación de VP se puede medir mediante el ensayo de ensayo de Miller, tal como se describe en la presente memoria, o mediante otros procedimientos conocidos en la materia.

15 Generalmente, la dosis puede oscilar con la edad, estado, género y extensión de la enfermedad en el paciente y la puede determinar un experto en la materia. La dosis también la puede ajustar el médico particular en caso de complicación.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar parenteralmente mediante inyección o mediante una infusión gradual durante un tiempo. Aunque típicamente se puede acceder al tejido que se debe tratar en el cuerpo mediante la administración sistémica y por consiguiente frecuentemente se trata mediante la administración intravenosa de las composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de administración cuando existe la posibilidad de que el tejido objetivo comprenda las moléculas diana. Así, las composiciones de la presente invención se pueden administrar intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracavidad, transdermalmente y se pueden administrar mediante medios peristálticos.

25 La administración intravenosa se realiza mediante inyección de dosis unitarias, por ejemplo. El término "dosis unitaria" cuando se utiliza haciendo referencia a una composición terapéutica de la presente invención, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto, comprendiendo cada unidad una cantidad predeterminada del material activo calculada con el fin de producir los efectos terapéuticos deseados en asociación con el diluyente necesario; es decir, portador o vehículo.

30 En una forma de realización preferida el agente activo se administra en una dosis unitaria intravenosa. La administración localizada se puede lograr mediante inyección directa o aprovechando compartimentos anatómicos aislados, aislando la microcirculación de sistemas de órganos diana, reperfusión en un sistema circulante o la oclusión temporal a base de catéter de regiones diana del sistema vascular asociado al tejido enfermo.

35 Las composiciones son administradas de un modo compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad y tiempo en que se debe administrar depende del sujeto que se debe tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo que se debe administrar dependen del juicio del médico y son características de cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosis de administración sistémica se dan a conocer en la presente memoria y dependen de la vía de administración. También se encuentran disponibles regímenes adecuados de administración, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante inyecciones subsiguientes u otra forma de administración. Por el contrario, se contempla una infusión intravenosa continua suficiente para mantener la concentración en la sangre en los intervalos especificados para la terapia *in vivo*.

40 La reducción del daño tisular debido a la pérdida vascular o el edema asociado a una enfermedad, daño o trauma, disminuye los síntomas de la enfermedad y, dependiendo de la enfermedad, puede contribuir a su curación. La extensión de la permeabilidad vascular en un tejido y por consiguiente la extensión de la inhibición se puede valorar mediante múltiples procedimientos. En particular, se pueden reducir los daños resultantes de la apoplejía u otros accidentes cerebrovasculares del SNC relacionados que tienen lugar como consecuencia del incremento de la VP inducida por la herida, y la siguiente pérdida vascular y/o daño por edema al tejido asociado.

45 En una forma de realización relacionada, un tejido que se debe tratar es un tejido inflamado y la permeabilidad vascular que se debe inhibir es debida a la estimulación mediada por VEGF. Para este tipo de afección, la presente invención contempla la inhibición de VP en los tejidos artríticos, tales como en un paciente con reumatismo articular crónico, en tejido inflamado inmune o no inmune, en tejido psoriático y semejantes.

50 En otra forma de realización relacionada, un tejido que se debe tratar es el tejido retiniano de un paciente con una enfermedad retiniana tal como la retinopatía diabética, degeneración macular o glaucoma neovascular y la VP que se debe inhibir es la VP del tejido retiniano en el que se produce neovascularización de tejido retiniano.

55 La composición de la presente invención se puede utilizar en un procedimiento destinado a la inhibición de la

permeabilidad vascular en un tejido asociado con una herida o enfermedad y por consiguiente también con el fin de practicar el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la permeabilidad vascular, que comprende poner en contacto un tejido en el que está teniendo lugar el incremento en la permeabilidad vascular, o corre el riesgo de que ocurra, con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas.

La modulación de VP y la reducción del daño tisular debido a pérdida vascular y edema pueden tener lugar en poco tiempo después de la administración de la composición terapéutica. La mayoría de los efectos terapéuticos se pueden visualizar dentro de 3 días desde la administración, en el caso de daño agudo o trauma. Típicamente, los efectos de la administración crónica no resultarán tan fácilmente evidentes.

Los factores temporales limitantes comprenden la velocidad de absorción por el tejido, la adquisición por el tejido, la traslocación de la proteína o la traducción del ácido nucleico (dependiendo del terapéutico) y la dirección de la proteína. Así, los efectos moduladores del daño tisular pueden tener lugar en tan poco tiempo como una hora desde el momento de la administración del inhibidor. También se puede prolongar o exponer más a los inhibidores de la familia Src de tirosina quinasas, utilizando las condiciones adecuadas. Así, modificando tales parámetros se pueden diseñar múltiples marcos terapéuticos temporales.

#### F. Composiciones terapéuticas (consideraciones generales)

La presente invención contempla composiciones terapéuticas de utilidad en la práctica de los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria. En una forma de realización preferida, la composición terapéutica no es inmunogénica cuando se administra a un mamífero o paciente humano con fines terapéuticos.

Las proteínas Yes y Src pueden ser activas, inactivas o una mezcla de las mismas dependiendo de la modulación deseada. Las formas preferidas de Src y Yes son las descritas anteriormente. La proteína CSK comprende la forma activa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y las variaciones gramaticales de los mismos, haciendo referencia a la composición, vehículos, diluyentes, y reactivos se utilizan de modo intercambiable y se refieren a que los materiales se pueden administrar a un mamífero sin producir efectos fisiológicos indeseables tales como náusea, mareos, molestia gástrica y semejantes.

La preparación de una composición farmacológica que comprende ingredientes activos disueltos o dispersos en ésta es bien conocida por los expertos en la materia y no necesita estar limitada con base en la formulación. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables tanto como disoluciones líquidas como suspensiones, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensión, en líquido antes de su utilización. La preparación también se puede emulsionar o presentar como una composición de liposomas.

El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para la utilización en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerina, etanol o semejantes y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes mojantes o emulgentes, agentes tamponantes del pH y semejantes que incrementan la efectividad del ingrediente activo.

La composición terapéutica de la presente invención puede comprender sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en ella. Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y semejantes. Las sales formadas con los grupos carboxílicos libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos y bases orgánicas tales como isopropilamina, tremetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y semejantes.

Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la materia. Son ejemplares de los vehículos líquidos las disoluciones acuosas estériles que no comprenden materiales además de los ingredientes activos y agua, o comprenden un tampón tal como fosfato sódico con un valor de pH fisiológico, disolución salina fisiológica o tanto una como la otra, tales como disolución salina tamponada con fosfato. Adicionalmente, los vehículos acuosos pueden comprender más de una sal tamponante, así como sales tales como los cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas también pueden comprender fases líquidas además de y con la exclusión de agua. Los ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de algodón y emulsiones de aceite agua.

F (i). Composiciones terapéuticas moduladoras de la VP de la presente invención

En una forma de realización de la presente invención, una composición terapéutica contiene una cantidad moduladora de la permeabilidad vascular de una proteína Yes o una proteína Yes y Src, formulada típicamente para contener una cantidad de por lo menos 0,1 por ciento en peso de la proteína Yes o Src por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una proporción en peso de la proteína Yes o Src para la composición total. Por lo tanto, por ejemplo, 0,1 por ciento en peso son 0,1 gramos de la proteína Yes o Src por 100 gramos de la composición total.

F(ii). Composiciones terapéuticas inhibidoras de la familia Src de tirosina quinasas de la presente invención

Los inhibidores adecuados de la familia Src de tirosina quinasas inhibirá específicamente la actividad tirosina quinasa biológica de la familia Src de tirosina quinasas. Una tirosina quinasa de la familia Src muy adecuada tendrá especificidad primaria para inhibir la actividad de la proteína <sup>pp60</sup>Src y secundariamente inhibir las quinasas de la familia Src más próximamente relacionadas tales como Yes. Los ejemplos de inhibidores de las tirosina quinasas de la familia Src particularmente adecuados comprenden PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146, Geldanamicina y semejantes. Los inhibidores químicos adicionales de la familia Src de tirosina quinasas adecuados se pueden identificar y caracterizar utilizando ensayos conocidos en la materia.

Se hace referencia a las mutaciones en Src que demuestran ser inhibidoras de VP en lugar de estimularla, se refieren como mutaciones Src inactivas. Se hace referencia a las proteínas con mutaciones que confieren esta actividad inhibidora como proteínas Src dominantes negativas ya que inhiben la VP, comprendiendo la que resultante de actividad endógena de Src y también la actividad Src amplificada resultante de la actividad estimulante con factor de crecimiento. Así, ciertas mutaciones de c-Src tipo silvestre pueden también funcionar como dominantes negativas con respecto a su capacidad para bloquear el crecimiento de los vasos sanguíneos y VP y por ejemplo, por consiguiente reducir la VP *in vivo*. Por consiguiente, otros inhibidores adecuados de la familia Src de tirosina quinasas pueden comprender formas inactivas de las proteínas Src y Yes que pueden antagonizar la actividad Src y Yes, produciendo la inhibición o disminución en la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos en el tejido diana. Una proteína Src inactiva preferida es la Src 251. Otra proteína Src inactiva preferida es la Src K295M. Una proteína Yes inactiva preferida tendrá una actividad quinasa reducida en comparación con la de tipo silvestre.

Otros inhibidores de la familia Src de tirosina quinasas pueden ser ácidos nucleicos antisentido, análogos de los ácidos nucleicos o ácidos nucleicos proteínas que inhiben la expresión de los genes Src o Yes en las células diana. Las moléculas antisentido pueden estar en una cantidades terapéuticamente efectivas que modulan la VP cuando dicho ácido nucleico antisentido, que puede hibridarse al ARNm que codifica una proteína Src o Yes, puede hibridarse a dicho ARNm y producir la inhibición de la expresión celular de proteína tirosina quinasa Src o Yes cuando se transfecta en una célula diana en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se describió, la proteína c-Src inhibidora preferida comprende Src 251 en la que solamente se expresan los primeros 251 aminoácidos. Esta construcción no dispone del dominio quinasa completo y se le hace por consiguiente referencia como proteína Src "quinasa muerta". Una segunda construcción es la mutación Src (K295M) en la que el residuo del aminoácido lisina 295 está mutado a metionina. Esta mutación puntual en el dominio quinasa evita que se una el ATP y bloquea también las funciones quinasa dependientes relacionadas con la señalización y proliferación de las células vasculares y tumorales.

Con respecto a las mutaciones puntuales, cualquier mutación que resulta en la actividad inhibidora deseada se contempla para la utilización en la presente invención. Las construcciones de proteínas de fusión que combinan la proteína Src deseadas (mutación o fragmento de la misma) con etiquetas de aminoácido expresadas, epítopos antigénicos, proteínas fluorescentes, u otras proteínas o péptidos se contemplan también, siempre que el efecto modulador de la proteína Src esté intacto.

De modo semejante, la adición de un inhibidor exógeno de la actividad de la proteína Src o la estimulación de la expresión de dicho inhibidor en el tejido diana, tal como CSK (quinasa Src C-terminal), es también un medio para inhibir la actividad Src. La fosforilación de la Src inactivadora de la tirosina, es un medio para regular negativamente la quinasa c-Src terminal, a la que se hace referencia como CSK [Nada *et al.*, *Nature*, 351:69-72 (1991); Okada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266(36):24249-24252 (1991)]. Cuando CSK fosforila el aa527 en una Src de tipo silvestre, la proteína Src se inactiva. Así, CSK es un inhibidor útil y potente de la actividad Src. La secuencia de la proteína CSK humana de 450 aminoácidos se identifica mediante el número de acceso P41240 y se puede encontrar en el la base de datos del proteína suiza. Una secuencia de ácido nucleico de mRNA que codifica CSK humana se identifica con el número de acceso NM 004383 en la base de datos GenBank.

En una forma de realización de la invención, una composición farmacéutica contiene una cantidad moduladora de la permeabilidad de una proteína Src, Yes y CSK, o un vector de expresión suficiente para expresar una cantidad efectiva de proteína Src, Yes inactiva, o CSK activa, formulada típicamente para contener una cantidad de por lo menos 0,1 por ciento en peso de la proteína por el peso de la composición farmacéutica total. Así, por ejemplo, 0,1 por ciento en peso son 0,1 gramos de la proteína por 100 gramos de la composición total.

Así, la cantidad efectiva de un inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas en una composición farmacéutica es la cantidad que produce una modulación terapéuticamente efectiva de la permeabilidad vascular regulada por Src. Una cantidad terapéutica de una composición farmacéutica cualquiera es una que, por sí misma, produce la disminución de la pérdida vascular o edema relacionado con el daño tisular.

G (i) Consideraciones generales; artículo de fabricación

Tal como se utiliza en la presente invención, el término material de envasado se refiere a un material tal como vidrio, plástico, papel, láminas y semejantes que pueden retener en medios fijos un agente farmacéutico. Así, por ejemplo, el material de envasado puede ser viales de plástico o vidrio, sobres laminados y recipientes semejantes utilizados para contener una composición farmacéutica que comprende un agente farmacéutico.

En una forma de realización preferida, el material de envasado comprende una etiqueta que es una expresión tangible que describe el contenido del artículo de fabricación y la utilización del agente farmacéutico contenido en el mismo.

G (ii) Composiciones terapéuticas moduladoras de VP; artículo de fabricación

La invención considera un artículo de fabricación que comprende un recipiente etiquetado para proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de una mezcla de proteína Src y proteína Yes. Un artículo de fabricación comprende material de envasado y un agente farmacéutico contenido en el interior del material de envasado.

El agente farmacéutico en el artículo de fabricación es cualquiera de las composiciones de la presente invención adecuadas para proporcionar una proteína Src o Yes, formulada en una forma farmacéuticamente aceptable tal como se describe en la presente memoria según las indicaciones descritas. El artículo de fabricación contiene una cantidad de agente farmacéutico suficiente para su utilización en el tratamiento de un trastorno indicado en la presente memoria, tanto en dosis únicas como múltiples.

La proteína Src o Yes puede ser activa o inactiva, o una mezcla de las mismas, dependiendo del nivel de modulación deseado. Las formas preferidas de Src y Yes inactivas se describieron anteriormente.

El material de envasado comprende una etiqueta que indica la utilización del agente farmacéutico comprendido en el mismo, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos asistidos mediante la inhibición o potenciación de la permeabilidad vascular y estados semejantes descritos en la presente memoria. La etiqueta puede además incluir instrucciones de utilización e información relacionada como la requerida para su comercialización. El material de envasado puede comprender recipiente(s) para el almacenamiento del agente farmacéutico.

G (iii) Composición de inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas; Artículo de fabricación

La presente invención contempla también un artículo de fabricación que es un recipiente etiquetado destinado a proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas. El inhibidor puede ser un producto químico envasado, un inhibidor de la tirosina quinasasa de la familia Src ácido nucleico o proteico, combinaciones de más de uno, o sus mezclas. Un artículo de fabricación comprende material de envasado y un agente farmacéutico comprendido en el material de envasado. El artículo de fabricación también puede comprender dos o más cantidades terapéuticamente subefectivas de una composición farmacéutica, que actúan juntas sinérgicamente para producir la disminución del daño tisular debido a la pérdida vascular o edema.

El agente farmacéutico en el artículo de fabricación es una de las composiciones de la presente invención adecuada para proporcionar un inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas, formulada en una forma farmacéuticamente aceptable tal como se describe en la presente memoria según las indicaciones publicadas. Así, la composición puede comprender un inhibidor químico tal como PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, Radicol R2146 y Geldanamycin, una proteína inhibidora tal como Src inactiva, Yes inactiva, proteína CSK activa, o una molécula de ácido nucleico que es que puede expresar dicha proteína o combinación de proteínas. El artículo de fabricación comprende una cantidad de agente farmacéutico suficiente para su utilización en el tratamiento de un trastorno indicado en la presente memoria, tanto en dosis únicas como en dosis múltiples.

El material de envasado comprende una etiqueta que indica la utilización del agente farmacéutico comprendido en el mismo, por ejemplo, para el tratamiento de un trastorno asistido por la inhibición del incremento de la permeabilidad vascular y condiciones semejantes dadas a conocer en la presente memoria. La etiqueta puede además comprender instrucciones de utilización e información relacionada tal como se puede necesitar para la comercialización. El material de envasado puede comprender recipiente(s) para el almacenamiento del agente farmacéutico.

**Ejemplos**

Los ejemplos siguientes hacen referencia a la presente invención y son ilustrativos y no limitativos de la invención.

Además, las modificaciones de la presente invención, actuales o desarrolladas más adelante, que resultarán evidentes para los expertos en la materia, se deberán considerar dentro del alcance de la presente invención según las reivindicaciones adjuntas.

## 5 1. Preparación de construcciones para la expresión de c-Src o c-Yes

Con el fin de preparar las construcciones de expresión de utilidad en la modulación de VP y la angiogénesis, se manipuló cAND de c-Src y se insertó en un construcción/vector de expresión.

10 La secuencia de ADNc que codifica el tipo silvestre (es decir, endógeno) del c-Src de pollo se muestra en la Fig. 1 (SEC ID nº:2) la secuencia de residuos de aminoácidos codificada se muestra en la Fig. 2 (SEC ID nº:3). La secuencia de proteína codificada se traduce desde las posiciones de los nucleótidos 112 al 1713 del ADNc. La secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico del ADNc de c-Src humano (SEC ID nº:4) y las secuencias de residuos de aminoácidos codificada (SEC ID nº:5) se muestran respectivamente en las  
15 Figs. 3 y 4. Para la secuencia de proteína humana, la secuencia codificante comienza en la posición de nucleótido 134 a 1486 del ADNc.

Se prepararon ADNc de tipo silvestre así como también múltiples c-Src mutados. Las construcciones mutadas de c-Src se prepararon mediante mutagénesis dirigida tal como describen Kaplan *et al.*, [*EMBO J.*, 13:4745-4756 (1994)].  
20 Las construcciones de c-Src que codifican la proteína Src mutante se describen en Kaplan *et al.*, *id.* Kaplan *et al.*, describen múltiples construcciones de c-Src mutante y las proteínas codificadas de utilidad en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, Kaplan *et al.*, describen múltiples productos de alelos de c-Src de pollo en su Fig. 1, comprendiendo el Src A y Src 251.

25 La presente invención describe dos categorías de funcione c-Src con el fin de modular VP. Tal como se describió anteriormente, una categoría comprende moléculas de Src que incrementan la VP y por consiguiente se considera que son proteínas activas. En la presente invención se demuestra que el tipo silvestre de Src junto con múltiples mutaciones que inducen VP. Una mutación del c-Src de tipo silvestre que funciona en este contexto con respecto a su capacidad de inducir crecimiento de los vasos sanguíneos y VP es la mutación el mutante Src A que tiene una  
30 mutación puntual en la posición de residuo de aminoácido (aa) 527 que cambia tirosina 527 por fenilalanina. Este lugar es normalmente el lugar de regulación negativa por la quinasa c-Src, a la que se hace referencia como la quinasa CSK. Cuando CSK fosforila el aa527 en el tipo silvestre de Src, la proteína queda inactivada. Sin embargo, en el Src A mutado en la posición aa527, la tirosina reguladora está convertida en fenilalanina confiriendo así a la proteína actividad constitutiva (es decir, permanentemente) no sujeta no sujeta a inactivación mediante fosforilación.

35 En la presente memoria se describen otras mutaciones en Src que tienen el efecto modulador opuesto sobre VP, inhibiendo VP en lugar de estimulándolo. Dichas mutaciones se refieren como mutaciones inactivas de Src. Se hace referencia a las proteínas con mutaciones que confieren esta actividad inhibidora asimismo como proteínas Src dominantes negativas ya que inhiben VP, comprendiendo la resultante de la actividad endógena de Src así como  
40 también la actividad Src incrementada como resultado de la estimulación por factor de crecimiento. Así, ciertas mutaciones del c-Src tipo silvestre pueden funcionar como dominantes negativas con respecto a su capacidad de bloquear el crecimiento de los vasos sanguíneos y la VP, por ejemplo, por consiguiente reducen la VP *in vivo*.

45 Tal proteína c-Src inhibidora preferida comprende Src 251 en la que solamente se expresan los primeros 251 aminoácidos de Src. A esta construcción le falta el dominio quinasa por completo y se refiere por consiguiente como proteína Src de "quinasa muerta". Una segunda construcción es la mutación de Src (K295M) en la que el residuo de aminoácido lisina 295 está mutado a metionina. Esta mutación puntual en el dominio quinasa impide que se una el ATP y también bloquea las funciones de Src dependientes de la quinasa relacionadas a la señalización de las células vasculares y tumorales.

50 Con respecto a las mutaciones puntuales, cualquier mutación que produce la deseada actividad inhibidora o activadora se contempla para la utilización en la presente invención. También se contemplan las construcciones de proteínas de fusión que combinan la proteína Src deseada (mutante o fragmento del mismo) con las etiquetas de aminoácido deseadas, epítopos antigénicos, proteínas fluorescentes u otras proteínas o péptidos, siempre y cuando  
55 el efecto modulador de la proteína Src deseado esté intacto.

Por ejemplo, para la mutación activadora de Src en el residuo 527, siempre y cuando el residuo de aminoácido mutado resultante no sea tirosina, serina o treonina, la presente invención contempla que la presencia de un aminoácido alternativo en la posición deseada producirá una proteína Src con la deseada actividad moduladora promotora de VP activa.  
60

La quinasa Yes de la familia Src a sido descrita anteriormente, pero no se conoce mucho sobre su función celular [Burck *et al.*, *The Oncogenes*, Springer-Verlag, New York, pp. 133-155 (1988); Marth *et al.*, *Cell*, 43:393 (1985); Semba *et al.*, *PNAS (USA)*, 83:5459 (1986); Shibuya *et al.*, *J. Virol*, 42:143 (1982); Yoshida *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 76:559 (1985)]. La proteína Yes activa preferida está codificada en el ácido nucleico descrito por Sukegawa *et al.*, [*Mol. Cell Biol.*, 7:41-47 (1987)]. Las modificaciones inactivantes de la proteína Yes humana y los ácidos  
65



nucleicos que codifican Yes se pueden lograr tal como se describió para Src.

TABLA 1

<u>Src/mutación</u>	<u>Función Src</u>	<u>Efecto sobre VP y angiogénesis</u>
c-Src	+ Activo	Estimula
SrcA (T527F)	+ Activo	Estimula
Src527 (puntual)	+ Activo	Estimula
Src251	- Inactivo	Inhibe
Src (truncada)	- Inactivo	Inhibe
Src (K295M)	- Inactivo	Inhibe
Src295 (puntual)	- Inactivo	Inhibe

5

Una construcción de expresión preferida es la construcción RCASBP (A) (SEC ID n°:1). Este vector de expresión se basa en una serie de virus del sarcoma aviar competentes en la replicación con una polimerasa Bryan amplificada (BP) para mejor título y es específico para el tipo A de la glicoproteína del sobre expresada en las células aviares normales [Revisado en *Methods in Cell Biology*, 52:179-214 (1997); ver también, Hughes *et al.*, *J. Virol*, 61:3004-3012 (1987); Fekete & Cepko, *Mol. Cellular Biol.*, 13(4):2604-2613 (1993); Itoh *et al.*, *Development*, 122:291-300 (1996) y Stott *et al.*, *BioTechniques*, 24:660-666 (1998)]. La secuencia completa de RCASBP (A) (SEC ID n°:1) se proporciona en la lista de secuencias y en la Fig. 10 se describe un mapa de restricción de la construcción, al que se hace referencia en la presente memoria como RCAS.

10

15 La construcción Src 251 original fue subclonada por el Dr. Pam Schawrtzberg, en el NIH en el laboratorio del Dr. Harold Varmus. En resumen, la clonación del ADNc de la secuencia Src para la expresión de la misma se logró mediante la inserción de un conector que comprendiendo lugares de restricción Not I- BstB1-Not I en el lugar Not I único en el extremo 5' de Src 251. Src tiene un lugar Cla I único en el extremo 3'. La digestión de Src 251 con BstB1 y Cla I generó un fragmento BstB1-ClaI que se ligó en el lugar Cla I de RCASBP (A). Un extremo sobresaliente BstB1 permite la ligación del sobresaliente Cla I que no se recortará con Cla I.

20

Las construcciones Src se obtienen fácilmente en el vector anterior mediante primero digiriendo el vector RCAS que comprende Src 251 con Not I y Cla I (en un fondo DAM+) con el fin de permitir la inserción de un ADNc de Src digerido de modo semejante. Por consiguiente esta construcción RCASBP (A) inicial que comprende Src 251 se utilizó además con el fin de subclonar todas las demás construcciones Src tal como se describieron anteriormente y en [Kaplan *et al.*, *The EMBO J.*, 13(20):4745-4756 (1994)] en RCASBP (A) mediante un fragmento Not I- Cla I generado mediante la construcción Src 251. Con el fin de producir la mutación c-Src deseada en el ADNc, se utilizaron procedimientos estándar de mutación dirigida conocidos por los expertos en la materia. Los cebadores diseñados para incorporar las mutaciones deseadas se diseñaron también con lugares de restricción con el fin de facilitar las siguientes operaciones de clonación. Se eliminan de la construcción de ácido nucleico fragmentos enteros de secuencias de ácido nucleico que codifican Src mediante procedimientos de amplificación por PCR sobre la base de las secuencias conocidas de ADNc de pollo, humanas y los homólogos semejantes de Src y a continuación se formaron las nuevas construcciones.

25

30

35 En una forma de realización, el cebador de PCR 3' utilizado con el fin de amplificar ácidos nucleicos Src codifica también una secuencia en marco. La utilización de este cebador añade una etiqueta de epítipo 9E10-myc al extremo carboxilo de la siguiente construcción de Src. Los aminoácidos siguientes se añadieron después del aminoácido 251 de Src con el fin de generar la construcción de vector que comprende la etiqueta de epítipo 9E10-myc: VDMEQKLI AEEDLN (SEC ID n°:6). Se realizaron dos PCR para cada una de las construcciones y se obtuvieron resultados semejantes. Todas las construcciones de mutantes construidas mediante PCR se secuenciaron también mediante PCR con el fin de confirmar la secuencia de ADN prevista de los clones. Los ADNc de Src tipo silvestre y mutado de utilización en los sistemas de expresión se encuentran también disponibles en Upstate Biotech Laboratories, Lake Placid, NY que vende Src aviar así como también humano y múltiples formas de quinasa mutante muerta y activada.

45

Los vectores de expresión alternativos para la expresión de proteínas Src o Yes de comprenden también vectores adenovíricos tales como los descritos en las patentes US n° 4.797.368; n° 5.173.414; n° 5.436.146; n° 5.589.377 y n° 5.670.488. Los procedimientos alternativos para la administración de proteínas moduladoras de Src o Yes comprenden la administración de ADNc de Src o Yes con un sistema de vector no vírico tal como se describe en la patente US n° 5.675.954 y la administración del ADNc propiamente como ADN desnudo tal como se describe en la patente US n° 5.589.466. La administración de las construcciones tampoco está limitada a la aplicación tópica de vector vírico tal como se describe en el sistema de ensayo CAM más adelante. Por ejemplo, las preparaciones de vector vírico también se inyectan intravenosamente para la administración sistémica en el lecho vascular. Estos vectores también son dirigibles a los lugares de vascularización incrementada mediante la inyección localizada en un tumor, por ejemplo.

50

55

Las proteínas expresadas *in vitro* se contemplan también para la administración de las mismas después de la expresión y purificación de la proteína Src seleccionada mediante procedimientos de utilidad para la administración

de proteínas o polipéptidos. Uno de tales procedimientos comprende sistemas de administración por liposomas, tales como los descritos en las patentes US nº 4.356.167; nº 5.580.575; nº 5.542.935 y nº 5.643.599. Los expertos en la materia también conocen otros vectores y sistemas de administración de proteínas para ser utilizado en la expresión y/o administración de las proteínas Src o Yes.

5

## 2. Caracterización de la preparación de la membrana corioalantoica de pollo (CAM) no tratada

### A. Preparación de CAM

10 Se puede inducir la angiogénesis en la membrana corioalantoica (CAM) después de que la angiogénesis embrionaria normal a resultado en la formación de vasos sanguíneos maduros. Se ha demostrado que la angiogénesis se induce en respuesta a citoquinas específicas o fragmentos de tumor tal como describen Leibovich *et al.*, [*Nature*, 329:630 (1987) y Ausprunk *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 79:597 (1975)]. Las CAM se prepararon a partir de embriones de pollo para la subsiguiente inducción de la angiogénesis e inhibición de la misma. Embriones de pollo de diez días de McIntyre Poultry (Lakeside, CA) y se incubaron a 37°C y 60% humedad. Se produjo una pequeña perforación a través de la cáscara en el extremo del huevo directamente sobre la cámara de aire mediante la utilización de un pequeño taladro (Dremel, Division of Emerson Electric Co, Racine WI). Se realizó una segunda perforación en el lado ancho del huevo en una zona libre de vasos sanguíneos del embrión que se determinó previamente por transparencia del huevo. Se aplicó presión negativa en la primera perforación, lo que resultó en la separación de la CAM (membrana corioalantoica) de la membrana de la cáscara y creó una falsa cámara de aire sobre la CAM. Se cortó una pequeña ventana de 1,0 centímetro (cm) x 1,0 cm cuadrado a través de la cáscara sobre la CAM descolgada mediante la utilización de un pequeña rueda de cortar (Dremel). La pequeña ventana permitió acceso directo a la CAM subyacente.

25 La preparación de CAM resultante a continuación se utilizó a los 6 días de embriogénesis, una etapa marcada por una neovascularización activa, sin tratamiento adicional a la CAM, reflejando el modelo utilizado para la evaluación de los efectos sobre la neovascularización embrionaria o se utilizaron a los 10 días de embriogénesis cuando ha cesado la embriogénesis. Esta última preparación se utilizó en la presente invención con el fin de inducir angiogénesis renovada en respuesta al tratamiento con citoquinas o a ponerla en contacto con un tumor tal como se describe más adelante.

30

## 3. Ensayo de angiogénesis en CAM

### A. Angiogénesis inducida por factores de crecimiento

35 Se ha demostrado que las citoquinas o factores de crecimiento inducen angiogénesis. Se indujo angiogénesis colocando un disco de 5 mm x 5 mm de filtro Whatman (Whatman Filter Paper nº1) saturado de disolución de equilibrada de sal Hank (HBSS, Gibco, Grand Island, NY) o HBSS con 2 microgramos/ml ( $\mu\text{g/ml}$ ) de factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) o factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Genzyme, Cambridge, MA) en la CAM de los embriones de pollo de 9 ó 10 días en una región desprovista de vasos sanguíneos y a continuación se sellaron las ventanas mediante cinta adhesiva. También son efectivas otras concentraciones de factores de crecimiento en la inducción del crecimiento de vasos sanguíneos. En los ensayos en los que la inhibición de la angiogénesis se evaluó mediante la inyección intravenosa de antagonistas, la angiogénesis se induce inicialmente con ente 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  de bFGF o VEGF en medio de crecimiento fibroblástico. La angiogénesis se monitorizó mediante fotomicroscopía después de 72 horas.

45

### B. Angiogénesis embrionaria

50 La preparación de CAM destinada a evaluar el efecto de los inhibidores de la angiogénesis sobre la formación natural de neovasculatura embrionaria es la del embrión de pollo embrionario de 6 días tal como se describió anteriormente. En esta etapa del desarrollo los vasos sanguíneos están sufriendo crecimiento de nuevo y por consiguiente proporcionan un sistema de utilidad con el fin de evaluar la modulación de la angiogénesis por las proteínas Src de utilidad en la presente invención. El sistema CAM se prepara tal como se describió anteriormente, con la excepción de que el ensayo se realiza en el día embrionario 6 en lugar de en el día 9 ó 10.

55

## 4. Modulación de la angiogénesis tal como se mide en el ensayo CAM

60 Con el fin de evaluar los efectos de las proteínas Src sobre la angiogénesis, los siguientes ensayos se realizaron en preparaciones de CAM de pollos de 10 días de edad. Se transfectaron cinco  $\mu\text{g}$  de construcciones RCAS preparadas tal como se describe en el Ejemplo 1, en la línea de fibroblastos de pollo inmortalizado DF-1 (regalos de Doug Foster, U. of Minn.). Esta línea celular así como también los fibroblastos primarios de embrión de pollo fue que puede producir virus, sin embargo, la línea celular DF-1 produjo títulos más elevados. Los sobrenadantes víricos se recogieron de las líneas celulares DF-1 confluentes productoras en medio CLM libre de suero [composición: base de medio F-10 suplida con DMSO, ácido fólico, ácido glutámico y disolución vitamínica MEM]. Se concentraron treinta y cinco ml de sobrenadante vírico mediante ultracentrifugación a 4° C durante 2 horas a 22.000 rpm. Estos precipitados de virus concentrados se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial en medio CLM libre de suero, se

65

hicieron alícuotas y se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C. El título se ensayó mediante la infección de diluciones seriadas de un vector vírico control que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), a la que se hace referencia como RCAS-GFP, mediante la infección de fibroblastos primarios de embrión de pollo que se incubaron durante entre 48 y 72 horas. Los títulos del stock vírico que se obtuvieron después de la concentración superaron rutinariamente  $10^8$  I.U./ml. Para el ensayo CAM que utiliza los stocks víricos, se prepararon discos de filtro Whatman de 6 mm de diámetro mojados en acetato de cortisona, en cortisona a 3 mg/ml acetato de cortisona durante 30 minutos en 95% etanol. Los discos se secaron en una campana de flujo laminar y a continuación se mojaron en 20  $\mu$ l de stock vírico por disco durante 10 minutos. Estos discos se aplicaron al CAM de embrión de pollo de 9 a 10 días, se sellaron con cinta de celofano y se incubaron a  $37^{\circ}$  C durante entre 18 y 24 horas. A continuación se añadió PBS simulado o factores de crecimiento a una concentración de 5  $\mu$ g/ml a la CAM en un volumen de 20  $\mu$ l del stock vírico adecuado, como un empujón de virus adicional al tejido CAM. Después de 72 horas, las CAM se cosecharon y examinaron para determinar los cambios en el índice de angiogénesis tal como se determina mediante un conteo doble ciego del número de puntos de bifurcación en la CAM subyacente al disco. Para los ensayos de quinasa, se cosechó el tejido debajo del disco en RIPA, se homogeneizó mediante un triturador monitorizado y se inmunoprecipitó Src de cantidades equivalentes de proteína total y se sometió a un ensayo de quinasa *in vitro* utilizando la proteína de fusión FAK-GST como sustrato. Para los ensayos de inmunofluorescencia, el tejido CAM debajo de los discos se congeló en OCT, un criopreservante, se seccionó a 4  $\mu$ m, se fijó en acetona durante 1 minuto, se incubó en 3% suero normal de cabra durante 1 hora, seguido de una incubación en anticuerpo primario de conejo antiERK fosforilada tal como se describió anteriormente [Eliceiri *et al.*, *J. Cell Biol.*, 140:1255-1263 (1998)], se lavó en PBS y se detectó mediante un anticuerpo secundario fluorescente.

#### A. Activación de Src endógeno mediante bFGF o VEGF

Con el fin de determinar los efectos de los factores de crecimiento sobre la actividad de Src en la modulación de la angiogénesis, se realizaron los siguientes ensayos. Se homogenizaron extractos de tejido de CAM de pollo de 10 días de edad que se habían expuesto a bFGF o VEGF (2  $\mu$ g/ml) durante dos horas. Se inmunoprecipitó Src endógena de cantidades equivalentes de proteína total y se sometió a un ensayo *in vitro* de quinasa complejo inmune utilizando una proteína de fusión FAK-GST como sustrato, se sometió a electroforesis y se transfirió a nitrocelulosa.

Los resultados del ensayo se muestran en la Fig. 5, en la que el incremento en actividad Src se evidencia mediante el incremento de la densidad en el gel con tratamiento de bFGF o VEGF en comparación con muestras (simuladas) que son indicativas del nivel basal de actividad Src en el ensayo CAM. Tanto bFGF como VEGF produjeron aproximadamente un incremento de 2 veces en la actividad endógena de Src presente en la CAM. El ensayo de transferencia anterior también se ensayó mediante un anticuerpo antiSrc como control de la carga de un contenido equivalente de Src e IgG.

#### B. Efecto de la expresión génica de Src A mediada por retrovirus en la angiogénesis en CAM de pollo

Se realizaron los siguientes ensayos con el fin de ensayar el efecto de proteínas mutantes Src sobre la angiogénesis en la preparación CAM. Para el ensayo, se expusieron CAM de pollo de 9 días de edad a retrovirus que expresan RCAS-Src A o RCAS-GFP o a tampón durante 72 horas siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig. 6A en la que se cuantificó el nivel de angiogénesis tal como se describió anteriormente. Las microfotografías (4X) se tomaron utilizando un estereomicroscopio tal como se muestra en la Fig. 6B. La actividad Src endógena basal tiene un índice angiogénico de aproximadamente 50. Por el contrario, las CAM tratadas con RCAS-Src-A expresado por vector retroviral con una mutación puntual en la posición de residuo de aminoácido 527 de tirosina a fenilalanina, resultó en un incremento (inducción) de la angiogénesis a un índice angiogénico de 90. El incremento de la angiogénesis mediado por Src-A también resulta evidente en las fotografías mostradas en la Fig. 6B.

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

El efecto de Src A en comparación con los factores de crecimiento VEGF y PMA sobre la fosforilación quinasa MAP vascular se ensayaron también según los procesos de ensayo descritos anteriormente en la presente memoria. Los extractos de tejido de CAM de pollos de 10 días de edad expuestas a VEGF o PMA (otro mitógeno a una concentración comparable) durante 30 minutos, se compararon con los infectados con retrovirus que expresan Src-A durante 48 horas. A continuación se inmunoprecipitó Src de cantidades equivalentes de extracto de proteína total y se sometió a un ensayo *in vitro* de inmunocomplejo quinasa utilizando una proteína de fusión FAK-GST como sustrato, se sometió a una electroforesis y se transfirió a nitrocelulosa.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig. 7A, en la que las CAM no tratadas (NT) muestran fosforilación endógena de la quinasa MAP vascular mediada por Src a nivel basal. Tanto el VEGF como el PMA produjeron un incremento de aproximadamente 2 veces sobre la línea basal. Por el contrario, Src A incrementó la actividad en entre aproximadamente 5 y 10 veces sobre la observada con muestras sin tratar.

También se midieron alícuotas de los anteriores homogeneizados de tejido total para determinar la fosforilación endógena de ERK mediante inmunotransferencia con un anticuerpo antifosfo-ERK tal como se muestra en la Fig. 7B. Para este ensayo, se infectaron CAM de 10 días de edad con RCAS simulados o con RCAS que expresaban Src A. después de dos días, se disecaron las CAM, se criopreservaron en OCT y se seccionaron a 4 µm. Las secciones se inmunotifieron con anticuerpo antiERK-fosforilada (New England Biolabs), se lavaron y se detectó con un anticuerpo secundario de cabra anticonejo conjugado a FITC. Las imágenes fluorescentes se capturaron en una cámara con un CCD enfriado (Princeton Inst.). Las fotomicrografías indicaron un incremento de la inmunofluorescencia en las preparaciones tratadas con Src-A en comparación con los controles simulados.

10 D. Requerimiento selectivo de la actividad Src durante la angiogénesis inducida por VEGF pero no por bFGF

Con el fin de ensayar el efecto de la actividad moduladora de Src sobre la angiogénesis inducida por factor de crecimiento, se realizaron los siguientes ensayos. Se expusieron CAM de pollos de nueve días a la preparación de vectores retrovíricos que expresa la mutación de Src dominante negativa a la que se hace referencia como Src 251 o Src K295M tal como se describió anteriormente. CAM tampón o retrovirus RCAS-Src 251 o RCAS-GFP de control o tampón se trataron durante 20 horas y se incubaron durante 72 horas adicionales en presencia o ausencia de bFGF o VEGF.

El nivel de angiogénesis, cuantificado tal como se describió anteriormente, se muestra en la Fig. 8A. Las fotomicrografías representativas (6X), mostradas en la Fig. 8B, se tomaron mediante un estereomicroscopio. La Fig. 8C ilustra una transferencia explorada con un anticuerpo antiSrc con el fin de confirmar la expresión de Src 251 en las células transfectadas en comparación con el tratamiento simulado.

Los resultados de los ensayos descritos anteriormente indican que tanto las CAM tratadas con bFGF como con VEGF en presencia de controles RACS-GFP indujeron angiogénesis superior a la angiogénesis basal mediada por Src observada en las preparaciones de CAM simuladas o no tratadas. El mutante Src 251 negativo dominante expresado fue efectivo en la inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF al nivel de la línea basal sin ser efectivo en la inhibición de la angiogénesis mediada por bFGF. Las fotomicrografías mostradas en la Fig. 8B confirman gráficamente los datos mostrados en la Fig. 8A. así, Src 251 expresado retroviralmente es un inhibidor efectivo de la angiogénesis, cuando la angiogénesis está inducida con VEGF.

En la presente invención se contemplan las aplicaciones de la proteína Src de utilidad en la presente invención con otros modelos de angiogénesis tal como se describe en los Ejemplos más adelante.

35 **5. Regresión del crecimiento del tejido tumoral con moduladores Src tal como se mide mediante el ensayo en el modelo de ojo de conejo**

El efecto de los moduladores Src sobre la angiogénesis inducida mediante factores de crecimiento se puede observar en microestructuras naturalmente transparentes tales como las que ejemplifica la córnea del ojo. Los nuevos vasos sanguíneos crecen a partir del borde de la córnea, que dispone de un aporte sanguíneo rico, hacia el centro de la córnea que normalmente no tiene aporte sanguíneo. Los estimuladores de la angiogénesis, tales como bFGF, cuando se aplican a la córnea inducen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del borde de la córnea. Los antagonistas de la angiogénesis, aplicados a la córnea, inhiben el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del borde de la córnea. Así, la córnea produce angiogénesis mediante una invasión de las células endoteliales del borde de la córnea hacia el rudo tejido corneal lleno de colágeno que es fácilmente visible. El ensayo de modelo de ojo de conejo proporciona por consiguiente un modelo *in vivo* para la observación directa de la estimulación e inhibición de la angiogénesis después de la implantación de compuestos directamente en la córnea del ojo.

50 El ensayo modelo de ojo de conejo *in vivo* demuestra angiogénesis inducida por factores de crecimiento

Se induce angiogénesis en el ensayo modelo de ojo de conejo *in vivo* mediante los factores de crecimiento bFGF o VEGF y se describe en la sección siguiente.

55 Se preparan partículas del polímero Hydron conteniendo factor de crecimiento según describen D'Amato *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:4082-4085 (1994). Las partículas contienen 650 ng de factores de crecimiento unidos independientemente a sucralfate (Carafet, Marion Merrell Dow Corporation) con el fin de estabilizar el factor de crecimiento y asegurar su liberación lenta en el tejido circundante. Además, las partículas de hydron se preparan conteniendo el retrovirus que expresa el Src deseado tal como se describió anteriormente. Las partículas se moldean en clavijas de teflón especialmente preparadas que disponen de un núcleo taladrado en su superficie. Se colocan aproximadamente 12 µl del material de moldear en cada clavija y se deja polimerizar durante la noche en una campana estéril. Las partículas se esterilizan mediante irradiación ultravioleta. A continuación se ensayan los efectos de las proteínas Src tal como se describió anteriormente.

## 6. Regresión *in vivo* del crecimiento de tejido tumoral mediante moduladores Src tal como se mide mediante el ensayo quimérico ratón:humano

Se genera un modelo de quimera ratón:humano *in vivo* reemplazando una parte de la piel de un ratón SCID con piel de prepucio neonatal humano. El ensayo *in vivo* de quimera ratón:humano se prepara esencialmente tal como describen Yan, *et al.*, [*J. Clin. Invest.*, 91:986-996 (1993)]. En breve, se extrae quirúrgicamente un cuadrado de 2 cm<sup>2</sup> de superficie de piel de un ratón SCID (6 a 8 semanas de edad) y se reemplaza con prepucio humano. El ratón se anestesia y se elimina el pelo de un área de 5 cm<sup>2</sup> en cada lado de la región abdominal lateral mediante afeitado. Se preparan dos lechos circulares de injerto de 2 cm<sup>2</sup> mediante la eliminación del grosor total de piel hasta la fascia. Se colocan injertos de prepucio humano de todo el grosor del mismo tamaño sobre las heridas del lecho y se suturan en el lugar. El injerto se recubre con un Band-Aid que se sutura a la piel. También se aplica cinta adhesiva de tejido micropore con el fin de cubrir la herida.

Se utiliza la línea de melanoma humano M21-L o la línea de carcinoma de mama humano MDA 23.1 (ATCC HTB 26;  $\alpha_v\beta_3$  negativa mediante inmunoreactividad de secciones de tejido a mAb LM609) con el fin de formar tumores sólidos humanos en el injerto de piel humana en el ratón SCID. Se inyecta una suspensión de  $5 \times 10^6$  células independientes M21-L o MDA 23.1 intradermalmente en el injerto de piel humana. A continuación se observan los ratones durante entre 2 a 4 semanas con el fin de permitir el crecimiento tumores humanos medibles.

Una vez se establece un tumor humano medible, se inyectan preparaciones de retrovirus o PBS en la vena de la cola del ratón. Después de un período de entre 2 y 3 semanas, el tumor se extrae y se analiza mediante pesado e histología. Se ensayan los efectos de la proteína Src expresada, sobre los tumores.

## 7. Regresión *in vitro* del crecimiento del tejido tumoral mediante moduladores Src tal como se mide mediante ensayo CAM

El crecimiento tumoral depende de la angiogénesis [Folkman, *J. Biol. Chem.* 267:10931-10934 (1992); Weidner *et al.*, *N.E. J. Med.* 324:1-8 (1991); Brooks *et al.*, *Cell* 79:1157-1164 (1994)] de hecho, las publicaciones recientes sugieren que el crecimiento tumoral es sensible a los efectos antiangiogénicos de los antagonistas del receptor de VEGF [Kim *et al.*, *Nature*, 362:8451-844 (1993)]. Por consiguiente, se examinó si la supresión de angiogénesis mediante la administración de Src-251-sin quinasa influenciaría el crecimiento de un meduloblastoma humano (DAOY), un tumor muy angiogénico que se conoce que produce VEGF y muy poco bFGF.

Los ensayos de crecimiento tumoral de meduloblastoma DAOY de entre 3 y 6 días se realizaron en CAM de pollo esencialmente tal como se describió anteriormente [Brooks *et al.*, *supra* (1994)]. Se lavaron  $5 \times 10^6$  células DAOY cultivadas en RPMI 1640 con 10% suero bovino fetal y se sembraron en la CAM de un embrión de 10 días con el fin de producir fragmentos de tumor DAOY. Después de 7 días, se disecaron fragmentos de tumor de 50 mg y se resembraron en otro embrión de 10 días y se incubaron durante otros 3 a 6 días con aplicación tópica (25  $\mu$ l) de retrovirus control RCAS-GFP, RCAS-Src 251 o tratamiento simulado. Mediante la generación de imagen confocal de tejido completo de los tumores infectados como guía, fue posible determinar que, mediante esta estrategia tópica, se produjo una expresión significativa de las construcciones RCAS alrededor de y en los fragmentos de tumor. Se resecaron y pesaron los tumores de modo doble-ciego extrayendo solamente la masa tumoral definible [Brooks *et al.*, *supra* 1994]. El peso húmedo del tumor después de entre 3 y 6 días se comparó con el peso inicial y se determinó el porcentaje de cambio en el peso tumoral para cada grupo.

Estos tumores crecieron fácilmente en la CAM y produjeron angiogénesis activa (Fig. 9) permitiendo dirigir selectivamente al sistema vascular tumoral derivada del ave mediante la utilización de un retrovirus RCAS específico de ave.

La Fig. 9, describe resultados que muestran que la administración retroviral de RCAS-Src 251 a los tumores humanos creciendo en la CAM de pollo invierte el crecimiento tumoral. La Fig. 9A muestra meduloblastomas que habían sido crecidos en CAM de embrión de pollo tal como se describió anteriormente. Se aplicó tópicamente retrovirus que comprenden RCAS-GFP o RCAS-Src 251 a tumores preestablecidos superiores a 50 mg. Una micrografía de un fragmento de tumor de meduloblastoma infectado con RCAS-GFP que expresaba GFP revela la expresión exclusiva en los vasos sanguíneos del tumor (flecha) tal como se detectó mediante sección óptica con un microscopio confocal de barrido láser Bio Rad (barra = 500  $\mu$ m). La Fig. 9B muestra los resultados de tumores tratados tal como anteriormente a los que se permitió crecer durante entre 3 y 6 días después de los que se resecaron y se determinó el peso húmedo. Los datos se expresan como el cambio medio en peso tumoral (desde el peso inicial de 50 mg del tumor) +/- SEM de 2 réplicas. Los RCAS-Src 251 tuvieron un impacto significativo sobre el crecimiento tumoral después de 3 días (\*,  $p < 0,002$ ) y 6 días (\*\*,  $p < 0,05$ ). La Fig. 9C muestra estereomicrografías representativas de tumores de meduloblastoma extraídos quirúrgicamente de embriones que fueron tomadas mediante un estereomicroscopio Olympus (barr = 350  $\mu$ m). Panel inferior, una micrografía de gran amplificación de cada tumor mostrando el sistema vascular de cada tumor en detalle (barra = 350  $\mu$ m). Las flechas indican vasos sanguíneos destruidos en los tumores tratados con RCAS-Src-251.

Los resultados muestran que la administración de RCAS que comprenden Src 251 a los meduloblastomas

preestablecidos resultó en la expresión vírica selectiva en los vasos sanguíneos asociados a los tumores (Fig. 9A) y ello finalmente condujo a la regresión de estos tumores en el período de seis días (Fig. 6B). Importantemente, los vasos sanguíneos asociados a los tumores en los animales tratados con virus que comprenden Src 251 estuvieron severamente destruidos y fueron menos en número en comparación con los vasos tumorales en los animales control (Fig. 9C). El hecho de que los tumores infectados con RCAS-GFP mostraron GFP localizada solamente en el sistema vascular del tumor sugiere que los efectos antitumorales observados con el Src 251 administrado retroviralmente fueron debidos a sus propiedades antiangiogénicas.

#### 8. Necesidad de Src para la supervivencia celular durante la angiogénesis mediada por VEGF pero no por bFGF

La información reciente sugiere que los receptores de los factores de crecimiento [Choi y Ballermann, *J. Biol. Chem.*, 270:21144-21150 (1995); Satake *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 244:642-646 (1998)] e integrinas [Meredith, *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 4:953-961 (1993); Brooks *et al.*, *Science*, 264:569-571 (1994a)] promocionan la supervivencia de las células endoteliales angiogénicas. El hecho de que tanto los factores de crecimiento como los receptores de adhesión también regulen la actividad Src sugirió el examen de la función de Src sobre la supervivencia de las células endoteliales durante la angiogénesis. Se infectaron CAM estimuladas con bFGF o VEGF con retrovirus comprendiendo Src 251 y se analizaron secciones de criostato de los tejidos para determinar la presencia de células apoptóticas.

En breve, secciones de criostato de CAM tratadas con RCAS-GFP o RCAS-Src 251 tratadas con bFGF o VEGF se analizaron para determinar células apoptóticas utilizando Apoptag Kit (Oncor, Gaithersburg, MD). Las secciones se inmunotñieron también con un anticuerpo policlonal de conejo antiVwf (Biogenix, San Ramon, CA) y se contratiñeron con 1 µg/ml DAPI. Las imágenes de fluorescencia se capturaron con una cámara de CCD enfriado (Roper, Trenton, NJ), y las imágenes de fluorescencia se procesaron y aparejaron las exposiciones entre tratamientos experimentales tal como se describió anteriormente [Elcelri, *et al.*, 1998, *supra*].

Con el fin de medir el índice apoptótico de los tejidos CAM infectados con retrovirus, se utilizó annexina V conjugada a FITC (Clontech, Palo Alto, CA) para teñir las suspensiones celulares y las células lavadas se analizaron por citometría de flujo. Las suspensiones celulares de células de CAM se prepararon a partir de CAM infectadas con virus o simuladamente infectadas, mediante la digestión con 0,1% (peso/vol) colagenasa tipo IV (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ) en RPMI 1640 de tejido de CAM triturado, con agitación durante 1 hora a 37° C tal como se describió anteriormente (Brooks *et al.*, 1994b) y filtrado a través de una rejilla de nylon de 100 µm [Becton Dickinson, Fountain Lakes, NJ]. La fluorescencia se midió con un citómetro de flujo FACscan (Becton Dickinson) con el fin de contar 10.000 células.

Las mediciones de tinción con vWf mediante FAC se realizaron en preparaciones paralelas de células de tejido de CAM digerido con colagenasa, que se fijaron en 1,8% paraformaldehído, se fijaron en 70% etanol, se incubaron con anticuerpo antiVwf y se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado a FITC.

La administración de Src 251 promovió una tinción TUNEL extensa entre los vasos sanguíneos positivos al antígeno relacionado al factor VIII [factor von Willebrand [vWf]] en las CAM estimuladas con VEGF pero no con bFGF. De hecho, en estas CAM se observó una apoptosis mínima entre los demás tipos celulares, lo que sugiere una necesidad específica de las células endoteliales por actividad quinasa Src para la supervivencia celular en los vasos sanguíneos activados por VEGF. En una segunda serie de experimentos, las CAM infectadas con retrovirus estimuladas con VEGF o con bFGF se sometieron a una digestión limitada con colagenasa con el fin de preparar una suspensión de células sueltas. Estas células derivadas de CAM demostraron comprender aproximadamente entre el 20 y el 50% de células endoteliales (positivas a vWf) y se analizaron para determinar apoptosis mediante detección por citometría de flujo de células positivas a annexina V, un marcador temprano de la apoptosis. Las células derivadas de las CAM infectadas con Src 251 y estimuladas con VEGF tuvieron una tinción con annexina V significativamente incrementada relativa a las células de CAM infectadas simuladamente con RCAS-GFP y tratadas con VEGF. Por el contrario, las células derivadas de CAM infectadas simuladamente o las infectadas con RCAS-Src 251 y estimuladas con bFGF mostraron poca o no tinción con annexina V. Además, no se detectó tinción con annexina V entre las células derivadas de CAM no estimuladas o estimuladas con bFGF. Estos datos demuestran que la actividad quinasa Src es necesaria selectivamente para la supervivencia de las células endoteliales durante la angiogénesis mediada por VEGF pero no por bFGF en la CAM.

#### 9. Requerimiento selectivo de la actividad de quinasa Src en un modelo subcutáneo murino de angiogénesis

Con el fin de analizar más la función de Src en la angiogénesis se utilizó un modelo murino. En este caso, se indujo la angiogénesis mediante la inyección subcutánea de factor de matrigel sin factor de crecimiento suplementado con bFGF (100 ng/ml) o VEGF (400 ng/ml) en ratones atímicos wehl (nu/nu) adultos y se analizó después de 5 días [Passaniti *et al.*, 1992]. La angiogénesis se cuantificó extrayendo y homogeneizando el tejido, aislando las proteínas e inmunotransfiriendo con anticuerpo contra receptor del VEGF (flk-1) (Fig. 13A) que es específico para la células endoteliales. Tal como se observó en el pollo, la expresión de ADNc de Src-251 desprovisto de quinasa bloqueó la angiogénesis inducida por VEGF en este modelo murino mientras que no tuvo efecto sobre la angiogénesis inducida

por bFGF (Fig. 13B). Con el fin de establecer la función del Src endógeno en este modelo, se infectaron los tejidos con un retrovirus para la expresión de Cak que inhibe la actividad de Src endógeno mediante la fosforilación del lugar regulador C-terminal [Nada *et al.*, *Nature*, 361:68-72 (1991)]. La expresión de Cak bloqueó la angiogénesis inducida por VEGF pero no la inducida por bFGF (Fig. 13), confirmando una función de la actividad Src endógena en la angiogénesis mediada por VEGF. La neovascularización de estos tejidos estimulados infectados por virus, se confirmó mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpo antiDC34 conjugado a FITC (Fig. 13) o con anticuerpo antiflk-1 y se cuantificó por enumeración del número de vasos sanguíneos positivamente teñidos para CD34 en cada criosección (Fig. 13C).

En breve, se indujo angiogénesis mediante la inyección subcutánea de Matrigel desprovisto de factor de crecimiento que contenía disolución salina o VEGF (400 ng/ml) con  $2 \times 10^6$  células ecotrópicas empaquetadoras que expresaban retrovirus GFP, en el flanco de un ratón atómico wahl (nu/nu) y se analizó después de 5 días de incubación. La neovascularización se cuantificó mediante inmunotransferencia con anticuerpo antireceptor del VEGF (flk-1) que es específico para las células endoteliales. La Fig. 15A describe los resultados de la inmunotransferencia. Los efectos del retrovirus Src-251 desprovisto de quinasa, Csk o GFP sobre la angiogénesis inducida por VEGF (400 ng/ml) o bFGF (400 ng/ml) se analizó mediante inmunotransferencia del homogeneizado de tejido con un anticuerpo antiflk-1. Un ejemplo de estos resultados se describe en la Fig. 15B. El efecto de los retrovirus que expresan Src-251 y Csk sobre la neovascularización inducida por VEGF se cuantificó mediante la enumeración del número de vasos CD34 positivos en secciones transversales de tejido mediante inmunofluorescencia indirecta en campos triplicados al azar, a 20X. Las criosecciones de las biopsias se sometieron también a tinción por inmunofluorescencia con anticuerpo antiCD34 o con anticuerpo antiflk, se fotografiaron y se cuantificaron tal como se describió anteriormente para los ensayos de angiogénesis en CAM.

La fluorescencia de los montajes completos de fragmentos tumorales infectados con RCAS-FGP se logró mediante la disección de un fragmento de tumor y haciendo imágenes del fragmento sin fijar directamente en un portaobjetos utilizando un microscopio confocal láser (MRC 1024: Rio-Rad, Hercules, CA).

#### 10. Efecto de la expresión intradermal de VEGF en oreja de ratón Src<sup>-/-</sup> o Src<sup>+/-</sup>

Continuando con los resultados obtenidos en los modelos de pollo y ratón, se utilizó una estrategia genética directa con el fin de examinar la angiogénesis inducida por VEGF en ratones Src<sup>-/-</sup>. También se examinaron los efectos sobre la permeabilidad vascular, ya que se conoce que el VEGF tanto inicia el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos como promueve la permeabilidad vascular [Senger *et al.*, *Science*, 218:983-985 (1983); Ferrera y Davis-Smyth, *Endocr. Rev.*, 16:4-25 (1997)].

Se realizó en una oreja de ratones Src<sup>-/-</sup> y Src<sup>+/-</sup> la inyección intradermal de adenovirus que expresan un ADNc del VEGF humano, mientras que en la oreja opuesta de cada ratón se inyectó adenovirus que expresaba  $\beta$ -galactosidasa. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos dependiente de VEGF en las orejas Src<sup>+/-</sup> se detectó por primera vez a las 48 horas y la neovascularización se analizó a los 5 días.

En breve, se generaron ratones pp60<sup>c-src</sup>, pp60<sup>c-yes</sup>, pp60<sup>c-fyn</sup> deficientes (129/8v/Ev X C57B16/J) tal como se describió anteriormente [Soriano *et al.*, *Cell*, 64:693-702 (1991)]. Se obtuvieron stocks adicionales de Jackson Labs. Las orejas de los ratones se inyectaron intradermalmente [Eriksson *et al.*, *Microvasc. Res.*, 19:374-378 (1980)] con 5  $\mu$ l de adenovirus que expresaba o VEGF o  $\beta$ -galactosidasa y se fotografiaron las orejas después de 5 días, con un estereoscopio.

Se encontró que había niveles idénticos de expresión vírica en las orejas inyectadas con Src<sup>+/-</sup> y Src<sup>-/-</sup> tal como se determinó mediante tinción con X-gal de las orejas inyectadas con adenovirus  $\beta$ -galactosidasa. En las orejas Src<sup>-/-</sup> inyectadas con VEGF, no se produjo una disminución significativa de la angiogénesis tal como se midió mediante el conteo de puntos de bifurcación ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, sorprendentemente, el fenotipo más evidente en estos animales fue el completo bloqueo de la pérdida vascular en comparación con las orejas Src<sup>+/-</sup> inyectadas con VEGF. El examen de las orejas inyectadas con VEGF confirmó la extensión de la pérdida vascular en los ratones Src<sup>+/-</sup>, que estuvo esencialmente ausente en los ratones Src<sup>-/-</sup>. La pérdida vascular en estos animales sugirió que la actividad VP, que ha sido asociada con la angiogénesis *in vivo* [Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 148:11029-1039 (1995)], se podría interrumpir selectivamente en ratones pp60<sup>c-src</sup> deficientes.

#### 11. VEGF fracasa en comprometer la barrera hematoencefálica en ratones deficientes en pp60<sup>c-src</sup>

El sistema vascular cerebral está caracterizado porque presenta una barrera hematoencefálica muy restrictiva que prohíbe la extravasación de pequeñas moléculas en el tejido cerebral circundante. El crecimiento tumoral dentro del cerebro puede comprometer esta barrera debido en parte a la producción de factores de crecimiento angiogénicos tales como el VEGF. Por consiguiente, se examinó la naturaleza de la barrera hematoencefálica en ratones Src<sup>+/-</sup> o Src<sup>-/-</sup>. En este caso, se inyectó disolución salina o VEGF estereotácticamente en los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro, respectivamente. Todos los ratones recibieron inyecciones sistémicas de colorante azul de Evan con el fin de monitorizar la actividad VP.

En breve, se inyectó disolución salina o VEGF (200 ng en 2  $\mu$ l) estereotácticamente en los lóbulos izquierdo o derecho a 92 mm a la izquierda/derecha de la línea media, 0,5 mm rostral de Bregma, y 3 mm en profundidad desde la dura, respectivamente. Los animales recibieron una disolución intravenosa de colorante azul de Evan a lo 30 min., después de la inyección, tal como se describió anteriormente. Después de 30 minutos adicionales, se perfundieron los animales y se extrajeron los cerebros. Se observó la fluorescencia del colorante azul de Evan utilizando un microscopio confocal láser en criosecciones no fijadas del cerebro.

La pérdida vascular de sangre se localizó en el hemisferio inyectado con VEGF en los ratones Src<sup>+/-</sup>, pero hubo una ausencia total de pérdida vascular en los ratones Src<sup>-/-</sup>. Este fue también el caso cuando se examinó la VP mediante la medición de la acumulación de colorante azul de Evan tal como se detecta mediante análisis de epifluorescencia de las secciones de criostato de estos cerebros. Así, el VEGF compromete la barrera hematoencefálica en un modo que depende del pp60<sup>c-Src</sup> activo.

### 12. La VP mediada por VEGF, pero no la VP asociada a inflamación, depende de pp60<sup>c-Src</sup>

Con el fin de analizar más y cuantificar el efecto de VEGF como factor VP en los ratones Src<sup>+/-</sup> o Src<sup>-/-</sup>, se utilizó el ensayo de Miles [Miles & Miles, 1952] para medir cuantitativamente la permeabilidad vascular en la piel de estos animales. Se inyectó VEGF intradermalmente en ratones Src<sup>+/-</sup> o Src<sup>-/-</sup> que habían recibido una administración intravenosa sistémica de colorante azul de Evan. En los 15 minutos posteriores a la inyección de VEGF, se produjo un incremento de 3 veces en la VP en los ratones Src<sup>+/-</sup>. Sin embargo, en los ratones Src<sup>-/-</sup> no se observó actividad VP detectable. La extracción del colorante de los parches de piel inyectada se cuantificó y comparó con controles de disolución salina y bFGF. Los controles de bFGF o disolución salina inyectados adyacentemente al VEGF no mostraron un incremento significativo en VP.

En resumen, el ensayo de Miles [Miles *et al.*, 1962] se adaptó para ratones mediante la inyección de 10  $\mu$ l de VEGF (400 ng/ml), alilisocianato (aceite de mostaza, 20% peso/vol. en aceite mineral), o disolución salina, intradermalmente en ratones que habían sido inyectados previamente con 100  $\mu$ l de 0,5% colorante azul de Evan. Después de 15 min. Los parches de piel se disecaron, fotografiaron y extrajeron a 58° C con formalina y se cuantificaron con un espectrofotómetro.

También se conoce que la pérdida vascular/permeabilidad tiene lugar durante la inflamación, lo que permite la acumulación de proteínas adhesivas del suero y células inflamatorias en los tejidos.

De hecho, los mediadores inflamatorios promocionan por sí directamente la pérdida vascular. Por consiguiente, se ensayó uno de tales mediadores inflamatorios, el alilisotiocianato, también conocido como aceite de mostaza [Inoue *et al.*, 1997 *supra*], en ratones Src<sup>+/-</sup> o Src<sup>-/-</sup> para determinar su capacidad de producir VP. Contrariamente a lo observado con animales Src<sup>-/-</sup> estimulados con VEGF, no se detectó disminución en VP producido por la inyección del mediador inflamatorio alilisotiocianato. Así, se puede concluir que Src tiene una función selectiva en la actividad VP inducida por VEGF y no influencia la VP asociada al proceso inflamatorio.

### 13. La actividad VP mediada por VEGF depende de src y Yes, pero no de Fyn

La especificidad de la necesidad de Src para la VP se exploró mediante el examen de la actividad VP inducida por VEGF asociada a SFK tales como Fyn o Yes, que, como Src, se conoce que se expresan en las células endoteliales [Bull *et al.*, *FEBS letters*, 361:41-44 (1994); Kiefer *et al.*, *Curr. Biol.*, 4:100-109 (1994)]. Se confirmó que estos tres SFK se expresaban de modo equivalente en las aortas de los ratones tipo silvestre. Como en los ratones Src<sup>-/-</sup>, los animales deficientes en Yes también fueron defectivos en la VP inducida por VEGF. Sin embargo, sorprendentemente, los ratones sin Fyn retuvieron una elevada VP en respuesta a VEGF que no fue significativamente diferente de la de los animales control. La disrupción de la VP inducida por VEGF en los ratones Src<sup>-/-</sup> o Yes<sup>-/-</sup> demuestra que la actividad quinasa de las SFK específicas es esencial para el evento de señalización mediado por VEGF que conduce a la actividad VP pero no a la angiogénesis.

Las propiedades de permeabilidad vascular de VEGF en la piel de ratones Src<sup>+/-</sup> (Fig. 14A, panel izquierdo) o Src<sup>-/-</sup> (Fig. 14A, panel derecho) se determinaron mediante inyección intradermal de disolución salina o VEGF (400 ng) en ratones que habían sido inyectados intravenosamente con colorante azul de Evan. Después de 15 minutos, se fotografiaron los parches de piel (barra de escala, 1 mm). Las estrellas indican los lugares de inyección. Se disecaron las regiones que rodean los lugares de inyección de VEGF, bFGF o disolución salina y se cuantificó VP mediante la elusión del colorante azul de Evan en formamida a 58° C durante 24 horas y se midió la absorbancia a 500 nm (Fig. 14B, gráfica derecha). La capacidad de un mediador de la inflamación (alilisotiocianato), que se conoce que induce VP en relacionada a la inflamación, se ensayó en ratones Src<sup>+/-</sup> o Src<sup>-/-</sup> (Fig. 14B, derecha).

La capacidad de VEGF para inducir VP se comparó en ratones Src<sup>-/-</sup>, Fyn<sup>-/-</sup> o Yes<sup>-/-</sup> mediante el ensayo de Miles (Fig. 14C). Los datos para cada uno de los ensayos de Miles se expresó como la media  $\pm$  SD de animales por triplicado. Los defectos VP de Src<sup>-/-</sup> y Yes<sup>-/-</sup> en comparación con animales control fueron estadísticamente significativo (\*p < 0,05, ensayo t pareado), mientras que ni los defectos VP de los ratones Fyn<sup>-/-</sup> tratados con VEGF ni los de los ratones Src<sup>+/-</sup> tratados con alilisotiocianato fueron estadísticamente significativos (\*\*p < 0,05).



**14. Los ratones tratados con inhibidor de la familia Src de tirosina quinasa y los ratones Src<sup>-/-</sup> muestran un daño asociado al trauma o a la herida de los vasos sanguíneos inferior al de los ratones de tipo silvestre sin tratar**

5 La administración específica de inhibidores de la familia Src de tirosina quinasa funciona como inhibidora de la pérdida vascular patológica y de la permeabilidad durante el daño vascular o los trastornos tales como la apoplejía. El endotelio vascular es un tipo celular dinámico que responde a muchas señales para regular procesos tales como el brote de nuevos vasos durante la angiogénesis de un tumor o la regulación de la permeabilidad de la pared vascular durante el edema inducido por la apoplejía y el daño tisular.

15 La reducción de la permeabilidad vascular en dos modelos de apoplejía en ratón, mediante la inhibición con fármacos de la senda de Src, es suficiente para inhibir el daño cerebral mediante la reducción de la pérdida vascular inducida por la isquemia. Además, en ratones genéticamente deficientes en Src, con una reducida pérdida vascular/permeabilidad, el volumen de infarto también se reduce. La combinación de los datos de inhibidor de Src sintético, con la evidencia genética que soporta una reducida pérdida vascular durante la apoplejía y otros modelos relacionados demuestran la relevancia fisiológica de esta estrategia para reducir el daño cerebral después de la apoplejía. La inhibición de estas sendas mediante una gama de inhibidores disponibles de las quinasa de la familia Src de estas cascadas de señalización tiene el beneficio terapéutico de mitigar el daño cerebral derivado del daño tisular relacionado a la permeabilidad.

25 Se utilizaron dos procedimientos para inducir isquemia cerebral localizada. Los dos modelos animales de isquemia cerebral focalizada están bien establecidos y se usan ampliamente en la investigación de la apoplejía. Se han utilizado los dos modelos anteriormente con el fin de investigar la patofisiología de la isquemia cerebral así como para ensayar nuevos fármacos antiapopléticos.

30 a) se anestesiaron ratones con avertin y se mantuvo la temperatura corporal manteniendo a los animales sobre un manta térmica. Se realizó una incisión ente la oreja derecha y el ojo derecho. Se expuso el cráneo mediante retracción del músculo temporal y se taladró una pequeña perforación en la región obre la arteria cerebral media (MCA). Se eliminaron las meninges y se ocluyó la MCA derecha mediante coagulación utilizando un filamento caliente. Se permitió que se recuperasen los animales y se devolvieron a las jaulas. Después de 24 hora, se perfundieron los cerebros, se extrajeron y se cortaron en secciones de 1 mm. Las secciones se sumergieron en cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) al 2% y el área de cerebro infartado se identificó como tejido no teñido (blanco) rodeado de tejido viable (rojo). El volumen del infarto se definió como la suma de las áreas no teñidas de las secciones, multiplicada por el grosor.

35 Se utilizaron ratones deficiente en Src (Src<sup>-/-</sup>) para estudiar la función de Src en la isquemia cerebral. Los ratones src<sup>+/-</sup> sirvieron como controles. Se descubrió que en los ratones Src<sup>-/-</sup> el volumen de infarto estaba reducido de  $26 \pm 10 \text{ mm}^3$  a  $16 \pm 4 \text{ mm}^3$  en los controles a las 24 horas después del insulto. El efecto fue todavía más pronunciado cuando se inyectaron ratones C57B16 tipo silvestre con 1,5 mg/kg PP1 intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos después de la oclusión del vaso. El tamaño del infarto se redujo de  $31 \pm 12 \text{ mm}^3$  en el grupo sin tratar a  $8 \pm 2 \text{ mm}^3$  en el grupo tratado con PP1.

45 b) En un segundo modelo de isquemia cerebral se ocluyó la MCA mediante el emplazamiento de un bolus en el origen de la MCA. Se colocó un solo coágulo homólogo intacto de 24 horas rico en fibrina en el origen de la MCA utilizando un catéter PE-50 modificado. Se demostró la inducción de isquemia cerebral mediante la reducción del flujo sanguíneo cerebral en el hemisferio ipsilateral en comparación con el del hemisferio contralateral. Después de 24 horas se extrajeron los cerebros, se prepararon secciones seriadas y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE). Los volúmenes infartados se determinaron sumando las áreas infartadas en las secciones HE seriadas multiplicadas por la distancia entre cada sección.

55 Las dosis de PP1 utilizadas en este estudio (1,5 mg/kg i.p.) se seleccionaron empíricamente. Es conocido que el VEGF se expresa primero a aproximadamente a las 3 horas de la isquemia cerebral en el cerebro con un máximo después de 12 a 24 horas. En este estudio PP1 se administró 30 minutos después del inicio del infarto con el fin de bloquear completamente el incremento en la permeabilidad vascular inducido por el VEGF. Según el proceso temporal típico de expresión de VEGF, una ventana terapéutica para la administración de los inhibidores Src sería de hasta 12 horas después de la apoplejía. En las enfermedades asociadas con un incremento sostenido de la permeabilidad vascular sería apropiada una administración crónica del fármaco inhibidor de Src.

60 La Fig. 15 es un gráfico que describe los resultados comparativos de los volúmenes ( $\text{mm}^3$ ) promediados de infarto en cerebros de ratones después de la herida, en los que los ratones fueron Src (Src<sup>+/-</sup>) heterogéneos, mutantes dominante negativos (Src<sup>-/-</sup>), tipo silvestre (WT) o tipo silvestres tratado con 1,5 mg/kg PP1 (PP1).

65 La Fig. 16 describe muestras secuenciales de rastreos MRI de cerebros de ratón perfundidos después del tratamiento para inducir daño al SNC, en los que la progresión de los rastreos de los animales tratados con PP1 (derecha) muestra claramente un menor infarto que en la progresión de los rastreos de los animales control no

tratados (izquierda).

5 La presente invención es particularmente adecuada para la intervención específica del daño tisular inducido por PV debido a que la inhibición dirigida de la acción de las tirosina quinasas de la familia Src enfoca la inhibición sobre VP sin un efecto a largo tiempo sobre otras respuestas inducidas por VEGF que pueden ser beneficiosas para la recuperación del daño. Por el contrario a la neutralización de la proteína VEGF, la inhibición de Src no interfiere con el efecto angiogénico acumulativo del VEGF que podría ser beneficioso en una etapa posterior de la enfermedad.

10 La utilización de pequeñas moléculas sintéticas inhibitoras resulta en general más segura y más manejable que la utilización de proteínas grandes. La utilización de proteínas recombinantes, tales como una proteína de fusión receptor de VEGF-inmunoglobulina murina es potencialmente dañina y no permite la administración repetida por miedo a provocar una reacción alérgica cuando se utiliza en seres humanos (es decir, anticuerpo humano antiratón; HAMA).

15 Finalmente, el VEGF no es el único activador del Src corriente abajo, existen otras citoquinas implicadas en la patofisiología de la isquemia cerebral que pueden influenciar la permeabilidad vascular, tale como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Así, la inhibición de VEGF podría no inhibir todo el daño subsiguiente relacionado a la activación de Src. De hecho, la reducción del tamaño del infarto por PP1 es más pronunciada que por antagonismo del VEGF lo que indica que otras sendas pueden activar las quinasas Src facilitando el incremento de la permeabilidad.

20 La memoria anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. El depósito de material no constituye una admisión de que la descripción escrita comprendida en la presente memoria resulte inadecuada para permitir la práctica de un aspecto cualquiera de la presente invención, comprendiendo el mejor modo de la misma, ni se debe considerar como limitativo del alcance de las reivindicaciones a la ilustración que representa. Desde luego, a partir de la descripción anterior resultarán evidentes múltiples modificaciones de la presente invención para los expertos en la materia que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende proteínas tirosina quinasas Src y Yes, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha proteína Src es Src-A, o presenta en el residuo de aminoácido 527 cualquier residuo de aminoácido excepto tirosina, serina o treonina, o en la que dicha proteína Src es inactiva.
- 10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que dicha proteína Src inactiva es Src K295M o Src 251.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha proteína Yes es una proteína Yes inactiva.
- 15 5. Composición farmacéutica que comprende una proteína tirosina quinasa Yes inactiva, o una mezcla de proteínas tirosina quinasas inactivas Src y Yes para su utilización en un procedimiento para modular la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico y que comprende poner en contacto dicho tejido con una cantidad moduladora de la VP terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica, en la que el estado patológico es seleccionado de entre el grupo constituido por daños inducidos por apoplejía, crecimiento de tumores, infarto de miocardio, aterosclerosis, edema cerebral, traumatismo o enfermedad cerebrovascular, artritis reumatoide, retinopatía diabética, artritis, enfermedades inflamatorias, reumatismo articular crónico y psoriasis, restenosis, hemorragia cerebral, traumatismo cerebral y espinal, lesión espinal y cerebral inducida por hipoxia, trastornos inflamatorios del SNC, infecciones víricas o bacterianas del SNC, trastornos autoinmunes, enfermedades con un incremento crónico de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA); y formación de metástasis.
- 20 6. Composición farmacéutica que comprende una proteína tirosina quinasa activa Yes o una mezcla de proteínas tirosina quinasas activas Src y Yes para su utilización en un procedimiento para modular la permeabilidad vascular en un tejido que padece un estado patológico y que comprende poner en contacto dicho tejido con una cantidad moduladora de la VP terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica, en la que el estado patológico es seleccionado de entre el grupo constituido por extremidades isquémicas y heridas crónicas.
- 30 7. Artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica contenida en dicho material de envasado, en el que dicha composición farmacéutica puede modular la permeabilidad vascular en un tejido que sufre un estado patológico, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha composición farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento de estados patológicos mediante la modulación de la permeabilidad vascular, y en el que dicha composición farmacéutica comprende una proteína Yes y proteína Src tirosina quinasa en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 8. Artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica contenida en dicho material de envasado, en el que dicha composición farmacéutica puede modular la permeabilidad vascular en un tejido que sufre un estado patológico, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha composición farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento de estados patológicos mediante la modulación de la permeabilidad vascular, y en el que dicha composición farmacéutica comprende una proteína tirosina quinasa Yes, en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 9. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de tirosina quinasas de la familia Src para su utilización en un procedimiento para mejorar un daño tisular relacionado con la fuga vascular o el edema que comprende poner en contacto dicho tejido con una cantidad moduladora de la permeabilidad vascular de dicha composición farmacéutica, en la que el inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src es seleccionado de entre el grupo constituido por una proteína Yes inactiva, una mezcla de una proteína Src inactiva y una proteína Yes inactiva, y una mezcla de una proteína Yes inactiva y/o una proteína Src inactiva junto con un inhibidor químico seleccionado de entre PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, radicicol R2146, y geldanamicina.
- 45 10. Artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica contenida en dicho material de envasado, en el que dicha composición farmacéutica puede modular el aumento de la permeabilidad vascular en un tejido que sufre un estado patológico, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha composición farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento de estados patológicos asociados a edema o fuga vascular, y en el que dicha composición farmacéutica comprende un inhibidor de tirosina quinasa de la familia Src y un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo, en el que el inhibidor de la tirosina quinasa de la familia Src es seleccionado de entre el grupo constituido por una proteína Yes inactiva, una mezcla de una proteína Src inactiva y una proteína Yes inactiva, y una mezcla de una proteína Yes inactiva y/o una proteína Src inactiva junto con inhibidor químico seleccionado de entre PP1, PP2, PD173955, AGL1872, PD162531, radicicol R2146, y geldanamicina.
- 50 55 60

## ADNc de c-SRC de pollo

(SEC ID nº:2)

1 tctgacacc atctgtctgt ctgtctgtgt gctgcaggag ctgagctgac tctgctgtgg  
 61 cctcgcgtac cactgtggcc aggcggtagc tgggacgtgc agcccaccac catggggagc  
 121 agcaagagca agcccaagga ccccagccag cgccggcgca gcctggagcc acccgacagc  
 181 accaccacg ggggattccc agcctcgcag accccaaca agacagcagc ccccgacacg  
 241 caccgcacc ccagccgctc ctttgggacc gtggccaccg agcccaagct cttcgggggc  
 301 ttcaacactt ctgacaccgt tacgtcgccg cagcgtgccg gggcactggc tggcggcgtc  
 361 accactttcg tggtctctc cgactacgag tcccggactg aaacggactt gtccttaag  
 421 aaaggagaac gcctgcagat tgtcaacaac acggaagggtg actggtggct ggctcattcc  
 481 ctactacag gacagacggg ctacatccc agtaactatg tcgcgcctc agactccatc  
 541 caggctgaag agtggctact tgggaagatc actcgtcggg agtccgagcg gctgctgctc  
 601 aacccgaaa acccccgggg aaccttctg gtccgggaga gcgagacgac aaaaggtgcc  
 661 tattgctct cgtttctga ctttgacaac gccaaagggc tcaatgtgaa gcactacaag  
 721 atccgcaagc tggacagcgg cggttctac atcacctcac gcacacagtt cagcagcctg  
 781 cagcagctgg tggcctacta ctccaacat gctgatggct tgtgccaccg cctgaccaac  
 841 gtctgcccc cgtccaagcc ccagaccag ggactcgcca aggacgcgtg ggaaatcccc  
 901 cgggagtcgc tgcggctgga ggtgaagctg gggcagggtc gctttggaga ggtctggatg  
 961 gggacctgga acggcaccac cagagtggcc ataaagactc tgaagcccgg caccatgtcc  
 1021 ccggagcct tctgcagga agcccaagt atgaagaagc tccggcatga gaagctggtt  
 1081 cagctgtacg cagtgggtc ggaagagccc atctacatg tctactgagta catgagcaag  
 1141 gggagcctcc tggatttct gaagggagag atgggcaagt acctgcggct gccacagctc  
 1201 gtcgatatgg ctgctcagat tgcattccgc atggcctatg tggagaggat gaactacgtg  
 1261 caccgagacc tgcgggcggc caacatctg gtgggggaga acctggtgtg caaggtggct  
 1321 gactttgggc tggcacgcct catcgaggac aacgagtaca cagcacggca aggtgccaag  
 1381 tccccatca agtggacagc ccccgaggca gccctctatg gccggttcac catcaagtgc  
 1441 gatgtctggt ccttcggcat cctgctgact gagctgacca ccaagggccg ggtgccatac  
 1501 ccagggatgg tcaacagga ggtgctggac caggtggaga ggggctaccg catgccctgc  
 1561 ccgcccagat gcccagatc gctgcatgac ctcatgtgcc agtgcctggcg gagggacct  
 1621 gaggagcggc ccactttga gtacctgcag gccttctgg aggactactt cacctcgaca  
 1681 gagccccagt accagcctgg agagaacct taggcctgga gctcctctg gaccagagc  
 1741 ctgcctgtgg ggtacaggg

FIG. 1

**Proteína codificada por el cSRC de pollo**

**(SEC ID n°:3)**

MGSSKSKPKDPSQRRRSLEPPDSTHHGGFPASQTPNKTA  
PDTHRTPSRSFGTVATEPKLFGGFNTSDTVTSPQRAGALA  
GGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTTEGDWWL  
AHSLTTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAEEWYFGKITRRESER  
LLNPNENPRGTFLVRESETTKGAYCLSVSDFDNAKGLNVK  
HYKIRKLDSGGFYITSRTQFSSLQQLVAYYSKHADGLCHR  
LTNVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGCFCGE  
VWMGTWNGTTRVAIKTLKPGTMSPEAFLQEAQVMKCLRHE  
KLVQLYAVVSEEPYIVTEYMSKGSLLDFLKGEMGKYLRL  
PQLVDMAAQIASGMAYVERMNYVHRDLRAANILVGENL  
VCKVADFGLARLIEDNEYTARQGAKFPIKWTAPEAALYGR  
FTIKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPGMVNREVLDQVERG  
YRMPCPPECPESLHDLMCQCWRRDPEERPTFEYLQAFLE  
DYFTSTEPQYQPGENL

**FIG. 2**

## ADNc de Src humano

(SEC ID n°:4)

1 gcgccgcgtc ccgcaggccg tgatgccgcc cgcgcggagg tggcccggac cgcagtgccc  
 61 caagagagct ctaatggtac caagtgcag gttggcttta ctgtgactcg gggacgccag  
 121 agtcctgag aagatgtcag caatacaggc cgcctggcca tccggtacag aatgtattgc  
 181 caagtacaac ttccacggca ctgccgagca ggacctgccc ttctgcaaag gagacgtgct  
 241 caccattgtg gccgtacca aggaccccaa ctggtacaaa gccaaaaaca aggtgggccc  
 301 tgagggcac atcccagcca actacgtcca gaagcgggag ggcgtgaagg cgggtaccaa  
 361 actcagctc atgcttgggt tccacggcaa gatcacacgg gagcaggctg agcggcttct  
 421 gtaccgccg gagacaggcc tgttctggt gcgggagagc accaactacc ccggagacta  
 481 cacgctgtgc gtgagctgcg acggcaaggt ggagcactac cgcacatgt accatgccag  
 541 caagctcagc atcgacgagg aggtgtactt tgagaacctc atgcagctgg tggagcacta  
 601 cacctcagac gcagatggac tctgtacgcg ctcattaaa ccaaaggcca tggaggccac  
 661 agtggcggcc caggatgagt tctaccgag cggctgggcc ctgaacatga aggagctgaa  
 721 gctgctcag accatcggga agggggagtt cggagacgtg atgctgggcg attaccgagg  
 781 gaacaaagtc gccgtcaagt gcattaagaa cgacgccact gccaggcct tctgggtga  
 841 agcctcagtc atgacgcaac tgcggcatag caacctggtg cagctcctgg gcgtgatcgt  
 901 ggaggagaag ggcgggctct acatcgtcac tgagtacatg gccaaaggga gccttggga  
 961 ctacctcgg tctaggggtc ggtcagtgt gggcgggagc tgtctctca agttctcgt  
 1021 agatgtctgc gaggccatgg aatactgga gggcaacaat ttctgcatc gagacctggc  
 1081 tgcccgaat gtgctggtgt ctgaggaaa cgtggccaag gtcagcact ttggtctac  
 1141 caaggaggcg tccagcacc aggacacggg caagctgcca gtcaagtga cagcccctga  
 1201 ggccctgaga gagaagaaat tctccactaa gtctgacgtg tggagtctc gaatcctct  
 1261 ctgggaaatc tactccttg ggcgagtgc ttatccaaga attcccctga aggacgtcgt  
 1321 ccctcgggtg gagaagggt acaagatgga tgccccgac ggctgcccgc ccgagtcta  
 1381 tgaagtcag aagaactgct ggcacctgga cgcgccatg cggccctct tctacagct  
 1441 ccgagagcag cttagacaca tcaaaacca cgagctgcac ctgtgacggc tggcctccgc  
 1501 ctgggtcatg ggctgtggg gactgaacct ggaagatcat ggacctggtg cccctgctca  
 1561 ctgggcccga gcctgaactg agccccagcg ggctggcggg ccttttct gcgtcccagc  
 1621 ctgacccct ccggccccgt ctctctgga cccacctgt gggcctgggg agcccactga  
 1681 ggggcccagg aggaaggagg ccacggagcg ggaggcagcg cccaccacg tcgggctcc  
 1741 ctggcctccc gccactccc ttcttagagt ttattcctt tctttttg agattttt  
 1801 tccgtgtgt tatttttat tttttcaa gataaggaga aagaaagtac ccagcaaatg  
 1861 ggcattttac aagaagtac aatcttatt ttctgtct gccctgagg gtggggggga  
 1921 ccgggcccc ctctagggac cctcgcacc agcctcalt cccattctgt gtcccagtc  
 1981 ccgtgtctc teggtcggc cgtgtttgc ctgacctg ttgactgt tgcagtcgc  
 2041 cgaggcagac gtctgtcagg ggcttggatt tcgtgtgccc ctgccaccg cccaccgcc  
 2101 ttgtgagat gaattgtaat aaaccacgcc atgaggacac cggcggcgc ctggcgctt  
 2161 cctccaccga aaaaaaaaa aaaaaaa

FIG. 3

**Proteína codificada por c-SRC humano**

**(SEC ID nº:5)**

MSAIQAAWPSGTECIAKYNFHGTAEQDLPFCKGDVLTIVAVTKD  
PNWYKAKNKVGREGIIPANYVQKREGVKAGTKLSLMPWFHGKIT  
REQAERLLYPPETGLFLVRESTNYPGDYTLCVSCDGKVEHYRIMY  
HASKLSIDEEVYFENLMQLVEHYTSDADGLCTRLIKPKVMEGTVA  
AQDEFYRSGWALNMKELKLLQTIGKGEFGDVMLGDYRGNKVAV  
KCIKNDATAQAFLAEASVMTQLRHSNLVQLLGVIVEEKGGLYIVTE  
YMAKGSLVDYLRSRGRSVLGGDCLLKFSLDVCEAMEYLEGNNFVH  
RDLAARNVLVSEDNVAKVSDFGLTKEASSTQDTGKLPVKWTAPEAL  
REKKFSTKSDVWSFGILLWEIYSFGRVPYPRIPKDVVPRVEKGYKM  
DAPDGCPPAVYEVKNCWHLDAAMRPSFLQLREQLLEHIKTHELHL

**FIG. 4**

## Activación de la actividad Src endógena por bFGF y VEGF

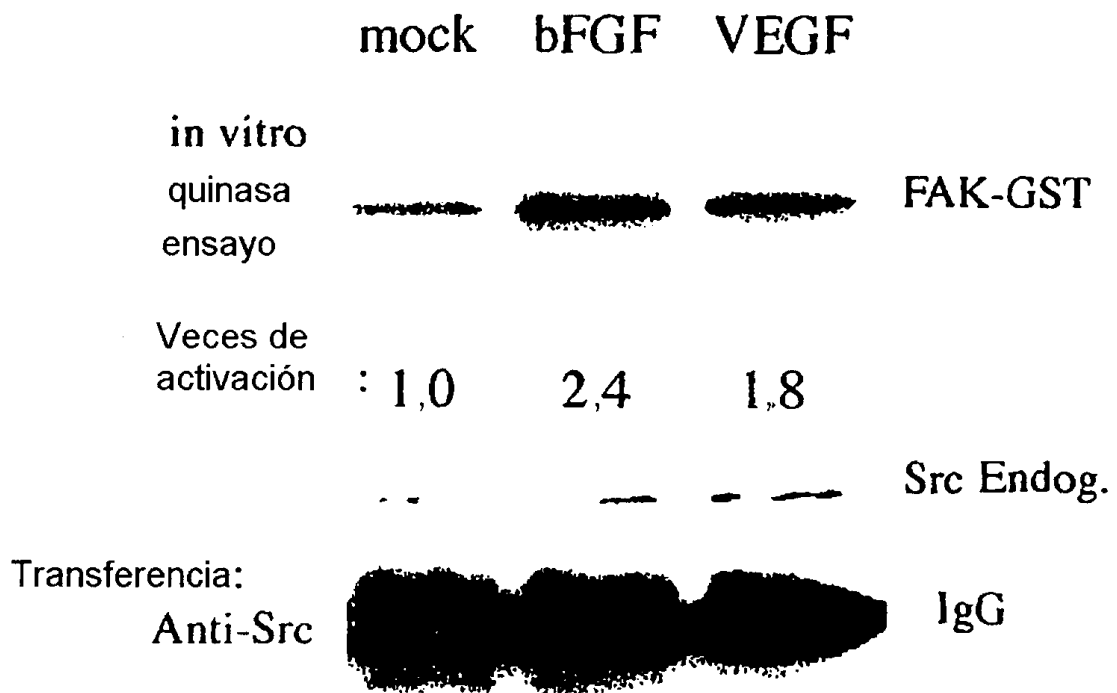
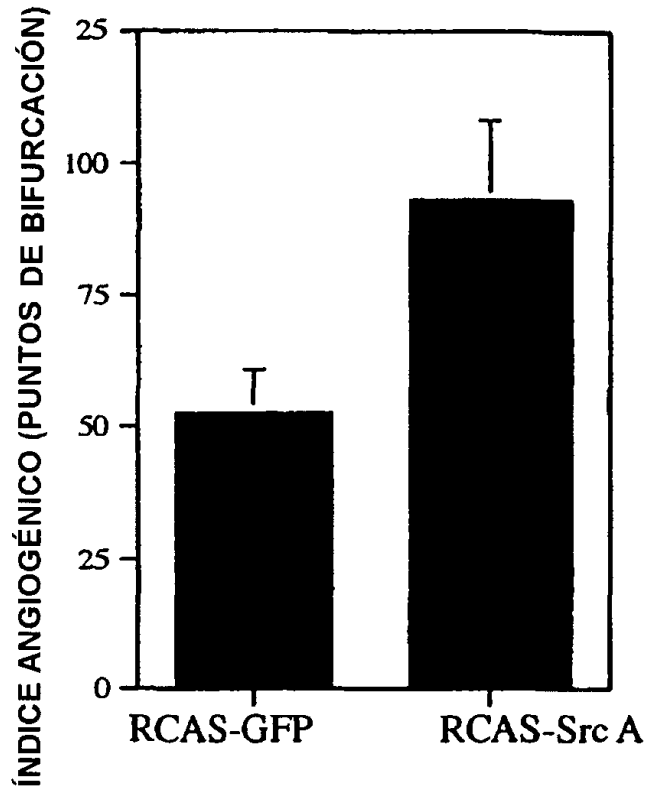


FIG. 5

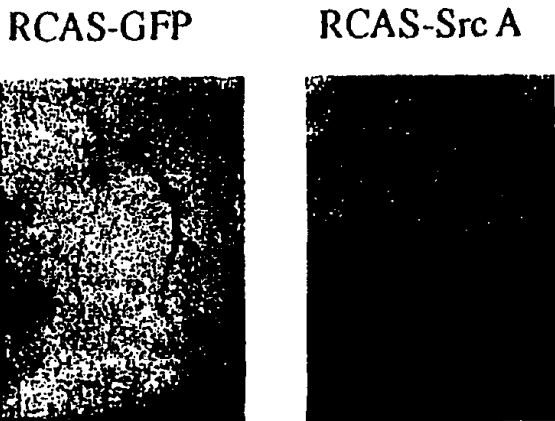


**Efecto de la expresión de Src A  
mediada por RCAS sobre la  
angiogénesis en CAM de pollo**

**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



## La expresión retroviral de Src A activa la fosforilación de la quinasa MAP vascular

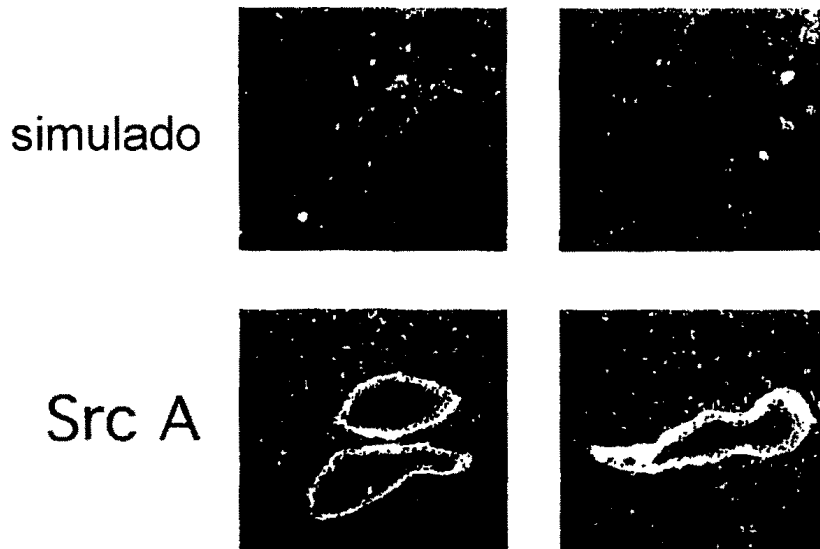
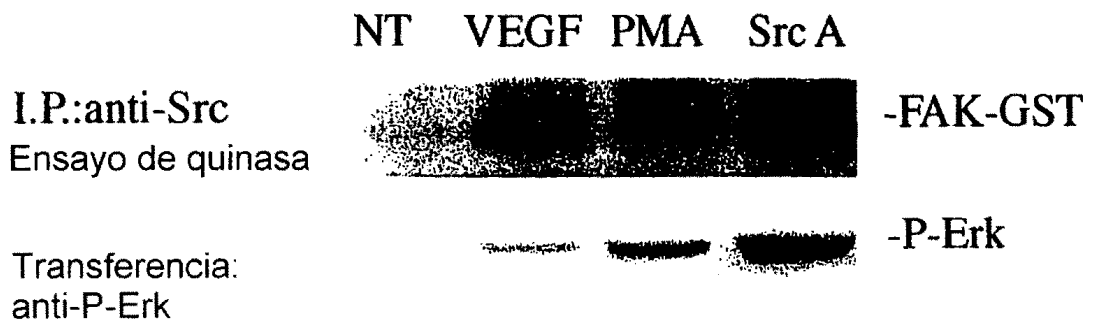


FIG. 7

### Requerimiento selectivo de la actividad Src durante la angiogenesis inducida por VEGF pero no bFGF

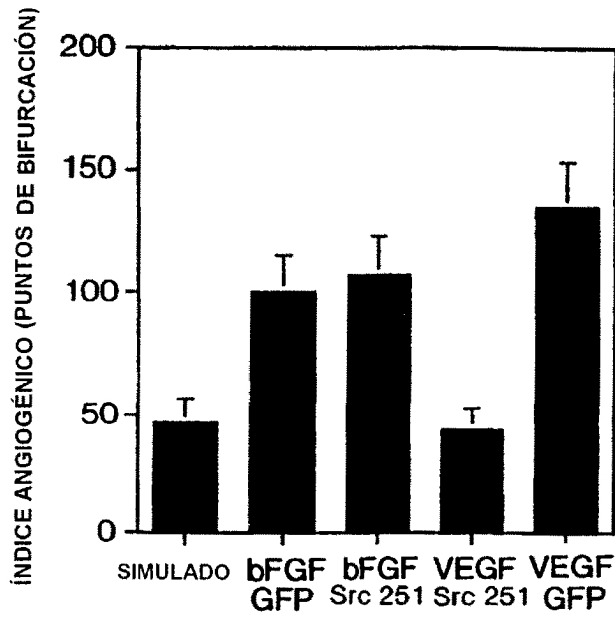


FIG. 8A

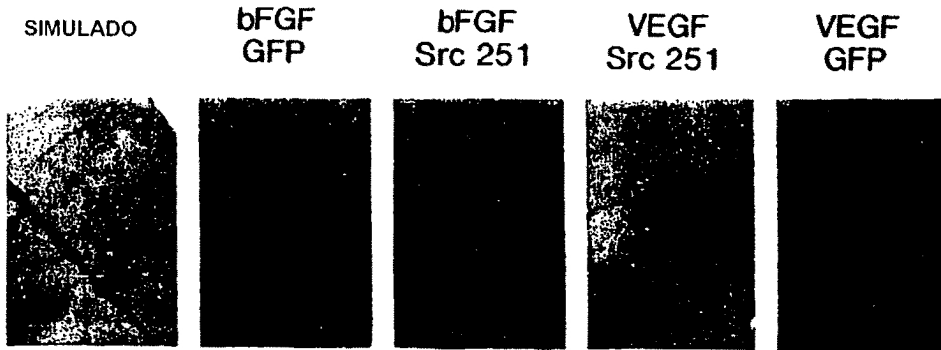


FIG. 8B

simulado Src 251-myc

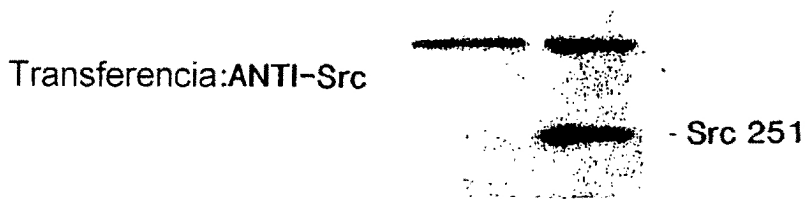
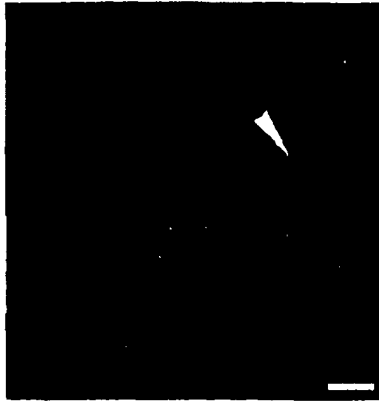
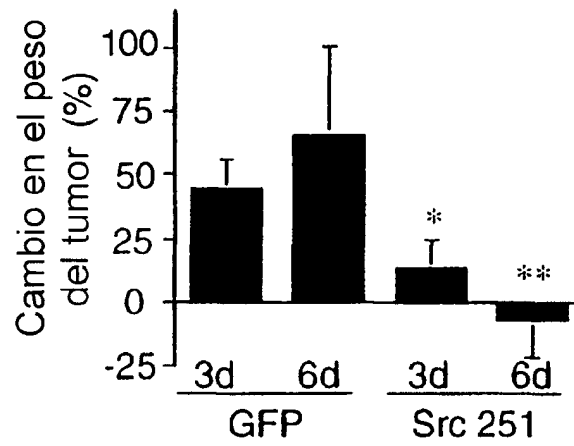


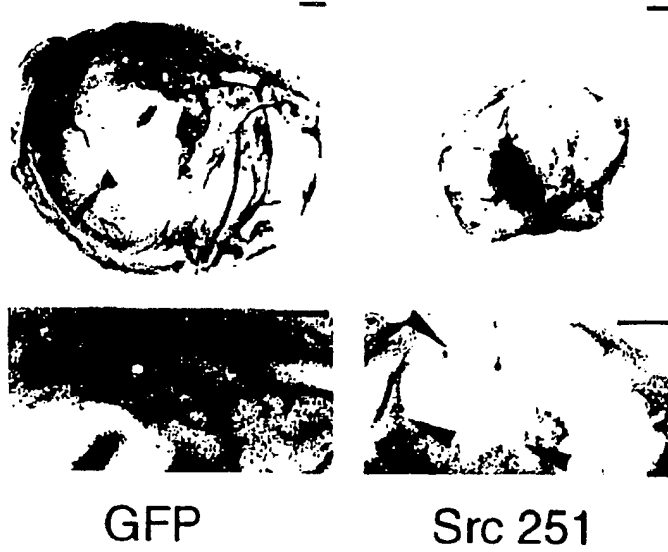
FIG. 8C



**FIG. 9A**



**FIG. 9B**



**FIG. 9C**

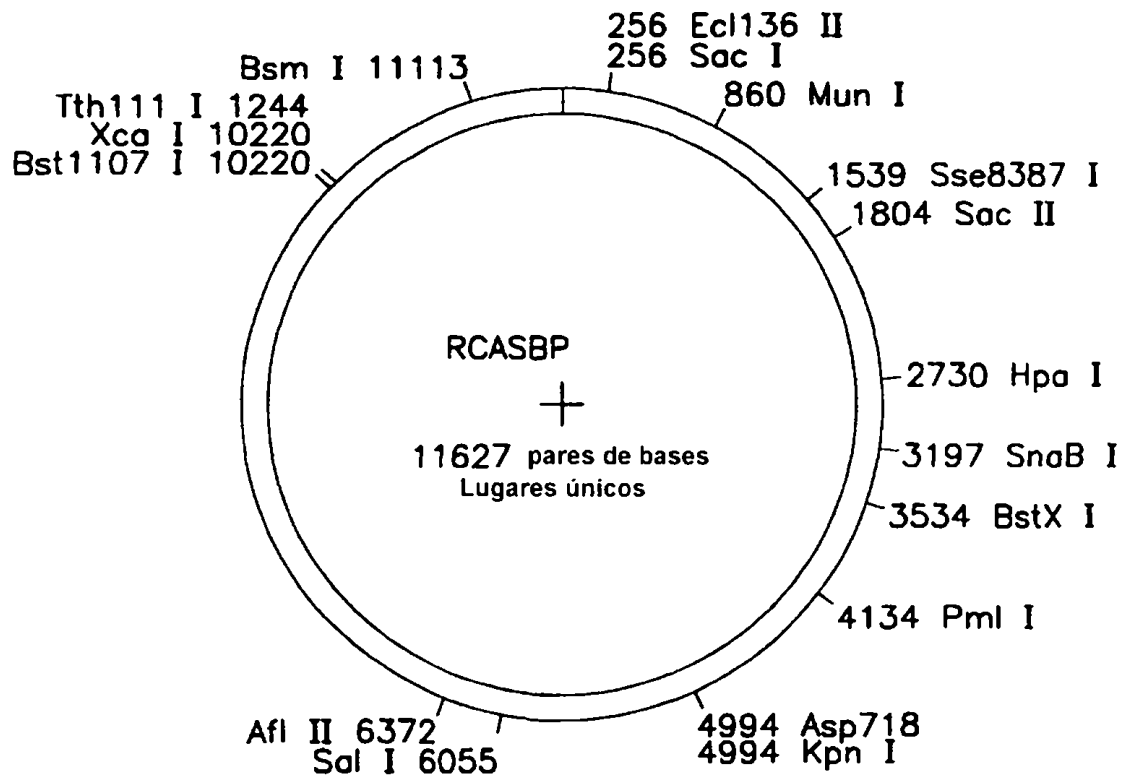


FIG. 10

Secuencia de aminoácidos de la proteína Yes-1 humana

"MGCIKSKENKSPAIKYRPENTPEPVSTSVSHYGAEP TTVSPGPS  
 SSAKGTAVNFSSLSMTFFGGSSGVTPFFGASSSFVVPSSYPAGLTGGVTIFVALYDY  
 EARTTEDLSFKKGERFQIINNTEGDWEARSIATKNGYIPSNYVAPADSIQAEEWYF  
 GKMGRKDAERLLLNPQNQRGIFLVRESETTKGAYSLSIRDWDEIRGDNVVKHYKIRKLLD  
 NGGYITTRAQFDTLQKLVKHYTEHADGLCHKLTTVCPTVKPQTQGLAKDAWEIIPRES  
 LRLEVKLGQCCFGEVWMGTWNGTTKVAIKTLKPGTMMPEAFIQEAQIMKKLRHDKLVP  
 LYAVVSEEP IYIVTEFMSKGSLLDFLKEGDGKYLKLPQLVDMAAQIADGMAYIERMNY  
 IHRDLRAANILVGENLVCKIADFGLARLLIEDNEYTARQAKFP I KWTAPEAALYGRFT  
 IKSDVWSFGILQTELVTKGRVPY PGMVNREVLQVERGYRMP C PQGCPESLHELMNLC  
 WKKDPDERPTFEYIQSFLEDYFTATEPQYQPGENL"

**FIG. 11**

```

1 ggggagccaa ggcacacggg tctgaccctt gggccggccc ggagcaagtg acacggaccg
61 gtcgcctatc ctgaccacag caaagcggcc cggagcccgc ggaggggacc tgacgggggc
121 gtaggcgccc gaaggctggg gggccccggg cggggccggc gtggcccagag ttccgggtgag
181 cggacggccg cgcgcgcaga tttgataatg ggctgcatta aaagtaaaga aaacaaaagt
241 ccagccatta aatacagacc tgaaaatact ccagagcctg tcagtacaag tgtgagccat
301 tatggagcag aaccactac agtgtcacca tgtccgtcat cttcagcaaa gggaacagca
361 gttaatttca gcagctcttc catgacacca tttggaggat cctcaggggt aacgcctttt
421 ggaggtgcat cttcctcatt ttcagtggtg ccaagttcat atcctgctgg tttaacaggt
481 ggtgttacta tatttgtggc cttatatgat tatgaagcta gaactacaga agcacttca
541 ttaagaagg gtgaaagatt tcaaataaatt aacaatacgg aaggagattg gtgggaagca
601 agatcaatcg ctacaggaaa gaatggttat atccccagca attatgtagc gcctgcagat
661 tccattcagg cagaagaatg gtattttggc aaaatgggga gaaaagatgc tgaaagatta
721 cttttgaatc ctggaaatca acgaggtatt ttcttagtaa gagagagtga aacaactaaa
781 ggtgcttatt ccctttctat tcgtgattgg gatgagataa ggggtgacaa tgtgaaacac
841 tacaaaatta ggaaacttga caatggtgga tactatatca caaccagagc caaatttgat
901 actctgcaga aattggtgaa acactacaca gaacatgctg atggtttatg ccacacttca
961 acaactgtgt gtccaactgt gaaacctcag actcaaggtc tagcaaaaga tgcctgggaa
1021 atccctcgag aatctttgcg actagaggtt aaactaggac aaggatgttt cggcgaagtg
1081 tggatgggaa catggaatgg aaccacgaaa gtagcaatca aaacactaaa accaggtaca
1141 atgatgccag aagctttcct tcaagaagct cagataatga aaaaattaag acatgataaa
1201 cttgttccac tatatgctgt tgtttctgaa gaaccaattt acattgtcac tgaatttatg
1261 tcaaaaggaa gcttattaga tttccttaag gaaggagatg gaaagtattt gaagcttcca
1321 cagctggctg atatggctgc tcagattgct gatggtatgg catatatgta aagaatgaa
1381 tatattcacc gagatcttgc ggctgcta atcttctgag gagaaaatct tgtgtgcaaa
1441 atagcagact ttggtttagc aaggtaatt gaagacaatg aatacacagc aagacaaggt
1501 gcaaaatttc caatcaaatg gacagctcct gaagctgcac tgtatggctg gtttacaata
1561 aagtctgatg tctggctcatt tggaaatctg caaacagaac tagtaacaaa gggccgagtg
1621 ccatatccag gtatggtgaa ccgtgaagta ctagaacaag tggagcggag atacaggatg
1681 ccgtccctc agggctgtcc agaattcctc catgaattga tgaatctgtg tggaagaag
1741 gaccctgatg aaagaccaac atttgaatat attcagctct tcttggaaag ctacttcaact
1801 gctacagagc cacagtagca gccaggagaa aatttataat tcaagtagcc tattttatat
1861 gcacaaatct gccaaaatat aaagaacttg tgtagatttt ctacaggaat caaaagaaga
1921 aaatcttctt tactctgcat gtttttaatg gtaaactgga atcccagata tggttgcaca
1981 aaaccacttt tttttcccca agtattaaac tctaattgtac caatgatgaa tttatcagcg
2041 tatttcaggg tccaaacaaa atagagctaa gatagctgat acagtggtgg ttagcagctg
2101 gtaatgaagg acagtgaggc tctgcttcat ttataaatca tttcctttct tttttcccc
2161 aaagtcagaa ttgctcaaag aaaattattt attgttacag ataaaacttg agagataaaa
2221 agctatacca taataaaatc taaaatttag gaatatcatg ggaccaaata attccattcc
2281 agttttttaa agtttcttgc atttattatt ctcaaaagtt ttttctaagt taacagtca
2341 gtatgcaatc ttaatatatg ctttcttttg catggacatg ggccaggttt tcaaaagga
2401 atataaacag gatctcaaac ttgattaaat gttagaccac agaagtgga tttgaaagta
2461 taatgcagta cattaatatt catgctcatg gtaactgaaag aataagaact ttttcaactc
2521 agtcttttcc tgaagagttt gacttagaat aatgaaggta actagaaagt gagttaatct
2581 tgtatgaggt tgcattgatt ttttaaggca atataataat gaaactactg tccaatcaaa
2641 ggggaaatgt tttgatcttt agatagcatg caaagtaaga cccagcattt taaaagccct
2701 ttttaaaaaa ctagactctg tactgtgagt attgcttata tgtccttatg gggatgggtg
2761 ccacaaatag aaaatatgac cagatcaggg acttgaatgc acttttgcctc atggtgaata
2821 tagatgaaca gagaggaaaa tgtattttaa agaaatacga gaaaagaaa tgtgaaagtt
2881 ttacaagtta gagggatgga aggtaattgt taatgtgat gtcatggagt gacagaatgg
2941 ctttgcctggc actcagagct cctcacttag ctatatctcg agactttgaa gagttataaa
3001 gtataactat aaaactaatt tttcttacac actaaatggg tatttgttca aaataatgaa
3061 gttatggctt cacattcatt gcagtgggat atggttttta tgtaaaacat ttttagaact
3121 ccagttttca aatcatgttt gaatctacat tcactttttt ttgttttctt ttttgagacg
3181 gagtctcgct ctgccgccca ggctggagtg cagtggcgcg atctcgctc actgcaagct
3241 ctgcctccca ggttcacacc attctctgc ctcagctcc cgagtacagc cgactacag
3301 tccccaccac cacgcctggc tagttttttg tatttttagt agagacgcag tttcaccgtg
3361 ttagccagga tggctctgat ctctgacct tgtgatctgc ccgctcggc ctcccaaagt
3421 gctgggatta caggtgtgag ccaccgcgcc cagcctacat tcacttctaa agtctatgta

```

FIG. 12A

```

3481 atgggtgggtca ttttttccct tttagaatac attaaatggt tgatttgggg aggaaaactt
3541 attctgaata ttaacgggtg tgaaaagggg acagttttta ccctaaagtg caaaagtgaa
3601 acatacaaaa taagactaat ttttaagagt aactcagtaa tttcaaaata cagatttgaa
3661 tagcagcatt agtgggttga gtgtctagca aaggaaaaat tgatgaataa aatgaaggtc
3721 tgggtgtatat gttttaaaat actctcatat agtcacactt taaattaagc cttatattag
3781 gccctctat tttcaggata taattcttaa ctatcattat ttacctgatt ttaatcatca
3841 gattcgaaat tctgtgccat ggcgtatatg ttcaaattca aaccattttt aaaatgtgaa
3901 gatggacttc atgcaagttg gcagtggttc tggtaactaa aattgtgggt gtttttctg
3961 tttacgtaac ctgcttagta ttgacactct ctaccaagag ggtcttccta agaagagtgc
4021 tgtcattatt tcctcttate aacaacttgt gacatgagat tttttaaggg ctttatgtga
4081 actatgatat tgtaattttt ctaagcatat tcaaaaaggg gacaaaatta cgtttatgta
4141 ctaaactctaa tcaggaaagt aaggcaggaa aagttgatgg tattcattag gttttaactg
4201 aatggagcag tcctttatat aataacaatt gtatagtagg gataaaacac taacaatgtg
4261 tattcatttt aaattgttct gtatttttaa attgccaaaga aaaacaactt tgtaaatgtg
4321 gagatatttt ccaacagctt ttcgtcttca gtgtcttaat gtggaagtta acccttacca
4381 aaaaaggaag ttggcaaaaa cagccttcta gcacactttt taaatgaat aatggtagcc
4441 taaacttaat atttttataa agtattgtaa tattgttttg tggataattg aaataaaaag
4501 ttctcat tga atgcacc

```

FIG. 12B



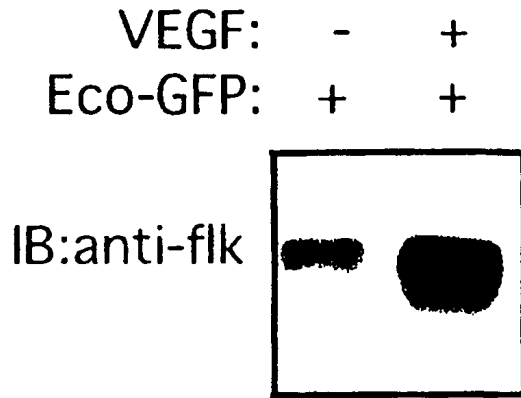


FIG. 13A

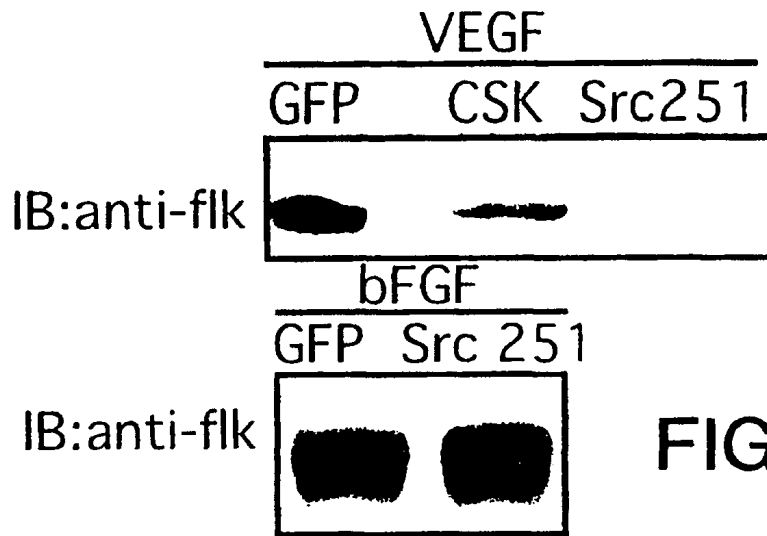


FIG. 13B

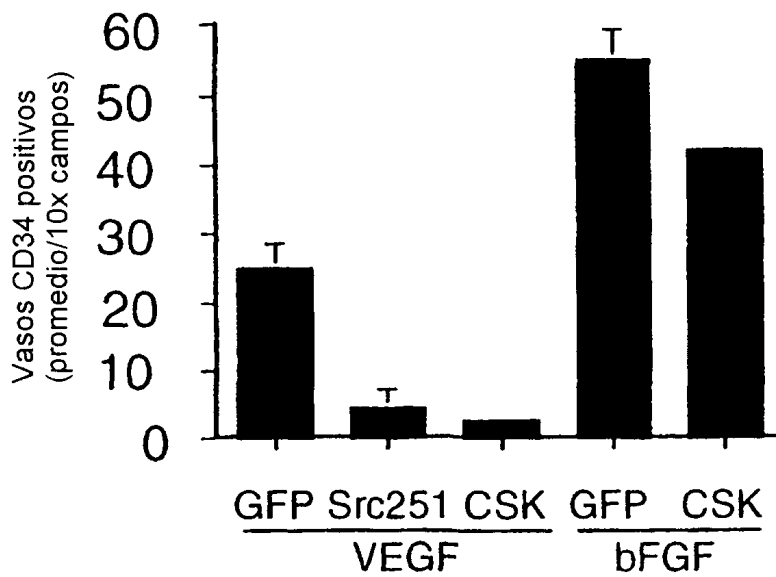


FIG. 13C

FIG. 14A

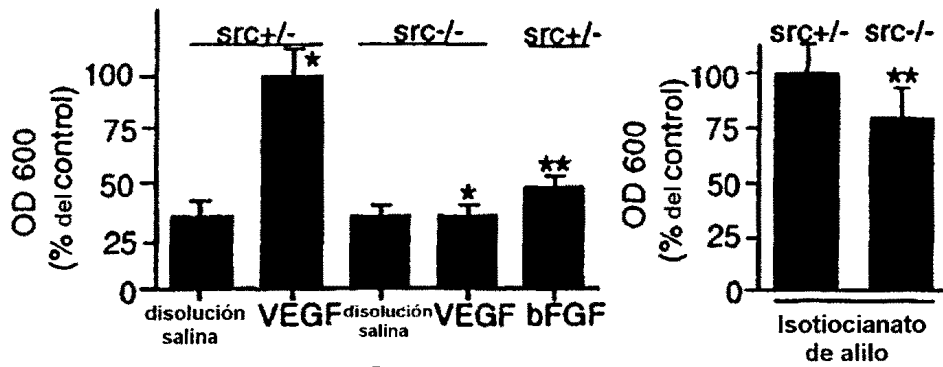
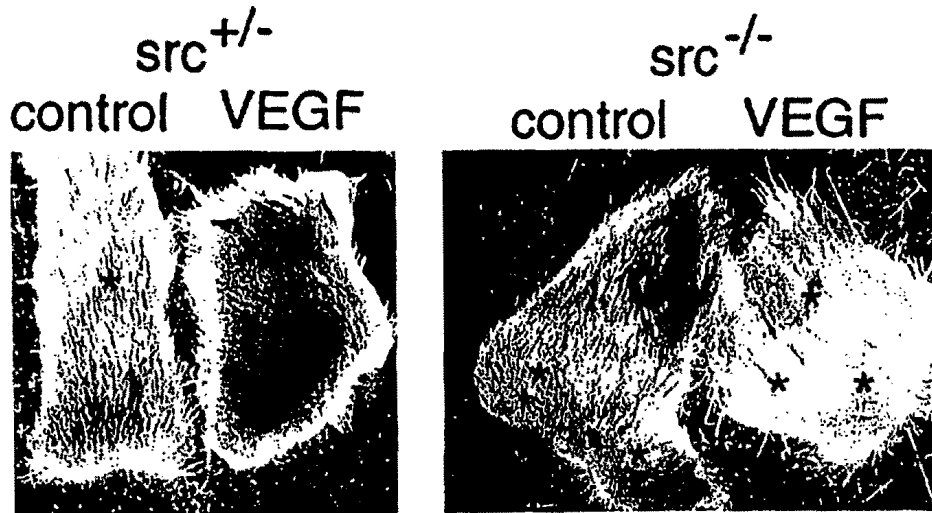


FIG. 14B

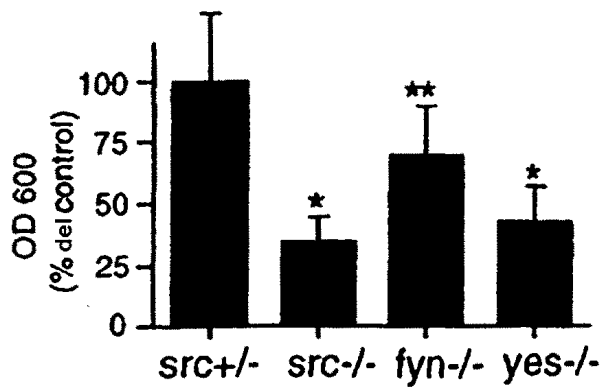
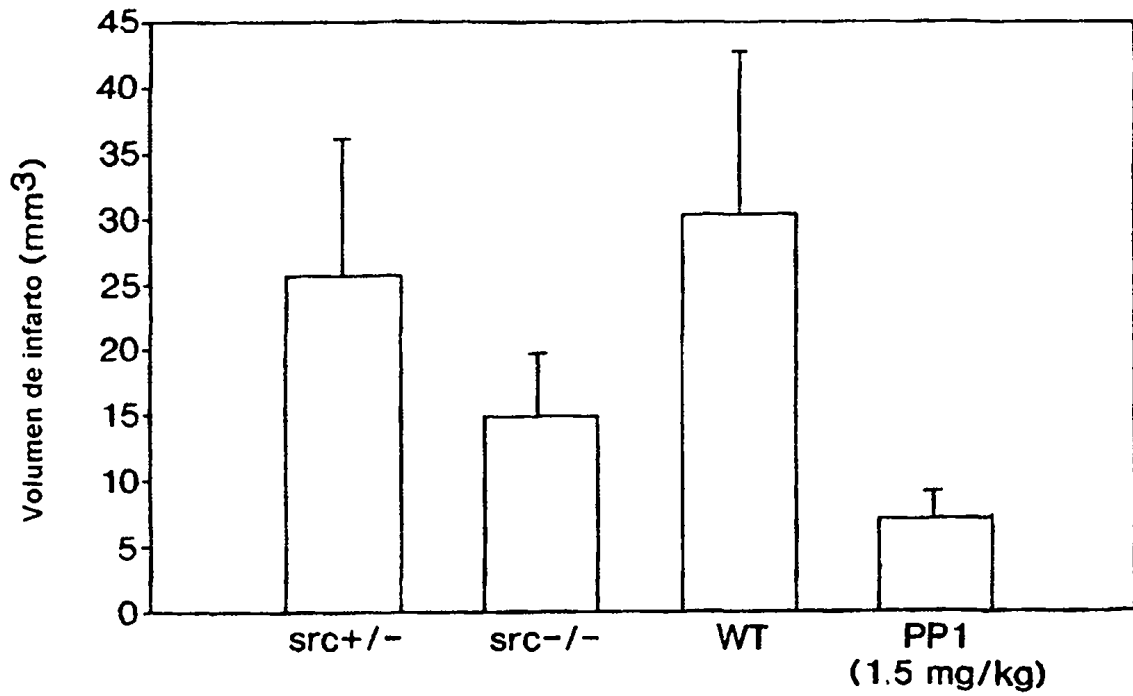


FIG. 14C



**FIG. 15**

Fig.16

