

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 434**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)
A61K 38/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/65 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2007 E 07800446 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2056868**

54 Título: **Inhibición de la angiogénesis, de la tumorigénesis y de la actividad de la catepsina usando una proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina**

30 Prioridad:

16.08.2006 US 837930 P

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

13.08.2013

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)
INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES,
BUILDING M 58, 1200 MONTREAL ROAD
OTTAWA, ONTARIO K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

MORENO, MARIA J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 418 434 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

Inhibición de la angiogénesis, de la tumorigénesis y de la actividad de la catepsina usando una proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para inhibir la angiogénesis, la tumorigénesis y la actividad de la catepsina, particularmente en células de mamífero.

Antecedentes de la invención

- 10 La familia de proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP, por sus siglas en inglés) comprende seis proteínas relacionadas (IGFBP1-6) que interactúan con alta afinidad con factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, por sus siglas en inglés) y modulan sus efectos biológicos. En la circulación y en fluidos intersticiales, las IGFBP son las proteínas vehículo principales para los IGF e impiden su degradación por las proteasas. Los IGF solo pueden unirse a receptores de superficie IGF después de la proteólisis de IGFBP. Separando los IGF lejos de los receptores de IGF, las IGFBP inhiben la mitogénesis, la diferenciación, la supervivencia y otros acontecimientos inducidos por IGF. Las IGFBP también tienen efectos independientes de IGF sobre diferentes tipos celulares, aunque el mecanismo o mecanismos de acción aún son desconocidos.

15 El documento WO 2005049648 desvela de este modo la producción de proteínas de fusión o quiméricas de dos o más IGFBP.

El documento WO 2006017824 desvela que IGFBP-3 puede administrarse para inhibir la proliferación de células asociadas con un tumor.

- 20 El artículo "Identification of insulin-like growth factor binding protein-3 as a farnesyl transferase inhibitor SCH66336-induced negative regulator of angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma" por S.-H. Oh y col. en Clinical Cancer Research, vol. 12, enero de 2006, páginas 653-661 indica que IGFBP-3 media actividades antitumorales de SCH66336.

- 25 El artículo "Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits the growth of non-small cell lung cancer" por H.-Y. Lee en Cancer Research, vol. 62, nº. 12, junio de 2002, páginas 3530-3537 indica que IGFBP-3 puede inhibir el crecimiento de cáncer pulmonar no microcítico.

El artículo "Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells" por N. Sueoka y col. en Oncogene vol. 19, nº. 38, septiembre de 2000, páginas 4432-4436 indica que IGFBP-6 puede activar la muerte celular programada en células de cáncer pulmonar no microcítico.

- 30 El artículo "Insulin-like growth factor binding protein-6 inhibits neuroblastoma cell proliferation and tumour development" por D. Seurin y col. en European Journal of Cancer, vol. 38, nº. 15, octubre de 2002, páginas 2058-2065 indica que IGFBP-6 puede inhibir la proliferación de células de neuroblastoma y el desarrollo tumoral.

- 35 Los análisis de secuencia de la familia de proteínas IGFBP indican la presencia de un dominio conservado de tiroglobulina de tipo-1 en todos los miembros de la familia. Las proteínas que albergan dos dominios de tipo-1 han demostrado inhibir la cisteína proteinasa(s) (catepsinas). Las catepsinas son proteasas, normalmente presentes en lisosomas, que desempeñan una función importante en muchos procesos fisiológicos tales como la degradación de proteínas, la presentación de antígeno, y la resorción ósea. En tumores y células activadas, las catepsinas pueden trasladarse a la membrana y secretarse a espacios extracelulares, participando en la degradación de la matriz extracelular (MEC), facilitando de este modo la migración celular. La invasión tumoral, la angiogénesis y la metástasis se han asociado con el transporte lisosomal alterado y la expresión aumentada de las catepsinas lisosomales. Más específicamente, la cisteína proteasa lisosomal catepsina B se ha implicado recientemente en la diseminación tumoral y la angiogénesis. La actividad proteolítica de la catepsina B facilita la degradación directa de diversas proteínas MEC, incluyendo laminina, fibronectina, tenastina C, y colágeno de tipo IV, siendo el último un componente principal de la MEC y la membrana basal vascular. La catepsina B también se ha implicado en la activación de otras enzimas de la cascada proteolítica que media la degradación de la MEC, tales como metaloproteasas y activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA, por sus siglas en inglés). La catepsina B está presente en los lisosomas de diversos tipos de células, incluyendo células endoteliales. Recientes estudios han demostrado que, en células tumorales y endoteliales, la catepsina B tanto extracelular como, más significativamente, intracelular está implicada en la degradación de la MEC. La presencia de catepsina B en las células endoteliales de tumores cerebrales se correlaciona con una mala supervivencia de estos pacientes y por lo tanto puede usarse como un indicador de pronóstico.

- 55 La solicitud PCT relacionada del mismo propietario PCT/CA2006/000250 presentada el 20 de febrero de 2006 desvela que IGFBP-4 (IBP-4) es un factor anti-angiogénico y anti-tumorigénico potente y pleiotrópico. En particular, esta solicitud relacionada desvela que el fragmento proteico C-terminal de IGFBP-4 (CIBP-4), que contiene un dominio tiroglobulina de tipo I (TY), tiene actividad anti-angiogénica.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) y sus variantes inhiben la actividad de la catepsina.

5 También puede proporcionarse un uso de una proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, o una variante de la misma, para inhibir la actividad de la catepsina.

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

10 Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que consta de los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que consta de los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral.

20 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que consta de los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.

25 Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido que comprende los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.

La invención se describirá adicionalmente o llegará a ser más evidente en el transcurso de la siguiente descripción detallada.

30 IGFBP-1 (IBP1), IGFBP-2 (IBP2), IGFBP-3 (IBP3), IGFBP-4 (IBP4), IGFBP-5 (IBP5) e IGFBP-6 (IBP6) o una variante de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6 puede por tanto usarse para inhibir la actividad de la catepsina. Debe observarse que, como se usa en el presente documento, las "variantes" también incluyen modificaciones tales como PEGilación, glucosilación, ciclación o derivatización de uno o más grupos funcionales.

Debe observarse también que la homología de las secuencias de IGFBP varía entre el 54-70 %. Para los fragmentos C-terminales que se han producido la homología varía entre el 54-82 %, como se analiza a continuación.

35 IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6 o una variante de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6 puede usarse adicionalmente para inhibir la angiogénesis.

IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6 o una variante de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6 puede también usarse para inhibir la tumorigénesis.

40 Las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) incluyen, por ejemplo, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6 o una mezcla de las mismas. Son variantes de dichas proteínas preferentemente los fragmentos proteicos C-terminales de las IGFBP, particularmente el dominio tiroglobulina de tipo I (TY) en los fragmentos C-terminales. En algunos casos, las variantes tienen preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 % con una de las IGFBP, preferentemente al menos una identidad de secuencia del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % ó 99 %. En algunos casos, las variantes tienen preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 45 70 % con uno de los fragmentos C-terminales de una IGFBP, preferentemente al menos una identidad de secuencia del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % ó 99 %.

50 Los péptidos IGFBP comprenden o constan o constan esencialmente de los dominios TY1, es decir, comprenden, constan o constan esencialmente de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 173-251 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1), los aminoácidos 207-309 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2), los aminoácidos 210-285 de la SEC ID N° 11 (IGFBP-3), los aminoácidos 171-249 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4), los aminoácidos 189-263 de la SEC ID N° 7 (IGFBP-5) o los aminoácidos 160-234 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6).

- Las proteínas IGFBP y sus fragmentos inhiben la actividad de la cathepsina, particularmente la actividad de la cathepsina B, y por tanto son útiles como agentes activos para retrasar o prevenir patologías agudas o crónicas asociadas con la actividad de la cathepsina. Dichas patologías incluyen, por ejemplo, trastornos neurodegenerativos incluyendo ictus isquémicos (de origen trombotico o embólico), ictus hemorrágicos y fenómenos vasculares posteriores, infarto de miocardio, consecuencias neurológicas de derivación coronaria y operaciones de injerto, traumatismo craneal, enfermedad de Alzheimer, demencia asociada con la edad, demencias vasculares, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica. Las proteínas IGFBP y sus fragmentos son particularmente útiles para inhibir la angiogénesis y/o la tumorigénesis. Las proteínas IGFBP y sus fragmentos son particularmente útiles en mamíferos, particularmente en células de mamífero.
- 5
- 10 Como apreciará un especialista en la técnica, las proteasas tienen el potencial de ocasionar daño tisular significativo debido a la hidrólisis de una amplia diversidad de sustratos intracelulares y extracelulares. La liberación incontrollada de proteasas puede agravar el daño tisular en curso iniciado por una lesión mecánica primaria. La filtración lisosomal o ruptura con la posterior liberación de proteasas representa la mayor amenaza para la supervivencia neuronal. Un aumento anómalo en la actividad de la cathepsina B, intra o extracelularmente, puede afectar a la degradación de las proteínas y a la integridad celular. La cathepsina B se ha asociado recientemente con la muerte celular y la apoptosis neuronal. Se ha informado de que la regulación positiva de la cathepsina B sucede en múltiples trastornos neurodegenerativos incluyendo ictus, enfermedad de Alzheimer, traumatismo craneal, demencia y similares.
- 15
- 20 En un uso o procedimiento de tratamiento para efectuar el tratamiento de un paciente aquejado de una patología descrita anteriormente, las IGFBP o sus fragmentos pueden administrarse en cualquier forma o modo que los haga biodisponibles en cantidades eficaces, incluyendo las vías oral y parenteral. Por ejemplo, las IGFBP o sus fragmentos pueden administrarse por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intranasal, rectal, tópica, y similares. Generalmente, la administración oral o intravenosa es la preferida. Un especialista en la técnica de preparaciones de formulaciones puede seleccionar fácilmente la forma y el modo de administración apropiados dependiendo de las características particulares del agente activo seleccionado para la patología a tratar, de la fase de la enfermedad, y de otras circunstancias relevantes. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (1990). Debe observarse que "una cantidad eficaz" puede ser de aproximadamente 0,1-30 mg/kg, dependiendo, por supuesto, de la edad, peso y estado del paciente así como del procedimiento de administración seleccionado.
- 25
- 30 Los agentes activos pueden formularse como un medicamento y pueden administrarse solos o en forma de una composición farmacéutica en combinación con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, cuya proporción y naturaleza se determinan por la solubilidad y las propiedades químicas del agente activo seleccionado, la vías de administración elegida, y la práctica farmacéutica convencional.
- 35 En la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis puede usarse un péptido que comprenda 20 o más aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 1-259 de la SEC ID Nº 1; aminoácidos 170-259 de la SEC ID Nº 1; aminoácidos 173-251 de la SEC ID Nº 1; aminoácidos 1-328 de la SEC ID Nº 3; aminoácidos 107-328 de la SEC ID Nº 3; aminoácidos 207-309 de la SEC ID Nº 3; aminoácidos 1-272 de la SEC ID Nº 7; aminoácidos 177-272 de la SEC ID Nº 7; aminoácidos 189-263 de la SEC ID Nº 7; aminoácidos 1-240 de la SEC ID Nº 9; aminoácidos 151-240 de la SEC ID Nº 9; aminoácidos 160-234 de la SEC ID Nº 9; aminoácidos 1-291 de la SEC ID Nº 11 y aminoácidos 210-285 de la SEC ID Nº 11 .
- 40 En la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 107-328 de la SEC ID Nº 3.
- 45 En la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 177-272 de la SEC ID Nº 7.
- 50 En la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 151-240 de la SEC ID Nº 9.
- 55 En la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 1-291 de la SEC ID Nº 11.
- En la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral puede usarse un péptido que comprenda 20 o más aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 1-259 de la SEC ID Nº 1; aminoácidos 170-259 de la SEC ID Nº 1; aminoácidos 173-251 de la SEC ID Nº 1; aminoácidos 1-328 de la SEC ID Nº 3; aminoácidos 107-328 de la SEC ID Nº 3; aminoácidos 207-309 de la SEC ID Nº 3; aminoácidos 1-272 de la SEC ID Nº 7; aminoácidos 177-272 de la SEC ID Nº 7; aminoácidos 189-263 de la SEC ID Nº 7; aminoácidos 1-240 de la SEC ID Nº 9; aminoácidos 151-240 de la SEC ID Nº 9; aminoácidos 160-234 de la SEC ID Nº 9; aminoácidos 1-291 de la SEC ID Nº 11 y aminoácidos 210-285 de la SEC ID Nº 11.
- En la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 107-328 de la SEC ID Nº 3.
- En la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 177-272 de la SEC ID Nº 7.

En la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9.

En la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11.

- 5 En la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina puede usarse un péptido que comprenda 20 o más aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 1-259 de la SEC ID N° 1; aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1; aminoácidos 173-251 de la SEC ID N° 1; aminoácidos 1-328 de la SEC ID N° 3; aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3; aminoácidos 207-309 de la SEC ID N° 3; aminoácidos 1-258 de la SEC ID N° 5; aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5; aminoácidos 171-249 de la SEC ID N° 5; aminoácidos 1-272 de la SEC ID N° 7; aminoácidos 177-272 de la SEC ID N° 7; aminoácidos 189-263 de la SEC ID N° 7; aminoácidos 1-240 de la SEC ID N° 9; aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9; aminoácidos 160-234 de la SEC ID N° 9; aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11 y aminoácidos 210-285 de la SEC ID N° 11.

- 15 En la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3.

En la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5.

En la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 177-272 de la SEC ID N° 7.

- 20 En la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9.

En la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina también puede usarse un péptido que comprenda al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Para que la invención pueda entenderse más claramente, las realizaciones de la misma se describirán ahora con detalle a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 representa imágenes de microscopía confocal que muestran la internalización de CIBP4 (naranja) en células endoteliales de cerebro humano (teñidas con el colorante de membrana DiCO3(5), verde) que aborda estructuras de tipo lisosomales perinucleares.

- 30 La Fig. 2 representa imágenes de microscopía confocal que muestran la co-localización (rosa) de CIBP4 (naranja) y lisosomas (teñidos con solución LysoTracker™, azul) en HBEC (teñidas con un colorante de membrana DiCO3(5), verde).

- 35 La Fig. 3 representa experimentos representativos en los que gráficos de barras (eje de la izquierda) indican la longitud total de los conductos de tipo capilar (CTC) formados durante una noche por HBEC sembradas en Matrigel (ensayo de angiogénesis *in vitro*) y expuestas a DME (**A-C**) o a estímulos pro-angiogénicos (MC U87MG, **A**; VEGF, **B**; IGF-1, **C**) solos o en combinación con CIBP4 20 nM (**A-C**). Las líneas (eje de la derecha) indican los niveles de actividad de la catepsina B intracelular (medida como unidades de fluorescencia, U.F., después de incubación con solución de detección de catepsina B Magic Red™ durante 2 horas) en HBEC al final del experimento. Se obtuvo un patrón de correlación similar entre la angiogénesis y la actividad de la catepsina B en 2-3 experimentos adicionales.

- 45 La Fig. 4 representa experimentos representativos en los que los gráficos de barras (eje de la izquierda) indican la longitud total de los CTC formados durante una noche por HBEC sembradas en Matrigel y expuestas a DME (**A-D**) o a estímulos pro-angiogénicos (MC U87MG, **A**; VEGF, **B**; IGF, **C**; bFGF, **D**) solos en combinación con IBP-2 20 nM (de R&D systems), IBP-2 20 nM (producido por NRC) o IBP-3 20 nM (de R&D systems), IBP-5 20 nM (de R&D systems), IBP-5 20 nM (producido por NRC), o CIBP-5 20 nM (**A-D**). Las líneas (eje de la derecha) indican los niveles de actividad de la catepsina B intracelular (medida como unidades de fluorescencia, U.F.) en HBEC al final del experimento. Se obtuvo un patrón de correlación similar entre la angiogénesis y la actividad catepsina B en 2-3 experimentos adicionales.

- 50 La Fig. 5 representa experimentos representativos en los que los gráficos de barras (eje de la izquierda) representan la longitud total de los CTC formados durante una noche por HBEC sembradas en Matrigel y expuestas a DME (**A-D**) o a estímulos pro-angiogénicos (MC U87MG, **A y C**; IGF-1, **B y D**) solos o en combinación con IBP-1 20 nM CIBP-1 20 nM (ambos producidos por IBS-NRC) (**A-B**) o IBP-6 20 nM (de R&D systems) y CIBP-6 20 nM (producido en NRC) (**C-D**). Las líneas (eje de la derecha) indican los niveles de actividad de la catepsina B intracelular (medida como unidades de fluorescencia, U.F.) en HBEC al final del

experimento. Se obtuvo un patrón de correlación similar entre la angiogénesis y la actividad catepsina B en 2-3 experimentos adicionales.

La Fig. 6 representa imágenes de microscopía confocal que muestran la distribución celular de la actividad de la catepsina B (azul) en células U87MG (teñidas con un colorante de membrana, verde) después de 15 minutos de incubación con reactivo de detección de catepsina B Magic Red™.

La Fig. 7 representa imágenes de microscopía confocal que muestran la co-localización (rosa) de CBIP4 (naranja) y lisosomas (teñidos con solución LysoTracker™, azul) en células U87MG (teñidas con un colorante de membrana DiCO3(5), verde).

La Fig. 8 representa la actividad de la catepsina B medida en DME (control) y en MC U87MG no tratado o tratado durante una noche con 20 nM de IBP-1, CIBP1, IBP2, CIBP2, IBP3, CIBP4, IBP5, CIBP5, IBP6, CIBP6 o 10 μM de CA074-ME, un inhibidor permeable sintético de catepsina B (EMD Biosciences, Canadá). Las barras son las medias ± e.t.m. de dos experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 9 representa la actividad de la catepsina B intracelular medida en células U87MG expuestas durante una noche a DME (control) o a IBP2 20 nM (de R&D systems), IBP2 (producido por BRI-NRC), CIBP2, IBP5 (de R&D systems), IBP5 (producido por BRI-NRC) y CIBP5. Las barras son las medias ± e.t.m. de dos experimentos realizados por triplicado. Un * indica la significancia (p<0,05, ANOVA seguido por Newman-Keuls) entre células U87MG expuestas a DME y las expuestas a miembros y fragmentos de IGFBP.

La Fig. 10 representa el crecimiento dependiente de anclaje (ensayado por medición de fluorescencia con azul de Alamar) de células U87MG en agar blando en ausencia (control) o presencia de 20 nM de CIBP42, CIBP4, ó 500 μg/ml de dB-AMPC (A) y 20 nM de CIBP1, CIBP6, 10 μM de CA074-ME o 500 μg/ml de dB-AMPC (B). Las barras son las medias ± e.t.m. de dos experimentos realizados por triplicado. Un * indica la significancia (p<0,05, ANOVA seguido por Newman-Keuls) entre el control y los tratamientos.

La Fig. 11 representa una imagen representativa de tumores formados por el crecimiento de células U87MG sobre la membrana corioalantoidea (MCA) de gallina de huevos fertilizados tratados durante 4 días consecutivos con vehículo (A, panel izquierdo) o CIBP-4 250 nM (A, panel derecho). El peso del tumor se evaluó después del tratamiento con vehículo o CIBP-4 250 nM (B). Las barras son las medias ± e.t.m. de 35 (vehículo) y 38 (CIBP4) huevos. Dos ** indican la significancia (p<0,005, ensayo t de muestras independientes) entre tumores tratados con vehículo y CIBP4. Se analizó (C) la distribución de la frecuencia del peso del tumor en tres intervalos (0-15 mg, 15-20 mg, 20-36 mg). Se evaluó el peso promedio de los tumores en cada intervalo en grupos tratados tanto con vehículo (barras grises) como con CIBP4 (barras negras) (D). Los números en las barras indican el número de tumores que pertenecen al intervalo de peso correspondiente en cada grupo.

Descripción de realizaciones preferidas

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque puede usarse cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos.

La angiogénesis puede reducirse modulando la interacción de IGF con un receptor, que comprende regular la concentración de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-6 cerca del receptor. En algunas realizaciones, la concentración de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 y/o IGFBP-6 está regulada.

Puede proporcionarse una secuencia de aminoácidos útil para inhibir las respuestas angiogénicas inducidas por una diversidad de factores de crecimiento en células endoteliales y/o las propiedades invasivas de células de glioblastoma. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica en secuencia de aminoácidos a al menos una de la SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11. En algunos casos, las diferencias en la identidad de la secuencia de aminoácidos serán atribuibles a sustituciones conservativas en las que los aminoácidos están reemplazados por aminoácidos que tienen un tamaño, carga y nivel de hidrofobicidad similares.

El péptido inhibidor angiogénico puede comprender 20 o más aminoácidos consecutivos de uno cualquiera de: los aminoácidos 1-259 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1 de longitud completa); los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 (SEC ID N° 2, fragmento C-terminal de IGFBP-1); los aminoácidos 1-328 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2 de longitud completa); los aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3 (fragmento C-terminal de IGFBP-2, SEC ID N° 4); los aminoácidos 1-258 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4 de longitud completa); los aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5 (fragmento C-terminal de IGF4, SEC ID N° 6); los aminoácidos 1-272 de la SEC ID N° 7 (IGF5 de longitud completa); los aminoácidos 177-272 (fragmento C-terminal de IGFBP-5, SEC ID N° 8); los aminoácidos 1-240 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6 de longitud completa); los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9 (fragmento C-terminal de IGF-6, SEC ID N° 10); y los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11 (IGFBP-3).

5 El péptido también puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 1-259 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1 de longitud completa); los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 (SEC ID N° 2, fragmento C-terminal de IGFBP-1); los aminoácidos 1-328 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2 de longitud completa); los aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3 (fragmento C-terminal de IGFBP-2, SEC ID N° 4); los aminoácidos 1-258 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4 de longitud completa); los aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5 (fragmento C-terminal de IGFBP-4, SEC ID N° 6); los aminoácidos 1-272 de la SEC ID N° 7 (IGFBP-5 de longitud completa); los aminoácidos 177-272 (fragmento C-terminal de IGFBP-5, SEC ID N° 8); los aminoácidos 1-240 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6 de longitud completa); los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9 (fragmento C-terminal de IGFBP-6, SEC ID N° 10); y los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11 (IGFBP-3). Como apreciará el especialista en la técnica, las sustituciones adecuadas pueden determinarse comparando la secuencia de IGFBP con otros miembros de la familia de IGFBP. Específicamente, las localizaciones de aminoácidos dentro de las IGFBP probables para tolerar las sustituciones no son probables para estar altamente conservadas entre los miembros de la familia de IGFBP. Además, las sustituciones conservadas toleradas también pueden determinarse comparando las secuencias. Cabe observar que, como se ha analizado anteriormente, el porcentaje de homología de las secuencias de IGFBP1-6 varía entre el 54-70 %.

En otras realizaciones, la secuencia peptídica de IGFBP puede estar flanqueada en cualquier lado o en ambos por aminoácidos adicionales que pueden ser o no secuencia de IGFBP 'nativa' o pueden estar dentro de un péptido transportador o de presentación como se conoce en la técnica.

20 Como apreciará el especialista en la técnica, los fragmentos C-terminales analizados anteriormente representan fragmentos de la secuencia nativa que han demostrado tener actividad significativa. Por consiguiente, también pueden usarse fragmentos más largos, incluyendo aminoácidos adicionales nativos o en algunas realizaciones no nativos.

También pueden proporcionarse secuencias de ácido nucleico que codifican una o más de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente.

25 Para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero puede usarse una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos 70 % con los aminoácidos 1-259 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1 de longitud completa); los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 (SEC ID N° 2, fragmento C-terminal de IGFBP-1); los aminoácidos 1-328 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2 de longitud completa); los aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3 (fragmento C-terminal de IGFBP-2, SEC ID N° 4); los aminoácidos 1-258 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4 de longitud completa); los aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5 (fragmento C-terminal de IGFBP-4, SEC ID N° 6); los aminoácidos 1-272 de la SEC ID N° 7 (IGFBP-5 de longitud completa); los aminoácidos 177-272 (fragmento C-terminal de IGFBP-5, SEC ID N° 8); los aminoácidos 1-240 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6 de longitud completa); los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9 (fragmento C-terminal de IGFBP-6, SEC ID N° 10); y los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11 (IGFBP-3). En algunos casos la identidad de secuencia es preferentemente al menos del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunos casos la secuencia incluye aminoácidos no naturales y/o modificados químicamente.

40 También puede usarse un péptido IGFBP, o un fragmento o una variante del mismo, como se ha descrito anteriormente, para modular la actividad de, o la respuesta biológica a, uno o más factores de crecimiento. En algunos casos, el factor de crecimiento cuya actividad biológica se modula es al menos uno de: IGFBP-1, VEGF y bFGF.

45 Por tanto puede proporcionarse un procedimiento para inhibir la transformación angiogénica de células endoteliales que comprenda administrar IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 o IGFBP-6, o un fragmento o variante de las mismas, como se ha descrito anteriormente. Como se ha analizado anteriormente, hay muchos procedimientos conocidos en la técnica para la medición de la angiogénesis. En algunas realizaciones, la inhibición de la angiogénesis puede basarse en una comparación entre un grupo de tratamiento, al que se administra una cantidad eficaz del fragmento de la proteína IGFBP como se describe en el presente documento, y un control no tratado o tratado de manera simulada. Cabe observar que el control no tendría que repetirse necesariamente cada vez.

50 En algunas realizaciones, el péptido IGFBP como se analiza en el presente documento puede combinarse con una matriz, gel u otro compuesto similar de modo que el péptido IGFBP se retenga sustancialmente en un área localizada después de su aplicación en el sitio de interés.

55 En la fabricación de un medicamento útil para la reducción de la angiogénesis o crecimiento tumoral o la inhibición de la actividad de la catepsina en un mamífero puede usarse un péptido que comprenda o que conste de o que conste esencialmente de los aminoácidos 1-259 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1 de longitud completa); los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 (SEC ID N° 2, fragmento C-terminal de IGFBP-1); los aminoácidos 1-328 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2 de longitud completa); los aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3 (fragmento C-terminal de IGFBP-2, SEC ID N° 4); los aminoácidos 1-258 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4 de longitud completa); los aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5 (fragmento C-terminal de IGFBP-4, SEC ID N° 6); los aminoácidos 1-272 de la SEC ID N° 7 (IGFBP-5 de longitud completa); los aminoácidos 177-272 (fragmento C-terminal de IGFBP-5, SEC ID N° 8); los

aminoácidos 1-240 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6 de longitud completa); los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9 (fragmento C-terminal de IGFBP-6, SEC ID N° 10); y los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11 (IGFBP-3) o una variante o fragmento del mismo. En algunos casos, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden marcarse con isótopos radiactivos o etiquetas fluorescentes para la detección o pueden conjugarse con secuencias hidrófobas para aumentar su permeabilidad a través de membranas biológicas.

En algunos casos, las secuencias de aminoácidos de la invención incluirán aminoácidos no naturales y/o aminoácidos modificados. Las modificaciones de interés incluyen ciclación, derivatización y/o glucosilación de uno o más grupos funcionales, como se ha analizado anteriormente.

Para generar una proteína recombinante de una o más de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente pueden usarse vectores de expresión (por ejemplo, bacterianos, virales, de mamífero, de levaduras, etc.). Como apreciarán el especialista en la técnica, en estas realizaciones, las secuencias de nucleótidos deducidas de: los aminoácidos 1-259 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1 de longitud completa); los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 (SEC ID N° 2, fragmento C-terminal de IGFBP-1); los aminoácidos 1-328 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2 de longitud completa); los aminoácidos 107-328 de la SEC ID N° 3 (fragmento C-terminal de IGFBP-2, SEC ID N° 4); los aminoácidos 1-258 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4 de longitud completa); los aminoácidos 157-258 de la SEC ID N° 5 (fragmento C-terminal de IGFBP-4, SEC ID N° 6); los aminoácidos 1-272 de la SEC ID N° 7 (IGFBP-5 de longitud completa); los aminoácidos 177-272 (fragmento C-terminal de IGFBP-5, SEC ID N° 8); los aminoácidos 1-240 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6 de longitud completa); los aminoácidos 151-240 de la SEC ID N° 9 (fragmento C-terminal de IGFBP-6, SEC ID N° 10); y los aminoácidos 1-291 de la SEC ID N° 11 pueden unirse operativamente a un promotor adecuado para la expresión de la célula huésped deseada.

En otras realizaciones, los péptidos IGFBP comprenden o constan o constan esencialmente de los dominios TY1, es decir, comprenden, constan o constan esencialmente de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 173-251 de la SEC ID N° 1 (IGFBP-1), los aminoácidos 207-309 de la SEC ID N° 3 (IGFBP-2), los aminoácidos 210-285 de la SEC ID N° 11 (IGFBP-3), los aminoácidos 171-249 de la SEC ID N° 5 (IGFBP-4), los aminoácidos 189-263 de la SEC ID N° 7 (IGFBP-5) o los aminoácidos 160-234 de la SEC ID N° 9 (IGFBP-6).

Para el suministro y expresión de una o más de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente en órganos de mamífero para inhibir la angiogénesis patológica o el crecimiento tumoral o para inhibir la actividad de la catepsina, como se analiza en el presente documento, pueden usarse vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple) o procedimientos no virales de transferencia de ADN (por ejemplo, ADN desnudo, liposomas y conjugados moleculares, nanopartículas).

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares, desempeña una función crucial en muchos entornos fisiológicos y patológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la curación de heridas, enfermedades oculares, y el crecimiento tumoral y la metástasis. Durante la angiogénesis, se forman nuevos capilares por un proceso de brote a partir de microvasos existentes: en respuesta a factores angiogénicos liberados localmente, las células del endotelio microvascular degradan su membrana basal y posteriormente invaden la matriz intersticial circundante, en la que forman brotes capilares tubulares.

Las células cancerosas son células que han perdido la capacidad de dividirse de un modo controlado. Un tumor consta de una población de células cancerosas que se dividen y crecen rápidamente. Se acumulan rápidamente mutaciones dentro de la población. Estas mutaciones permiten que las células cancerosas desarrollen resistencia a fármacos y se escapen de la terapia. Los tumores no pueden crecer más allá de un cierto tamaño, generalmente 1-2 mm³, sin suministro de sangre debido a la ausencia de oxígeno y otros nutrientes esenciales. Los tumores inducen el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) secretando diversos factores de crecimiento. Los factores de crecimiento, tales como bFGF, IGF-1 y VEGF pueden inducir el crecimiento capilar en el tumor, permitiendo la expansión del tumor. Las células endoteliales se han considerado desde hace mucho tiempo genéticamente más estables que las células cancerosas. Esta estabilidad genómica confiere una ventaja para abordar las células endoteliales usando terapia antiangiogénica, en comparación con la quimioterapia dirigida a células cancerosas, que mutan rápidamente y adquieren 'resistencia a fármacos' contra el tratamiento.

Materiales y métodos:

Cultivos celulares

La línea celular de glioma humano U87MG se estableció a partir de glioma/glioblastoma de tipo III extirpado quirúrgicamente y se obtuvo de la ATCC. Se sembraron células (5 x 10⁴ células/ml) en placas pre-revestidas de poli-L-lisina y se cultivaron a 37 °C en D-MEM (DME) complementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y suero bovino fetal (FBS) termo-inactivado al 10 % (HyClone, Logan, Utah) en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %/aire al 95 % hasta alcanzarse una confluencia del 80 %. Después, se retiraron los medios y las células se incubaron durante 3 días en DME sin suero para obtener medios condicionados (MC). Los medios condicionados se recogieron y se filtraron (membrana de filtro esterilizante Millex-GV, 0,22 µm). Después, las células se recogieron para ensayos moleculares y bioquímicos.

Se obtuvieron células endoteliales de cerebro humano (HBEC, por sus siglas en inglés) de pequeños microvasos y capilares intracorticales (20-112 μm) recogidos de la corteza temporal de pacientes tratados quirúrgicamente de epilepsia idiopática. Los tejidos se obtuvieron con la aprobación del Comité Ético de Investigación Institucional. Las HBEC se separaron de las células de músculo liso con anillos de clonación y se cultivaron a 37 °C en medios HBEC que contenían sales de Earle, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico (HEPES) 25 mM, 4,35 g/l de bicarbonato sódico, y L-glutamina 3 mM, FBS al 10 %, suero humano al 5 %, 20 % de medio condicionado por células de melanoma murino (melanoma de ratón, Cloudman S91, clon M-3, células productoras de melanina), 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina, 5 ng/ml de selenio, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de complemento de crecimiento de células endoteliales. Los cultivos de HBEC se caracterizaron de forma rutinaria morfológica y bioquímicamente. Más del 95 % de las células en cultivo se tiñeron inmunopositivas para los marcadores endoteliales selectivos, enzima convertidora de angiotensina II y antígeno relacionado con el Factor VIII, incorporaron Ac-LDL marcado de forma fluorescente, y mostraron altas actividades de las enzimas específicas de la barrera hematoencefálica, γ -glutamiltanspeptidasa y fosfatasa alcalina.

Producción de IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 y -6 de longitud completa recombinante y fragmentos proteicos C-terminales

SECUENCIA ID Nº 1: precursor de la proteína de unión 1 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1) (IBP-1/IBP1) (Número de referencia al gen [NM_000596.2](#))

El gen IGFBP-1 se amplificó por PCR usando oligos directo (CTAGAATTCACCATGTCAGAGGTCCCCGTTG, SEC ID Nº 12) e inverso (CTAACCGGTGTTTTGTACATTAATAATATATC, SEC ID Nº 13), se digirió por EcoRI y AgeI, y se clonó en el vector pTT5SH8Q2. La proteína resultante contiene una etiqueta octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce TG (véase a continuación).

Proteína de longitud completa IGFBP-1 (aa 1-259)

MSEVFPVARVWLVLVLLLVQVGVTAGAPWQCAPCSAEKLLALCPPVSASCSE
 VTRSAGCGCCPMCALPLGAACGVATARCARGLSCRALPGEQQPLHALTRG
 QGACVQESDASAPHAEEAGSPESPESTEITEEELLDNFHLMAPSEEDHSI
 LWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEPCRIELRYRVVESLAKAQETS GEEISK
 FYLPNCNKNGFYHSRQCETSMDGEAGLCWCVYPWNGKRIPGSPEIRGDPN
 CQIYFUVQNTGHHHHHHHHGGQ

Fuente normal: secuencia de aminoácidos de IGFBP-1

Cursiva: engarce + etiqueta (His)₈GGQ

SECUENCIA ID Nº 2: dominio C-terminal de IGFBP-1 (CIBP1, número de referencia al gen [AAH57806.1](#))

Se optimizaron los codones del gen CIBP1 y se sintetizó por GeneScript Corporation digerido por NheI y se clonó en el vector pTT28 linealizado con NheI. El gen sintético resultante contiene un péptido señal SEAP modificado y una etiqueta octahistidina separada de la proteína central por un engarce ASSGSSTG (véase a continuación).

Dominio C-terminal de IGFBP-1 (aa 170-259)

MGELLLLLLLGLRLQLSLGIASKKWKEPCRIELRYRVVESLAKAOETS GEE
 ISKFYLPNCNKNGFYHSRQCETSMDGEAGLCWCVYPWNGKRIPGSPEIRG
 DPNCQIYFHVQASSGSSTGHHHHHHHHHG

Subrayado: péptido señal modificado (escisión prevista entre G-I)

Fuente normal: secuencia de aminoácidos C-terminal de IGFBP1 (debe incluir los restos IAS)
Cursiva: engarce+etiqueta (His)₈G

SECUENCIA ID Nº 3: precursor de la proteína de unión 2 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-2) (IBP-1/IBP2) (número de referencia al gen [NM_000597](#))

La IGFBP-2 se amplificó por PCR usando oligos directo (CTAGAATTCACCATGCTGCCGAGAGTGGG, SEC ID Nº 14) e inverso (TAGGGATCCCTGCATCCGCTGGGTGTGC, SEC ID Nº 15), se digirió por EcoRI y BamHI, y se clonó en el vector pYD7SH8Q2. La proteína resultante contiene un etiqueta de fusión StreptagII-octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce GSG (véase a continuación).

Proteína de longitud completa IGFBP-2 (aa 1-328)

MLPRVGC PALPLPPP LLLPLLL LLLLLL GASGGGGGARA EVLFRCP PCTP
 ERLAACG PPPVAPPA AVAAVAGGARMPCA ELVREPGCGCCSVCARLEGEA
 CGVYT PRCGQGLRCY PHPGSELPLQALVMGEGTCEKRRDAEY GASPEQVA
 DNGDDHSEGLVENHVDSTMNMLGGGGSAGRKPLKSGMKELAVFREKVTE
 5 QHRQMKGKGGKHHLGLEEPKLRPPPARTPCQQLDQVLERI STMRLPDER
 GPLEHLYSLHIPNCDKHGLYNLQCKMSLNGQRGECWCVPNTGKLIQGA
 PTIRGDPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQSGWSHPQFEKTGHHHHHHHGG
 GQ

Fuente normal: secuencia de aminoácidos de IGFBP-2

10 *Cursiva: engarce+etiqueta StreptagII-(His)₈GGQ*

SECUENCIA ID N° 4: C-terminal de IGFBP-2 (CIBP2, número de referencia al gen NM_000597)

La CIBP2 se amplificó con cebadores directo (CTAGCTAGCAAGGGTGGCAAGCATCAC, SEC ID N° 16) e inverso (TAGGGATCCCTGCATCCGCTGGGTGTGC, SEC ID N° 17), se digirió con NheI y BamHI y se clonó en fase en el vector pYD1. La proteína resultante contiene el péptido señal SEAP y una etiqueta de fusión StreptagII-octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce DP (véase a continuación).

Fragmento C-terminal de IGFBP-2 (aa 107-328)

MLLLLLLLGLRLOLSLGIASKGGKHHLGLEEPKLRPPPARTPCQQLDQ
 VLERI STMRLPDERGPLEHLYSLHIPNCDKHGLYNLQCKMSLNGQRGEC
 WCVNPNTGKLIQGA PTIRGDPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQDPWSHPQF
 20 *EKTGHHHHHHHGGQ*

Subrayado: péptido señal SEAP (escisión prevista entre G-I)

Fuente normal: secuencia de aminoácidos C-terminal de IGFBP-2

Cursiva: engarce+etiqueta StreptagII-(His)₈GGQ

25 **SECUENCIA ID N° 5: precursor de la proteína de unión 4 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-4) (IBP-4/IBP4) (número de referencia al gen NP_001543.2)**

La IGFBP4 se amplificó con cebadores directo (TAAGAATTCGCCACCATGCTGCCCTCTGCCT, SEC ID N° 18) e inverso (TTAGGATCCACCTCTCGAAAGCTGTACGCC, SEC ID N° 19), se digirió con NheI y BamHI y se clonó en el vector pTT5SH8Q1. La proteína resultante contiene una etiqueta de fusión StreptagII-octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce DP (véase a continuación).

30 Proteína de longitud completa IGFBP-4

MLPLCLVAALLLAAGPGPSLGDEAIHCPPCSEELKARCRPPVGCEELVRE
 PGCGCCATCALGLGMPGCVYT PRCGSGRLRCYPPRGVEKPLHTLMHGQGVC
 MELAEIEAIQESLQPSDKDEGDHPNNSFSPCSAHDRRCLOKHF AKIRDRS
 TSGGKMKVNGAPREDARPVPQGSQSELHRALERLAASQSRTHEDLYIIP
 35 IPNCDRNGNFHPKQCHPALDQGRGKCWCVDRKTGVKLPGGLEPKGELDCH
 QLADSFREVD PWSHPQFEKTGHHHHHHHGGQ

Fuente normal: secuencia de aminoácidos de IGFBP4

Cursiva: etiqueta Streptag-II/(His)₈G (SH8Q1)

SECUENCIA ID Nº 6: fragmento C-terminal de IGFBP-4 (CIBP4, número de referencia al gen NP_001543.2)

CIBP4 se amplificó con cebadores directo (GCCGCTAGCAAGGTCAATGGGGCGCCCCGGGA, SEC ID Nº 20) e inverso (TTAGGATCCACCTCTCGAAAGCTGTCAGCC, SEC ID Nº 21), se digirió con NheI y BamHI y se clonó en el vector pYD1. La proteína resultante contiene el péptido señal SEAP y una etiqueta de fusión StreptagII-octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce DP (véase a continuación).

Fragmento C-terminal de IGFBP-4 (aa 157-258)

MLLLLLLLGLRLQLSLGIASKVNGAPREDARPVPQGSQSELHRALERLA
 ASQSRTHEDLYIIPINCDRNGNFHPKQCHPALDQGRGKCWCVDRKTGVK
 LPGGLEPKGELDCHQLADSFREVDPW~~SH~~PQFEKTGHHHHHHHHGGQ

10 **Subrayado: péptido señal (SSP)**

Fuente normal: secuencia de aminoácidos C-terminal de IGFBP4 (debe incluir los restos IAS)

Cursiva: etiqueta streptag-II(His)₈G (SH8Q1)

SECUENCIA ID Nº 7: proteína de unión 5 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-5) (IBP-5/IBP5) (número de referencia al gen NP_000590.1)

15 La IGFBP-5 se amplificó con cebadores directo (CTAGAATTCCACCATGGTGTGCTCACCGCGGTC, SEC ID Nº 22) e inverso (CTAGGATCCCTCAACGTTGCTGCTGTCGAAGGT, SEC ID Nº 23), se digirió con EcoRI y BamHI y se clonó en el vector pTT5SH8Q2. La proteína resultante contiene el péptido señal SEAP y una etiqueta de fusión StreptagII-octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce GSG (véase a continuación).

Proteína de longitud completa IGFBP-5 (aa 1-272)

20 MVLLTAVLLLLLAAYAGPAQSLGSLFVHCEPCDEKALSMCPPSPLGCELVKE
 PGCGCMTCALAEGQSCGVYTERCAQGLRCLPRQDEEKPLHALLHGRGVC
 LNEKSYREQVKIERDSREHEEPTTSEMAEETYSKIFRPKHTRISELKA
 AVKKDRRKKLTQSKFVGGAENTAHPRIISAPEMRQESEQGPCRRHMEASL
 QELKASPRMVPRAVYLPNCDRKGIFYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMK
 25 LPGMEYVDGDFQCHTFDSSNVEGSGW~~SH~~PQFEKTGHHHHHHHHGGQ

Fuente normal: secuencia de aminoácidos de IGFBP5

Cursiva: etiqueta Streptag-II(His)₈G (SH8Q1)

SECUENCIA ID Nº 8: dominio C-terminal de IGFBP-5 (CIBP5, número de referencia NP_000590.1)

30 CIBP5 se amplificó con cebadores directo (CTAGCTAGCATCATCTCTGCACCTGAGATG, SEC ID Nº 24) e inverso (CTAGGATCCCTCAACGTTGCTGCTGTCGAAGGT, SEC ID Nº 25), se digirió con NheI y BamHI y se clonó en el vector pYD1. La proteína resultante contiene el péptido señal SEAP y una etiqueta de fusión StreptagII-octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce DP (véase a continuación).

Fragmento C-terminal de IGFBP-5 (aa 177-272)

MLLLLLLLGLRLQLSLGIASIIISAPEMROESEOGPCRRHMEASLOELKAS
 PRMVPRAVYLPNCDRKGIFYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMKLPGMEY
 VDGDFQCHTFDSSNVEDPW~~SH~~PQFEKTGHHHHHHHHGGQ

35 **Subrayado: péptido señal (SSP)**

Fuente normal: secuencia de aminoácidos C-terminal de IGFBP5 (debe incluir los restos IAS)

Cursiva: etiqueta Streptag-III(His)₈G (SH8Q1)

40

SECUENCIA ID Nº 9: precursor de la proteína de unión 6 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-6) (número de referencia NM_002178.2)

5 MTPHRLLPPLLLLLLALLLAASPGGALARCPGCGQGVQAGCPGGCVEEEDGGSPAEGCAEA
 EGCLRREGQECGVYTPNCAPGLQCHPPKDDEAPLRALLLGRGRCLPARAPAVAAEENPKES
 KPQAGTARPDVNRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGPCRRHLDVSLQQLQTEVYR
 GAQTLVVPNCDFRGFYRKRQCRSSQGQRRGPCWCVDRMGKSLPGSPDNGSSSCTGSSG

SECUENCIA ID Nº 10: precursor de la proteína de unión 6 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-6) C-terminal (CIBP6, número de referencia NM_002178.2)

10 Se optimizaron los condones de CIBP6 y se sintetizó por Bio S&T Inc, se digirió con EcoRI y BamHI y se clonó en el vector pTT29. La proteína resultante contiene un péptido señal SEAP modificado y una etiqueta octahistidina C-terminal separada de la proteína central por un engarce SSTG (véase a continuación).

CIBP6 (aa 151-240)

15 MGELLLLLLLGLRLOLSLGIARNSAGVODTEMGPCRRHLDVLOOLOTEV
 YRGAQTLVVPNCDFRGFYRKRQCRSSQGQRRGPCWCVDRMGKSLPGSPDG
 NGSSSCTGSSGSSTGHHHHHHHGG

Subrayado: péptido señal SEAP modificado

Normal: secuencia de aa C-terminal de IGFBP-6 (debe incluir los restos IAS)

SECUENCIA ID Nº 11: precursor de la proteína de unión 3 al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3) (número de referencia NM_001013398) (aminoácidos 1-291)

20 MQRARPTLWAAALTLVLLRGPPVARAGASSAGLGPVVRCEPCDARALAQCAPPPAVCAE
 LVREPGCGCLTCALSEGQPCGIYTERCGSGLRCQSPDEARPLQALLDGRGLCVNASAV
 SRLRAYLLPAPPAGNASESEEDRSAGSVESPSVSSTHRVSDPKFHPLHSKI I I I KKGHA
 KDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSEKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNC
 DKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFVCVVDKYGQPLPGYTTKKGKEDVHCYSMQSK

25 Todas las construcciones de IGFBP se produjeron tras transfección a gran escala de células HEK293-EBNA1 (293E). La transfección de células 293E (clon 6E) de cultivo en suspensión se realizó en matraces de agitación. Las células se cultivaron en medio F17 (Invitrogen) y se transfectaron a 1×10^6 células/ml usando polietilenimina lineal de 25 kDa como se ha descrito previamente (Durocher y col. 2002) con algunas modificaciones. Por cada litro de cultivo, se mezclaron 750 ug de ADN plasmídico con 1500 ug de PEI y la mezcla se incubó durante 15 minutos
 30 antes de su adición al cultivo. El medio se recogió 5 días después, se aclaró por filtración a través de un filtro de 0,45 um y se cargó en una columna de cobalto Fractogel. La columna se lavó con Tampón A (fosfato sódico 50 mM pH 7,0, NaCl 300 mM), después con Tampón B (Tampón A con imidazol 25 mM) y las IGFBP unidas se eluyeron con Tampón C (Tampón A con imidazol 300 mM). Después, las proteínas eluidas después se desalinizaron en PBS usando una columna EconoPac 10DG (BioRad) o HiPrep 26/10 (Pharmacia) y se filtraron a esterilidad. La
 35 concentración de proteína se estimó por absorbancia a 280 nm usando un dispositivo Nanodrop y sus respectivos coeficientes de extinción molar.

Conjugación de CIBP-4 con Alexa Fluor 647

Se añadieron 80 µl de Alexa Fluor 647 -NHS 1 mM en DMSO a 0,4 ml de CIBP-4 recombinante (0,2 mg/ml) en carbonato 100 mM pH 8,4, y la muestra se incubó durante una noche a temperatura ambiente. La reacción se
 40 detuvo con 150 µl de etanolamina 200 mM pH 8,0. Para eliminar el colorante libre, la muestra se diluyó con 4,5 ml de agua y se cargó en una columna de 1 ml de afinidad por metales de Co^{+2} -Talon equilibrada con PBS. La columna se lavó exhaustivamente con PBS y CIBP-4 se eluyó con 2 ml de imidazol 1 M en PBS. Para eliminar el imidazol del conjugado AF647-CIBP-4, la muestra se concentró a aproximadamente 200 µl en Biomax (punto de corte de P.M. 5.000), se diluyó al volumen original con PBS y se concentró de nuevo. Ese procedimiento de
 45 concentración/dilución se repitió tres veces. Volumen final 0,5 ml (0,14 mg/ml). Recuperación del 86 %.

Estudios de microscopía confocal

Se sembraron HBEC (100.000 células/pocillo en una placa de formato de 24 pocillos) y U87MG (50.000) respectivamente sobre cubreobjetos revestidos con fibronectina humana (40 µg/ml) o poli-L-lisina (Bellco

Biotechnology) en 400 μ l de medio HBEC/U87MG y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 80 %. Después, las células se lavaron dos veces con DME y se incubaron en DME durante 30 min. a 37 °C. Después, se eliminó el DME y se reemplazó con 250 μ l/pocillo de DME sin rojo fenol que contenía conjugado AF647-CIBP-4 100 nM y solución LysoTracker™ 150 nM (Invitrogen) durante 90 min. En otra serie de experimentos, las células se incubaron con 250 μ l/pocillo de DME sin rojo fenol que contenía conjugado AF647-CIBP-4 100 nM durante 75 min. y después se añadió una dilución 2X de solución de detección de catepsina B Magic Red™ (Immunochemistry Technologies) durante 15 min. adicionales. Las células se tiñeron con contraste con el colorante de membrana DiOC5(3) durante 15 segundos y después se lavaron con PBS. La imagen de las células se realizó usando un microscopio de barrido con láser invertido Zeiss LSM 410 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EEUU) equipado con un láser de iones de Argón/Kriptón y un Plan- Achromat 63X, NA 1.4. Se obtuvieron secuencialmente imágenes confocales de dos fluorosondas usando líneas de láser de excitación de 488, 647 y 540-590 nm para detectar la fluorescencia de DiOC5(3) (emisión a 510-525 nm) y Alexa 647 (emisión a 670-810 nm) y catepsina B Magic Red™ (>610 nm).

Formación de conductos de tipo capilar (CTC) y ensayos de actividad de la catepsina B intracelular

La angiogénesis in vitro se evaluó por formación de conductos endoteliales en Matrigel™ reducido con factor de crecimiento (BD Bioscience, Bedford, MA). Se revistieron placas de 24 pocillos con 300 μ l de Matrigel™ no polimerizado (5-7 mg prot/ml) y se dejó que polimerizara durante 90 min. a 37 °C. Se suspendieron HBEC (40.000 células) en 500 μ l de DME, MC U87MG sin suero (recogidas como se ha descrito en cultivos celulares) o factores de crecimiento (VEGF, IGF-1, bFGF) en ausencia o presencia de 20 nM de IGFBP-1 recombinante de longitud completa (IBP1, producida en BRI-NRC), IGFBP-2 (IBP2, producida en BRI-NRC y adquirida de R&D systems, Minneapolis), IGFBP-3 (IBP3, de R&D systems), IGFBP-4 (IBP4, producida en BRI-NRC), IGFBP-5 (IBP5, producida en BRI-NRC y adquirida de R&D systems) e IGFBP-6 (IBP6, de R&D systems) o los fragmentos proteicos C-terminales de IGFBP-1 (CIBP1), IGFBP-2 (CIBP2), IGFBP-4 (CIBP4), IGFBP-5 (CIBP5) e IGFBP-6 (CIBP6), todos producidos en BRI-NRC). También se estudió la capacidad de un inhibidor de catepsina B permeable a membrana sintético (CA074-ME, EMD Biosciences, Canadá) para inhibir la angiogénesis y la actividad de la catepsina B. La formación de CTC se analizó después de 24 h usando un microscopio Olympus 1X50. Se capturaron imágenes de contraste de fase con una videocámara digital (Olympus U-CMT) y se analizaron usando el programa informático Northern Eclipse v.5.0. Los experimentos se repitieron tres veces. Para determinar los niveles de actividad de la catepsina B en cada condición experimental, al final del experimento, se añadieron 6 μ l de reactivo de catepsina B Magic Red™ 26X (Immunochemistry Technologies, LLC) a todos los pocillos y se mantuvieron a 37 °C en la oscuridad durante dos horas. Las células se lavaron dos veces con HBSS y se realizó la cuantificación de fluorescencia intracelular (excitación a 530/25 nm y emisión a 645/40 nm) usando un lector de placa de citofluorímetro (Bio-Tek FL600).

Crecimiento de U87MG en agar semisólido

El crecimiento celular de U87MG en agar semisólido se determinó en ausencia o presencia de 20 nM de CIBP-4, CIBP-5 o dibutilil AMPc (dB-AMPc) como se ha descrito previamente (Moreno y col., 2006). Se resuspendieron aproximadamente 15.000 células \pm tratamiento en 150 μ l de medio que contenía agar al 0,3 %, y se sembraron en un pocillo de una placa de 24 pocillos previamente recubierta con 250 μ l de agar al 0,6 %. La capa celular solidificada se cubrió con 50 μ l de DME \pm tratamiento que se reemplazó cada tres días durante un periodo de 21 días. Se capturaron imágenes de contraste de fase (6 campos/pocillo) usando una videocámara digital (Olympus U-CMT) y se analizaron con el programa informático Northern Eclipse v.5.0. Las imágenes a color se transformaron a una escala de grises, se determinaron los umbrales, y después se convirtieron en imágenes binarias. Se calculó el número y el área de colonias por campo. Para medir la viabilidad celular, al final del experimento, se añadieron 40 μ l de azul de alamar a cada pocillo y se realizaron las lecturas de fluorescencia cada 10 min. durante un periodo de 180 min. Los experimentos se repitieron 2-3 veces por triplicado.

Ensayo de actividad de la catepsina B

Se sembraron células U87MG a una densidad de 10^4 células/pocillo en 500 μ l de medio U87MG en placas de 24 pocillos revestidas de poli-L-lisina. Tres días después, se eliminó el medio U87MG, las células se aclararon dos veces con HBSS y se incubaron durante 2 h o 18 h en 300 μ l de DME o DME complementado con 20 nM de las proteínas de longitud completa IBP1, IBP2, IBP3, IBP4, IBP5, IBP6 o 20 nM de CIBP1, CIBP2, CIBP4, CIBPS, CIBP6 C-terminales. Después, se añadieron 6 μ l de reactivo de catepsina B Magic Red™ 26X (Immunochemistry Technologies, LLC) a todos los pocillos y se mantuvieron a 37 °C en la oscuridad durante dos horas más. Después, las células se lavaron dos veces con HBSS antes de la cuantificación de la fluorescencia intracelular (excitación a 530/25 nm y emisión a 645/40 nm) en un lector de placa de citofluorímetro (Bio-Tek FL600). Las lecturas de fluorescencia para cada tratamiento se normalizaron a su correspondiente contenido de proteínas celulares medido por el procedimiento de Lowry.

También se midieron los niveles de actividad de la catepsina B en MC U87MG solo o pre-incubado durante dos o 18 horas (durante una noche) con 20 nM de IBP-1, IBP-2, IBP-3, IBP-4, IBP5, IBP-6, CIBP1, CIBP2, CIBP4, NIBP-4, CIBP5, CIBP6 o 5-10 μ g/ml de CA074-Me (EMD Biosciences).

Ensayo de glioma experimental

Se obtuvieron huevos de gallinas fertilizadas (*Gallus gallus*) de la Canadian Food Inspection Agency y se colocaron en una incubadora de huevos a 37 °C y humedad del 67-70 % (día 0). El día 3, se cortaron ventanas en la cáscara del huevo y se cubrieron con cinta quirúrgica (Durapore,) hasta el día 10. Después, se puso un anillo de plástico estéril Nunc Thermanox (Nunc Inc., Naperville, IL) sobre la MCA, se laceró suavemente la superficie delimitada con una hoja de escalpelo y se depositó un sedimento de 10⁶ células U87MG en el centro del anillo. Los días 11-14, se aplicaron treinta µl de agua estéril + DMSO al 6 % solo (vehículo) o en combinación de 250 nM de CIBP-4 a los tumores. Se tomaron fotos digitales usando una cámara Canon 40D. El día 17, los tumores se retiraron cuidadosamente de la MCA y se pesaron.

10 Ejemplo 1: Células endoteliales de cerebro humano (HBEC)

La microscopía confocal indica que el fragmento proteico C-terminal (CIBP-4, nt 155-258) de IGFBP-4 conjugado con alexa fluor 647 (CIBP-4-AF147) se internaliza en células endoteliales de cerebro humano (HBEC). Las proteínas muestran localización perinuclear puntuada en estructuras vesiculares (Fig. 1). Esto indica que CIBP-4 muy probablemente reconoce y se une a proteínas específicas contenidas en estas vesículas.

15 La co-localización de CIBP-4 con lisosomas en HBEC usando LysoTracker™ (una sonda acidotrópica permeable para el marcaje fluorescente selectivo de lisosomas) (Fig. 2) confirma que las vesículas abordadas por CIBP4 son lisosomas.

Se ha desvelado en la solicitud PCT relacionada PCT/CA2006/000250 que la CIBP-4 puede inhibir la respuesta angiogénica inducida por medio condicionado U87MG y por diferentes factores de crecimiento, incluyendo bFGF, VEGF e IGF-1. Para determinar la capacidad de estos factores angiogénicos de estimular la actividad de la catepsina B en HBEC, se usó un péptido de secuencia diana de catepsina B permeable a membrana (Arginina-Arginina) ligado a un fluoróforo sustituido con amida, violeta de cresilo (Magic Red™, Immunochemistry Technologies, LLC). Tras la escisión enzimática en el sitio del enlace amida de la arginina, el fluoróforo violeta de cresilo genera fluorescencia roja cuando se excita a 550-590 nm. Se descubrió que MC U87MG, VEGF (20 ng/ml), IGF-1 (150 ng/ml) y bFGF (20 ng/ml) inducen actividad catepsina B intracelular en HBEC sembradas en Matrigel (Fig. 3A-C, Fig. 4A-D, Fig. 5A-D). Esto indica que la angiogénesis inducida por factores de crecimiento está asociada con niveles aumentados de actividad catepsina B intracelular en células endoteliales.

Como todos los miembros de la familia IGFBP (1-6) tienen un dominio de tiroglobulina de tipo I en su secuencia C-terminal, y otras proteínas no relacionadas que albergan el dominio de tiroglobulina de tipo I han demostrado tener actividad anti-proteasa (principalmente anti-catepsina), se analizó la capacidad de la IGFBP-4 C-terminal/CIBP-4 (producida en BRI-NRC), de inhibir la actividad catepsina B intracelular. Como se muestra en la Fig. 3A-C, existe una fuerte correlación entre la actividad catepsina B intracelular y la reducción en la formación de CTC ejercida por CIBP-4 en células HBEC sembradas en Matrigel. 3D).

Para determinar la capacidad de otros miembros de la familia IGFBP y sus respectivos fragmentos C-terminales (que contienen el dominio de tiroglobulina de tipo I) de inhibir la angiogénesis (formación de CTC por HBEC en Matrigel) y la actividad catepsina B, se produjeron las proteínas recombinantes IGFBP-1 (IBP1, SEC ID 1), IGFBP-2 (IBP2, SEC ID 3), IGFBP-5 (IBP5, SEC ID 7) y los fragmentos C-terminales de IGFBP-1 (CIBP1, SEC ID 2), IGFBP-5 (CIBP5, SEC ID 8) e IGFBP-6 (CIBP6, SEC ID 9) en BRI-NRC usando un procedimiento interno optimizado. Se usaron IGFBP-2 e IGFBP-5 de R&D systems como controles positivos, para comparar su eficacia con la de las proteínas correspondientes producidas por BRI-NRC. Como se muestra en las Fig. 4-5, todos los miembros de IGFBP y sus correspondientes fragmentos C-terminales fueron potentes inhibidores tanto de la angiogénesis (formación de CTC por HBEC en Matrigel) como de la actividad de la catepsina B, con la excepción de IGFBP-2 que no inhibió la respuesta angiogénica ni la actividad de la catepsina B intracelular inducida en HBEC por MC U87MG o bFGF. Sin embargo, IGFBP-2 pudo inhibir completamente la respuesta angiogénica y la actividad de la catepsina B intracelular inducida por VEGF e IGF-1.

Estos resultados también indican que los miembros de la familia IGFBP, especialmente sus fragmentos C-terminales que contienen un dominio de tiroglobulina de tipo I, son potentes inhibidores de la angiogénesis muy probablemente debido a su capacidad para inhibir la actividad de la catepsina B en células endoteliales.

Ejemplo 2: Células de glioblastoma humano (U87MG)

50 Para determinar si las propiedades anti-tumorigénicas de CIBP4 (como se desvela en la solicitud PCT relacionada PCT/CA2006/000250) están asociadas con su capacidad para inhibir la actividad de la catepsina B, se realizó microscopía confocal para mapear la actividad de la catepsina B intracelular en células U87MG. Como se muestra en la Fig. 6, se observaron elevados niveles de actividad de la catepsina B en células U87MG predominantemente en el citoplasma y la membrana plasmática junto con los procesos celulares.

55 La co-localización de CIBP-4 conjugada con alexa fluor 647 con lisosomas se confirmó en células U87MG usando LysoTracker™ (Fig. 7)

También se midieron niveles muy elevados de actividad de la catepsina B secretada en MC U87MG y la actividad se inhibió parcialmente (20-70 %) por incubación durante una noche con miembros de la familia IGFBP y sus fragmentos C-terminales (Fig. 8); siendo el orden de eficacia CIBP2 (~70 %) > IBP2 = IBP6 = CIBP6 (~60 %) > CA074-ME (~40 %).

5 La evaluación intracelular de la actividad de la catepsina B usando Magic Red™ en U87MG también confirmó niveles muy elevados de actividad en condiciones basales. La actividad de la catepsina B intracelular se inhibió (~50 %) por incubación durante una noche de las células con 20 nM de IBP2 (tanto de BRI-NRC como de R&D systems), CIBP2 (producida por BRI-NRC), IBP5 (tanto de BRI-NRC como de R&D systems) y CIBP5 (producida por BRI-NRC). Estos resultados indican que proteínas IGFBP pueden inhibir la actividad de la catepsina B tanto intracelular
10 como extracelular en células tumorales de glioblastoma.

Como se desvela en la solicitud PCT relacionada PCT/CA2006/000250, IGFBP-4 y el fragmento C-terminal de IGFBP-4 (CIBP-4) pudieron reducir la formación de colonias de U87MG en agar blando. Ahora se investigó la capacidad de fragmentos C-terminales de los otros miembros IGFBP de inhibir la formación de colonias U87MG en agar blando. Como se muestra en la Fig. 10, la eficacia de los fragmentos fue: CIBP1 = CIBP6 (~25 %) < CIBP2 = CIBP4 (~50 %) < dB-AMPc (control positivo, -65 %) < CA074-ME (~70 %). Esto indica que la inhibición de la catepsina, como se demuestra con el inhibidor sintético de la catepsina B, bloquea el crecimiento tumoral de glioblastoma y que los miembros IGFBP, especialmente CIBP2 y CIBP4 son potentes inhibidores tanto de la actividad catepsina B como del crecimiento tumoral.

La capacidad de CIBP4 (250 ng/ml) de bloquear el crecimiento tumoral se ensayó usando el ensayo de glioma experimental (Fig. 4A). El crecimiento de células U87MG en MCA estuvo significativamente ($p < 0,005$) reducido (20-25 %) en el grupo tratado con CIBP4 en comparación con el grupo tratado con vehículo. El análisis de la distribución de la frecuencia del peso del tumor en tres grupos principales (tamaño pequeño: 0-15 mg, tamaño medio: 15-20 mg y tamaño grande: 20-36 mg) indica que el tratamiento con CIBP-4 induce un desplazamiento (factor ~3) hacia tumores más pequeños [reducción de factor 3 en la cantidad de tumores de tamaño grande (20-36 mg) frente al aumento de factor tres en tumores de tamaño pequeño (0-15 mg)] en comparación con el tratamiento con vehículo (Fig. 3C). El tamaño promedio de los tumores en cada intervalo fue similar entre el grupo tratado con CIBP4 y el tratado con vehículo. Estos resultados indican que CIBP4 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de glioma experimental *in vivo*.

Otras ventajas que son intrínsecas a la estructura son obvias para los especialistas en la técnica. Las realizaciones se describen en el presente documento de forma ilustrativa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> National Research Council of Canada Moreno, Maria J Stanimirovic, Danica B Ball, Marguerite Durocher, Yves

<120> PROCEDIMIENTO PARA INHIBIR LA ANGIOGÉNESIS, LA TUMORIGÉNESIS Y LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA

<130> 83815-5403

<150> US 60/837.930

<151> 16-08-2006

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 272

<212> PRT

<213> humana

<400> 1

ES 2 418 434 T3

Met Ser Glu Val Pro Val Ala Arg Val Trp Leu Val Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Val Gln Val Gly Val Thr Ala Gly Ala Pro Trp Gln Cys Ala Pro
20 25 30

Cys Ser Ala Glu Lys Leu Ala Leu Cys Pro Pro Val Ser Ala Ser Cys
35 40 45

Ser Glu Val Thr Arg Ser Ala Gly Cys Gly Cys Cys Pro Met Cys Ala
50 55 60

Leu Pro Leu Gly Ala Ala Cys Gly Val Ala Thr Ala Arg Cys Ala Arg
65 70 75 80

Gly Leu Ser Cys Arg Ala Leu Pro Gly Glu Gln Gln Pro Leu His Ala
85 90 95

Leu Thr Arg Gly Gln Gly Ala Cys Val Gln Glu Ser Asp Ala Ser Ala
100 105 110

Pro His Ala Ala Glu Ala Gly Ser Pro Glu Ser Pro Glu Ser Thr Glu
115 120 125

Ile Thr Glu Glu Glu Leu Leu Asp Asn Phe His Leu Met Ala Pro Ser
130 135 140

Glu Glu Asp His Ser Ile Leu Trp Asp Ala Ile Ser Thr Tyr Asp Gly
145 150 155 160

Ser Lys Ala Leu His Val Thr Asn Ile Lys Lys Trp Lys Glu Pro Cys
165 170 175

Arg Ile Glu Leu Tyr Arg Val Val Glu Ser Leu Ala Lys Ala Gln Glu
180 185 190

Thr Ser Gly Glu Glu Ile Ser Lys Phe Tyr Leu Pro Asn Cys Asn Lys
195 200 205

Asn Gly Phe Tyr His Ser Arg Gln Cys Glu Thr Ser Met Asp Gly Glu
210 215 220

Ala Gly Leu Cys Trp Cys Val Tyr Pro Trp Asn Gly Lys Arg Ile Pro
225 230 235 240

Gly Ser Pro Glu Ile Arg Gly Asp Pro Asn Cys Gln Ile Tyr Phe Asn
245 250 255

Val Gln Asn Thr Gly His His His His His His His His Gly Gly Gln
260 265 270

ES 2 418 434 T3

<211> 128
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Fragmento C-terminal de IGFBP-1
<400> 2

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

10

<210> 3
<211> 352
<212> PRT
<213> humana

15

<400> 3

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

ES 2 418 434 T3

180 185 190
 Val Phe Arg Glu Lys Val Thr Glu Gln His Arg Gln Met Gly Lys Gly
 195 200 205
 Gly Lys His His Leu Gly Leu Glu Glu Pro Lys Lys Leu Arg Pro Pro
 210 220
 Pro Ala Arg Thr Pro Cys Gln Gln Glu Leu Asp Gln Val Leu Glu Arg
 225 230 235 240
 Ile Ser Thr Met Arg Leu Pro Asp Glu Arg Gly Pro Leu Glu His Leu
 245 250 255
 Tyr Ser Leu His Ile Pro Asn Cys Asp Lys His Gly Leu Tyr Asn Leu
 260 265 270
 Lys Gln Cys Lys Met Ser Leu Asn Gly Gln Arg Gly Glu Cys Trp Cys
 275 280 285
 Val Asn Pro Asn Thr Gly Lys Leu Ile Gln Gly Ala Pro Thr Ile Arg
 290 295 300
 Gly Asp Pro Glu Cys His Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Gln Glu Ala Arg
 305 310 315 320
 Gly Val His Thr Gln Arg Met Gln Gly Ser Gly Trp Ser His Pro Gln
 325 330 335
 Phe Glu Lys Thr Gly His His His His His His His His Gly Gly Gln
 340 345 350

<210> 4
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Fragmento C-terminal de IGFBP-2

10

<400> 4

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Ile Ala Ser Lys Gly Gly Lys His His Leu Gly Leu Glu Glu Pro
 20 25 30
 Lys Lys Leu Arg Pro Pro Pro Ala Arg Thr Pro Cys Gln Gln Glu Leu
 35 40 45

ES 2 418 434 T3

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

<210> 5
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> humana
 <400> 5

5

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

10

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

<210> 6
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Fragmento C-terminal de IGFBP-4

<400> 6

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 418 434 T3

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

5

<210> 7
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> humana

<400> 7

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

10

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

<210> 8
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Fragmento C-terminal de IGFBP-5

<400> 8

5

10

ES 2 418 434 T3

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

<210> 9
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> humana

5

<400> 9

Met Thr Pro His Arg Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Ala Leu Ala Arg Cys Pro Gly Cys
 20 25 30
 Gly Gln Gly Val Gln Ala Gly Cys Pro Gly Gly Cys Val Glu Glu Glu
 35 40 45
 Asp Gly Gly Ser Pro Ala Glu Gly Cys Ala Glu Ala Glu Gly Cys Leu
 50 55 60

10

Arg Arg Glu Gly Gln Glu Cys Gly Val Tyr Thr Pro Asn Cys Ala Pro
 65 70 75 80
 Gly Leu Gln Cys His Pro Pro Lys Asp Asp Glu Ala Pro Leu Arg Ala
 85 90 95
 Leu Leu Leu Gly Arg Gly Arg Cys Leu Pro Ala Arg Ala Pro Ala Val
 100 105 110
 Ala Glu Glu Asn Pro Lys Glu Ser Lys Pro Gln Ala Gly Thr Ala Arg
 115 120 125
 Pro Gln Asp Val Asn Arg Arg Asp Gln Gln Arg Asn Pro Gly Thr Ser
 130 135 140
 Thr Thr Pro Ser Gln Pro Asn Ser Ala Gly Val Gln Asp Thr Glu Met
 145 150 155 160
 Gly Pro Cys Arg Arg His Leu Asp Ser Val Leu Gln Gln Leu Gln Thr
 165 170 175
 Glu Val Tyr Arg Gly Ala Gln Thr Leu Tyr Val Pro Asn Cys Asp His
 180 185 190
 Arg Gly Phe Tyr Arg Lys Arg Gln Cys Arg Ser Ser Gln Gly Gln Arg
 195 200 205
 Arg Gly Pro Cys Trp Cys Val Asp Arg Met Gly Lys Ser Leu Pro Gly
 210 215 220
 Ser Pro Asp Gly Asn Gly Ser Ser Ser Cys Pro Thr Gly Ser Ser Gly
 225 230 235 240

<210> 10
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Fragmento C-terminal de IGFBP-6

<400> 10

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

130		135		140											
Ser 145	Ala	Gly	Ser	Val	Glu 150	Ser	Pro	Ser	Val	Ser 155	Ser	Thr	His	Arg	Val 160
Ser	Asp	Pro	Lys	Phe 165	His	Pro	Leu	His	Ser 170	Lys	Ile	Ile	Ile	Ile	Lys 175
Lys	Gly	His	Ala 180	Lys	Asp	Ser	Gln	Arg 185	Tyr	Lys	Val	Asp	Tyr 190	Glu	Ser
Gln	Ser	Thr 195	Asp	Thr	Gln	Asn	Phe 200	Ser	Ser	Glu	Ser	Lys 205	Arg	Glu	Thr
Glu	Tyr 210	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg 215	Glu	Met	Glu	Asp	Thr 220	Leu	Asn	His	Leu
Lys 225	Phe	Leu	Asn	Val	Leu 230	Ser	Pro	Arg	Gly	Val 235	His	Ile	Pro	Asn	Cys 240
Asp	Lys	Lys	Gly	Phe 245	Tyr	Lys	Lys	Lys	Gln 250	Cys	Arg	Pro	Ser	Lys 255	Gly
Arg	Lys	Arg	Gly 260	Phe	Cys	Trp	Cys	Val 265	Asp	Lys	Tyr	Gly	Gln 270	Pro	Leu
Pro	Gly	Tyr 275	Thr	Thr	Lys	Gly	Lys 280	Glu	Asp	Val	His	Cys 285	Tyr	Ser	Met
Gln	Ser	Lys 290													

- 5 <210> 12
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador pcr para la clonación de igfbp-1

- <400> 12
- ctagaattcc accatgtcag aggtccccgt tg 32

- 15 <210> 13
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador pcr para la clonación de igfbp-1

- <400> 13
- ctaaccggtg tttgtacat taaatatat c 31

- 25 <210> 14
- <211> 30
- <212> ADN

ES 2 418 434 T3

<213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación de igfbp-2

5

<400> 14
ctagaattcc accatgctgc cgagagtggg 30

<210> 15
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

10

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación de igfbp-2

15

<400> 15
taggatccc tgcacccgct ggggtgct 28

20

<210> 16
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

25

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación c-terminal de IGFBP-2

30

<400> 16
ctagctagca aggggtgcaa gcatcac 27

35

<210> 17
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación del fragmento c-terminal de IGFBP-2

40

<400> 17
taggatccc tgcacccgct ggggtgct 28

45

<210> 18
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación de igfbp-4

50

<400> 18
taagaattcg ccacatgct gccctctgc ct 32

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

55

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación de igfbp-4

60

<400> 19
ttaggatcca cctctcgaaa gctgtcagcc 30

<210> 20
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial

65

ES 2 418 434 T3

<220>
<223> Cebador pcr para la clonación del clon c-terminal de igfbp-4

5 <400> 20
gccgctagca aggtcaatgg ggcgccccgg ga 32

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
10 <213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para el clon c-terminal de igfbp-4

15 <400> 21
ttaggatcca cctctgaaa gctgtcagcc 30

<210> 22
<211> 34
20 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr primer para el clon de igfbp-5

25 <400> 22
ctagaattcc accatggtgt tgctcaccgc ggtc34

<210> 23
30 <211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para el clon de igfbp-5

35 <400> 23
ctaggatccc tcaacgttgc tgctgtcgaa ggt 33

<210> 24
40 <211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para el clon c-terminal de igfbp-5

45 <400> 24
ctagctagca tcattctctgc acctgagatg 30

<210> 25
<211> 33
<212> ADN
50 <213> artificial

<220>
<223> Cebador pcr para el clon c-terminal de igfbp-5

55 <400> 25
ctaggatccc tcaacgttgc tgctgtcgaa ggt 33

60

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.
- 5 2. Uso de un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral.
- 10 3. Uso de un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.
4. Uso de un péptido que consta de los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.
5. Uso de un péptido que consta de los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento tumoral.
- 15 6. Uso de un péptido que consta de los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.
7. Uso de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.
- 20 8. Uso de un péptido que comprende los aminoácidos 170-259 de la SEC ID N° 1 en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la catepsina.

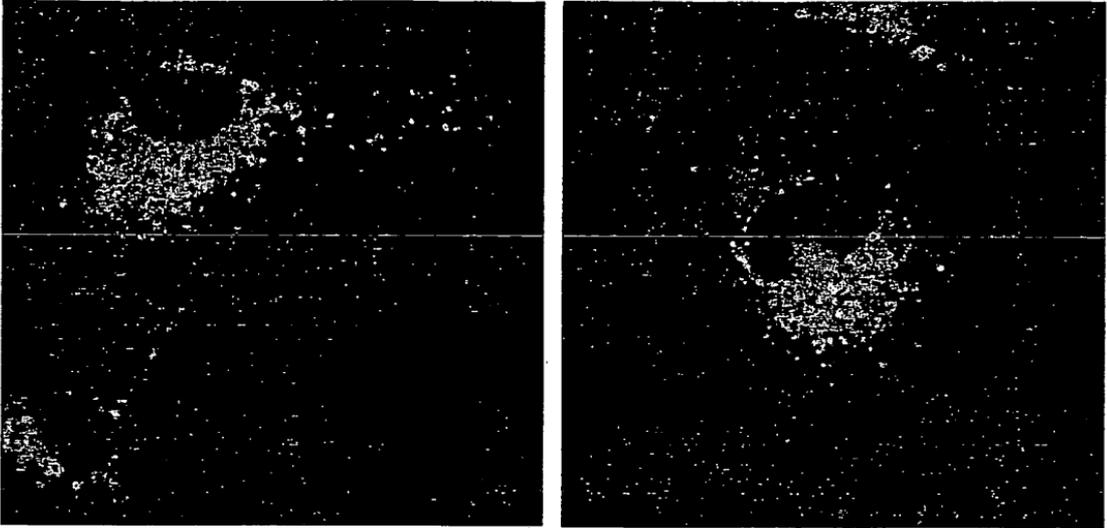


Fig. 1

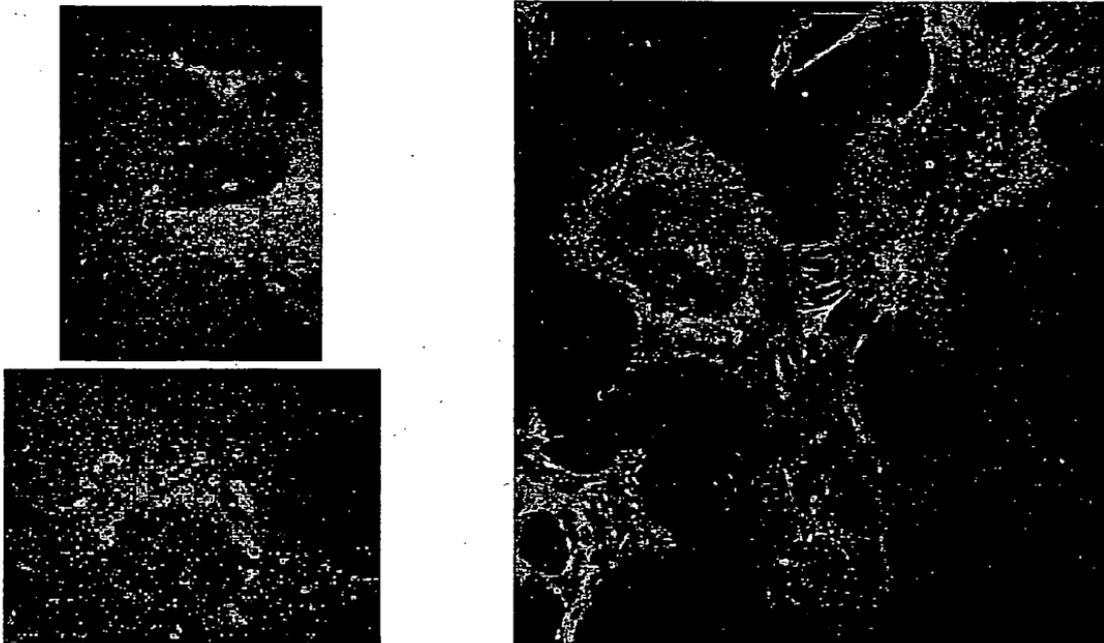


Fig. 2

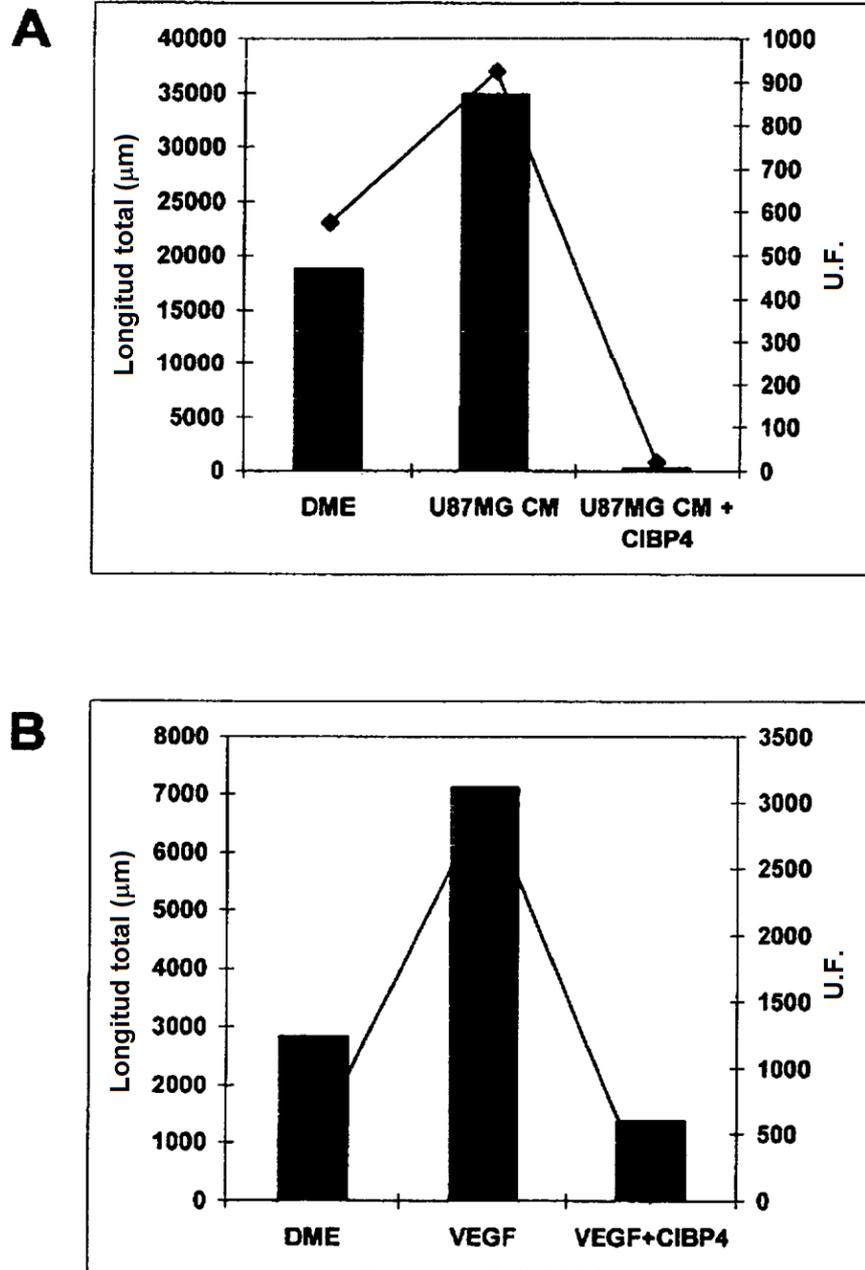


Fig. 3

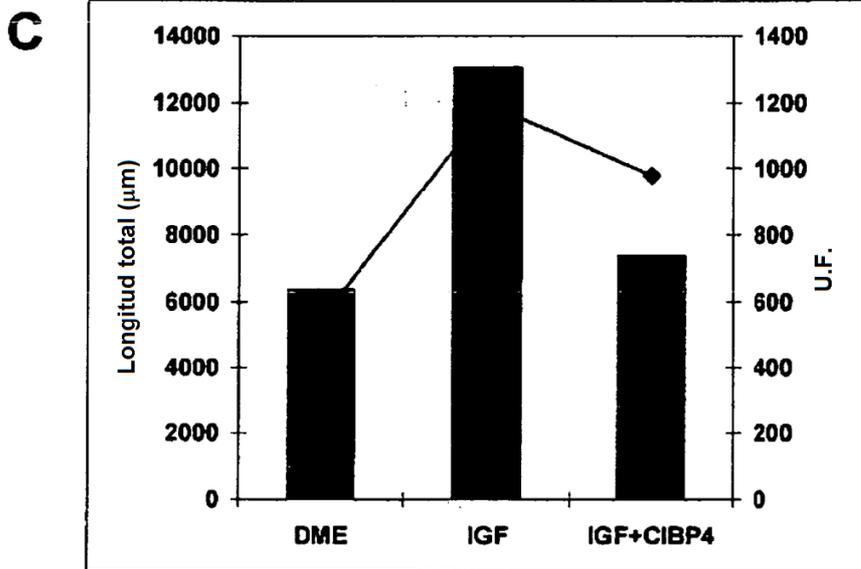


Fig. 3

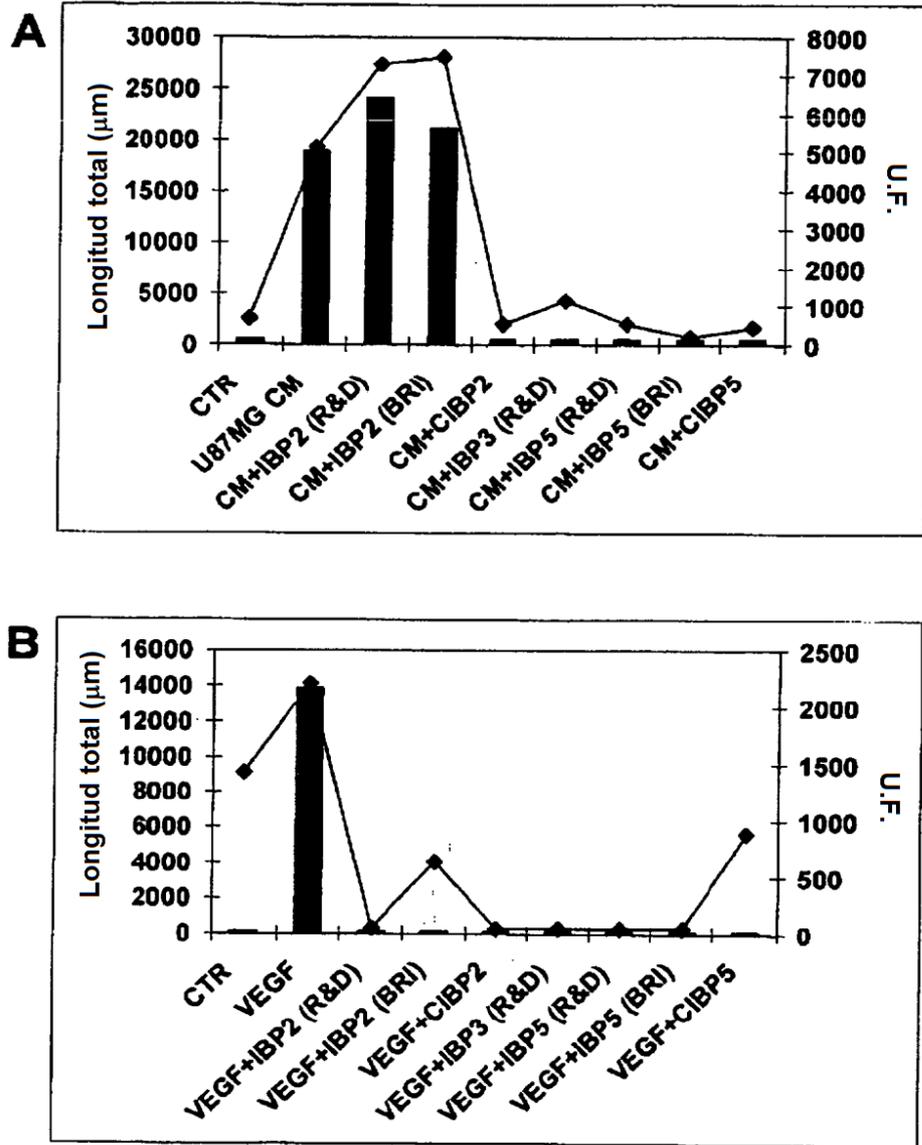


Fig. 4

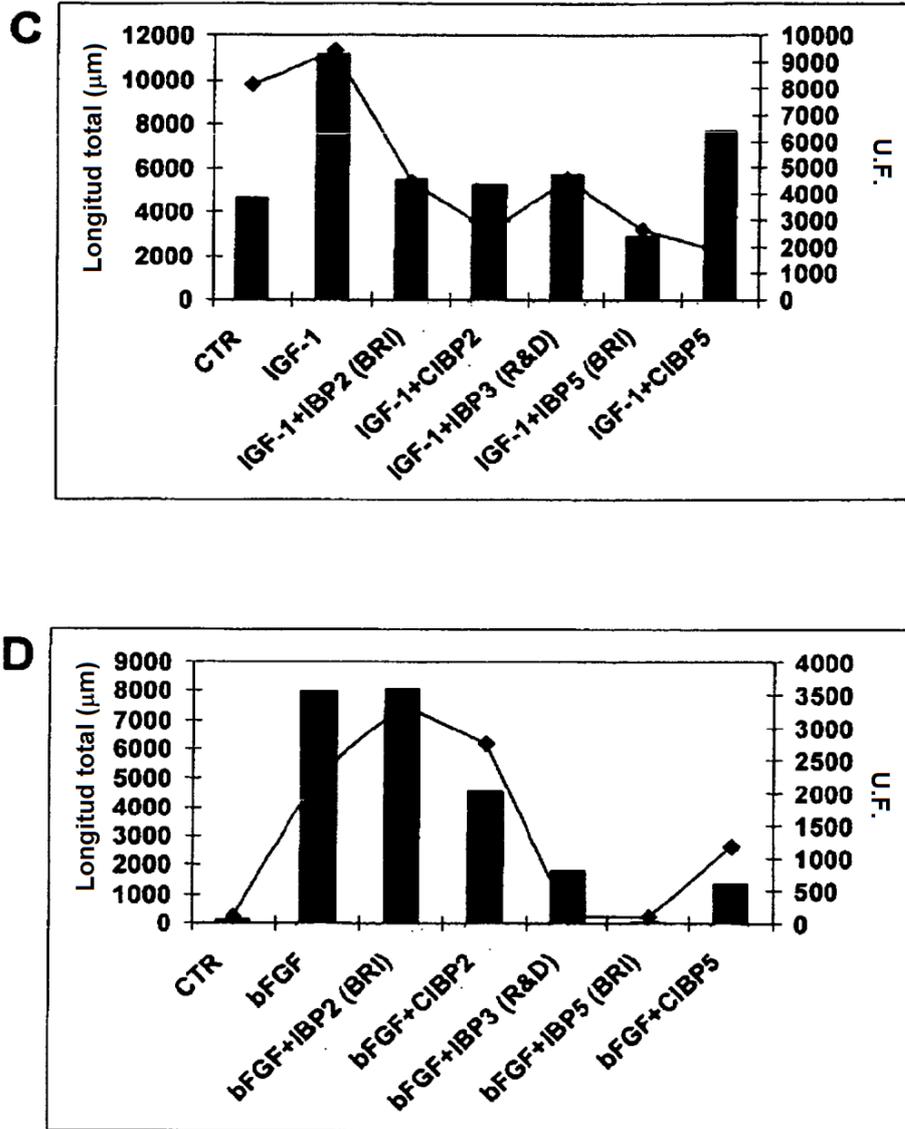


Fig. 4

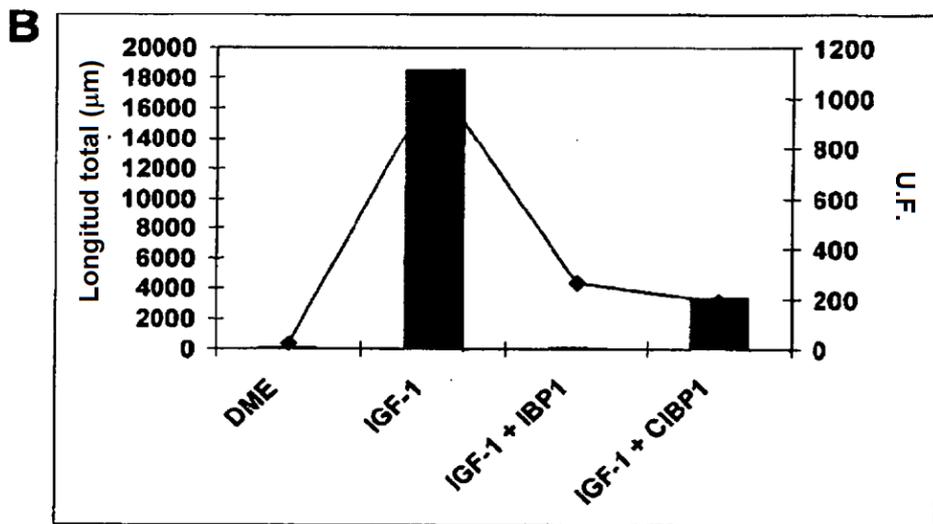
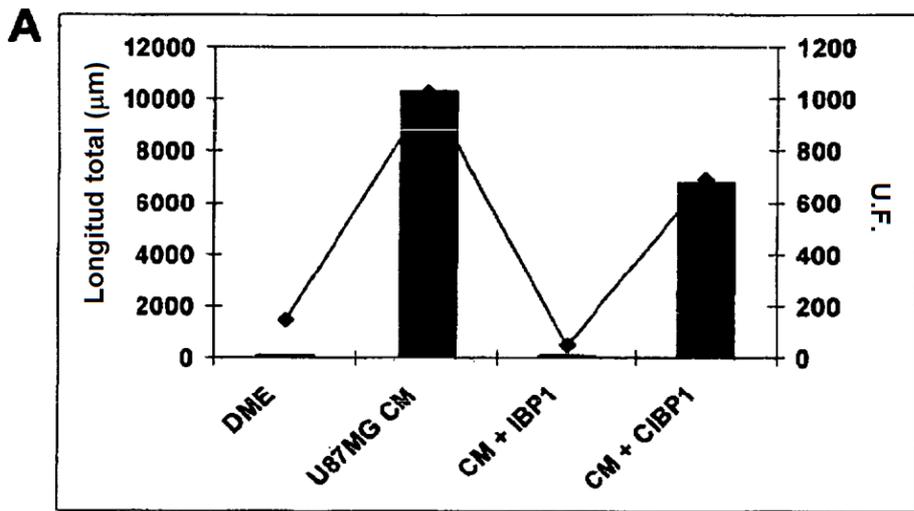


Fig. 5

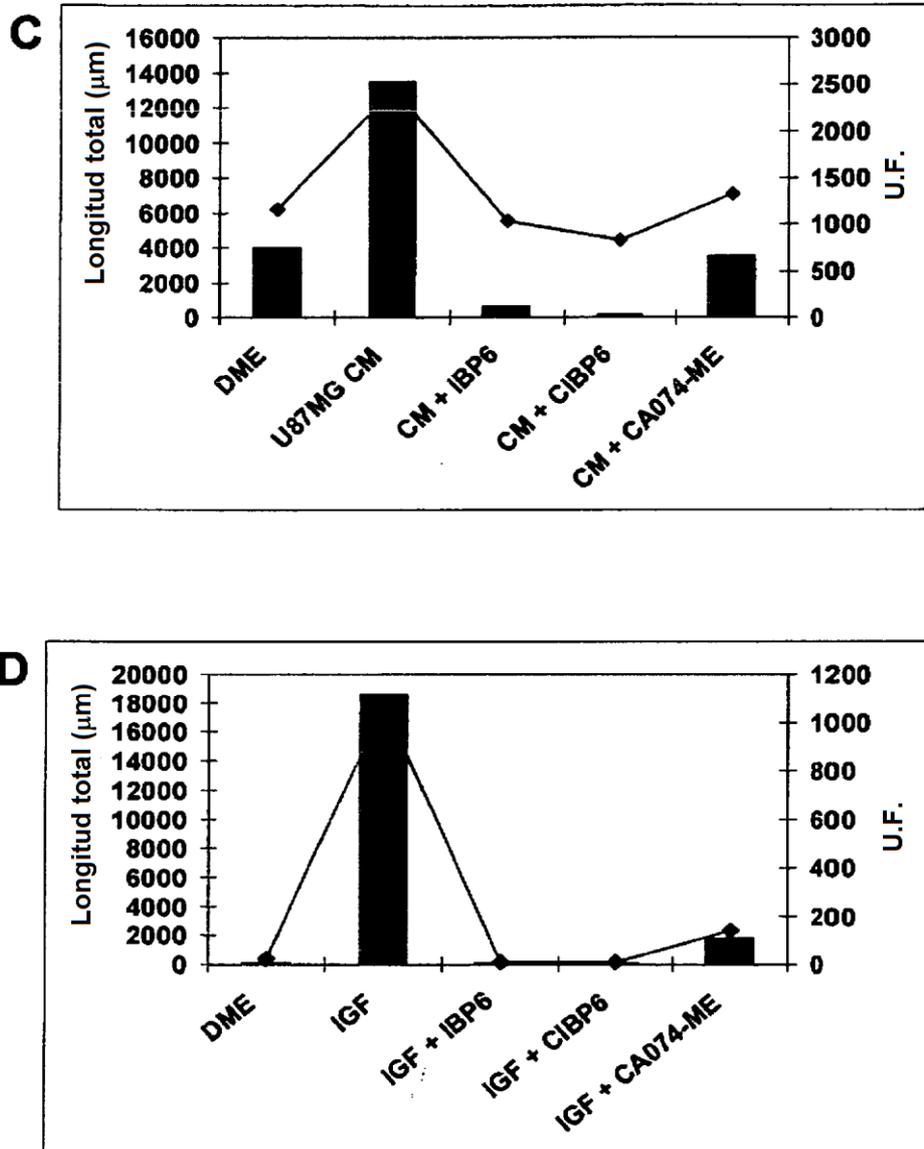


Fig. 5

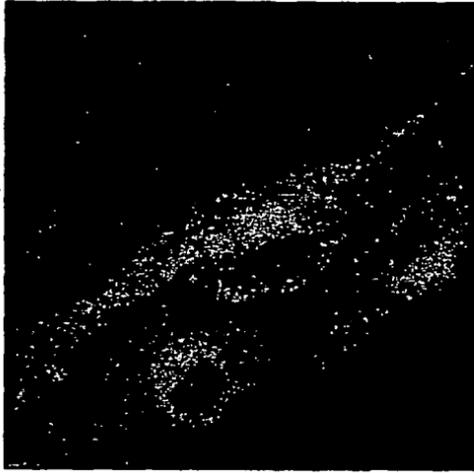


Fig. 6

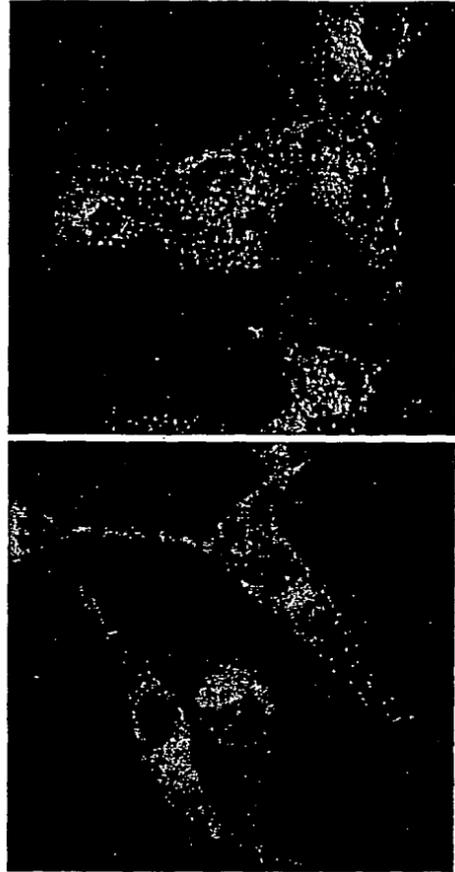


Fig. 7

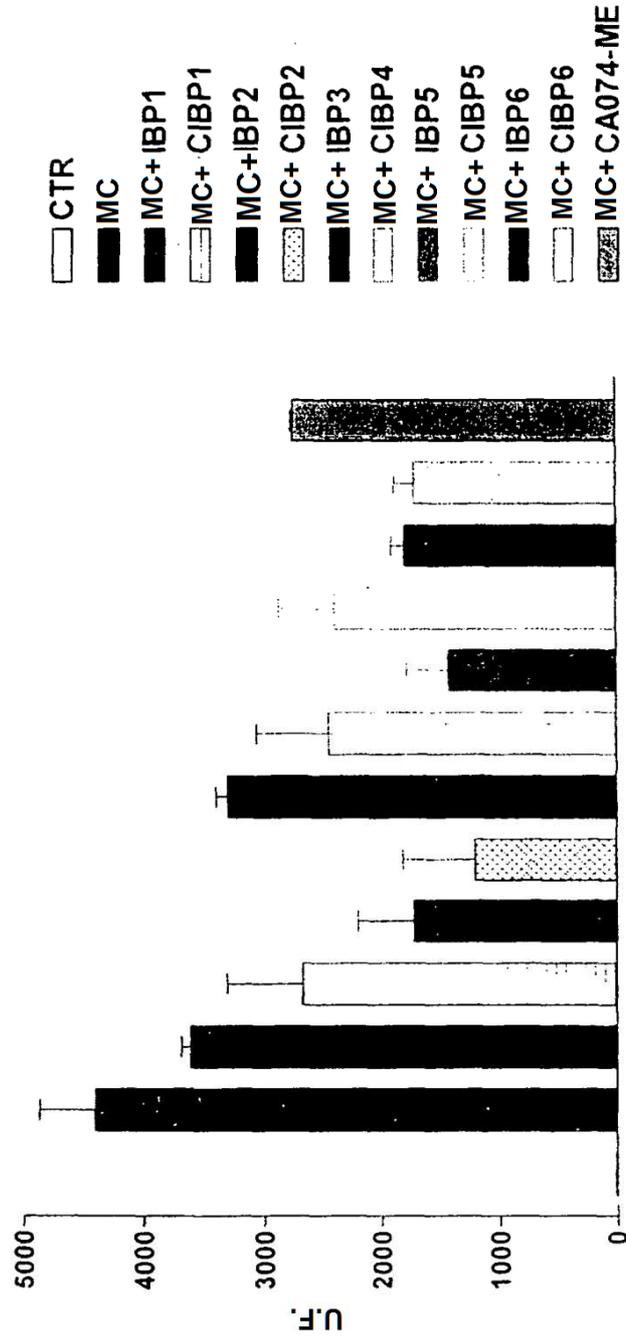


Fig. 8

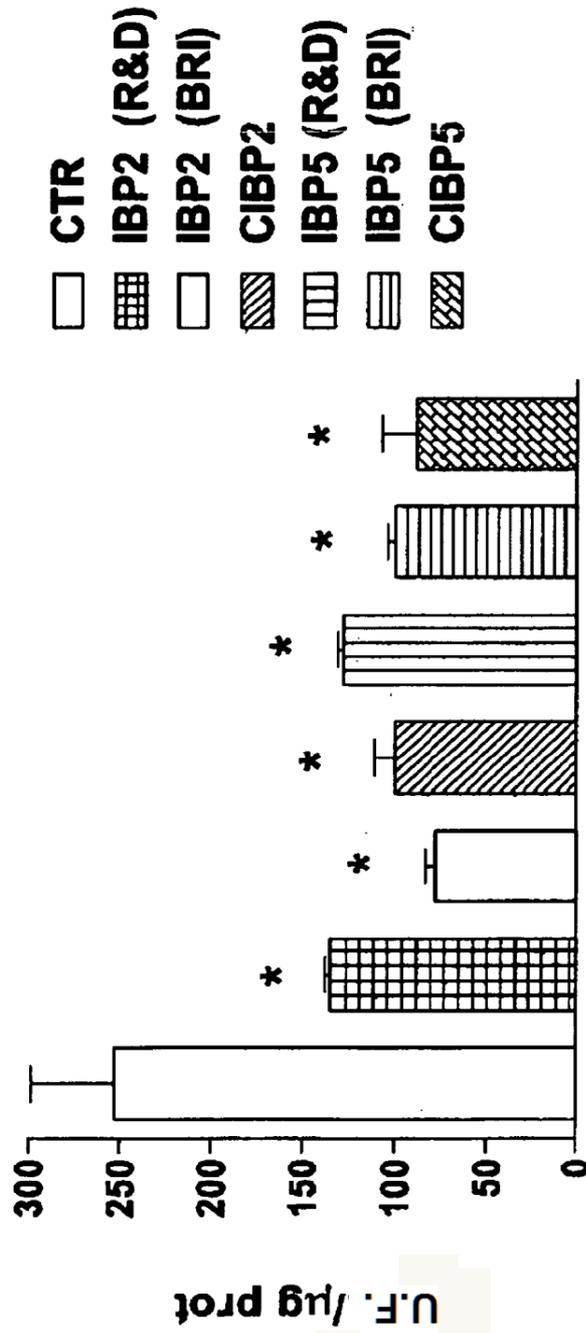


Fig. 9

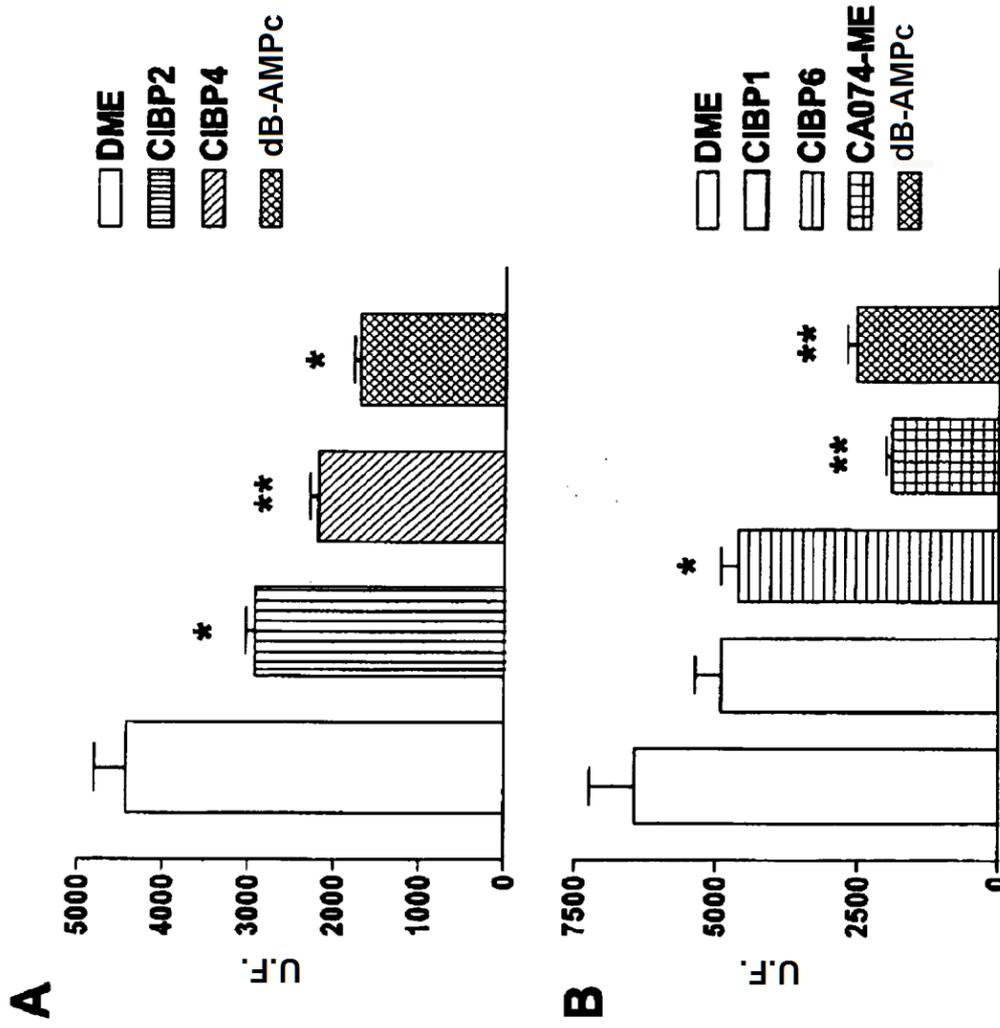
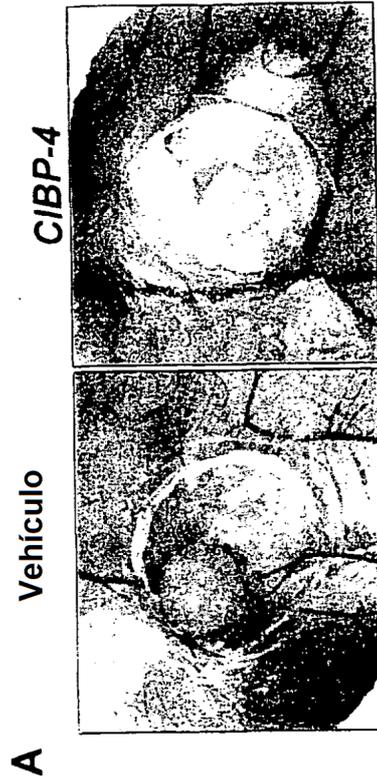


Fig. 10



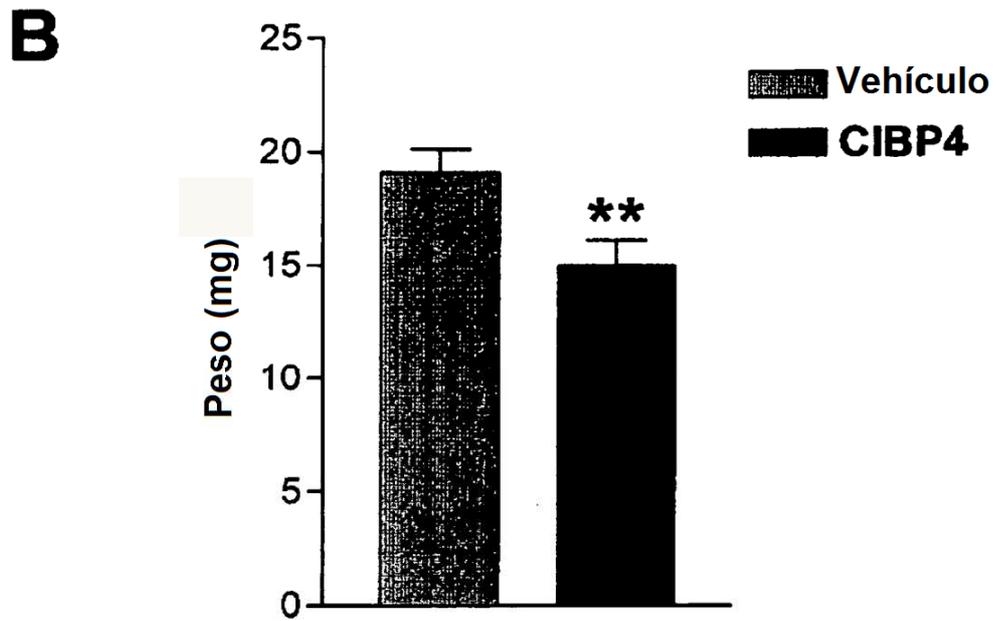
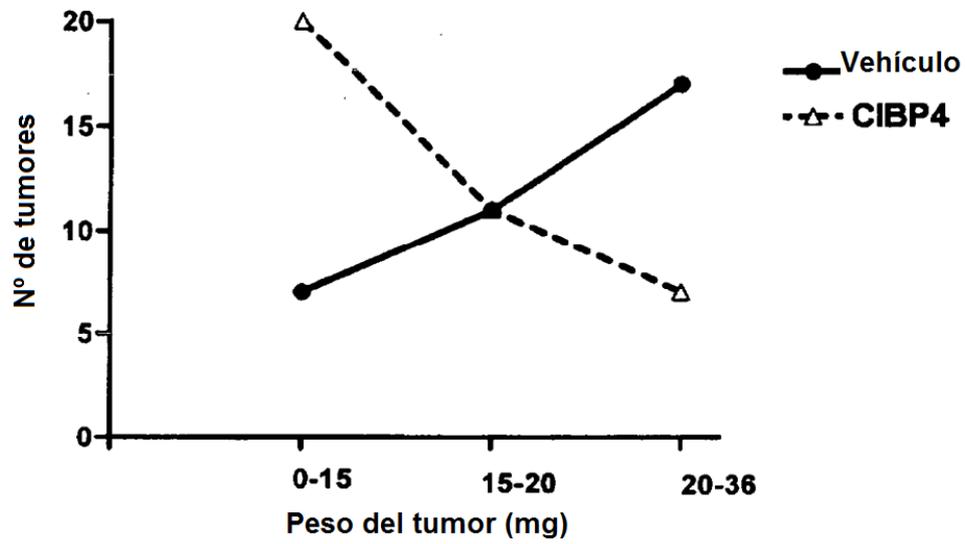


Fig. 11

C



D

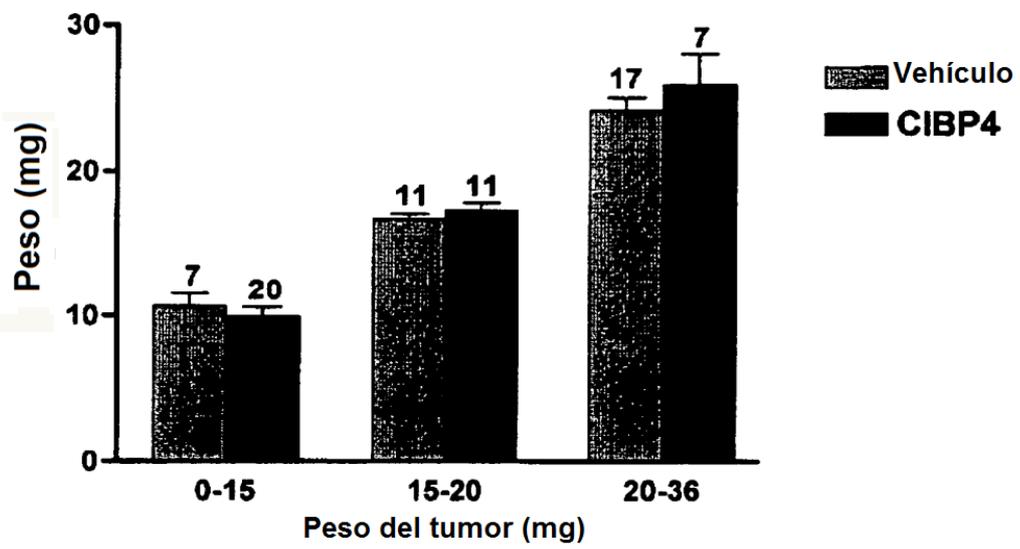


Fig. 11