

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 484**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2008 E 08771306 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2155878**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de angiogénesis anómala a través de la familia BAI de proteínas y sus fragmentos de proteína**

30 Prioridad:

19.06.2007 US 936196 P

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**EMORY UNIVERSITY (100.0%)
1599 CLIFTON RD. NE 4TH FLOOR
ATLANTA, GA 30322, US**

72 Inventor/es:

VAN MEIR, ERWIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 484 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

Procedimiento de tratamiento de angiogénesis anómala a través de la familia BAI de proteínas y sus fragmentos de proteína.

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos con el título "Procedimiento para tratar angiogénesis anómala a través de la familia BAI de proteínas y sus fragmentos de proteína", que tiene número de serie 60/936.196 presentada el 19 de junio de 2007.

Declaración con respecto al patrocinio federal

Investigación o desarrollo

- 10 La presente invención(s) se realizó en parte con el apoyo del gobierno con los n.ºs de Subvención: CA86335, HL67839, y NS056203. El gobierno tiene ciertos derechos en la divulgación(s).

Campo de la divulgación

- 15 La presente divulgación se refiere al Inhibidor de la Angiogénesis Cerebral, BAI1, sus fragmentos de escisión, Vasculostatina 120 (Vstat120) y Vasculostatina 40 (Vstat40), y homólogos de los mismos. La presente divulgación también se refiere al uso de estos polipéptidos como agentes antiangiogénicos y antitumorogénicos.

Antecedentes

- La angiogénesis, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, desempeña papeles fundamentales tanto en el desarrollo embrionario como en diversos procesos fisiológicos o patológicos. Estos incluyen curación de heridas, enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, estenosis aórtica e insuficiencia cardíaca isquémica, artritis, psoriasis, diabetes, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades vasculares periféricas, diversas formas de ceguera, tales como la degeneración macular y cáncer. Con los cánceres, la comprensión de que los tumores necesitan establecer un suministro vascular para proporcionar soporte de nutrientes así como para proporcionar una ruta de residuos, ha suscitado gran interés en la posibilidad de que la inhibición de la angiogénesis ofrezca una *nueva* forma para inhibir el crecimiento tumoral. Para obtener suministro de sangre para su crecimiento, las células tumorales son potentemente angiogénicas y atraen nuevos vasos a través de aumento de la secreción de inductores (factores de crecimiento) y disminución de la producción de reguladores negativos endógenos. Este equilibrio de factores normalmente está muy controlado con crecimiento de nuevos vasos suprimido en condiciones fisiológicas normales. Un cambio en este equilibrio en ocasiones se denomina el "cambio angiogénico". El descubrimiento de nuevos factores pro- y anti-angiogénicos y la capacidad de regular su expresión de forma endógena o administrarlos de forma exógena tiene implicaciones potenciales para múltiples afecciones, y presenta una ruta única para el desarrollo de agentes terapéuticos.

- El proceso de la angiogénesis está estrechamente regulado en tejidos adultos normales mediante el mantenimiento de un equilibrio delicado entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos. En la neoplasia, este equilibrio se inclina en favor del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, aumentando de ese modo su suministro vascular y la estimulación de crecimiento y metástasis (Folkman, J. N. Engl. J. Med., 1971; 285: 1182-1186; Wang y col., Brain Pathol., 2005; 15: 318-326). La producción de moléculas proangiogénicas, tales como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) e IL-8 aumenta, y la expresión de factores antiangiogénicos, tales como trombospondina-1 (TSP-1) se reduce (Tenan y col., J. Exp. Med., 2000; 191: 1789-1798; 4. Desbaillets y col., J. Exp. Med., 1997; 186: 1201-1212). Estos sucesos de regulación de la angiogénesis secundarios son las consecuencias de la pérdida de supresores tumorales tales como p53 y PTEN o ganancia de expresión de oncogenes tales como EGFR. La detención de la angiogénesis en combinación con otros agentes que actualmente se está explotando en la actualidad como una nueva modalidad terapéutica eficaz para el cáncer (Batchelor y col., Cancer Cell, 2007; 11: 83-95; Kurozumi y col., J. Natl. Cancer Inst., 2007; 99: 1768-1781). Se sabe poco sobre cómo se regula aproximadamente la angiogénesis fisiológica en el cerebro y cómo se llega a incorporar durante el desarrollo del tumor cerebral.

- Los gliomas son el tumor primario más frecuente del sistema nervioso central. El glioblastoma multiforme (GBM), la forma más agresiva de astrocitoma maligno (estadio IV de la OMS) se caracteriza patológicamente por una vasculatura altamente anómala (Brat y col., Cancer Res., 2004; 64: 920-927). Durante la evolución del astrocitoma de estadio bajo alto, un aumento de la densidad de los vasos precede a la evolución maligna, así como una acumulación de defectos genéticos. Las dos alteraciones genéticas que coinciden con la transición a GBM en estadio IV de la OMS son la pérdida del gen supresor tumoral *PTEN* y la amplificación del protooncogén de EGFR (Li y col., Science, 1997; 275: 1943-1947; Smith y col., J Natl Cancer Inst, 2001; 93: 1246-1256). Aparte de la amplificación genética y la sobreexpresión del receptor, el gen EGFR también muta frecuentemente en GBM. La más común de estas mutaciones da como resultado en un EGFRVIII independiente de ligando truncado con actividad constitutiva (Ekstrand y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992; 89: 4309-4313; Libermann y col., Nature, 1985; 313: 144-147). Es importante destacar que se sabe que estos dos sucesos aumentan el fenotipo angiogénico

de las células de glioma.

Se cree que el inhibidor 1 de la angiogénesis cerebral (BAI1) es un miembro de la subfamilia de adhesión de receptores acoplados a proteína G (GPCR), participa en interacciones de célula-célula y de célula-matriz (Shiratsuchi y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 247: 597-604; Nishimori y col., *Oncogene*, 1997; 15: 2145-2150). Su expresión se reduce en gliomas malignos, adenocarcinoma pulmonar, cánceres pancreático y gástrico, pero está presente en el tejido normal correspondiente con, como mucho, la expresión más abundante en el cerebro (Kaur y col., *Am. J. Pathol.*, 2003; 162: 19-27; Hatanaka y col., *Int. J. Mol. Med.*, 2000; 5: 181-183; Fukushima y col., *Int. J. Oncol.*, 1998; 13: 967-970.).

El inhibidor 1 de la angiogénesis cerebral (BAI1), puede contribuir a la regulación del "cambio angiogénico" y su pérdida de expresión parece importante para la evolución de los gliomas (Kaur et al, 2003 *Am. J. Pathol.* 162: 19-27). BAI1 es una proteína transmembrana de 1584 aminoácidos estructura de manera similar a una clase B de siete receptores transmembrana acoplados a la proteína G. Tiene tanto un dominio intracelular de 45 kDa cuya función precisa se desconoce, como un gran dominio extracelular 120 kDa. Este dominio contiene dos áreas importantes, un motivo de unión a integrina Arg-Gly-Asp (RGD), así como cinco repeticiones de trombospondina de tipo 1 (TSR). El motivo de unión a integrina RGD le confiere la capacidad de interactuar con integrinas de superficie celular y puede influir en la migración celular y señalización del factor de crecimiento intracelular, mientras que la presencia de las TSR indica posibles funciones antiangiogénicas.

Se ha demostrado que la reexpresión de BAI1 en las células tumorales que han perdido su expresión da como resultado la reducción del crecimiento de los tumores con densidad de los vasos reducida, lo que sugiere una función antiangiogénica (Kudo y col., *Oncol. Rep.*, 2007; 18: 785-791; Kang y col., *Cancer Gene Ther*, 2006; 13: 385-392). La vasculostatina es un fragmento de origen natural de 120 kDa (Vstat120) de BAI1 (Kaur y col., *Oncogene*, 2005; 24: 3632-3642) y se libera de BAI1 por escisión proteolítica en un sitio de GPS consenso situado cerca de la unión con la membrana plasmática. Vstat120 contiene el motivo de reconocimiento de integrina, arginina-glicina-aspartato (RGD), y 5 repeticiones de trombospondina de tipo 1 (TSR).

El crecimiento tumoral, así como su respuesta a tratamientos dirigidos se ve influido por su ubicación y microentorno (Blouw y col., *Cancer Cell*, 2003; 4: 133-146). Vstat120 puede suprimir el crecimiento de tumores gliales en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de ratón (Kaur y col., *Oncogene*, 2005; 24: 3632-3642). Sin embargo, a pesar de su expresión principalmente específica del cerebro, todavía no se ha informado de un efecto de Vstat120 en el crecimiento de tumores intracerebrales.

Los gliomas derivados de células gliales son el tipo de tumor primario más común que se produce dentro del el sistema nervioso central. De estos, los astrocitomas anaplásicos y Glioblastoma Multiforme (GBM) son las formas más comunes y agresivas. Ante los avances en detección, cirugía, quimioterapia y radiación han mejorado el resultado de muchos tipos de cáncer, la supervivencia media tras el diagnóstico inicial con GBM sigue siendo baja, aproximadamente 50 semanas, y la supervivencia más allá de 3 años de un 2%. Esto deja el desarrollo y la identificación de nuevas terapias y nuevas dianas terapéuticas como una posible ruta para mejorar el tratamiento.

Sumario

De acuerdo con la reivindicación 1, la presente invención se refiere, en al menos una realización, a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona entre el grupo de SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 5, y variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con respecto a la SEQ ID NO.: 3 o la SEQ ID NO.: 5, mediante la cual el polipéptido se une a CD36 a través de la repetición de trombospondina de tipo 1 e inhibe la angiogénesis.

De acuerdo con la reivindicación 2, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 3.

Las realizaciones de la presente divulgación incluyen la proteína BAI1 de la familia BAI, y sus dos productos de escisión, los *nuevos* fragmentos de proteína, Vstat120 y Vstat40. La presente divulgación también describe el uso de Vstat120 y Vstat40 como una terapia antiangiogénica y antitumorígenica para gliomas así como otros tipos de cáncer y afecciones que implican angiogénesis anómala.

Un aspecto de la presente divulgación es un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS.: 3 y 4, y variantes conservativas de las mismas, y en las que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1.

En una realización de este aspecto de la divulgación, el polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3. En otra realización de este aspecto de la divulgación, el polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 4.

En otra realización de la divulgación, el polipéptido se puede aislar a partir de un cultivo celular, en el que el cultivo celular puede estar formado por células animales o humanas que comprende un ácido nucleico heterólogo que

codifica el polipéptido, y en el que el ácido nucleico heterólogo puede ser un vector de expresión que comprende una región que codifica el polipéptido unidad de forma operativa a una región reguladora de la expresión genética.

5 En diversos aspectos de la divulgación, el vector de expresión se puede seleccionar entre el grupo que consiste en: un vector plásmido, un vector viral, y un cromosoma artificial, y en el que el vector de expresión está opcionalmente incorporado en el ADN genómico de las células animales o humanas.

10 Preferentemente, el vector de expresión que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 5, o variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3 o SEQ ID NO.: 5, en el que el polipéptido consiste en un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, y con lo que el polipéptido se une a CD36 a través de la repetición de trombospondina de tipo 1 e inhibe la angiogénesis.

15 Otra realización de la divulgación proporciona procedimientos para preparar un polipéptido, que comprenden: proporcionar un primer polipéptido, en el que el primer polipéptido es BA11 que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 1, o un fragmento extracelular del mismo, en el que el fragmento extracelular tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 4 y variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 4; y poner en contacto el primer polipéptido con furina formando de ese modo un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1.

20 El primer polipéptido puede estar de acuerdo con la SEQ ID NO.: 1, y el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, y variantes conservativas de las mismas. En una realización de la divulgación, el primer polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 2, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 2, y el segundo polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3 o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3. En otra realización, el primer polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 4, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 4, y el segundo polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 5, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 5. El procedimiento puede comprender adicionalmente el aislamiento del segundo polipéptido.

30 Otro aspecto de la presente divulgación es un vector de expresión seleccionado entre el grupo que consiste en: un vector plásmido, un vector viral, y un cromosoma artificial, y en el que el vector de expresión comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS.: 3 y 4, y variantes conservativas de las mismas, y en el que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1. En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3. En otras realizaciones de la divulgación, el polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 4.

35 Además, otro aspecto de la divulgación son procedimientos para inhibir la proliferación de células endoteliales que comprenden: poner en contacto una población de células endoteliales con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la de la proteína BA11 (SEQ ID NO.: 1), en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 3 y 5, o variantes conservativas de las mismas, y en la que el producto de escisión comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, con lo que la puesta en contacto de las células endoteliales con el polipéptido inhibe la proliferación de las células endoteliales.

40 En este aspecto de la divulgación, la población de células endoteliales puede estar en un animal o ser humano, y el procedimiento puede comprender adicionalmente la administración de forma sistémica del polipéptido al animal o al ser humano. El procedimiento puede comprender adicionalmente la administración del polipéptido directamente a una población de células en el animal o en el ser humano.

45 Otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la angiogénesis que comprenden: poner en contacto una población de células endoteliales con un polipéptido, en la que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, o variantes conservativas de las mismas, y en la que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1, con lo que la puesta en contacto de las células endoteliales con el polipéptido inhibe la proliferación de las células endoteliales inhibiendo de ese modo la angiogénesis. El procedimiento puede comprender adicionalmente la administración del polipéptido a un animal o ser humano, con lo que la angiogénesis se inhibe en el animal o en el ser humano, y el polipéptido se puede administrar a un animal o ser humano como una administración en forma de bolo o sostenida.

50 En este aspecto de la invención, el polipéptido se puede administrar a un animal o ser humano mediante la administración al mismo de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un vector de ácido

nucleico que incorpora en el mismo una secuencia heteróloga de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, o variantes conservativas de las mismas; y que expresa la secuencia heteróloga de ácidos nucleicos, administrando de ese modo el polipéptido a las células endoteliales.

5 En diversos aspectos de este procedimiento de la divulgación, el vector de ácido nucleico puede ser un vector plásmido o un vector viral.

En estos aspectos de este procedimiento de la divulgación, la afección patológica puede ser un tumor, una herida, o degeneración macular relacionada con la edad.

10 Además, otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la formación de un tumor en un animal o ser humano, en los que el tumor se mantiene o se disemina mediante angiogénesis, que comprenden: poner en contacto un tumor en desarrollo en un animal o ser humano con un polipéptido derivado de la proteína BAI1 (SEQ ID NO.: 1), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, y en la que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1, con lo que el contacto del tumor con el polipéptido inhibe la angiogénesis mediante la unión al receptor CD36 en células endoteliales, inhibiendo de ese modo la formación del tumor tal como un tumor cerebral, que incluye un glioma.

En este aspecto de la divulgación, el procedimiento puede comprender adicionalmente la administración del polipéptido directamente al tumor cerebral mediante inyección en el tejido tumoral o inyección en un vaso sanguíneo que con el tumor.

20 Además, otro aspecto de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido aislado derivado de la proteína BAI1 (SEQ ID NO.: 1), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede tener una similitud de al menos un 80 % con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, o variantes conservativas de las mismas, y comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 **Breve descripción de las figuras**

Las Figs. 1A-1C ilustran que la expresión de Vstat120 aumenta la supervivencia de ratas con células de glioma U87MG implantadas en el cerebro.

La Fig. 1A ilustra análisis de transferencia de Western de lisados celulares de células precursoras U87MG, y clones derivados de U87MG transfectados de forma estable con ADNc de Vstat120 (U14 y U18).

30 La Fig. 1B es un gráfico que ilustra las tasas de proliferación *in vitro* de células U87MG, y clones U14 y U18 como se determina con el ensayo de violeta de cristal.

La Fig. 1C es un gráfico que ilustra el ensayo de tumorigenicidad intracraneal para clones que expresan U87MG y Vstat120, U14 y U18. Se implantaron 1×10^6 células de forma estereotáctica en el cerebro de ratones desnudos atímicos. Las curvas de Kaplan-Meier de ratas implantadas con células que expresan Vstat120 mostraban una mejoría significativa en su supervivencia en comparación con las células precursoras U87MG de control ($p < 0,05$).

Las Figs. 2A-2D ilustran que la expresión de Vstat120 suprime el crecimiento del tumor subcutáneo e intracraneal de células U87 Δ EGFR a pesar del estímulo proangiogénico proporcionado por EGFRvIII.

40 La Fig. 2A es un gráfico que ilustra la caracterización de los clones Δ 19 y Δ 22 que expresan U87 Δ EGFR y Vstat120. Las tasas de proliferación *in vitro* de células U87 Δ EGFR y los clones Δ 19 y Δ 22 que expresan Vstat120 se midieron usando el ensayo de violeta de cristal. La expresión de Vstat120 no alteraba las tasas de proliferación *in vitro* de estas células. El Panel de la Parte inferior muestra el análisis de transferencia de Western de lisados celulares de células U87 Δ EGFR (calle 3) y los clones Δ 19 y Δ 22 derivados (calles 1 y 2 respectivamente), que expresan Vstat120 de forma estable.

45 La Fig. 2B es un gráfico que ilustra U87 Δ EGFR y células que expresan Vstat120 de forma estable (Δ 19 y Δ 22) que se inyectaron por vía subcutánea en ratones ($n = 6$) y el volumen tumoral para los clones indicados se representó como una función del tiempo, con disminución del crecimiento tumoral de clones expresan Vstat120.

50 Los paneles de la parte superior de la Fig. 2C muestran imágenes representativas de las exploraciones de MRI de cerebros de ratas individuales. La presencia de glioma se detecta a través de las áreas brillantes de aumento de contraste a partir del agente gadolinio (flecha de color blanco). Obsérvese el tumor pequeño en células U87MG, tumor grande en células U87 Δ EGFR y tumores mínimos apenas detectables en los clones Δ 22 y Δ 19. El panel de la parte inferior muestra secciones de cerebro histopatológicas correspondientes teñidas con H&E. El crecimiento del tumor es visible como un área de color azul oscuro (flecha de color negro).

55 La Fig. 2D es un gráfico que ilustra la curva de supervivencia de Kaplan Meier de ratas implantadas con U87MG, U87 Δ EGFR y clones que expresan Vstat120, Δ 19 y Δ 22. Se implantaron 1×10^6 células de forma estereotáctica en el cerebro de ratas *nu/nu* atímicas. Las ratas implantadas con células U87 Δ EGFR tenían el tiempo de supervivencia más corto debido a la naturaleza muy angiogénica y agresiva de estos tumores. Los clones Δ 19 y Δ 22 que expresan Vstat120, mostraban una mejoría significativa en su supervivencia en comparación con U87 Δ EGFR y las células precursoras de control, U87MG ($p < 0,05$).

60 Las Figs. 3A y 3B ilustran que Vstat120 reduce la densidad vascular de tumores U87 Δ EGFR que crecen de

forma intracraneal.

La Fig. 3A muestra fotografías representativas de la inmunohistoquímica para el factor de von Willebrand en secciones de tumor derivadas de U87ΔEGFR o clon que expresa Vstat120 (Δ19). La tinción de color marrón indica capilares de revestimiento de células endoteliales (flechas).

La Fig. 3B es un gráfico que ilustra densidades de los vasos en U87-EGFR y clones que expresan Vstat120 (Δ19 y Δ22). Los tumores que expresan Vstat120 mostraban una densidad de los vasos significativamente menor que los tumores precursores. Las densidades de los vasos se expresan como Media +/- ETM. * p < 0,005

Las Figs. 4A-4D ilustran que Vstat120 inhibe la migración de células endoteliales de una manera dependiente de CD36.

La Fig. 4A ilustra la producción de Vstat120 secretado mediante transfección transitoria en células 293. Las células (confluentes en un 80 %) se dejaron sin tratar (calle 1) o se transfectar un con cualquiera de vector pcDNA3.1lacZ de control (calle 2) o vector de expresión de Vstat120, pcDNA3.1Vstat120-myc/his (Calle 3). Vstat120 producido por las células transfectadas con el vector de la expresión BAI1 de longitud completa se usó como un control del tamaño (Calle 4).

La Fig. 4B es un gráfico que ilustra un ensayo de migración Transwell. El control o Vstat120 que contiene CM se sometió a ensayo para su capacidad para inhibir la liberación de las HDMEC y HUVEC en un ensayo de migración Transwell.

La Fig. 4C ilustra que el anticuerpo del bloqueo de la función de CD36 evita la función antiangiogénica de Vstat120. Las HDMEC se dañaron, y a continuación se dejaron sin tratar o se trataron con anticuerpo del bloqueo de la función anti-CD36 a 10 μg/ml durante 30 min. A continuación, las células se trataron con CM (como se ha mencionado anteriormente) durante 30 min, seguido de tratamiento con suero al 10 % para inducir la migración celular. El ancho del daño final se midió después de 8 h y se calculó la distancia migrada. Los datos son Media +/- ETM. n = 3 para cada condición. * p < 0,05 y ** no significativo con el ensayo de T de Student.

La Fig. 4D es un gráfico que ilustra un ensayo de migración de herida raspada. Las HDMEC confluentes se dañaron, se trataron con CM y se permitió que las células migraran durante 8 hrs, a continuación se fijaron y se tiñeron con violeta de cristal. La Fig. 4D también incluye fotografías representativas de células migradas. Las barras de color negro indican el ancho del daño inicial en micrómetros. La distancia de la migración, porcentaje del cierre de heridas, y velocidad de migración se cuantificó. El experimento se repitió dos veces con resultados similares. Los datos se expresan como Media +/- ETM; n = 6 para cada condición; * p < 0,01 en comparación con Vstat120.

Las Figs. 5A-5C ilustran que Vstat120 se une al dominio CLESH de CD36 purificado.

La Fig. 5A ilustra una representación esquemática de la estructura de CD36 con el dominio CLESH. Se muestran las dos construcciones de GST-CD36 usadas (aminoácidos 5-143 y 67-157), ambas de las cuales contienen el dominio CLESH (aminoácidos 93-120).

El panel de la parte superior de la Fig. 5B ilustra un gel teñido con coomassie que muestra GST purificado, y proteínas recombinantes etiquetadas con GST que codifican los aminoácidos 67-157 y 5-143 de CD36. Las proteínas se purificaron casi hasta homogeneidad y migraron a su peso molecular predicho. El panel de la parte inferior de la Fig. 5B ilustra un análisis de transferencia de Western para cada proteína de fusión explorada con anticuerpo monoclonal anti-GST (MAB3317 Chemicon International).

La Fig. 5C ilustra un ensayo de interacción de GST. GST solo o los dos péptidos GST-CD36 recombinantes se unieron a perlas de glutatión Sepharose y CM de células de glioma LN229 que expresan Vstat120 de forma estable (calles +) o células de control (calles -) se sometieron a ensayo para interacción de proteína. Un ensayo de interacción separado con CM a partir de células que expresan TSP1 (clon C9 de LN229) se usó como un control positivo. Las proteínas unidas se eluyeron y se analizaron para expresión de Vstat120 y TSP1 mediante transferencia de Western. Tanto el CD36 etiquetado con GST que contenía péptidos recombinantes como TSP1 pudieron interactuar con Vstat120, pero no el GST purificado. Las calles del control positivo son precipitaciones de TCA de CM (recogidos sin suero después de 96 horas) que expresan cualquiera de Vstat120 o TSP1.

La Fig. 6 ilustra que Vstat120 inhibe la angiogénesis corneal de una manera dependiente de CD36. La Fig. 6A ilustra córneas de ratones a los 5 días después del implante de gránulos que contenían 25 ng de bFGF y CM de células 293 (50 ng de proteína CM total) transfectadas con Vstat120 o control de vector (Ctrl). La Fig. 6A muestra fotografías que muestran capilares etiquetados con FITC-dextrano (flecha) que evolucionan hacia el gránulo, insertado anteriormente en la córnea de ratón. La respuesta acción génica se cuantificó, como se muestra en el gráfico que se muestra en la Fig. 6B, midiendo el área neovascular en la córnea. Con respecto al control (Fig. 6A, parte superior izquierda), la CM recogida de células que expresan Vstat120 (Fig. 6A, parte superior derecha) altera la formación de capilares en un 40 %. Este efecto se invalida totalmente en ratones con supresión genética de CD36 (Fig. 6A, fotografías en la parte inferior). Cada condición se realizó en al menos 9 córneas. Los valores se expresan SE media. El análisis estadístico se realizó usando el ensayo de ANOVA, *p < 0,05. 29

Las Figs. 7A y 7B ilustran que la expresión de BAI1 se interrumpe durante la tumorigénesis. La Fig. 7A ilustra una muestra de ensayos de autopsia contiene un blastoma glial y materia blanca no neoplásica hacia adyacente teñida para BAI1 (a la izquierda), y también se muestran un aumento mayor para el cerebro adyacente (a la derecha, parte superior), y tejido neoplásico (a la derecha, parte inferior).

Las Figs. 8A y 8B ilustran que el fragmento de escisión de BAI1 de Vstat120 tiene propiedades antiangiogénicas. La Fig. 8A muestra los resultados de la migración de células endoteliales en un ensayo de cámara de Boyden. La Fig. 8B muestra proliferación de células endoteliales en un ensayo de violeta de cristal.

Las Figs. 9A-9F ilustran que la expresión de Vstat120 inhibe la angiogénesis *in vivo* en un ensayo de tapón de Matrigel. La longitud de los canales vasculares se midió después de 14 días. Las Figs. 9A y 9B muestran

secciones representativas del control teñidas con H&E o muestras que expresan Vstat120, respectivamente. La Fig. 9C muestra un aumento mayor de la región encuadrada en la Fig. 9A y la ilustración de la inmunotinción con vWF de las células endoteliales que revisten los canales vasculares (flecha). La Fig. 9D muestra que los pericitos teñidos con actina del músculo liso revisten los canales vasculares (flecha). La Fig. 9E muestra una transferencia de Western que muestra expresión de Vstat120 en clones usados en el experimento de Matrigel. C = control de vector. La actina era el control de carga. La Fig. 9F muestra una comparación de la longitud/área media superficial del canal vascular en tapones de células de control y células que expresan Vstat120.

La Fig. 10 ilustra que CD36 es necesario para la función antiangiogénica de Vstat40 y Vstat120 en células HUVEC y HDMEC tratadas previamente con medios acondicionados de células 293 transfectadas con LacZ (Control), BAI1-S927A (Vstat40), o ADNc de Vstat120 durante 30 min. Los medios que contenían suero al 10 % se usaron como un agente quimioattractor y se colocaron en la cámara de la parte inferior. Después de 8 h, las células migradas se cuantificaron.

La Fig. 11A ilustra que los fragmentos de escisión de BAI1, Vstat40 y Vstat120, inhiben la formación de cordón endotelial *in vitro*. Las células HDMEC se cultivaron en Matrigel que contenía medio acondicionado de células 293 transfectadas con LacZ (Cont), BAI1-S927A (Vstat40), o ADNc de Vstat120. El recuento de las estructuras encerradas (gráfico) se hizo después de 8 h. Se muestra la desviación estándar (n = 4). * p < 0,05 del Ensayo de T de Student.

La Fig. 11B ilustra que Vstat40 y Vstat120 conservan uniones de adherencia endotelial. Las células HDMEC se trataron con medio acondicionado de células 293 transfectadas con LacZ (Cont), BAI1-S927A (Vstat40), o ADNc de Vstat120 durante 30 min. A continuación, las células se dejaron sin tratar o se trataron con VEGF (100 ng/ml) durante 16 h. Las células se fijaron y se inmunotñieron usando un anticuerpo de cadherina anti-VE (Ab) revelado con un Ab de FITC. Observar las diferencias en el "espesor" de la tinción de cadherina VE de la membrana celular.

La Fig. 12 ilustra la secuencia de la proteína BAI1 humana, SEQ ID NO.: 1. Cinco repeticiones de trombospondina de tipo I se indican en letras mayúsculas grandes. La secuencia en negrita representa el sitio de escisión de GPS consenso usado para generar Vstat120. El sitio de escisión predicho para el Vstat120 se encuentra entre la secuencia subrayada "Is". Los datos indican que el corte N-terminal que genera Vstat40 se produce entre la "rs" subrayada.

La Fig. 13 ilustra una secuencia de proteínas de Vstat120 humana, SEQ ID NO.: 2.

Fig. 14 ilustra una secuencia de proteínas de Vstat40 humana, SEQ ID NO.: 3.

Fig. 15 ilustra una secuencia de proteínas de Vstat120 humana, que no incluye la secuencia peptídica líder, (SEQ ID NO.: 4).

Fig. 16 ilustra una secuencia de proteínas de Vstat40 humana, SEQ ID NO.: 5, que no tiene una secuencia peptídica líder.

Fig. 17A ilustra de forma esquemática la estructura del receptor BAI1 de 180 kDa.

Fig. 17B ilustra una transferencia de Western que muestra que el dominio extracelular de BAI1 se procesa principalmente en la molécula secretada, Vstat40, además de Vstat120.

Fig. 18A ilustra que algunos truncamientos en serie de ADNc N-terminal de BAI1 generan productos peptídicos de tamaño correspondiente cuando se transfectan en células de glioma LN229. El truncamiento en el aminoácido 328 genera un producto del tamaño aproximado de Vstat40 (flecha), lo que indica que el sitio de escisión está cerca al aminoácido 328. Las líneas verticales discontinuas indican el sitio de escisión de Vstat40. El fragmento 1-374 todavía está escindido y genera una pequeña cantidad de Vstat40.

La Fig. 18B ilustra la unión de etiquetas de 3 kDa (sombra de color oscuro) con respecto a construcciones que terminan entre los aminoácidos 322 y 334. Las construcciones 2, 3, y 4 aún están escindidas en Vstat40 aunque (1) no lo está, lo que indica que el sitio de escisión se produce entre los aminoácidos 322 y 330.

La Fig. 19 ilustra que los inhibidores de furina anulan el procesamiento de Vstat40. La Fig. 19A muestra la proteína BAI1 de longitud completa en el lisado celular completo de células de glioma LN229 transfectadas. La Fig. 19B muestra que el tratamiento de células de glioma LN229 transfectadas con ADNc de BAI1 con dos inhibidores de furina anula el procesamiento y la secreción del fragmento de Vstat40 en medios acondicionados.

La Fig. 20 ilustra que los inhibidores de MMP no inhiben el procesamiento de Vstat40. (A) muestra la proteína BAI1 de longitud completa en el lisado celular completo de células de glioma LN229 transfectadas. (B) muestra que el tratamiento de células de glioma LN229 transfectadas ADNc de BAI1 con inhibidores de MMP no influyen en el procesamiento y la secreción del fragmento de Vstat40 en medios acondicionados.

La Fig. 21 ilustra que algunas mutaciones puntuales en la región del sitio de procesamiento de Vstat40 identifican los aminoácidos fundamentales importantes para la escisión.

La Fig. 22 ilustra que el procesamiento de Vstat40 se anula en células de adenocarcinoma LoVo deficientes en furina. La Fig. 22A muestra la proteína BAI1 de longitud completa en el lisado celular completo de células LoVo transfectadas. La Fig. 22B muestra que el procesamiento de Vstat40 se inhibe en la línea de células de adenocarcinoma de colon humano LoVo deficientes en furina y se restablecen en células LoVo transfectadas de forma estable con ADNc de furina.

La Fig. 23 ilustra que Vstat40 inhibe la migración de células endoteliales CD36⁺ (HDMEC).

Las Figs. 24A y 24B ilustran que un anticuerpo de bloqueo CD36 inhibe los efectos de Vstat40 en la migración de células endoteliales en un ensayo de herida raspada. La Fig. 24A muestra el porcentaje de cierre de la herida, y la Fig. 24B muestra la distancia migrada.

La Fig. 25A ilustra fotomicrografías de células de cordones endoteliales cultivados en medio sin Vstat40 o Vstat120 (control), con Vstat40 o con Vstat120.

La Fig. 25B ilustra un gráfico que compara los números de estructuras encerradas observadas en el campo visual de los cultivos mostrados en la Fig. 25A.

La Fig. 25C ilustra un gráfico que compara los números de cordones observados en el campo visual de los cultivos mostrados en la Fig. 25A.

- 5 Los detalles de algunas realizaciones y aspectos a modo de ejemplo de los procedimientos y sistemas de la presente divulgación se exponen en la descripción que sigue a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la divulgación serán evidentes para un experto en la materia después del examen de la siguiente descripción, figuras, ejemplos y reivindicaciones. Se pretende que todos estos sistemas, procedimientos, características y ventajas adicionales que se incluyen dentro de la presente descripción, estén dentro del alcance de la presente divulgación, y queden protegidos con las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la divulgación

- 15 Antes de describir la presente divulgación con mayor detalle, se debe entender que la presente divulgación no se limita a realizaciones y aspectos de invención que se describen en particular, y como tal puede variar, por supuesto. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es con la finalidad de describir solamente realizaciones y aspectos de la invención en particular, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente divulgación se limitará solamente con las reivindicaciones adjuntas.

- 20 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cualquier valor que interviene, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o que intervenga en ese intervalo indicado, se incluye dentro de la divulgación. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños y también se incluyen dentro de la divulgación, sujeto a cualquier límite excluido de forma específica en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la divulgación.

- 25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Ante cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento también se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente divulgación, los procedimientos y materiales preferentes se describen a continuación.

- 30 La mención de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no se debería interpretar como una admisión de que la presente divulgación no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la divulgación anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar de forma independiente.

- 35 Como será evidente para los expertos en la materia después de la lectura de la presente divulgación, cada una de las realizaciones y aspectos individuales de la invención de escritos e ilustrados en el presente documento tiene componentes y características separados que se pueden separar fácilmente y combinar con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Cualquier procedimiento mencionado se puede realizar del orden de los sucesos mencionados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

- 40 Las realizaciones de la presente divulgación usarán, a menos que se indique de otro modo, técnicas de medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular, farmacología, y similares, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía.

- 45 Se debe indicar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un soporte" incluye una pluralidad de soportes. En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen a continuación, se hará referencia a un número de términos que se definirán para que tengan los siguientes significados al menos sea evidente una intención al contrario.

- 50 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuye a menos que se especifique de otro modo. En la presente divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares puede entender el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos y puede significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste básicamente de" o "consiste básicamente en" o similares, cuando se aplican a procedimientos y composiciones incluidas en la presente divulgación se refiere a composiciones como las que se divulgan en el presente documento, pero que pueden contener grupos estructurales, componentes de la composición o etapas de procedimiento adicionales (o análogos o derivados de los mismos como se ha discutido anteriormente). Tales grupos estructurales, composiciones de componente o etapas de procedimiento, adicionales etc., sin embargo, no influyen de forma material en la característica o características básicas y nuevas de las composiciones o procedimientos, en comparación con las de las composiciones o procedimientos correspondientes divulgados en el presente documento. "la esplénica que consiste básicamente en" o "que consiste

básicamente" o similares, cuando se aplican a procedimientos y composiciones incluidos en la presente divulgación tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos y la expresión es abierta, lo que permite la presencia de más de lo que se menciona siempre y cuando las características básicas o *nuevas* de lo que se menciona no cambien mediante la presencia de más de lo que se menciona, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

Antes de describir las diversas realizaciones y aspectos de la invención, se proporcionan las siguientes definiciones y se deberían usar a menos que se indique de otro modo.

Definiciones

Por lo general, los términos y expresiones usados en el presente documento tienen sus significados reconocidos en la técnica que significan que se pueden encontrar por referencia a textos convencionales, preferencias en revistas y contextos conocidos por los expertos en la materia. Las siguientes definiciones se proporcionan para aclarar su uso específico en el contexto de la presente divulgación.

El término "expresado" o "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido nucleico de ARN complementaria al menos en parte con una región de una de las dos hebras de ácido nucleico del gen. El término "expresado" o "expresión" como se usa en el presente documento también puede hacer referencia a la traducción de ARN para producir una proteína o péptido.

El término "fragmento" como se usa en el presente documento se refiere, por ejemplo, a una porción de aminoácidos de al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 1000, o 2000, de una secuencia de aminoácidos, porción que se escinde de una secuencia de aminoácidos de origen natural mediante escisión proteolítica con al menos un proteasa, o es una porción de la secuencia de aminoácidos de origen natural sintetizada con procedimientos químicos o usando tecnología del ADN recombinante (por ejemplo, expresada a partir de una porción de la secuencia de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de origen natural) conocidos por un experto en la materia. "Fragmento" también puede hacer referencia a una porción, por ejemplo, de aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 99 % de una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos en particular.

La expresión "región que controla la expresión genética", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos que están asociadas con una secuencia de codificación y que regulan, total o parcialmente, la expresión de la secuencia de codificación, por ejemplo, regulan, total o parcialmente, la transcripción de la secuencia de codificación. La expresión "regiones que controlan la expresión genética" puede preceder, pero no se limita a que precede, a la región de una secuencia de ácidos nucleicos que se encuentra en la región en la posición 5' del extremo de una secuencia de codificación que se puede transcribir en el ARNm.

Los términos "heterólogo", "exógeno" y "extraño" se usan indistintamente en el presente documento y por lo general se refieren a una biomolécula tal como un ácido nucleico o una proteína que no se encuentra normalmente en un determinado organismo o en una determinada célula, tejido u otro componente contenido en o producido por un organismo.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier matriz lineal o secuencial de nucleótidos y nucleósidos, por ejemplo ADNc, ADN genómico, ARNm, ARNt, ARNsi, ARNsh, ARNm, oligonucleótidos, oligonucleósidos y derivados de los mismos. Para facilitar la discusión, los ácidos nucleicos de origen no natural se pueden denominar construcciones en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden incluir vectores de plásmido bacteriano que incluyen vectores de expresión, clonación, cósmidos y de transformación tales como, vectores virales de animales tales como, pero no limitados a, adenovirus modificados, virus del herpes, virus de la gripe, virus de la polio, virus de la viruela, retrovirus tales como vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV), un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV), y un vector de lentivirus, y similares y fragmentos de los mismos. Además, el ácido nucleico puede ser un LTR de un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV), un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV), o un vector de lentivirus y fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos también pueden incluir vectores de NL tales como NLB, NLD y NLA y fragmentos de los mismos y oligonucleótido sintéticos tales como ADN o ARN sintetizados químicamente. Los ácidos nucleicos pueden incluir nucleótidos y nucleósidos modificados o derivados tales como, pero no limitados a, nucleótidos halogenados tales como, pero no solamente, 5-bromouracilo, y nucleótidos derivados tales como nucleótidos etiquetados con biotina.

Los términos "vector" y "vector de ácido nucleico", como se usan en el presente documento, se refieren a un plásmido mono o bicatenario natural o sintético o molécula de ácido nucleico viral que se pueden transfectar o transforman en células y replicar independientemente de, o dentro, del genoma de la célula hospedadora. Un vector bicatenario circular se puede linealizar por tratamiento con una enzima de restricción apropiada basada en la secuencia de nucleótidos del vector. Un ácido nucleico se puede insertar en un vector mediante el corte del vector con enzimas de restricción y ligando las piezas deseadas en conjunto.

La expresión "unido de forma operativa" se refiere a una colocación de elementos en la que los componentes descritos de este modo se configuran con el fin de realizar su función habitual. Las regiones o promotores que controlan la expresión genética (por ejemplo, componentes de promotor) unidos de forma operativa a una secuencia de codificación son capaces de realizar la expresión de la secuencia de codificación. No es necesario que las secuencias de control sean contiguas con la secuencia de codificación, siempre y cuando funcionen para dirigir la expresión de las mismas. Por lo tanto, por ejemplo, las secuencias intermedias sin traducir aunque transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia de codificación y la secuencia promotora aún se pueden considerar "unidas de forma operativa" a la secuencia de codificación.

Las expresiones "porcentaje de identidad de secuencias", y "porcentaje de identidad" como se usan, por ejemplo, en "idénticas en un %", "porcentaje de homología de secuencias", y "porcentaje de homología", cómo se usan, por ejemplo, en "% de homología" y "porcentaje de similitud de secuencias", cada una se refiere al grado de emparejamiento de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos o dos secuencias de aminoácidos como se determina usando el algoritmo de Karlin y Attschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Attschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Attschul y col. (1990) T. Mol. Biol. Q15: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la divulgación. Las búsquedas de proteínas con BLAST se realizan con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una secuencia de aminoácidos de referencia. Para obtener alineamientos con espacios para fines de comparación, se usa BLAST con Espacios como se describe en Attschul y col. (1997) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402. Cuando se usa en los programas BLAST y BLAST con Espacios, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo XBLAST y NBLAST). Otros algoritmos, programas y ajustes por efecto también pueden ser adecuados, tales como, pero no solamente, el Paquete de Análisis de Secuencias GCG del U.K. Human Genome Mapping Project Resource Centre que incluye programas para comparaciones de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos.

La expresión "vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un vector de ácido nucleico que puede incluir adicionalmente al menos una secuencia reguladora unidad de forma operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido deseado tal como una variante del polipéptido Vstat de la presente divulgación. Las secuencias reguladoras se reconocen bien en la técnica y se pueden seleccionar para asegurar una buena expresión de la secuencia de nucleótidos unidad sin experimentación excesiva por los expertos en la técnica. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias reguladoras" incluye promotores, potenciadores, y otros elementos que pueden controlar la expresión. Algunos libros de texto convencionales de biología molecular tales como Sambrook y col. eds "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª ed. Cold Spring Harbor Press (1989) y Lodish y col., eds., "Molecular Cell Biology", Freeman (2000), se pueden consultar para es de expresión, promotores, adecuados y otros elementos de control de la expresión. Sin embargo, se debería reconocer, que la elección de un vector de expresión adecuado depende de múltiples factores que influyen en la elección de la célula hospedadora transformada y/o el tipo de proteína a expresar.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las variantes de polipéptidos Vstat de la presente divulgación se pueden administrar en dosificaciones y con técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médicas o veterinarias, teniendo en cuenta factores tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del paciente en particular y la vía de administración. La vía de administración puede ser cualquier vía que administre una dosis segura y eficaz de una composición de la presente divulgación a la diana deseada tal como un tumor, un ojo y similares en los que se desea la inhibición de la angiogénesis. Las composiciones farmacéuticas o terapéuticas se pueden administrar solas, o se pueden coadministrar o administrar de forma secuencial con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración, incluyendo administración inyectable, incluyen, pero no se limitan a, una vía de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, intraarticular, intrapulmonar, intraperitoneal, a retroperitoneal, intrapleural, una vía de administración subcutánea, percutánea, transmucosal, intranasal, oral, gastrointestinal, y intraocular de tales soluciones, suspensiones o emulsiones estériles. Una vía de administración particularmente ventajosa de las composiciones de la divulgación a un tumor y similares es introducir directamente la composición en un vaso sanguíneo que conduce a la zona que se puede tratar.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulgentes, agentes de taponamiento del pH, adyuvantes, aditivos de gelificación o de potenciación de la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, colorantes, y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseadas. Algunos textos farmacéuticos convencionales, tales como as "Remington's Pharmaceutical Science," 17ª edición, 1985 se pueden consultar para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación excesiva. La dosificación y la vía de administración eficaces se determinan de acuerdo con el intervalo y la naturaleza terapéutica del compuesto, y de acuerdo con factores conocidos, tales como la edad, peso, y condición del hospedador, así como la DL₅₀ y otros procedimientos de identificación sistemática que son conocidos y no requieren experimentación extensiva. Las dosificaciones pueden variar generalmente de unos pocos cientos de microgramos a unos pocos gramos administrados en forma de un bolo o durante un periodo de tiempo sostenido según lo determine la afección médica y la necesidad de un sujeto animal o humano. El término "sostenido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier periodo de

tiempo prolongado que varía de varios minutos a años.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o combinación de compuestos que aunque son biológicamente activos no perjudicarán a la fisiología del receptor humano o animal hasta el punto en el que la viabilidad del receptor se vea comprometida. Preferentemente, el compuesto o combinación de compuestos administrados provocaran, como máximo, un efecto perjudicial temporal en la salud del receptor humano o animal que se reduce.

La expresión "por vía intravascular", como se usa en el presente documento, se refiere a una vía de administración de un fluido, tal como una composición farmacéuticamente aceptable, a un vaso sanguíneo.

El término "dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un polipéptido Vstat de la presente divulgación administrada a un animal o ser humano. Algunas unidades de dosificación adecuadas para uso en los procedimientos de la presente divulgación varían de mg/kg de peso corporal del sujeto receptor a mg/kg. El agente terapéutico se puede administrar al receptor en forma de un bolo o mediante una administración sostenida (continua o intermitente). La administración de una dosificación se puede sostener durante un periodo de tiempo, que puede ser del orden de unos pocos minutos a varios días, semanas o meses, o se puede administrar de forma crónica durante un periodo de años.

En este sentido, durante el periodo de administración, cada paciente individual debería ser examinado para observar cómo está reaccionando al tratamiento de la presente divulgación. Por ejemplo, el paciente debería ser examinado para las posibles reacciones adversas indicadas anteriormente. El tejido enfermo, por ejemplo, tumor, se debería examinar, por ejemplo, mediante biopsia o microscopia de rayos X en tejido blando, para observar si el periodo de administración y/o la dosis se deberían modificar.

A la vista de lo mencionado anteriormente, el periodo de administración puede ser, pero no se limita a, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a 6 meses, de aproximadamente 1 semana a 3 meses, de aproximadamente 2 semanas a 1 mes, y de aproximadamente 2 a 3 semanas. Si el periodo de administración es demasiado largo, el periodo de recuperación entre periodos de administración aumenta y son más probables los impactos adversos en la salud del paciente. Si el periodo de administración es demasiado corto, el tejido enfermo, por ejemplo, tumor, puede no reducirse.

La expresión "que se administra directamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de la preparación farmacéutica en una masa de células diana o población de células dentro de una ubicación definida dentro de un sujeto humano o animal, con lo que la preparación no se administra mediante administración en el sistema circulatorio para su distribución por todo el organismo en lugar de de forma específica o principalmente al tejido diana. Se espera que la administración pueda ser por inyección cerca del tejido dañado, por ejemplo, masa tumoral, para minimizar los efectos secundarios, aunque se espera que otra vía ventajosa sea la vía intravascular, y de la forma más ventajosa en un vaso que conduce al área a tratar. El modo de administración también puede ser transdérmico, intramuscular, tópico, subcutáneo, intracavidad, peristáltico. Con respecto a la inyección cerca del tejido dañado, por ejemplo, masa tumoral, se espera que se puedan implantar microbombas en o cerca del tejido dañado, por ejemplo masa tumoral, para administrar la dosis de una manera similar a las bombas de insulina.

Las composiciones de la presente divulgación pueden comprender una composición farmacéutica que comprende un polipéptido(s) de la presente divulgación y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de las mismas, dado que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usa indistintamente y representan que los materiales son capaces de administración a o en un mamífero sin la producción de los efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareo, malestar gástrico y similares.

La preparación de una composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersos en la misma se entiende bien en la técnica y no es necesario que se limite basándose en la formulación. Por lo general, tales composiciones se preparan como inyectables ya sea como soluciones líquidas o suspensiones, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también puede ser en emulsión.

El principio activo se puede mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para uso en los procedimientos terapéuticos que se describen en el presente documento. Algunos excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulgentes, agentes de taponamiento del pH y similares que aumentan la eficacia del principio activo.

En la técnica se conocen bien algunos vehículos fisiológicamente tolerables. Algunos vehículos líquidos a modo de ejemplo son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato sódico a valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina campanada con fosfato. Además adicionalmente, algunos vehículos a cursos pueden contener más

de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con la exclusión de agua. Algunos ejemplos de fases líquidas adicionales de este tipo son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, y emulsiones de agua en aceite.

- 5 Una composición terapéutica contiene una cantidad que inhibe la angiogénesis de un compuesto activo de la presente divulgación, formulada por lo general para que contenga una cantidad que al menos aproximadamente un 0,1 por ciento en peso de compuesto activo de la presente divulgación por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje de peso es una proporción en peso de compuesto activo con respecto a la composición total. Por lo tanto, por ejemplo, aproximadamente un 0,1 por ciento en peso es aproximadamente 0,1 gramos de compuesto activo por 100 gramos de composición total.

- 10 Aunque no se desea quedar ligado por la teoría, se espera que la dosificación depende de factores tales como periodo de administración, estado del tejido enfermo, por ejemplo, tumor, factores endógenos, tejido enfermo, por ejemplo, tumor, comportamiento, y fisiología individual del paciente. Para periodos de administración más cortos, por lo general se usan estaciones más elevadas. Para tejido enfermo en estadio más tardío, por ejemplo, tumores, la dosificación debería ser por lo general más elevada. Por lo general, si el tumor ha producido metástasis, la dosificación debería ser por lo general más elevada. Por lo general, las dosificaciones serán más elevadas para tejido enfermo más resistente y/o agresivo, por ejemplo, tumores. La dosificación también se debería ver influida por la fisiología individual del paciente. Por ejemplo, si el individuo está sano, la dosificación puede ser más elevada. Además, si el individuo torera la composición de la presente divulgación, la dosificación debería ser por lo general más elevada.
- 15 Por el contrario, si un individuo tiene reacciones adversas, el procedimiento de tratamiento de la presente divulgación puede no ser apropiado o la dosificación se debería reducir por lo general.

- 20 En este sentido, durante el periodo de administración inicial, por lo general la dosificación debería ser baja y después se debería aumentar gradualmente dependiendo de cómo reacciona el paciente al tratamiento de la presente divulgación. Por ejemplo, durante la primera semana de administración, la dosificación por lo general debería ser pequeña. Después de la primera semana, si no hay reacciones adversas, la dosificación se puede aumentar durante la segunda semana. Después de la segunda semana, si todavía no hay reacciones adversas, la dosificación se puede aumentar incluso más durante la tercera semana.

- 25 A la vista de lo mencionado anteriormente, y en vista de los datos mostrados en los ejemplos de la presente solicitud, después del periodo de administración inicial, se debería permitir que el paciente se recuperara, tiempo durante el que no se administra la composición de la presente divulgación. Se espera que el periodo de recuperación entre periodos de administración dependa de factores tales como la salud del paciente. Si por lo general el paciente está sano, el periodo de recuperación entre periodos de administración puede ser menor.

- 30 Los compuestos de la presente divulgación también se pueden administrar en combinación con otros inhibidores de la angiogénesis. Por ejemplo, si los compuestos de la presente divulgación y los otros inhibidores de la angiogénesis tienen diferentes dianas, se espera que el efecto sea al menos aditivo y se esperaría que los efectos secundarios disminuyeran. En particular, las diferentes dianas pueden ser diferentes mecanismos y/o diferentes células. En este sentido, los compuestos de la presente divulgación se pueden dirigir tanto tejido enfermo, por ejemplo, células tumorales y células endoteliales capilares. Por consiguiente, se espera que los compuestos de la presente divulgación se puedan usar con composiciones que se dirigen a células endoteliales o células de tejido enfermo.

- 35 El término "polipéptidos" incluye proteínas y fragmentos de las mismas. En el presente documento se divulgan polipéptidos como secuencias de restos de aminoácidos. Esa secuencia se escribe de izquierda a derecha en la dirección del extremo amino al carboxi terminal. De acuerdo con la nomenclatura convencional, las secuencias de restos de aminoácidos se denominan con cualquiera de un código de tres letras o un código de una sola letra como se indica a continuación: Alanina (Ala, A), Arginina (Arg, R), Asparagina (Asn, N), Ácido Aspártico (Asp, D), Cisteína (Cys, C), Glutamina (Gln, Q), Ácido Glutámico (Glu, E), Glicina (Gly, G), Histidina (His, H), Isoleucina (Ile, I), Leucina (Leu, L), Lisina (Lys, K), Metionina (Met, M), Fenilalanina (Phe, F), Prolina (Pro, P), Serina (Ser, S), Treonina (Thr, T), Triptófano (Trp, W), Tirosina (Tyr, Y), y Valina (Val, V).

- 40 "Variante" se refiere a un polipéptido o polinucleótido que se diferencia de un polipéptido o polinucleótido de referencia, pero que mantiene las propiedades esenciales. Una variante habitual de un polipéptido que se diferencia de otro en la secuencia de aminoácidos, polipéptido de referencia. Por lo general, las diferencias se limitan de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante estén muy relacionadas en general y, en muchas regiones, sean idénticas. Un polipéptido variante y de referencia se puede diferenciar en la secuencia de aminoácidos mediante una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, adiciones, y/o supresiones). Una variante de un polipéptido incluye variantes modificadas de forma conservativas. Un resto de aminoácido sustituido o insertado puede ser o no un codificado por el código genético. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe si se produce de forma natural.
- 45
- 50
- 55

En la estructura de los polipéptidos de la presente divulgación se pueden realizar modificaciones y cambios y todavía obtener una molécula con características similares a las del polipéptido similar (por ejemplo, una sustitución

conservativa del aminoácido). Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir con otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida de actividad apreciable. Dado que es la capacidad de interacción y la naturaleza de polipéptido lo que define la actividad funcional biológica de ese polipéptido, ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos se pueden realizar en una secuencia de polipéptidos sin embargo obtener un polipéptido con propiedades similares.

La expresión "sustituciones conservativas", como se usa en el presente documento, se refiere a modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos para aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares quieran como resultado cambio o pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido. Estas "sustituciones conservativas" probablemente van a tener un impacto mínimo en la actividad de la proteína resultante. Algunos aminoácidos que se pueden sustituir por un aminoácido original en una proteína, y que por lo general se contemplan como sustituciones conservativas son (resto original: sustitución conservativas): Ala: ser; Arg: lys; Asn: gin, his; Asp: glu; Cys: ser; Gin: asn; Glu: asp; Gly: pro; His: asn, gin; Ile: leu, val; Leu: ile, val; Lys: arg, gin; Met: leu, ile; Phe: met, leu, tyr; Ser: thr; Thr: ser; Trp: tyr; Tyr: trp, phe; Val: ile, leu. Uno o más cambios conservativos, o hasta diez cambios conservativos, se pueden realizar en un polipéptido sin cambiar una función bioquímica del polipéptido. Por ejemplo, uno o más cambios conservativos se pueden realizar en un polipéptido Vstat40 o Vstat120 sin cambiar su capacidad para unirse a CD36.

En la realización de tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para transmitir una función biológica interactiva en polipéptido por lo general se entiende en la técnica. Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tengan un índice hidropático o puntuación similar y todavía pueden dar como resultado un polipéptido con una actividad biológica similar. Cada aminoácido se ha asignado a un índice hidropático sobre la base de su hidrofobia y características de carga. Estos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se cree que el carácter hidropático del aminoácido determina la estructura secundaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos, y similares. En la técnica se sabe que un aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido que tenga un índice hidropático similar y todavía obtener un polipéptido de funcionalidad equivalente. En tales cambios, es preferente la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , son particularmente preferentes aquellos que están dentro de ± 1 , y son incluso más particularmente preferentes aquellos que están dentro de $\pm 0,5$.

La sustitución de aminoácidos similares donde se puede realizar basándose en su hidrofobia, en particular, cuando el polipéptido o péptido equivalente funcional biológico creado de este modo se pretende para uso en realizaciones inmunológico. Los siguientes valores hidrofobia se han asignado a restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 6 1); glutamato (+3,0 6 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5 6 1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se cree que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y todavía obtener un equivalente biológico, y en particular, un polipéptido inmunológicamente equivalente. En tales cambios, es preferente la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia estén dentro de ± 2 , son particularmente preferentes aquellos dentro de ± 1 , y son incluso más particularmente precedentes aquellos dentro de $\pm 0,5$.

Como se ha resaltado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos por lo general se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño, y similares. Algunas sustituciones a modo de ejemplo que tienen en cuenta diversas de las características mencionadas anteriormente se conocen bien por los expertos en la materia que incluyen (resto original: solución a modo de ejemplo): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gin, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gin: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gin), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Tyr: Trp, Phe), y (Val: Ile, Leu). Por lo tanto, las realizaciones de la presente divulgación contemplan equivalentes funcionales o biológicos de un polipéptido como se ha expuesto anteriormente. En particular, las realizaciones de los polipéptidos pueden incluir variantes que tengan aproximadamente una identidad de secuencia de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, y 95 % con respecto a polipéptido de interés.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos, como se determina por comparación de las secuencias. La técnica, "identidad" también significa el grado de relación de las secuencias entre polipéptidos como se determina de acuerdo con el emparejamiento entre hebras de tales secuencias. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente con procedimientos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, los que se describen en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., Ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., Ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., Eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J

Applied Math., 48: 1073 (1988).

Algunos procedimientos preferentes para determinar la identidad se diseñan para dar el mayor emparejamiento entre la secuencia sometidas a ensayo. Algunos procedimientos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando software y análisis (por ejemplo, el Paquete de Software de Análisis de Secuencias de Genetics Computer Group, Madison Wis.) que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol., 48: 443-453, 1970) (por ejemplo, NBLAST, y XBLAST). Los parámetros por defecto se usan para determinar la identidad de los polipéptidos de la presente divulgación.

A modo de ejemplo, una secuencia de polipéptidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia, es decir, idéntica en un 100 %, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de modo que el % de identidad es inferior a un 100 %. Las alteraciones de este tipo se seleccionan entre: al menos una supresión, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción, de aminoácidos y la que dichas alteraciones se puede producir en las posiciones amino- o carboxi-terminal de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas de forma individual entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones del aminoácido para un % de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos en el polipéptido de referencia por el porcentaje numérico que el respectivo porcentaje de identidad (dividido entre 100) y a continuación restando ser producto de dicho número total de aminoácidos en el polipéptido de referencia.

Las variantes de aminoácido conservativas también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Algunos aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglucina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido piperico, ácido tiazolidin carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, terc-leucina, norvalina, 2-azafenil-alanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios procedimientos para incorporar restos de aminoácidos de origen no natural en proteínas. Por ejemplo, se puede usar un sistema *in vitro* en el que las mutaciones sin sentido se suprimen usando los ARNt supresores químicamente aminoacilados. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar aminoácidos y para aminoacilar ARNt. La transcripción y la traducción de plásmido que contienen mutaciones sin sentido se realizan en un sistema sin células que comprende un extracto S30 de *E. coli* y enzimas y otros reactivos disponibles en el mercado. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. (Robertson, y col., J. Am. Chem. Soc., 113: 2722, 1991; Ellman, y col., Methods Enzymol., 202: 301, 1991; Chung, y col., Science, 259: 806-9, 1993; y Chung, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 90: 10145-9, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se realiza en oocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y los ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti, y col., J. Biol. Chem., 271: 19991-8, 1996). Dentro de un tercer procedimiento, las células de *E. Coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural amino que se va a sustituir (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido(s) de origen no natural deseado (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. (Koide, y col., Biochem., 33: 7470-6, 1994). Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida al sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn, y col., Protein Sci., 2: 395-403, 1993).

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos homólogos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero de forma ventajosa es ADN bicatenario. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que se separa de las otras moléculas de ácido nucleico están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Un "nucleósido" se refiere a una base unida a un azúcar. La base puede ser adenina (A), guanina (G) (o su sustituto, inosina (I)), citosina (C), o timina (T) (o su sustituto, uracilo (U)). El azúcar puede ser ribosa (el azúcar de un nucleótido natural en el ARN) o 2-desoxirribosa (el azúcar de un nucleótido natural en el ADN). Un "nucleótido" se refiere a un nucleósido unido a un solo grupo fosfato.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una serie de restos de nucleótidos unidos, oligonucleótido que tiene un número suficiente de bases de nucleótidos a usar en una reacción de PCR. Una secuencia corta de oligonucleótidos se puede basar en, o diseñar a partir de, una secuencia genómica o de ADNc y se usa para amplificar, confirmar, o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula o tejido en particular. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar de forma química y se pueden usar como cebadores o sondas. Oligonucleótido significa cualquier nucleótido con una longitud de más de 3 bases usado para facilitar la detección de la identificación de un ácido nucleico diana, incluyendo sondas y cebadores.

El término "angiogénesis" como se usa en el presente documento es el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. Se usa para hacer referencia al crecimiento tanto en condiciones fisiológicas normales como en las que se producen en patologías tales como, pero no limitadas a, crecimiento tumoral.

Al término "cáncer", como se usa en el presente documento se le dará su significado habitual y un término general para enfermedades en las que las células se dividen sin control. Las células cancerígenas pueden invadir tejidos cercanos y se pueden propagar a través el torrente sanguíneo y sistema linfático a otras partes del organismo. Un "tumor" se refiere a tumores sólidos con un tamaño superior a 1-2 mm que resultan del crecimiento anómalo del tejido, y que implican la formación de nuevos vasos en.

Cuando las células normales pierden su capacidad para comportarse como una unidad coordinada, especificada y controlada, se forma un tumor. Por lo general, un tumor sólido es una masa anómala de tejido que normalmente no contiene quistes ni áreas líquidas (algunos tumores cerebrales tienen quistes y áreas necróticas centrales llenas de líquido). Un solo tumor puede tener incluso diferentes poblaciones de células dentro del mismo con diferentes procesos que se han desviado. Algunos tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerígenos), o malignos (cancerígenos). Diferentes tipos de tumores sólidos se denominan de acuerdo con el tipo de células que los forman. Algunos ejemplos de tumores sólidos son sarcomas, carcinomas, y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) por lo general no forman tumores sólidos.

Hay varios tipos principales de cáncer, por ejemplo, el carcinoma es un cáncer que comienza en la piel o en tejidos que reviste no cubren los órganos internos (epitelio). El sarcoma es un cáncer que comienza en el hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otro tejido conector o de soporte. La leucemia es un cáncer que comienza en el tejido que forma la sangre tal como la médula ósea, y produce grandes índices de células sanguíneas anómalas a producir y entrar en el torrente sanguíneo. El linfoma es un cáncer que comienzan las células del sistema inmune. Algunos cánceres representativos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de útero, cancer cervical. Esto incluye los gliomas descritos en los mismos así como tipos derivados de otros tejidos, tal como, pero no limitados a carcinomas, linfomas, leucemias y sarcomas.

La expresión "factor de crecimiento que estimula de la angiogénesis" se refiere a los compuestos capaces de estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos ya sea *in vitro*, *in vivo*, o ambos. En el presente documento estos factores también se denominan "proangiogénicos".

La expresión "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a los compuestos capaces de inhibir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos ya sea *in vitro*, *in vivo*, o ambos. En el presente documento estos factores también se denominan "antiangiogénicos".

El término "metástasis" se refiere a la capacidad de las células cancerígenas de separarse de un tumor primario, penetra en los vasos linfáticos o sanguíneos, circulan a través del torrente sanguíneo, y crecer en un foco distante en tejidos u órganos normales en cualquier parte en el organismo.

El término "homólogo" se refiere a proteínas o péptidos estructuralmente similares a BAI1 o los fragmentos de proteína similares a Vstat120 o Vstat40 que resultan de proteínas o péptidos similares a BAI1.

Angiogénesis

La angiogénesis es la formación y crecimiento de los vasos sanguíneos a partir de vasos existentes previamente y es un proceso natural importante que se produce en el organismo, tanto en estados sanos como patológicos. La angiogénesis se produce en el organismo sano durante la curación de heridas, restablecimiento del flujo sanguíneo a tejidos después de lesión o daño. También se produce normalmente en hembras, durante el ciclo reproductor mensual que sirve para reconstruir el revestimiento uterino así como durante el embarazo, para construir la placenta, para la circulación entre madre y feto.

En el individuo sano, el organismo controla la angiogénesis a través de una serie de "encendidos" y "apagados", conocidos como factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis (proangiogénico) que incluyen, Angiogenina, Angiopoyetina-1, Del-1, Factores de crecimiento de fibroblastos: ácidos (aFGF) y básicos (bFGF), Follistatina, Factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) /factor de dispersión (SF), Interleuquina-8 (IL-8), Leptina, Midkina, Factor de crecimiento placentario, Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), Factor de crecimiento BB derivado de plaquetas (PDGF-BB), Pleiotrofina (PTN), Progranulina, Proliferina, Factor alfa de crecimiento transformante (TGF-alfa), Factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), Factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/factor de permeabilidad vascular (VPF). Algunos inhibidores de la angiogénesis habituales incluyen Angioarrestina, Angiostatina (fragmento de plasminógeno), Antitrombina III antiangiogénica, BAI1, BAI2, BAI3, Inhibidor derivado de cartílago (CDI), factor de complemento CD59, Endostatina (fragmento XVIII de colágeno), Fragmento de fibronectina, Gro-beta, Heparinasas, Fragmento hexasacárido de heparina, Gonadotropina coriónica humana (hCG), Interferón alfa/beta/gamma, Proteína inducible por interferón (IP-10), Interleuquina-12, Kringle 5 (fragmento de plasminógeno), Inhibidores de metaloproteinasas (TIMP), 2-Metoxiestradiol, Inhibidor de ribonucleasa placentaria, Inhibidor de activador del plasminógeno, Factor 4 de plaquetas (PF4), Fragmento de prolactina de 16kD, Proteína relacionada con la proliferina (PRP), Retinoides, Tetrahidrocortisol-S, Trombospondina-1 (TSP-1), Factor beta de crecimiento transformante (TGF-b), Vasculostatina, Vasostatina (fragmento de calreticulina).

Cuando los factores de crecimiento angiogénicos se producen en exceso, el equilibrio de estos se inclina a favor del crecimiento de vasos sanguíneos, aunque cuando los inhibidores están presentes en exceso de estimuladores, la angiogénesis se detiene. En el organismo sano, normal, se mantiene un equilibrio perfecto de moduladores de la angiogénesis.

- 5 En muchas patologías, el organismo pierde el control con respecto a la angiogénesis. Algunas enfermedades dependientes del angiogénesis aparecen cuando los nuevos vasos sanguíneos crecen de forma excesiva o insuficiente. Algunas enfermedades que implican un crecimiento excesivo de los vasos sanguíneos incluyen pero no se limitan a, cánceres, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad inflamatoria crónica, artritis reumatoide, y psoriasis todas se producen cuando las células enfermas producen cantidades anómalas de factores proangiogénicos, que superan los efectos de los inhibidores naturales del angiogénesis. En estas condiciones, los nuevos vasos sanguíneos alimentan a los tejidos enfermos, destruyen los tejidos normales, y en el caso de cáncer, los nuevos vasos permiten que las células tumorales escapen en la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis tumoral). Una angiogénesis insuficiente desempeña un papel en afecciones tales como enfermedad arterial coronaria, apoplejía, y curación de heridas retardada, y resulta de la incapacidad de los tejidos para producir cantidades adecuadas de factores proangiogénicos. En estas condiciones, el crecimiento de los vasos sanguíneos es inadecuado, y la circulación no se restablece de forma adecuada, aumentando el riesgo de muerte tisular. El descubrimiento de nuevos factores pro- y antiangiogénicos así como el desarrollo de vías para regular factores pro- y antiangiogénicos endógenos proporciona una *nueva* vía para el tratamiento de tales afecciones.

Proteínas y Fragmentos Inhibidores de la Angiogénesis Cerebral

- 20 Las realizaciones de la presente divulgación incluyen la familia de proteínas BAI, y en particular la proteína BAI1, y sus dos productos de escisión, los fragmentos Vstat120 y Vstat40 de proteína. Algunas realizaciones y aspectos de la presente divulgación también describen el uso de estos polipéptidos como terapia antiangiogénica y antitumorígenica para gliomas, otros tipos de cáncer y afecciones que implican angiogénesis anómala, tales como, pero no limitados a, degeneración macular relacionada con la edad.

- 25 La proteína BAI1 y fragmentos extracelulares de la misma divulgados en el presente documento, incluyendo el Inhibidor 1 de la Angiogénesis Cerebral (BAI1) (SEQ ID NO.: 1), y los fragmentos Vstat120 (SEQ ID NOS.: 2 y 4) y Vstat40 (SEQ ID NOS.: 3 y 5) tienen propiedades antiangiogénicas. Las proteínas y fragmentos divulgados son parte de la familia BAI de proteínas. La primera de estas proteínas divulgadas, BAI1, es una proteína de la membrana celular de 170 kDa y el gen que la codifica está situado en el cromosoma 8q24. BAI1 tiene una estructura similar a la de un receptor acoplado a la proteína G de 7 dominios transmembrana de la clase B. Su supuesto ligando(s) se desconoce en la actualidad. Tiene un dominio intracelular de 387 aminoácidos (de aproximadamente 45 kDa) y un dominio extracelular inusualmente grandes (120 kDa) que contiene varios dominios o motivos que se pueden definir, como se ilustra de forma esquemática en la Fig. 17A. Estos motivos incluyen un motivo de unión a integrina, Arg-Gly-Asp (RGD), cinco repeticiones de trombospondina de tipo 1 (TSR), y un supuesto sitio de escisión encontrado en receptores acoplados a la proteína G (sitio GPS). Se sabe menos con respecto a los homólogos homólogos BAI2 y BAI3 de BAI1, aunque se sabe que tienen una estructura generalmente similar, tienen 7 dominios transmembrana, también contienen regiones TSR (solamente cuatro) pero no tienen un motivo de unión a integrina RGD.

- 40 TSP1 contiene tres repeticiones de tipo I. El motivo de repetición de tipo I es más eficaz que toda la proteína para inhibir la angiogénesis y contiene dos regiones de actividad. El extremo amino-terminal contiene un motivo rico en triptófano que bloquea la angiogénesis dirigida por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2 o bFGF). La segunda región de actividad, la región de unión a CD36 de TSP1, se puede encontrar en la mitad carboxi-terminal de las repeticiones de tipo I. También se ha mostrado que las repeticiones de tipo I se unen a heparina, fibronectina, TGF- β , y otros, antagonizando potencialmente los efectos de estas moléculas en células endoteliales. Se ha mostrado que las repeticiones de tipo I solubles disminuyen los índices de EC mediante la inhibición de la proliferación y estimulando la apoptosis.

- 50 El dominio extracelular de BAI1 se puede escindir en un sitio proteolítico receptor acoplado a la proteína G (GPS) de BAI1, liberando todo el fragmento soluble de 120 kDa denominado Vasculostatina-120 (Vstat120). El péptido Vstat120 contiene tanto el sitio de RGD además de los cinco TSR e inhibe la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. La presencia de un dominio de unión a RGD permite interacciones con integrinas de la superficie celular implicadas en la migración celular y en la señalización del factor de crecimiento intracelular, aunque múltiples dominios de TSR sugieren propiedades anti-angiogénicas basadas en la función de TSR en la proteína trombospondina-1 y el análisis de péptidos sintéticos con secuencia derivada de BAI1. Además, la expresión de Vstat120 se ve fuertemente reducida durante el crecimiento tumoral en varios modelos de glioma humano maligno agresivo.

- 55 Un segundo sitio de escisión situado entre el primer y el segundo TSR en el dominio extracelular de BAI1 da como resultado el fragmento de proteína, Vasculostatina-40 (Vstat40). El tamaño del fragmento Vstat40 es de aproximadamente 40 kDa basándose en marcadores de tamaño en experimentos de transferencia de Western, como se ilustra en las Figs. 17A y 17B. El fragmento Vstat40 retiene el motivo de RGD distal a uno de las TSR. La presencia de una TSR y un motivo de RGD en Vstat40 confieren a Vstat40 propiedades anti-angiogénicas.

La presente divulgación se refiere a que Vstat40 tiene una actividad inhibitoria en ensayos *in vitro* para angiogénesis, proliferación celular y migración celular. Alguna evidencia sugiere que los dos sucesos de escisión que proporcionan Vstat40 y Vstat120 pueden ser mutuamente exclusivos: una vez que se ha generado un fragmento, el otro fragmento ya no se puede generar. Además, parece que el suceso de escisión que conduce a Vstat40 se produce más rápidamente, de modo que Vstat40 se produce de forma más abundante que Vstat120.

La secuencia de aminoácidos de BAI1 (SEQ ID NO.: 1), que incluye la secuencia líder del mismo, se presenta en la Fig. 12. Las secuencias de Vstat120 (SEQ ID NO.: 2) y Vstat40 (SEQ ID NO.: 3), que incluyen secuencias líder de los mismos se muestran en las Figs. 13 y 14 respectivamente. Las secuencias de Vstat120 (SEQ ID NO.: 4) y Vstat40 (SEQ ID NO.: 5), que no incluyen secuencias líder de los mismos se muestran en las Figs. 15 y 16 respectivamente.

Procedimientos de Producción

Las realizaciones de la presente divulgación proporcionan procedimientos de producción de la proteína BAI1 antiangiogénica, y los péptidos Vstat120 y Vstat40. En un procedimiento, por ejemplo, Vstat120 se puede sintetizar a través de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). En la SPPS, pequeñas perlas se tratan con conectores en los que se pueden construir cadena específicas tales como Vstat120 o Vstat40. Una vez que todo el tejido se ensambla, este se escinde de la perla, se filtra y a continuación se purifica. Otro procedimiento adecuado para producir cualquiera de Vstat120 o Vstat40 es mediante expresión procariota o eucariota del fragmento de proteína, seguido de purificación del producto proteico. El fragmento genético que codifica Vstat120 o Vstat40 y un promotor inducible unido de forma operativa al mismo se puede clonar en un plásmido de vector de expresión y a continuación se puede transformar en una célula hospedadora bacteriana o eucariota a la expresión en el mismo. La proteína o fragmento resultante producen células que a continuación se pueden recoger y purificar con procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. El vector de expresión también se puede introducir en células eucariotas y expresar en las mismas para producir la proteína deseada secretadas en los medios de cultivo, a partir de las que se puede aislar.

Procedimientos de Uso

Los aspectos de la presente divulgación incluyen procedimientos para interferir, inhibir o interrumpir la angiogénesis mediante el uso de la proteína BAI1, sus fragmentos o sus homólogos. Tal inhibición se puede realizar mediante la administración de Vstat120/40 o mediante la regulación de la proteína BAI1.

Un procedimiento para el tratamiento con la prevención de la angiogénesis anómala puede ser mediante la administración a un hospedador, por ejemplo un mamífero, con necesidad de un tratamiento de este tipo, de una composición farmacéutica que comprende los compuestos antiangiogénicos Vstat120, Vstat40, los homólogos de estos dos compuestos que resultan de las proteínas BAI2 o BAI3, o a combinaciones de los mismos.

Los procedimientos de la divulgación incluyen adicionalmente el tratamiento o la prevención de cáncer o un tumor en un hospedador con necesidad de un tratamiento de este tipo mediante la administración al hospedador de los compuestos Vstat120, Vstat40, o los homólogos de estos dos compuestos que resultan de las proteínas BAI2 o BAI3 o una combinación de los mismos. Se contempla que la administración se podría realizar mediante un número de procedimientos de administración de proteínas que incluyen, pero no se limitan a, inyección iv directa o a través de cápsulas o nanopartículas de liberación con el tiempo.

Otro procedimiento de la divulgación contemplado es para tratar o prevenir angiogénesis anómala mediante la modulación de la expresión de Vstat120, Vstat40 endógenos, o sus homólogos, en una célula mediante la regulación de la escisión de estos fragmentos a partir de sus proteínas precursoras. Vstat40 se escinde de BAI1 mediante una furina proteasa aunque la enzima que escinde BAI1 en el sitio de GPS para generar Vstat120 se desconoce en la actualidad. El aumento de la liberación de estos fragmentos de proteína de BAI1 con estas proteasas mediante la administración de un compuesto o composición presenta una vía de administración.

Además, otro procedimiento útil proporciona una vía de administración de los compuestos antiangiogénicos Vstat120, Vstat40, o los homólogos de estos dos compuestos que resultan de BAI2 o BAI3 mediante terapia genética o viroterapia. La secuencia genética que codifica Vstat120 o Vstat40 o sus homólogos se puede insertar en el genoma usando un vector viral para sustituir un gen que causa enfermedad, "anómalo", o para aumentar o restaurar la expresión de los fragmentos de proteína. Algunos virus posibles que se podrían usar como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, o virus del herpes simple. El ADN que codifica estos compuestos también se podría administrar de forma no viral a través de introducción directa de ADN terapéutico en células diana, o mediante un liposoma o nanopartícula artificial portador de la secuencia genética. El vector se puede usar para proporcionar la secuencia genética a células diana que incluyen, pero no se limitan a, glía en un paciente. A continuación, el gen se incorpora en el genoma de las células diana y un producto proteico funcional, en este caso, el péptido Vstat codificado, es generado por la célula.

La vasculostatina inhibe el crecimiento de glioma intracraneal y regula de forma negativa al angiogénesis *in vivo* a través de un mecanismo dependiente de CD36

El fragmento de Vstat120 de 120 kDa escindido y secretado de BAI1, funciona como un factor antiangiogénico paracrino autónomo (Kaur y col., *Oncogene*, 2005; 24: 3632-3642,). Sin embargo, la expresión de Vstat120 también puede prolongar la vida de las ratas que portan gliomas intracraneales. Este efecto supresor tumoral de Vstat120 en el cerebro se mantuvo incluso cuando las células de glioma se modificaron por ingeniería para sobreexpresar EGFRvIII, un EGFR mutante oncogénico dando como resultado tumores invasivos y agresivos altamente angiogénicos (Nishikawa y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 7727-7731,). Estos resultados resaltan la significancia potencial del uso de Vstat120 como un agente terapéutico para el tratamiento de la forma más maligna de glioma en seres humanos.

El mecanismo del efecto angiostático de Vstat120 se entiende muy poco (Kaur y col., *Oncogene*, 2005; 24: 3632-3642, Koh y col., *Exp. Cell Res.*, 2004; 294: 172-184). El dominio extracelular de BAI1 incluye cinco TSR, y un motivo de RGD de unión a integrina (Nishimori y col., *Oncogene*, 1997; 15: 2145-2150). Las TSR se descubrieron originalmente en TSP-1, un potente inhibidor de la angiogénesis de origen natural. Las TSR tienen una longitud de aproximadamente 60 aminoácidos y se han identificado más de 180 TSR diferentes en más de 70 proteínas que contienen TSR dentro del genoma humano (de Fraipont y col., *Trends Mol Med*, 2001; 7: 401-407). Las últimas incluyen proteínas de diversas funciones tales como la familia de metaloproteasas, ADAMTS, factores de complemento C6, C7, C8, y C9, las F-, R- y M-Espondinas, Semaforinas, Unc5, Heparina que se une a molécula asociada al crecimiento (HB-GAM), y BAI-1, -2 y -3. Los niveles de identidad de secuencias entre TSR dentro de una sola proteína es tan diverso que se encuentra en otras proteínas que contienen TSR, lo que sugiere un origen evolutivo complejo (Nicholson y col., *Evol. Biol.*, 2005; 5: 11). El nivel elevado de heterogeneidad en las secuencias entre las TSR dentro y a través de diversas proteínas sugiere que éstas pueden realizar múltiples funciones. Basándose en el conocimiento actual, la homología de la función no se puede inferir, sino que en su lugar es necesario someter a ensayo cada TSR individual. Esto resalta la importancia de la definición de la función de las TSR individuales en diferentes proteínas de modo que los determinantes estructurales se puedan identificar en el futuro lo que ayudará a acelerar el diseño de algoritmos de predicción de la función de la estructura. Aunque al menos cinco proteínas que contienen TSR: TSP-1 y -2, ADAMTS-1 y -8, y BAI1/Vstat120 son inhibidores de la angiogénesis potentes, hasta ahora solamente TSR de TSP se han relacionado de forma convincente con la actividad antiangiogénica de esa familia de proteínas. Los datos estructurales recientes han sugerido que las proteínas que contienen TSR se podrían subdividir en dos categorías basándose en el número y la orientación de los enlaces disulfuro entre sus tres hebras antiparalelas y la carga positiva global de su superficie de cobertura externa (Tan y col., *J. Biol. Chem.*, 2007).

La primera categoría incluye TSP-1 y -2; BAI 1-3, y las proteínas ADAMTS, mientras que la segunda categoría comprende las F- y M-espondinas, y algunas proteínas de complemento. El hecho de que todas las proteínas que contienen TSR antiangiogénica pertenecen a la primera categoría, sugiere que la similitud en la acción antiangiogénica de las proteínas podría derivarse directamente de la homología en la función de algunas de sus TSR. Además, la base mecánica probable de esta distinción es la capacidad de unirse al receptor CD36 de células endoteliales antiangiogénico. Los estudios divulgados en el presente documento apoyan esta hipótesis.

Inicialmente se mostró que algunos péptidos recombinantes purificados que expresan tres de las cinco TSR de BAI1 inhibían la angiogénesis en un ensayo de angiogénesis corneal de conejo (Nishimori y col., *Oncogene*, 1997; 15: 2145-2150). Sin embargo, aún no queda claro si servirían para la misma función en la proteína BAI1 humana de longitud completa, en la que la conformación nativa, modificaciones posteriores a la traducción y concentraciones fisiológicas podrían definir la actividad.

Los datos también mostraban que las TSR de BAI1 son responsables del reconocimiento y captación de células apoptóticas por macrófagos a través del eje de señalización ELMO/Dock180/Rac (Park y col., *Nature*, 2007). Para complicar aún más la cuestión, hay un estudio reciente que sugiere que el efecto angiostático de BAI1 estaba mediado por su capacidad para bloquear receptores de $\alpha\beta 5$ integrina en células endoteliales (Nishimori y col., *Oncogene*, 1997; 15: 2145-2150; Koh y col., *Exp Cell Res*, 2004; 294: 172-184). Dado que los efectos antiangiogénicos de las TSR de la trombospondina-1 y -2 están mediados por su unión a CD36 y la posterior activación de una cascada de señalización que desencadena la apoptosis (Dawson y col., *J. Cell Biol.*, 1997; 138: 707-717, Jimenez y col., *Nat. Med.*, 2000; 6: 41-48., Anderson y col., *Cancer Biol. Ther.*, 2007; 6: 454-462), el efecto antiangiogénico de Vstat120 también podría ser dependiente de la conexión de la células endotelial CD36 mediante las TSR de Vstat120. Vstat120 inhibe la migración inducida por bFGF de las HDMEC que expresan CD36 pero no la de las HUVEC, que no expresan CD36. La capacidad de Vstat120 para inhibir la migración de HDMEC se suprimió en presencia de bloqueo de la función de anticuerpos de CD36.

Vstat120 también inhibía la neovascularización corneal en ratones de tipo silvestre pero no con supresión genética de CD36. Combinados, estos resultados indican que el efecto inhibitorio de Vstat120 depende de la expresión de CD36 en células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*. El efecto antiangiogénico mediado por trombospondina-1 que se une a CD36 va seguido de activación secuencial de p59fyn, proteasas de tipo caspasa-3 y proteína quinasas activadas por el mitógeno p38, y conduce a apoptosis de células endoteliales. La cascada de señalización precisa activada por la interacción de Vstat120 con CD36 en células endoteliales aún queda sin determinar, pero los

inventores predican que probablemente se super pondrá con la provocada por TSP-1 dada su homología de la función.

El dominio CLESH de CD36 es un determinante crítico de la unión de TSR de TSP-1 y -2 a células endoteliales. Este dominio puede formar parte de un bucle cargado de forma negativa dentro de CD36 y puede interactuar con el canal frontal con carga positiva de las TSR de tipo 1. La capacidad de Vstat120 para unirse a péptidos purificados que contienen el dominio CLESH de CD36, indica una interacción específica entre Vstat120 y CD36, y homología funcional con TSR de TSP-1 y -2. Estos estudios proporcionan la primera evidencia directa de que las TSR no TSP de tipo 1 se pueden unir a dominios CLESH. Estos resultados demuestran la significancia del receptor endotelial, CD36 en la mediación del efecto angiostático de Vstat120's. Por lo tanto, Vstat120 depende de la presencia de CD36 para suprimir del proceso de Neovascularización tanto *in vitro* como *in vivo*.

Vasculostatina-40 (Vstat40)

La presente divulgación incluye adicionalmente el producto de escisión primario del dominio extracelular de BAI1, que tiene una molécula secretada con un tamaño de aproximadamente 40 kDa, Vasculostatina-40 (Vstat40). La Vstat40 contiene una repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR), un dominio capaz de desencadenar respuestas anti-angiogénicas mediante la unión al receptor CD36 en células endoteliales. También contiene un dominio de unión a integrina RGD. La divulgación también proporciona que la proteasa furina media el procesamiento de Vstat40 y que Vstat40 inhibe la migración y formación de cordones de células endoteliales CD36⁺.

Como se muestra en la Fig. 12, la secuencia de aminoácidos de BAI1 (SEQ ID NO.: 1) comprende dos sitios de escisión, el primero entre los restos R328 y S329, y el segundo entre los restos L926 y S927. El primer sitio de escisión libera Vstat40, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 (Fig. 13) menos aproximadamente primeros 32 aminoácidos de la secuencia líder. La escisión en el segundo sitio de escisión solamente libera el fragmento de Vstat120 que puede incluir, al igual que en la SEQ ID NO.: 3 (Fig. 14), la secuencia líder. La determinación del sitio de escisión de Vstat40 preciso se realizó usando tres enfoques: 1) una región amplia se definió mediante la posición aproximada de la escisión basándose en el tamaño de Vstat40 de 40 kDa, 2) esta región se sometió a un enfoque de barrido de su presión para refinar la posición de la escisión (Fig. 18), 3) basándose en la posición de escisión refinada en el hallazgo de un sitio de escisión consenso para las furina proteasa en esta región, se generaron mutaciones puntuales para identificar los aminoácidos necesarios para la escisión. El truncamiento en el aminoácido 328 genera un producto del tamaño aproximado de Vstat40, como se muestra en la Fig. 18A, lo que indica que el sitio de escisión está próximo al aminoácido 328. Las líneas verticales discontinuas (Fig. 18A) indican el sitio de escisión de Vstat40. El fragmento 1-374 aún estaba escindido y generaba una pequeña cantidad de Vstat40,

La unión de etiquetas de 3 kDa (Fig. 18B, sombra de color oscuro) a construcciones que terminan entre las construcciones 2,3,4 de los aminoácidos 322 y 334 todavía permitía la escisión en Vstat40, lo que indica que el sitio de escisión se producen entre los aminoácidos 322 y 330. La secuencia de aminoácidos S³²²-T³³⁰ se identificó como un supuesto sitio de escisión para la furina proteasa usando un algoritmo publicado (Duckert y col., Protein Engineering, Design and Selection vol 17, pp. 107-112, 2004). Para confirmar que esta secuencia era necesaria para la unión de una proteasa y para determinar que los aminoácidos eran necesarios para la escisión, en esta región se realizó un barrido mutacional de alanina (Fig. 21). Estos experimentos demostraban que Q325A y R328A anulaban la escisión coherente con la importancia de aminoácidos hidrófilos para el procesamiento de la furina, aunque S326A y S329A no influían en el procesamiento de Vstat40. El sitio de escisión de dicho se encuentra entre los aminoácidos R328 y S329, coherente con los hallazgos de los estudios de formación de mapas de truncamiento de la Fig. 18.

Para confirmar la implicación de la furina en la escisión de Vstat40, se realizaron una serie de experimentos: 1) se mostró que el uso de inhibidores de furina anulaban la escisión en Vstat40 (Fig. 19), aunque en los inhibidores de la metaloproteínasa de matriz no tenían efecto (Fig. 20), 2) el procesamiento de BAI1 se controló en células LoVo deficientes en furina con o sin reconstitución de furina (Fig.22). Las células LoVo presentaban una fuerte reducción de la generación de Vstat40 que se restauró después de la transfección de ADNc de furina, lo que sugiere que la furina es la enzima principal responsable de la escisión.

Los efectos biológicos de Vstat40 y Vstat120 en la migración de células endoteliales, y especialmente de células endoteliales CD36⁺ se muestran en las Figs. 23-25C. Los datos de la presente divulgación indican que los efectos antimigración de ambos de los fragmentos de Vstat de BAI1, Vstat40 y Vstat120, están mediados por el receptor CD36 en células endoteliales. Un anticuerpo específico anti-αCD36 anulaba los efectos de Vstat40 y Vstat120 en células endoteliales, como se muestra en las Figs. 24A y 24B.

Un aspecto de la presente divulgación, por lo tanto, es un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS.: 3 y 4, o una variante conservativas de la misma, y en la que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1.

En una realización de este aspecto de la divulgación, el polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3.

En otra realización de este aspecto de la divulgación, el polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de

acuerdo con la SEQ ID NO.: 4.

En un aspecto con el polipéptido se aísla de un animal o un ser humano.

5 En otro aspecto más de la divulgación, el polipéptido se puede aislar a partir de un cultivo celular, en el que el cultivo celular puede estar formado por células animales o humanas que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica el polipéptido, y en el que el ácido nucleico heterólogo puede ser un vector de expresión que comprende una región que codifica el polipéptido unidad de forma operativa a una región reguladora de la expresión genética.

En un aspecto, el cultivo celular puede estar formado por células animales o humanas.

10 En diversos aspectos de la divulgación, el vector de expresión se selecciona entre el grupo que consiste en: un vector plásmido, un vector viral, y un cromosoma artificial, y en el que el vector de expresión está opcionalmente incorporado en el ADN genómico de las células animales o humanas.

En otro aspecto, el cultivo celular está formado por células bacterianas.

15 Otro aspecto de la presente divulgación es un vector de expresión seleccionado entre el grupo que consiste en: un vector plásmido, un vector viral, y un cromosoma artificial, y en el que el vector de expresión comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS.: 3 y 4, y variantes conservativas de las mismas, y en el que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1.

20 Otra realización de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 5, o variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3 o SEQ ID NO.: 5, en el que el polipéptido consiste en un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, y con lo que el polipéptido se une a CD36 a través de la repetición de trombospondina de tipo 1 e inhibe la angiogénesis.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3.

25 En otras realizaciones de la divulgación, el polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 4.

30 Otra realización de la divulgación proporciona procedimientos para preparar un polipéptido, que comprenden: proporcionar un primer polipéptido, en el que el primer polipéptido es BAI1 que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 1, o un fragmento extracelular del mismo, en el que el fragmento extracelular tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 4 y variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 4; y ponen en contacto el primer polipéptido con furina formando de este modo un segundo polipéptido que consiste en un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1.

35 En aspectos del procedimiento de este aspecto de la divulgación, el primer polipéptido puede estar de acuerdo con la SEQ ID NO.: 1, y el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, y variantes conservativas de las mismas.

En una realización de la divulgación, el primer polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 2, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 2, y el segundo polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3 o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3.

40 En otra realización, el primer polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 4, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 4, y el segundo polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 5, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 5.

45 En el aspecto del procedimiento de este aspecto de la divulgación, el procedimiento puede comprender adicionalmente el aislamiento del segundo polipéptido.

50 Además, otro aspecto de la divulgación son procedimientos para inhibir la proliferación de células endoteliales que comprenden: poner en contacto una población de células endoteliales con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la de la proteína BAI1 (SEQ ID NO.: 1), en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 3 y 5, o variantes conservativas de las mismas, y en la que el producto de escisión comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, con lo que la puesta en contacto de las células endoteliales con el polipéptido inhibe la proliferación de las células endoteliales.

En este aspecto de la divulgación, la población de células endoteliales puede estar en un animal o ser humano, y el

procedimiento puede comprender adicionalmente la administración de forma sistémica del polipéptido al animal o al ser humano.

En un aspecto de la divulgación, el procedimiento puede comprender adicionalmente la administración del polipéptido directamente a una población de células en el animal o en el ser humano.

- 5 Otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la angiogénesis que comprenden: poner en contacto una población de células endoteliales con un polipéptido, en la que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, o variantes conservativas de las mismas, y en la que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1, con lo que la puesta en contacto de las células endoteliales con el polipéptido inhibe la proliferación de las células endoteliales inhibiendo de ese modo la angiogénesis.

10 En una realización de la divulgación, el polipéptido se puede unir al receptor CD36 en la superficie de las células endoteliales.

En este aspecto de la divulgación, el procedimiento puede comprender adicionalmente la administración del polipéptido a un animal o ser humano, con lo que la angiogénesis se inhibe en el animal o en el ser humano .

- 15 En diversos aspectos del procedimiento de este aspecto de la divulgación, el polipéptido se puede administrar a un animal o ser humano como una administración en forma de bolo o sostenida.

- En un aspecto de este procedimiento, el polipéptido se puede administrar a un animal o ser humano mediante la administración al mismo de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un vector de ácido nucleico que incorpora en el mismo una secuencia heteróloga de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, o variantes conservativas de las mismas; y que expresa la secuencia heteróloga de ácidos nucleicos, administrando de ese modo el polipéptido a las células endoteliales.

- 20 En diversas realizaciones de este procedimiento de la divulgación, el vector de ácido nucleico puede ser un vector plásmido o un vector viral.

- 25 En aspectos del procedimiento, la angiogénesis en el animal o ser humano es un resultado de una afección patológica.

En aspectos de este procedimiento de la divulgación, la afección patológica puede ser un tumor, una herida, o degeneración macular relacionada con la edad.

- 30 Además, otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la formación de un tumor en un animal o ser humano, en los que el tumor se mantiene o se disemina mediante angiogénesis, que comprende: poner en contacto un tumor en desarrollo en un animal o ser humano con un polipéptido derivado de la proteína BAI1 (SEQ ID NO.: 1), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, y en la que el polipéptido comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1, con lo que el contacto del tumor con el polipéptido inhibe la angiogénesis mediante la unión al receptor CD36 en células endoteliales, inhibiendo de ese modo la formación del tumor.

35 En este aspecto de la divulgación, en realizaciones del procedimiento, el tumor puede ser un tumor cerebral.

En un aspecto con el tumor es un glioma.

- 40 En este aspecto de la divulgación, el procedimiento puede comprender adicionalmente la administración del polipéptido directamente al tumor cerebral mediante inyección en el tejido tumoral o inyección en un vaso sanguíneo que conduce al tumor.

- Otra realización de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona entre el grupo of SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 5, y variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3 o SEQ ID NO.: 5, con lo que el polipéptido se une a CD36 a través de la repetición de trombospondina de tipo 1 e inhibe la angiogénesis.

45 Preferentemente, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 3.

- Además, otro aspecto de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido aislado derivado de la proteína BAI1 (SEQ ID NO.: 1), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede tener una similitud de al menos un 80 % con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NOS.: 2, 3, 4, 5, o variantes conservativas de las mismas, y comprende un dominio de unión a integrina y al menos un repetición de trombospondina de tipo 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se debería enfatizar que las realizaciones de la presente divulgación, en particular, cualquier realización "preferente", son simplemente posibles ejemplos de las realizaciones, y que se exponen simplemente para una comprensión clara de los principios de la divulgación. Se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones a la realización o realizaciones de la divulgación descritas anteriormente sin apartarse sustancialmente del espíritu los principios de la divulgación. Se pretende que todas las modificaciones y variaciones de este tipo tienen incluidas en el presente documento dentro del alcance de la presente divulgación, y la presente divulgación y que queden protegidas con las reivindicaciones que siguen a continuación.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas de cómo realizar los procedimientos y usar las composiciones y los compuestos divulgados y reivindicados en el presente documento. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deberían tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica. La temperatura y presión estándar se definen como 20 °C y 1 atmósfera.

Ejemplos

Los ejemplos específicos que siguen a continuación se deben interpretar simplemente como ilustrativos y no limitantes del resto de la divulgación en modo alguno. Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la materia puede usar, basándose en la descripción en el presente documento, la presente divulgación en su alcance más completo.

Ejemplo 1

La expresión de Vstat120 suprime el crecimiento de gliomas intracraneales

Dado que BAI1 se expresa predominantemente en el cerebro, se examinó el papel de este producto de escisión proteolítico, Vstat120, en el crecimiento ortotópico de tumores cerebrales. Se generaron dos clones (U14 y U18) que expresan Vstat120 de forma estable en células de glioma U87MG humano después de transfección con un vector de expresión, como se muestra en la Fig. 1A. Las tasas de proliferación *in vitro* de estas células no se alteraron con la expresión de Vstat120 (véase la Fig. 1 B).

Para evaluar el potencial terapéutico de la expresión de Vstat120 en el crecimiento de tumor en el cerebro, se implantaron células precursoras U14, U18 y U87MG (106/animal) de forma estereotáctica en los cerebros de ratones desnudos atímicos (n = 6 ratas/grupo). Ambos clones de expresión de Vstat120 prolongaron la supervivencia media de los animales en comparación con las células precursoras U87MG de control (p < 0,05). La supervivencia media de los animales inyectados con células de glioma U87MG precursoras de control fue de 18 días. Por el contrario, la supervivencia media de los animales inyectados con los clones que U14 y U18 expresan Vstat120 fue de 28 días (24-34) y 41 (34-49) días, respectivamente como se muestra en la Fig. 1C.

Ejemplo 2

La expresión de Vstat120 puede suprimir el crecimiento de tumor intracraneal incluso cuando está presente un estímulo proangiogénico

Las células precursoras U87MG son proangiogénicas debido a la pérdida de PTEN (Wen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2001; 98: 4622-4627). Sin embargo, carecen de expresión de EGFRvIII, la evidencia genética de un gran subconjunto de GBM (Ekstrand y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1992; 89: 4309-4313; Libermann y col., Nature, 1985; 313: 144-147). Esta mutación confiere un fenotipo agresivo y altamente angiogénico (Nishikawa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1994; 91: 7727-7731; Abe y col., Cancer Res., 2003; 63: 2300-2305). Para someter a ensayo si Vstat120 podía suprimir el crecimiento de gliomas altamente agresivos de este tipo, los inventores usaron células de glioma U87MG que expresan de forma estable el receptor mutante EGFRvIII (U87ΔEGFR) (Nishikawa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1994; 91: 7727-7731). A continuación, U87ΔEGFR se transfectó de forma estable con un vector de expresión de Vstat120 y dos clones seleccionados (Δ19 y Δ22) para análisis adicionales. Estas células expresaban Vstat120, y no mostraban alteraciones en su tasa de proliferación *in vitro* (Fig. 2A). Para evaluar el potencial terapéutico de la expresión de Vstat120 en este glioma altamente agresivo, se usaron los modelos de xenoinjerto tanto subcutáneo de ratón como ortotópico de rata.

Los ratones *nu/nu* atímicos (n = 6/grupo) inyectados con células U87ΔEGFR forman un tumor es subcutáneos grandes, y los ratones se tuvieron que sacrificar el día 25. Por el contrario, los ratones inyectados con células Vstat120 que expresan Vstat120 eran incapaces de formar tumores detectables bajo la piel (Fig. 2B). Para examinar si Vstat120 también podía antagonizar la formación de tumor en su microentorno ortotópico, los inventores implantaron 106 células de U87MG, U87ΔEGFR, Δ19, y Δ22 de forma estereotáctica en el cerebro de ratas *nu/nu* atímicas. Inicialmente con el efecto de Vstat120 en el crecimiento tumoral, se midió de forma no invasiva mediante información de imágenes con resonancia magnética (MRI) en el día 14 para determinar el crecimiento del tumor (n = 3/grupo). Inmediatamente a partir de ese momento, los animales se sacrificaron y las secciones de los cerebros correspondientes se analizaron mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Los resultados indicaban tumores

más pequeños en gliomas derivados de células que expresan Vstat120 (Fig. 2C). A continuación, los inventores examinaron el efecto de la expresión de Vstat120 en la supervivencia de los animales con tumores intracraneales (n = 6 animales/grupo). La expresión de EGFRvIII con respecto a células U87MG redujo de forma significativa la supervivencia media de las ratas de 31 a 21 días (p < 0,002). Por el contrario, la supervivencia media de las ratas implantadas con células $\Delta 19$ y $\Delta 22$ intracraneales fue de 57 (de 34 a 114 días) y 41 (de 37 a 45 días) días, respectivamente (Fig. 2D).

Estos resultados demostraban que la expresión de Vstat120 disminuía de forma significativa el crecimiento del tumor y aumentaba la supervivencia (p < 0,001 entre animales implantados con cualquiera de los clones de expresión de Vstat120 ($\Delta 19$, y $\Delta 22$) y las células U87 Δ EGFR de control). De forma interesante, entre ratas inyectadas con células $\Delta 19$ que expresan Vstat120, había tres supervivientes a largo plazo que vivieron más de 60 días después del implante de las células tumorales. Dos de estas tres ratas murieron finalmente de carga tumoral los días 85 y 114, y el tercer animal se sacrificó el día 168 y se encontró que estaba libre de tumor. Combinados, los resultados mencionados anteriormente demuestran que Vstat120 tiene efectos inhibidores potentes en el crecimiento de glioma *in vivo*, en los microentornos tanto subcutáneo como cerebral.

Ejemplo 3

Medida de la densidad vascular en gliomas intracraneales

Para determinar si la reducción de la capacidad de células que expresan Vstat120 para crecer *in vivo* pero no *in vitro* se debía a la alteración en el reclutamiento del suministro vascular necesario para el crecimiento del tumor sólido, los inventores examinaron el fenotipo vascular de los tumores intracraneales derivados de los clones U87 Δ EGFR y Vstat120. La inmunohistoquímica para el Factor de von Willebrand (vWF), un marcador vascular, revelaba una reducción significativa de la densidad de las estructuras vasculares en tumores que expresaban Vstat120 (Fig. 3A). La densidad de los vasos en las secciones de tumor cerebral derivado de células que expresan Vstat120 ($\Delta 19$ y $\Delta 22$) mostraba un promedio de 18 ($\pm 2,0$) vasos/mm² mientras que los tumores U87 Δ EGFR de control tenían 32 ($\pm 1,5$) vasos/mm² (p < 0,005) (Fig. 3B). Estos datos demuestran que Vstat120 puede reducir la densidad vascular de una forma muy agresiva de tumor cerebral humano en su microentorno ortotópico en un modelo de rata.

Ejemplo 4

La inhibición de la migración de células endoteliales mediada por Vstat120 in vitro requiere CD36

Los datos mencionados anteriormente indican que Vstat120 puede suprimir la angiogénesis mediante el antagonismo de la respuesta de neovascularización de células endoteliales. Se sabe que CD36 se expresa en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) pero no en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Para evaluar el papel desempeñado por CD36 en el efecto antiangiogénico de Vstat120, los inventores compararon la susceptibilidad de las HDMEC que expresan CD36 y las HUVEC que no expresan CD36 con respecto a los efectos inhibidores de Vstat120 en un ensayo de migración Transwell. El tratamiento de células endoteliales con medios acondicionados (CM) de células 293 que expresan Vstat120 (Fig. 4A) inhibía la migración de las HDMEC que expresan CD36, pero no tenía efecto en la migración de células HUVEC que no expresan CD36, lo que implica de forma potencial a CD36 en los efectos de Vstat120 (Fig. 4B). El efecto de Vstat120 en la migración de HDMEC se sometió a ensayo adicionalmente en un ensayo de migración de raspado de herida (Figura 4C). Las HDMEC confluentes se dañaron y al alcance del cierre de la herida se midió después de 8 h, momento en el que las células se fijaron y se tiñeron. El borde principal de las células migró una distancia mayor en las células de control en comparación con las células tratadas con Vstat120. La cuantificación de la distancia migrada, porcentaje de cierre de la herida y velocidad de las migraciones de las células mostraban que Vstat120 reducía de forma significativa la migración de las HDMEC.

A continuación, los inventores determinaron si un anticuerpo de bloqueo de la función anti-CD36 podía anular la función inhibitoria de Vstat120 en las HDMEC en un ensayo de migración de raspado de herida (Fig. 4D). Las HDMEC confluentes se dejaron sin tratar o se trataron con anticuerpo anti-CD36 durante 30 minutos antes del tratamiento con control o CM que contenía Vstat120. La cuantificación de estos resultados mostró que la incubación previa de las HDMEC con anticuerpo anti-CD36 de neutralización anulaba de forma completa el efecto antimigratorio de Vstat120.

Ejemplo 5

Vstat120 se puede unir al dominio CLESH de CD36.

Los efectos antiangiogénicos de TSP-1 y -2 mediados por su unión a CD36 en células endoteliales dependen de la unión del dominio o dominios de TSR con respecto a una región conservada dentro de CD36 denominada dominio CLESH. La capacidad de Vstat120 para unirse a péptidos del dominio CLESH de CD36 recombinantes se sometió al ensayo. Los péptidos etiquetados con GST que se extendían a los aminoácidos 5 a 143, y 67 a 157 de CD36 se expresaron y se purificaron en *E.coli* (Figs. 5A y 5B). Las proteínas de fusión de GST indicadas se sometieron a ensayo por su capacidad para unirse a TSP1. En resumen, el péptido recombinante indicado unido a perlas de glutatión-Sepharose se usó hacer interacción de TSP1 a partir de CM de células LN229 que expresan TSP1 de

forma constitutiva (clon C9). La transferencia de Western de las proteínas de interacción confirmó su capacidad para unirse a las TSR (Fig. 5C, panel a la izquierda). Las proteínas de fusión de GST indicadas se sometieron a ensayo a continuación por su capacidad para unirse a Vstat120 en un ensayo de interacción similar usando Vstat120 de CM de células de idioma LN229 que expresan Vstat120 de forma constitutiva. La Fig. 5C muestra que las proteínas CLESH de CD36 recombinante etiquetado con GST, pero no GST solo, interacciona van con Vstat120. Estos resultados demuestran la capacidad de Vstat120 para unirse al dominio CLESH de CD36.

Ejemplo 6

Vstat120 inhibe la angiogénesis corneal de una manera dependiente de CD36

Para examinar si Vstat120 también podía inhibir la neovascularización *in vivo*, se realizaron ensayos de angiogénesis corneal en ratones. Para evaluar adicionalmente la implicación de CD36 en este proceso, se compararon los efectos de Vstat120 en angiogénesis corneal inducida por bFGF en ratones de tipo silvestre y con supresión genética de CD36. Se implantaron microgránulos que contenían bFGF y CM humanos de células 293 transfectadas con ADNc de Vstat120 o un vector de control en las córneas de los ratones. Los resultados muestran que Vstat120 puede reducir el alcance de la neovascularización corneal inducida por bFGF en ratones de tipo silvestre (Fig. 6A). Este efecto inhibitorio se abolió completamente en ratones con supresión genética de CD36. El área media de neovascularización en córneas con gránulos que contenían Vstat120 CM disminuyó de forma significativa (40 %, $p < 0,05$) en comparación con las que contenían CM de control (Fig. 6B). En conjunto con estos resultados muestran que la expresión de CD36 es necesaria para los efectos antiangiogénicos de Vstat120 en células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplo 7

Cultivo de líneas celulares y condiciones de transfección

Las líneas de células humanas de human glioblastoma (U87MG, LN229) y 293 se describieron anteriormente (Ishii y col., Brain Pathol, 1999;9: 469-479). U87 Δ EGFR expresa de forma estable la forma mutante EGFRvIII de EGFR. Las células LN229Vstat120 (clon 13) y LN229TSP1 (clon C9) se prepararon mediante transfección de forma estable de células LN229 con vectores de expresión para Vstat120 (pcDNA3.1mychisVstat120) y TSP1 (pcDNATS1). Se prepararon medios acondicionados (CM) de células a partir de cultivos confluentes en un 80 % cultivados durante 48-96 horas en medios sin suero. Para transfecciones transitorias, las células 293 sembradas en placas de 60 mm² se transfectaron con 8 ug de lacZ/pcDNA3.1, Vstat120-myc/his pcDNA3.1, o vector BAI1pcDNA3.1 de tipo silvestre, usando reactivo de transfección GenePORTER (Gene Therapy Systems; n.º de Cat. T201007). Se recogieron 4 ml de CM sin suero a partir de células después de 48 horas y se almacenó a - 20 °C. La CM (4 ml) se precipitó usando TCA al 50 % y se volvió a suspender en 150 μ l de tampón de muestra Laemmli.

Ejemplo 8

Preparación de proteínas de fusión de GST recombinantes

Dos construcciones diferentes de GST/CD36 (Figura 5A) que contenían el dominio CLESH (que se abarcaban los aminoácidos 5-143, y 67-157) se prepararon como se ha descrito anteriormente (34). Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación directa de nucleótidos. Las proteínas de fusión de GST se expresaron en bacterias BI21(DE3) de *E. Coli*. Un IPTG de fase global logarítmica se añadió a una concentración final de 3 mM. La expresión de proteínas se realizó durante 3 hrs a 37 °C. Las células se centrifugaron a continuación a 16.000 g durante 5 min, se volvieron a suspender en 5 ml de tampón de lisis (PBS + un comprimido de cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA Complete mini (n.º 4693159, Roche) + 1 mg/ml de lisozima) y se congelaron durante una noche a -20 °C. Las soluciones celulares se descongelaron en agua templada y se sonicaron con pulsos con 3 estallidos de 15 segundos cada uno. Los lisados celulares se sedimentaron a 31.000 g durante 30 min, y los gránulos ricos en proteínas se lavaron sucesivamente con tampón de lavado 1 (25 ml de PBS, Triton X-100 al 0,1 %), tampón de lavado 2 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0), y se disolvieron en 5 ml de tampón de desnaturalización (urea 8 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Después de 30 min de centrifugación a 30.000 g para retirar residuos insolubles, the las proteínas se volvieron a plegar con una adición gota a gota en 20 ml de tampón de replegamiento (Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, pH 9,0), y a continuación se hizo diálisis durante una noche en Tris 50 mM a pH 8,0. Las proteínas recombinantes se unieron a resina de glutatión Sepharose 4B (GE Healthcare) y se usaron para ensayos de interacción de Vstat120/TSP1 o se purificaron mediante elución con Tris-HCl 50 mM, glutatión 10 mM, pH 8,0.

Ejemplo 9

Ensayo de interacción de glutatión-S-transferasa

Las soluciones de proteína de fusión GST-CD36-CLESH (15 ml) se absorbieron previamente con 100 μ l de perlas de glutatión Sepharose 4B (GE Healthcare) durante 2 h a 4 °C. Después de dos lavados con PBS frío, 15 ml de CM sin diluir (recogido después de 96 h en medio sin suero) a partir de células de control transfectados de forma estable o precursoras se añadieron a 100 μ l de perlas y a continuación se incubó a 4 °C durante una noche con rotación

constante. Las perlas se centrifugaron (100 g durante 1 min) y se lavaron dos veces con 5 ml de PBS. Las proteínas unidas se eluyeron y se solubilizaron en 50 µl de tampón de muestra de desnaturalización de SDS-PAGE.

Ejemplo 10

Análisis de transferencia de Western

5 Se realizaron inmunotransferencias en lisados celulares (y salvos en Urea 8 M, SDS al 4 %, en Tris 10 mM (pH 7,4), a partir de células o tejidos indicados. Las cantidades iguales de proteína (40 µg) se resolvieron en un SDS PAGE al 7,5 % seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa. Las transferencias de Western se exploraron con un anticuerpo anti-N-terminal BAI1, seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (DAKO Co. Carpintería CA; n.º de Cat P0448). Las transferencias de actina se exploraron con anticuerpos de cabra anti-actina (n.º de cat SC-1616 SANTA CRUZ Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA; diluido a 1:500), seguido de anticuerpos secundarios de cerdo anti-cabra (n.º de cat 605275 ROCHE Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN; diluido a 1:1000), y se visualizaron con quimioluminiscencia aumentada (PIERCE Rockford IL). El anticuerpo monoclonal anti-GST (Chemicon International, MAB3317) se usó para detectar las proteínas de fusión mediante transferencia de Western.

Ejemplo 11

Ensayos de proliferación

15 Las tasas de proliferación de los diferentes clones transfectados con Vstat120 y vacíos se evaluaron con un ensayo de violeta de cristal. Se sembraron números iguales de células (4.000) de cada clon en una placa de 96 pocillos (n = 8). Las células se fijaron con glutaraldehído al 1 %, y a continuación se tiñeron con violeta de cristal al 0,5 %. Después del lavado, los cristales se disolvieron en tampón de Sorenson (citrato sódico 0,025 M, ácido cítrico 0,025 M en etanol al 50 %) y la Absorbancia se leyó a A590 nm.

Ejemplo 12

Estudios de tumorigénesis

25 Se realizaron xenoinjertos de tumor subcutáneo como se ha descrito anteriormente. Para estudios intracraneales, los inventores inyectaron de forma estereotáctica 106 células de glioma en los cerebros de ratones desnudos atímicos (peso medio corporal de 150 g) para establecer xenoinjertos de tumor cerebral ortotópico como se ha descrito. Estos animales se anestesiaron profundamente mediante la administración de una inyección intraperitoneal de mezcla de Ketamina (80 mg/kg)/Xilazina (10 mg/kg). El animal anestesiado se aseguró a un marco estereotáctico y la temperatura corporal se mantuvo con una almohadilla de calentamiento. Se realizó una incisión en la línea media sagital de 5 mm anterior al bregma con respecto al occipucio. A continuación, se usó un taladro de 2 mm para hacer un agujero de trepanación de 3 mm a la derecha y 1 mm anterior del bregma del cráneo. Se hizo avanzar una jeringa Hamilton de calibre 23 hasta una profundidad de 4,5 mm durante un periodo de un minuto, y a continuación se extrajo 0,5 mm para formar un bolsillo para inyección y se inyectaron 5 µl de suspensión de células tumorales durante un periodo de dos minutos. Después de la inyección, la aguja se extrajo durante un periodo de un minuto, y el agujero de trepanación se llenó con era estéril para hueso. La superficie del cráneo se lavó con agua estéril para destruir mediante ósmosis cualquier célula fugada en el espacio subgaleal. El cuero cabelludo se cerró posteriormente con 3-0 realizaciones de puntos de sutura con Vicryl. El animal se mantuvo aislado durante el periodo de recuperación. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se compararon usando el ensayo de rango logarítmico. Un valor de *P* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el uso del software estadístico SPSS (versión 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Los roedores se marcaron con un procedimiento de tatuaje sencillo para su identificación. Todos los estudios con animales se realizaron de conformidad con las directrices emitidas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Emory University Institutional.

Ejemplo 13

Formación de imágenes con resonancia magnética

45 Se realizaron exploraciones de MRI en un escáner 3T MRI (Philips Intera) usando una bobina de pequeño volumen (5 cm de diámetro). Los animales y anestesiaron como anteriormente y a continuación se colocaron en la bobina. La cabeza se aseguró usando una almohadilla de espuma para minimizar los posibles movimientos. El agente de contraste de MRI, Gadolinio ácido dietilentriamina-pentaacético (Gd-DTPA), se administró iv. a una dosis de 0,2 mM/kg para obtener un aumento de la señal en el tumor. Se obtuvieron imágenes de eco ponderadas en espín de T1 de múltiples cortes en la orientación coronal usando un tiempo de repetición de 400 ms, tiempo de eco de 14 ms y matriz de formación de imágenes de 128 x 128 con el campo de visión de 50 x 50 mm². Para hacer coincidir el análisis histológico, se usó un espesor de corte de 2 mm sin espacio de corte. El índice medio de la señal era 3 para la mayoría de las exploraciones. La formación de imágenes de eco ponderadas en espín de T1 se hizo antes y después de la administración del agente de contraste para cada animal usando los mismos parámetros de formación de imágenes.

Ejemplo 14*Análisis histológico e Inmunohistoquímica*

Los tumores recogidos se fijaron en formalina tamponada al 10 % seguido de embebido en parafina y formación de secciones de rutina (8 µm). Las secciones se tiñeron para Factor von Willebrand con un anticuerpo policlonal de conejo (dilución a 1:4, Dako, Carpintería, CA) para visualizar los vasos sanguíneos que revestían las células endoteliales que se profundían en el tumor. El número de estructuras vasculares/mm² en los xenoinjertos de tumor se cuantificó haciendo recuento de tres campos microscópicos diferentes a 10x para cada una de las 3 ratas/grupo. Se hizo el promedio de los tres campos en cada tumor y los promedios para cada animal usado para dar el recuento final +/- ETM.

Ejemplo 15*Ensayos de Transwell in vitro y de migración de células endoteliales de raspado de herida*

El CM de células HEK 293 transfectadas con Vstat120 (pcDNAecBAI1myc-his) o vector de control (pcDNA3.1-LacZ, un vector de expresión de β-galactosidasa) se recogió y se concentró 40x usando un filtro YM-10 (Amicon). Para los ensayos de migración Transwell, las células indicadas se sembraron en cámaras de Boyden modificadas con Transwell (Becton Dickinson Labware n.º 353097) con un tamaño de poro de 8 µm (50.000 células/cámara). Las células se colocaron en medio que contenía suero al 1 % durante una noche y a continuación se trataron previamente con CM (diluido a 1x en medio endotelial) durante 30 min. Los medios que contenía suero al 10 % se usaron como un quimioattractor en la parte inferior de la cámara, mientras que CM permanecía en la parte superior de la cámara. Después de 8 hrs, las células migradas se cuantificaron haciendo recuento de tres visualizaciones/filtro microscópicas a 10x y los datos se presentaron como la media de 3 filtros. Para los ensayos de migración de raspado de herida, se incubaron cultivos de HDMEC confluentes en medios al 1 % durante una noche en placas de 12 pocillos, a continuación se dañaron con una punta de pipeta de 10 µl. Las células desprendidas se retiraron mediante lavados con PBS y a continuación se trataron con un anticuerpo de bloqueo de función anti-CD36 a 10 µg/ml durante 30 min (FA6- 152, Cell Sciences). Las células se trataron con CM a una concentración final de 1x durante 30 min, seguido de incubación en suero al 10 % para inducir la migración celular. El ancho inicial de la herida se midió, y se permitió que las células migraran durante 8 h, y a continuación se fijaron con glutaraldehído al 1 %, se tiñeron con violeta de cristal al 0,5 %, y se fotografiaron. El experimento se repitió 2 veces independientes y la significancia se determinó con el ensayo de T de Student.

Ejemplo 16*Ensayos de angiogénesis de córnea in vivo*

Se generaron gránulos mezclando soluciones estériles de bFGF (Research Diagnostics, Inc) a una concentración final de 25 ng/gránulo, CM concentrado (50 ng de proteína total del CM por gránulo) y sucralfato (Teva Pharmaceuticals, North Wales, PA), y a continuación la solución se extendió en una malla de nailon de 3-300/50 con un tamaño de poro aproximado de 0,4 x 0,4 mm (Tetko Lancaster, NY). La mezcla se cerró herméticamente en ambos lados con hidrón. En este caso, se añadieron 7,5 µl de medios concentrados/100 gránulos. Los gránulos individuales se desprendieron separando la malla de nailon, y se eligieron los gránulos de tamaño similar en un microscopio de disección para implante. Los ratones anestesiaron como anteriormente y los ojos se anestesiaron por vía tópica con proparacaína al 0,5 % y alcirilo al 2 % y los globos se sometieron a proptosis con un fórceps. Los gránulos se implantaron a aproximadamente 1 mm desde el limbo. En resumen, con un microscopio de disección, se realizó una queratotomía lineal intraestromal, central (con una longitud de aproximadamente 0,5 mm) con una cuchilla quirúrgica (Bard-Parker n.º 15; Becton Dickinson), y usando el brazo de un fórceps fino, se creó un microbolsillo hacia el limbo. Los gránulos se colocaron en la base del bolsillo. En el ojo operado se aplicó una pomada antibiótica de eritromicina, tanto para evitar la infección como para disminuir la irritación. Los ratones recibieron Buprenex (2,5 mg/kg por vía subcutánea) después de la cirugía para controlar el dolor. Cinco días después del implante, los ratones anestesiaron y se inyectaron 50 µl de una solución de 2,5 mg/ml de FITC-dextrano estéril (~ PM 70.000 Da, Sigma) en el seno retroorbital. De nuevo se hizo proptosis de los ojos como anteriormente, y se capturaron imágenes digitales de la córnea con un microscopio de disección con fluorescencia (Leica) y se transfirieron a Adobe Photoshop para medidas. La longitud máxima del vaso y la zona de neovascularización (en horas de reloj), se usaron para calcular el área de neovascularización, usando la fórmula: Área (mm²) = 0,2 x π x VL (mm) x CH. VL = longitud del vaso; CH = horas de reloj, en el que una hora de reloj = 30° de un arco.

Ejemplo 17

Para determinar si la expresión de BAI1 se interrumpe durante la tumorigénesis, se examinó la expresión de la proteína BAI1 en células del cerebro humano normales y en Glioblastoma Multiforme (GBM). Se generó un anticuerpo anti-BAI1 y usando este anticuerpo, la tinción inmunohistoquímica se realizó en muestras de ensayo de autopsia humana que contenían GBM. BAI1 se expresaba ampliamente en el tejido de cerebro normal, pero estaba ausente en la mayoría de los 18 tejidos de GBM humanos investigados, lo que indica que la expresión de la proteína BAI1 probablemente se pierde o se suprime durante la formación del tumor, como se muestra en la en Fig. 7A.

Además, los inventores compararon la expresión del ARNm de BAI1 en 28 líneas de células de glioma con respecto a la expresión en tejidos de cerebro normal usando transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR). El ARNm de BAI1 solamente se expresaba en tejido de cerebro normal, y no se encontró en ninguna de las líneas de glioma, mostrado en la Fig. 7B.

- 5 Las células madre neurales en combinación con astrocitos normales son los dos tipos celulares que se cree que son el origen de GBM. RT/PCR también se usó para medir la expresión del ARNm de BAI1 en células C17.2 de ratón, una línea de células madre neurales inmortales, y se compararon con una línea de células 293 de Riñón Embrionario Humano (HEK) transfectadas con ADNc de BAI1 (hBAI1) humano. La transferencia de Western se usó a continuación para comparar la expresión de las proteínas hBAI1 y BAI1 de ratón (mBAI1). Se encontró que tanto el
10 ARNm de mBAI1 como mBAI1 se expresaban en las células C17.2 lo que indica que BAI1 se expresa de forma normal en células madre neurales y que la interrupción de su expresión puede ser fundamental para su función en la tumorigénesis (véase la Fig. 7B).

Ejemplo 18

- 15 El dominio de extracelular de BAI1 se extiende de forma proteolítica en un sitio de escisión proteolítica del receptor acoplado a la proteína G, liberando el fragmento soluble de Vstat120. Este fragmento contiene tanto un motivo de unión a integrina, arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que es distal a cinco dominios de repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR). Para mostrar que Vstat120 tiene propiedades antiangiogénicas, Vstat120 se sometió a ensayo usando medidas de angiogénesis tanto *in vitro* (mediante un ensayo de cámara de Boyden y un ensayo de violeta de cristal) como *in vivo* (mediante un ensayo de tapón de Matrigel subcutáneo).

- 20 En el ensayo de cámara de Boyden, las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas cultivadas (HDMEC) se incubaron con medios acondicionados (CM) de células LN229 GBM transfectadas de forma transitoria con un vector de expresión que codifica el fragmento de BAI1 de 120 kDa o un vector vacío. Las células se trataron a continuación con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y la migración celular se sometió a ensayo usando una cámara de Boyden modificada. Los resultados muestran que los medios de acondicionamiento del
25 fragmento de 120 kDa reducían de forma significativa la migración de células endoteliales, como se muestra en la Fig. 8A. A continuación, para examinar su efecto en la proliferación de EC, las HDMEC se incubaron con medios acondicionados a partir de las mismas células que anteriormente. Las células se trataron a continuación con bFGF y la proliferación de las células se determinó usando el ensayo de violeta de cristal. Los medios acondicionados, que contenían el fragmento de 120 kDa (*), inhibían la proliferación de EC *in vitro* como se muestra en la Fig. 8B.

- 30 Para examinar si la expresión del fragmento de 120 kDa también influiría en la angiogénesis *in vivo*, se usó el ensayo de tapón de Matrigel de ratón. El control del vector o las células LN229 que expresan el fragmento de 120 kDa se inyectaron con Matrigel por vía subcutánea en ratones *nu/nu*. A los 14 días después de la inyección, el tapón se retiró y se analizó para desarrollo vascular mediante histología. Los inventores observaron una formación robusta de canales vasculares en los tapones de control, a la vez que se reducía de forma sorprendente en los que
35 contenían las células que expresaban el fragmento de 120 kDa. Estas estructuras eran canales vasculares ya que estaban revestidas con EC que se tenía con factor de von Willebrandt (vWF) y músculo liso perivascular y pericitos que se teñían con actina del músculo liso (SMA). La longitud media de los canales vasculares/mm² se determinó, mostrando que los tapones que expresan el fragmento de 120 kDa tenían solamente un 11 % de la longitud media del canal vascular media observada en los tapones de control. Como un control, la expresión del fragmento de 120
40 kDa en ambos tipos celulares se verificó. De forma colectiva, estos datos sugieren un papel antiangiogénico para el fragmento de BAI1 de 120 kDa; y los inventores lo denominaron Vasculostatina-120 (Vstat120). (Véase la Fig. 9).

Ejemplo 19

Evidencia de las propiedades antiangiogénicas de Vstat40

- 45 Para examinar si el fragmento de escisión de Vstat40 de BAI1 poseía funciones antiangiogénicas como las de Vstat120, se realizaron los siguientes tres ensayos *in vitro*: el ensayo de formación de cordón endotelial, el ensayo de migración Transwell (equivalente al ensayo modificado de cámara de Boyden) y el ensayo de herida raspada. Vstat40, al igual que Vstat120, contiene un motivo de unión a integrina de RGD así como dos dominios de repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR).

- 50 En el ensayo de formación de cordón endotelial, las HDMEC se cultivaron en CM que contenía Matrigel a partir de células transfectadas con LacZ (control), Vstat40 o ADNc de Vstat120. Después de 8 hrs, se hizo el recuento del número de cordones y estructuras encerradas. CM de células transfectados con Vstat40 dio como resultado un número menor de estructuras encerradas lo que significa una disminución de la angiogénesis. El ensayo de cámara migración Transwell implicaba la siembra de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y HDMEC en cámaras de migración Transwell, colocándolas en medios con suero al 1 % durante una noche y después
55 tratando previamente con CM de células transfectar ya sea con LacZ, Vstat40, o ADN de Vstat120 durante 30 min. Los medios que contenían suero al 10 % se usaron como un quimioattractor y a continuación se colocaron en el fondo de la cámara. Después de 8 h, las células migradas se cuantificaron. No se determinaron cambios en el número de células que migraban usando las HUVEC, pero se encontró una disminución significativa de las células

que migraban para las HDMEC.

Un ensayo de herida raspada se realizó para examinar si un anticuerpo de ción anti-CD36, conocido por evitar el funcionamiento antiangiogénico en la trombospondina-1 (que contiene 3 repeticiones de TSR de tipo I) evitaría la función antiangiogénica de la herida en células tratadas con Vstat40. Los cultivos de las HDMEC se colocaron en medios al 1 % durante una noche y a continuación se dañaron usando una punta de pipeta de 10 µl. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con anticuerpo de bloqueo de la función anti-CD36 a 10 µg/ml durante 30 min. Las células se trataron a continuación con CM de células transfectadas ya sea con LacZ, Vstat40, o ADNc de Vstat120 durante 30 min, seguido de tratamiento con suero al 10 % para inducir la migración celular. El ancho final de la herida y la distancia migrada se midió a continuación después de 8 h. Las células tratadas con CM de células que expresan Vstat40 de forma significativa migraron menos que las tratadas con CM de células que expresan LacZ. Cuando se vuelven a tratar con un anticuerpo de función anti-CD36, la inhibición de la migración presentada por estas células se bloqueó. En conjunto, los resultados de los tres ensayos indican que Vstat40 posee propiedades antiangiogénicas, como se muestra en la Fig. 10.

Ejemplo 20

El tratamiento de células endoteliales con Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), también denominado factor de permeabilidad vascular (VPF), interrumpen las uniones de adherencia entre células. La capacidad para inhibir tal interrupción, reducida actualmente mediante administración de dexametasona, podría ser por lo tanto una adición útil a las propiedades antiangiogénicas de un compuesto. Los cultivos de células HDMEC se trataron con CM de células transfectadas con cualquiera de LacZ, Vstat40, o ADNc de Vstat120 durante 30 min, seguido de tratamiento con VEGF o sin tratamiento. A continuación las células se fijaron y se inmunotñeron con un anticuerpo de cadherina anti-VE (endotelial vascular) revelado con un anticuerpo FITC. La presencia de VE-cadherina en la membrana celular se midió a continuación con inmunofluorescencia. El tratamiento previo con la CM de células transfectadas con Vstat40 dio como resultado un aumento de la adherencia de célula-célula mediada por VE-cadherina en comparación con los controles, lo que indica una conservación de las uniones de adherencia entre células HDMEC cells, como se muestra en la Fig. 11.

Se debería enfatizar que las realizaciones de la presente divulgación descritas anteriormente son simplemente posibles ejemplos de las realizaciones, y que se exponen simplemente para una comprensión clara de los principios de la presente divulgación. Se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones a la realización o realizaciones de la divulgación descritas anteriormente sin apartarse sustancialmente de los principios de la divulgación. Se pretende que todas las modificaciones y variaciones de este tipo tienen incluidas en el presente documento dentro del alcance de la presente divulgación, y que queden protegidas con las reivindicaciones que siguen a continuación.

Listado de secuencias

<110> Emory University

<120> Procedimiento para Tratar Angiogénesis Anómala a través de la familia BAI de proteínas y sus fragmentos

<130> 050508-2680

<150> US 60/936.196

<151> 19-06-2007

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1584

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 569 484 T3

Met Arg Gly Gln Ala Ala Ala Pro Gly Pro Val Trp Ile Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Arg Arg Ala Arg Ala Ala Ala
 20 25 30

Gly Ala Asp Ala Gly Pro Gly Pro Glu Pro Cys Ala Thr Leu Val Gln
 35 40 45

Gly Lys Phe Phe Gly Tyr Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Pro Ala Asn
 50 55 60

Ala Ser Arg Cys Ser Trp Thr Leu Arg Asn Pro Asp Pro Arg Arg Tyr
 65 70 75 80

Thr Leu Tyr Met Lys Val Ala Lys Ala Pro Val Pro Cys Ser Gly Pro
 85 90 95

Gly Arg Val Arg Thr Tyr Gln Phe Asp Ser Phe Leu Glu Ser Thr Arg
 100 105 110

Thr Tyr Leu Gly Val Glu Ser Phe Asp Glu Val Leu Arg Leu Cys Asp
 115 120 125

Pro Ser Ala Pro Leu Ala Phe Leu Gln Ala Ser Lys Gln Phe Leu Gln
 130 135 140

Met Arg Arg Gln Gln Pro Pro Gln His Asp Gly Leu Arg Pro Arg Ala
 145 150 155 160

ES 2 569 484 T3

Gly Pro Pro Gly Pro Thr Asp Asp Phe Ser Val Glu Tyr Leu Val Val
165 170 175

Gly Asn Arg Asn Pro Ser Arg Ala Ala Cys Gln Met Leu Cys Arg Trp
180 185 190

Leu Asp Ala Cys Leu Ala Gly Ser Arg Ser Ser His Pro Cys Gly Ile
195 200 205

Met Gln Thr Pro Cys Ala Cys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Gly Pro Ala
210 215 220

Ala Gly Pro Leu Ala Pro Arg Gly Asp Val Cys Leu Arg Asp Ala Val
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Glu Asn Cys Leu Thr Ser Leu Thr Gln Asp Arg Gly
245 250 255

Gly His Gly Ala Thr Gly Gly Trp Lys Leu Trp Ser Leu Trp Gly Glu
260 265 270

Cys Thr Arg Asp Cys Gly Gly Gly Leu Gln Thr Arg Thr Arg Thr Cys
275 280 285

Leu Pro Ala Pro Gly Val Glu Gly Gly Gly Cys Glu Gly Val Leu Glu
290 295 300

Glu Gly Arg Gln Cys Asn Arg Glu Ala Cys Gly Pro Ala Gly Arg Thr
305 310 315 320

Ser Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg Ser Thr Asp Ala Arg Arg Arg Glu
325 330 335

Glu Leu Gly Asp Glu Leu Gln Gln Phe Gly Phe Pro Ala Pro Gln Thr
340 345 350

Gly Asp Pro Ala Ala Glu Glu Trp Ser Pro Trp Ser Val Cys Ser Ser
355 360 365

Thr Cys Gly Glu Gly Trp Gln Thr Arg Thr Arg Phe Cys Val Ser Ser
370 375 380

Ser Tyr Ser Thr Gln Cys Ser Gly Pro Leu Arg Glu Gln Arg Leu Cys
385 390 395 400

ES 2 569 484 T3

Asn Asn Ser Ala Val Cys Pro Val His Gly Ala Trp Asp Glu Trp Ser
 405 410 415

Pro Trp Ser Leu Cys Ser Ser Thr Cys Gly Arg Gly Phe Arg Asp Arg
 420 425 430

Thr Arg Thr Cys Arg Pro Pro Gln Phe Gly Gly Asn Pro Cys Glu Gly
 435 440 445

Pro Glu Lys Gln Thr Lys Phe Cys Asn Ile Ala Leu Cys Pro Gly Arg
 450 455 460

Ala Val Asp Gly Asn Trp Asn Glu Trp Ser Ser Trp Ser Ala Cys Ser
 465 470 475 480

Ala Ser Cys Ser Gln Gly Arg Gln Gln Arg Thr Arg Glu Cys Asn Gly
 485 490 495

Pro Ser Tyr Gly Gly Ala Glu Cys Gln Gly His Trp Val Glu Thr Arg
 500 505 510

Asp Cys Phe Leu Gln Gln Cys Pro Val Asp Gly Lys Trp Gln Ala Trp
 515 520 525

Ala Ser Trp Gly Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly Ala Gly Ser Gln Arg
 530 535 540

Arg Glu Arg Val Cys Ser Gly Pro Phe Phe Gly Gly Ala Ala Cys Gln
 545 550 555 560

Gly Pro Gln Asp Glu Tyr Arg Gln Cys Gly Thr Gln Arg Cys Pro Glu
 565 570 575

Pro His Glu Ile Cys Asp Glu Asp Asn Phe Gly Ala Val Ile Trp Lys
 580 585 590

Glu Thr Pro Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Arg Cys Pro Arg Asn Ala
 595 600 605

Thr Gly Leu Ile Leu Arg Arg Cys Glu Leu Asp Glu Glu Gly Ile Ala
 610 615 620

Tyr Trp Glu Pro Pro Thr Tyr Ile Arg Cys Val Ser Ile Asp Tyr Arg
 625 630 635 640

ES 2 569 484 T3

Asn Ile Gln Met Met Thr Arg Glu His Leu Ala Lys Ala Gln Arg Gly
645 650 655

Leu Pro Gly Glu Gly Val Ser Glu Val Ile Gln Thr Leu Val Glu Ile
660 665 670

Ser Gln Asp Gly Thr Ser Tyr Ser Gly Asp Leu Leu Ser Thr Ile Asp
675 680 685

Val Leu Arg Asn Met Thr Glu Ile Phe Arg Arg Ala Tyr Tyr Ser Pro
690 695 700

Thr Pro Gly Asp Val Gln Asn Phe Val Gln Ile Leu Ser Asn Leu Leu
705 710 715 720

Ala Glu Glu Asn Arg Asp Lys Trp Glu Glu Ala Gln Leu Ala Gly Pro
725 730 735

Asn Ala Lys Glu Leu Phe Arg Leu Val Glu Asp Phe Val Asp Val Ile
740 745 750

Gly Phe Arg Met Lys Asp Leu Arg Asp Ala Tyr Gln Val Thr Asp Asn
755 760 765

Leu Val Leu Ser Ile His Lys Leu Pro Ala Ser Gly Ala Thr Asp Ile
770 775 780

Ser Phe Pro Met Lys Gly Trp Arg Ala Thr Gly Asp Trp Ala Lys Val
785 790 795 800

Pro Glu Asp Arg Val Thr Val Ser Lys Ser Val Phe Ser Thr Gly Leu
805 810 815

Thr Glu Ala Asp Glu Ala Ser Val Phe Val Val Gly Thr Val Leu Tyr
820 825 830

Arg Asn Leu Gly Ser Phe Leu Ala Leu Gln Arg Asn Thr Thr Val Leu
835 840 845

Asn Ser Lys Val Ile Ser Val Thr Val Lys Pro Pro Pro Arg Ser Leu
850 855 860

Arg Thr Pro Leu Glu Ile Glu Phe Ala His Met Tyr Asn Gly Thr Thr
865 870 875 880

Asn Gln Thr Cys Ile Leu Trp Asp Glu Thr Asp Val Pro Ser Ser Ser

ES 2 569 484 T3

			885					890						895		
Ala	Pro	Pro	Gln	Leu	Gly	Pro	Trp	Ser	Trp	Arg	Gly	Cys	Arg	Thr	Val	
			900					905					910			
Pro	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	Arg	Cys	Leu	Cys	Asp	Arg	Leu	Ser	Thr	
		915					920				925					
Phe	Ala	Ile	Leu	Ala	Gln	Leu	Ser	Ala	Asp	Ala	Asn	Met	Glu	Lys	Ala	
	930					935					940					
Thr	Leu	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Ile	Val	Gly	Cys	Gly	Val	Ser	Ser	Leu	
945					950					955					960	
Thr	Leu	Leu	Met	Leu	Val	Ile	Ile	Tyr	Val	Ser	Val	Trp	Arg	Tyr	Ile	
				965					970					975		
Arg	Ser	Glu	Arg	Ser	Val	Ile	Leu	Ile	Asn	Phe	Cys	Leu	Ser	Ile	Ile	
			980					985					990			
Ser	Ser	Asn	Ala	Leu	Ile	Leu	Ile	Gly	Gln	Thr	Gln	Thr	Arg	Asn	Iy	
		995					1000					1005				
Val	Val	Cys	Thr	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Leu	His	Phe	Phe	Phe	Leu		
	1010					1015					1020					
Ser	Ser	Phe	Cys	Trp	Val	Leu	Thr	Glu	Ala	Trp	Gln	Ser	Tyr	Met		
	1025					1030					1035					
Ala	Val	Thr	Gly	His	Leu	Arg	Asn	Arg	Leu	Ile	Arg	Lys	Arg	Phe		
	1040					1045					1050					
Leu	Cys	Leu	Gly	Trp	Gly	Leu	Pro	Ala	Leu	Val	Val	Ala	Ile	Ser		
	1055					1060					1065					
Val	Gly	Phe	Thr	Lys	Ala	Lys	Gly	Tyr	Ser	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys		
	1070					1075					1080					
Trp	Leu	Ser	Leu	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe	Val	Gly	Pro		
	1085					1090					1095					
Ala	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Val	Asn	Met	Val	Ile	Gly	Ile	Leu	Val		
	1100					1105					1110					
Phe	Asn	Lys	Leu	Val	Ser	Lys	Asp	Gly	Ile	Thr	Asp	Lys	Lys	Leu		
	1115					1120					1125					

ES 2 569 484 T3

Lys Glu Arg Ala Gly Ala Ser Leu Trp Ser Ser Cys Val Val Leu
1130 1135 1140

Pro Leu Leu Ala Leu Thr Trp Met Ser Ala Val Leu Ala Val Thr
1145 1150 1155

Asp Arg Arg Ser Ala Leu Phe Gln Ile Leu Phe Ala Val Phe Asp
1160 1165 1170

Ser Leu Glu Gly Phe Val Ile Val Met Val His Cys Ile Leu Arg
1175 1180 1185

Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Cys Arg Val Val Asp Arg Gln
1190 1195 1200

Glu Glu Gly Asn Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Gln Asn Gly His
1205 1210 1215

Ala Gln Leu Met Thr Asp Phe Glu Lys Asp Val Asp Leu Ala Cys
1220 1225 1230

Arg Ser Val Leu Asn Lys Asp Ile Ala Ala Cys Arg Thr Ala Thr
1235 1240 1245

Ile Thr Gly Thr Leu Lys Arg Pro Ser Leu Pro Glu Glu Glu Lys
1250 1255 1260

Leu Lys Leu Ala His Ala Lys Gly Pro Pro Thr Asn Phe Asn Ser
1265 1270 1275

Leu Pro Ala Asn Val Ser Lys Leu His Leu His Gly Ser Pro Arg
1280 1285 1290

Tyr Pro Gly Gly Pro Leu Pro Asp Phe Pro Asn His Ser Leu Thr
1295 1300 1305

Leu Lys Arg Asp Lys Ala Pro Lys Ser Ser Phe Val Gly Asp Gly
1310 1315 1320

Asp Ile Phe Lys Lys Leu Asp Ser Glu Leu Ser Arg Ala Gln Glu
1325 1330 1335

Lys Ala Leu Asp Thr Ser Tyr Val Ile Leu Pro Thr Ala Thr Ala
1340 1345 1350

ES 2 569 484 T3

Thr Leu Arg Pro Lys Pro Lys Glu Glu Pro Lys Tyr Ser Ile His
 1355 1360 1365

Ile Asp Gln Met Pro Gln Thr Arg Leu Ile His Leu Ser Thr Ala
 1370 1375 1380

Pro Glu Ala Ser Leu Pro Ala Arg Ser Pro Pro Ser Arg Gln Pro
 1385 1390 1395

Pro Ser Gly Gly Pro Pro Glu Ala Pro Pro Ala Gln Pro Pro Pro
 1400 1405 1410

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Pro Leu Pro Pro
 1415 1420 1425

Pro Pro Asn Leu Glu Pro Ala Pro Pro Ser Leu Gly Asp Pro Gly
 1430 1435 1440

Glu Pro Ala Ala His Pro Gly Pro Ser Thr Gly Pro Ser Thr Lys
 1445 1450 1455

Asn Glu Asn Val Ala Thr Leu Ser Val Ser Ser Leu Glu Arg Arg
 1460 1465 1470

Lys Ser Arg Tyr Ala Glu Leu Asp Phe Glu Lys Ile Met His Thr
 1475 1480 1485

Arg Lys Arg His Gln Asp Met Phe Gln Asp Leu Asn Arg Lys Leu
 1490 1495 1500

Gln His Ala Ala Glu Lys Asp Lys Glu Val Leu Gly Pro Asp Ser
 1505 1510 1515

Lys Pro Glu Lys Gln Gln Thr Pro Asn Lys Arg Pro Trp Glu Ser
 1520 1525 1530

Leu Arg Lys Ala His Gly Thr Pro Thr Trp Val Lys Lys Glu Leu
 1535 1540 1545

Glu Pro Leu Gln Pro Ser Pro Leu Glu Leu Arg Ser Val Glu Trp
 1550 1555 1560

Glu Arg Ser Gly Ala Thr Ile Pro Leu Val Gly Gln Asp Ile Ile
 1565 1570 1575

ES 2 569 484 T3

Asp Leu Gln Thr Glu Val
1580

5 <210> 2
<211> 926
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 569 484 T3

Met Arg Gly Gln Ala Ala Ala Pro Gly Pro Val Trp Ile Leu Ala Pro
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Arg Arg Ala Arg Ala Ala Ala
20 25 30

Gly Ala Asp Ala Gly Pro Gly Pro Glu Pro Cys Ala Thr Leu Val Gln
35 40 45

Gly Lys Phe Phe Gly Tyr Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Pro Ala Asn
50 55 60

Ala Ser Arg Cys Ser Trp Thr Leu Arg Asn Pro Asp Pro Arg Arg Tyr
65 70 75 80

Thr Leu Tyr Met Lys Val Ala Lys Ala Pro Val Pro Cys Ser Gly Pro
85 90 95

Gly Arg Val Arg Thr Tyr Gln Phe Asp Ser Phe Leu Glu Ser Thr Arg
100 105 110

Thr Tyr Leu Gly Val Glu Ser Phe Asp Glu Val Leu Arg Leu Cys Asp
115 120 125

Pro Ser Ala Pro Leu Ala Phe Leu Gln Ala Ser Lys Gln Phe Leu Gln
130 135 140

Met Arg Arg Gln Gln Pro Pro Gln His Asp Gly Leu Arg Pro Arg Ala
145 150 155 160

Gly Pro Pro Gly Pro Thr Asp Asp Phe Ser Val Glu Tyr Leu Val Val
165 170 175

Gly Asn Arg Asn Pro Ser Arg Ala Ala Cys Gln Met Leu Cys Arg Trp
180 185 190

Leu Asp Ala Cys Leu Ala Gly Ser Arg Ser Ser His Pro Cys Gly Ile
195 200 205

ES 2 569 484 T3

Met Gln Thr Pro Cys Ala Cys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Gly Pro Ala
 210 215 220

Ala Gly Pro Leu Ala Pro Arg Gly Asp Val Cys Leu Arg Asp Ala Val
 225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Glu Asn Cys Leu Thr Ser Leu Thr Gln Asp Arg Gly
 245 250 255

Gly His Gly Ala Thr Gly Gly Trp Lys Leu Trp Ser Leu Trp Gly Glu
 260 265 270

Cys Thr Arg Asp Cys Gly Gly Gly Leu Gln Thr Arg Thr Arg Thr Cys
 275 280 285

Leu Pro Ala Pro Gly Val Glu Gly Gly Gly Cys Glu Gly Val Leu Glu
 290 295 300

Glu Gly Arg Gln Cys Asn Arg Glu Ala Cys Gly Pro Ala Gly Arg Thr
 305 310 315 320

Ser Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg Ser Thr Asp Ala Arg Arg Arg Glu
 325 330 335

Glu Leu Gly Asp Glu Leu Gln Gln Phe Gly Phe Pro Ala Pro Gln Thr
 340 345 350

Gly Asp Pro Ala Ala Glu Glu Trp Ser Pro Trp Ser Val Cys Ser Ser
 355 360 365

Thr Cys Gly Glu Gly Trp Gln Thr Arg Thr Arg Phe Cys Val Ser Ser
 370 375 380

Ser Tyr Ser Thr Gln Cys Ser Gly Pro Leu Arg Glu Gln Arg Leu Cys
 385 390 395 400

Asn Asn Ser Ala Val Cys Pro Val His Gly Ala Trp Asp Glu Trp Ser
 405 410 415

Pro Trp Ser Leu Cys Ser Ser Thr Cys Gly Arg Gly Phe Arg Asp Arg
 420 425 430

Thr Arg Thr Cys Arg Pro Pro Gln Phe Gly Gly Asn Pro Cys Glu Gly
 435 440 445

ES 2 569 484 T3

Pro Glu Lys Gln Thr Lys Phe Cys Asn Ile Ala Leu Cys Pro Gly Arg
450 455 460

Ala Val Asp Gly Asn Trp Asn Glu Trp Ser Ser Trp Ser Ala Cys Ser
465 470 475 480

Ala Ser Cys Ser Gln Gly Arg Gln Gln Arg Thr Arg Glu Cys Asn Gly
485 490 495

Pro Ser Tyr Gly Gly Ala Glu Cys Gln Gly His Trp Val Glu Thr Arg
500 505 510

Asp Cys Phe Leu Gln Gln Cys Pro Val Asp Gly Lys Trp Gln Ala Trp
515 520 525

Ala Ser Trp Gly Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly Ala Gly Ser Gln Arg
530 535 540

Arg Glu Arg Val Cys Ser Gly Pro Phe Phe Gly Gly Ala Ala Cys Gln
545 550 555 560

Gly Pro Gln Asp Glu Tyr Arg Gln Cys Gly Thr Gln Arg Cys Pro Glu
565 570 575

Pro His Glu Ile Cys Asp Glu Asp Asn Phe Gly Ala Val Ile Trp Lys
580 585 590

Glu Thr Pro Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Arg Cys Pro Arg Asn Ala
595 600 605

Thr Gly Leu Ile Leu Arg Arg Cys Glu Leu Asp Glu Glu Gly Ile Ala
610 615 620

Tyr Trp Glu Pro Pro Thr Tyr Ile Arg Cys Val Ser Ile Asp Tyr Arg
625 630 635 640

Asn Ile Gln Met Met Thr Arg Glu His Leu Ala Lys Ala Gln Arg Gly
645 650 655

Leu Pro Gly Glu Gly Val Ser Glu Val Ile Gln Thr Leu Val Glu Ile
660 665 670

Ser Gln Asp Gly Thr Ser Tyr Ser Gly Asp Leu Leu Ser Thr Ile Asp
675 680 685

ES 2 569 484 T3

Val Leu Arg Asn Met Thr Glu Ile Phe Arg Arg Ala Tyr Tyr Ser Pro
690 695 700

Thr Pro Gly Asp Val Gln Asn Phe Val Gln Ile Leu Ser Asn Leu Leu
705 710 715 720

Ala Glu Glu Asn Arg Asp Lys Trp Glu Glu Ala Gln Leu Ala Gly Pro
725 730 735

Asn Ala Lys Glu Leu Phe Arg Leu Val Glu Asp Phe Val Asp Val Ile
740 745 750

Gly Phe Arg Met Lys Asp Leu Arg Asp Ala Tyr Gln Val Thr Asp Asn
755 760 765

Leu Val Leu Ser Ile His Lys Leu Pro Ala Ser Gly Ala Thr Asp Ile
770 775 780

Ser Phe Pro Met Lys Gly Trp Arg Ala Thr Gly Asp Trp Ala Lys Val
785 790 795 800

Pro Glu Asp Arg Val Thr Val Ser Lys Ser Val Phe Ser Thr Gly Leu
805 810 815

Thr Glu Ala Asp Glu Ala Ser Val Phe Val Val Gly Thr Val Leu Tyr
820 825 830

Arg Asn Leu Gly Ser Phe Leu Ala Leu Gln Arg Asn Thr Thr Val Leu
835 840 845

Asn Ser Lys Val Ile Ser Val Thr Val Lys Pro Pro Pro Arg Ser Leu
850 855 860

Arg Thr Pro Leu Glu Ile Glu Phe Ala His Met Tyr Asn Gly Thr Thr
865 870 875 880

Asn Gln Thr Cys Ile Leu Trp Asp Glu Thr Asp Val Pro Ser Ser Ser
885 890 895

Ala Pro Pro Gln Leu Gly Pro Trp Ser Trp Arg Gly Cys Arg Thr Val
900 905 910

Pro Leu Asp Ala Leu Arg Thr Arg Cys Leu Cys Asp Arg Leu
915 920 925

<210> 3
<211> 328
<212> PRT

ES 2 569 484 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```

Met Arg Gly Gln Ala Ala Ala Pro Gly Pro Val Trp Ile Leu Ala Pro
1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Arg Arg Ala Arg Ala Ala Ala
20          25          30

Gly Ala Asp Ala Gly Pro Gly Pro Glu Pro Cys Ala Thr Leu Val Gln
35          40          45

Gly Lys Phe Phe Gly Tyr Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Pro Ala Asn
50          55          60

Ala Ser Arg Cys Ser Trp Thr Leu Arg Asn Pro Asp Pro Arg Arg Tyr
65          70          75          80

Thr Leu Tyr Met Lys Val Ala Lys Ala Pro Val Pro Cys Ser Gly Pro
85          90          95

Gly Arg Val Arg Thr Tyr Gln Phe Asp Ser Phe Leu Glu Ser Thr Arg
100         105         110

Thr Tyr Leu Gly Val Glu Ser Phe Asp Glu Val Leu Arg Leu Cys Asp
115         120         125

Pro Ser Ala Pro Leu Ala Phe Leu Gln Ala Ser Lys Gln Phe Leu Gln
130         135         140

Met Arg Arg Gln Gln Pro Pro Gln His Asp Gly Leu Arg Pro Arg Ala
145         150         155         160

Gly Pro Pro Gly Pro Thr Asp Asp Phe Ser Val Glu Tyr Leu Val Val
165         170         175

Gly Asn Arg Asn Pro Ser Arg Ala Ala Cys Gln Met Leu Cys Arg Trp
180         185         190

Leu Asp Ala Cys Leu Ala Gly Ser Arg Ser Ser His Pro Cys Gly Ile
195         200         205

Met Gln Thr Pro Cys Ala Cys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Gly Pro Ala
210         215         220

```

ES 2 569 484 T3

Ala Gly Pro Leu Ala Pro Arg Gly Asp Val Cys Leu Arg Asp Ala Val
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Glu Asn Cys Leu Thr Ser Leu Thr Gln Asp Arg Gly
245 250 255

Gly His Gly Ala Thr Gly Gly Trp Lys Leu Trp Ser Leu Trp Gly Glu
260 265 270

Cys Thr Arg Asp Cys Gly Gly Gly Leu Gln Thr Arg Thr Arg Thr Cys
275 280 285

Leu Pro Ala Pro Gly Val Glu Gly Gly Gly Cys Glu Gly Val Leu Glu
290 295 300

Glu Gly Arg Gln Cys Asn Arg Glu Ala Cys Gly Pro Ala Gly Arg Thr
305 310 315 320

Ser Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
325

<210> 4

<211> 894

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 569 484 T3

Gly Ala Asp Ala Gly Pro Gly Pro Glu Pro Cys Ala Thr Leu Val Gln
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Phe Gly Tyr Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Pro Ala Asn
 20 25 30

Ala Ser Arg Cys Ser Trp Thr Leu Arg Asn Pro Asp Pro Arg Arg Tyr
 35 40 45

Thr Leu Tyr Met Lys Val Ala Lys Ala Pro Val Pro Cys Ser Gly Pro
 50 55 60

Gly Arg Val Arg Thr Tyr Gln Phe Asp Ser Phe Leu Glu Ser Thr Arg
 65 70 75 80

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

Pro Ser Ala Pro Leu Ala Phe Leu Gln Ala Ser Lys Gln Phe Leu Gln

ES 2 569 484 T3

	100	105	110												
Met	Arg	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Gln	His	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Arg	Ala
		115					120					125			
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Thr	Asp	Asp	Phe	Ser	Val	Glu	Tyr	Leu	Val	Val
	130					135					140				
Gly	Asn	Arg	Asn	Pro	Ser	Arg	Ala	Ala	Cys	Gln	Met	Leu	Cys	Arg	Trp
145					150					155					160
Leu	Asp	Ala	Cys	Leu	Ala	Gly	Ser	Arg	Ser	Ser	His	Pro	Cys	Gly	Ile
				165					170					175	
Met	Gln	Thr	Pro	Cys	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Ala
			180					185						190	
Ala	Gly	Pro	Leu	Ala	Pro	Arg	Gly	Asp	Val	Cys	Leu	Arg	Asp	Ala	Val
		195					200					205			
Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Asn	Cys	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Asp	Arg	Gly
	210					215						220			
Gly	His	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Trp	Lys	Leu	Trp	Ser	Leu	Trp	Gly	Glu
225					230					235					240
Cys	Thr	Arg	Asp	Cys	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Thr	Arg	Thr	Arg	Thr	Cys
				245					250						255
Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Glu	Gly	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Glu
			260					265					270		
Glu	Gly	Arg	Gln	Cys	Asn	Arg	Glu	Ala	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Arg	Thr
		275					280					285			
Ser	Ser	Arg	Ser	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Asp	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu
	290					295					300				
Glu	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Gln	Gln	Phe	Gly	Phe	Pro	Ala	Pro	Gln	Thr
305					310					315					320
Gly	Asp	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Trp	Ser	Pro	Trp	Ser	Val	Cys	Ser	Ser
				325					330					335	
Thr	Cys	Gly	Glu	Gly	Trp	Gln	Thr	Arg	Thr	Arg	Phe	Cys	Val	Ser	Ser
			340					345					350		

ES 2 569 484 T3

Ser Tyr Ser Thr Gln Cys Ser Gly Pro Leu Arg Glu Gln Arg Leu Cys
 355 360 365

Asn Asn Ser Ala Val Cys Pro Val His Gly Ala Trp Asp Glu Trp Ser
 370 375 380

Pro Trp Ser Leu Cys Ser Ser Thr Cys Gly Arg Gly Phe Arg Asp Arg
 385 390 395 400

Thr Arg Thr Cys Arg Pro Pro Gln Phe Gly Gly Asn Pro Cys Glu Gly
 405 410 415

Pro Glu Lys Gln Thr Lys Phe Cys Asn Ile Ala Leu Cys Pro Gly Arg
 420 425 430

Ala Val Asp Gly Asn Trp Asn Glu Trp Ser Ser Trp Ser Ala Cys Ser
 435 440 445

Ala Ser Cys Ser Gln Gly Arg Gln Gln Arg Thr Arg Glu Cys Asn Gly
 450 455 460

Pro Ser Tyr Gly Gly Ala Glu Cys Gln Gly His Trp Val Glu Thr Arg
 465 470 475 480

Asp Cys Phe Leu Gln Gln Cys Pro Val Asp Gly Lys Trp Gln Ala Trp
 485 490 495

Ala Ser Trp Gly Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly Ala Gly Ser Gln Arg
 500 505 510

Arg Glu Arg Val Cys Ser Gly Pro Phe Phe Gly Gly Ala Ala Cys Gln
 515 520 525

Gly Pro Gln Asp Glu Tyr Arg Gln Cys Gly Thr Gln Arg Cys Pro Glu
 530 535 540

Pro His Glu Ile Cys Asp Glu Asp Asn Phe Gly Ala Val Ile Trp Lys
 545 550 555 560

Glu Thr Pro Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Arg Cys Pro Arg Asn Ala
 565 570 575

Thr Gly Leu Ile Leu Arg Arg Cys Glu Leu Asp Glu Glu Gly Ile Ala
 580 585 590

ES 2 569 484 T3

Tyr Trp Glu Pro Pro Thr Tyr Ile Arg Cys Val Ser Ile Asp Tyr Arg
 595 600 605

Asn Ile Gln Met Met Thr Arg Glu His Leu Ala Lys Ala Gln Arg Gly
 610 615 620

Leu Pro Gly Glu Gly Val Ser Glu Val Ile Gln Thr Leu Val Glu Ile
 625 630 635 640

Ser Gln Asp Gly Thr Ser Tyr Ser Gly Asp Leu Leu Ser Thr Ile Asp
 645 650 655

Val Leu Arg Asn Met Thr Glu Ile Phe Arg Arg Ala Tyr Tyr Ser Pro
 660 665 670

Thr Pro Gly Asp Val Gln Asn Phe Val Gln Ile Leu Ser Asn Leu Leu
 675 680 685

Ala Glu Glu Asn Arg Asp Lys Trp Glu Glu Ala Gln Leu Ala Gly Pro
 690 695 700

Asn Ala Lys Glu Leu Phe Arg Leu Val Glu Asp Phe Val Asp Val Ile
 705 710 715 720

Gly Phe Arg Met Lys Asp Leu Arg Asp Ala Tyr Gln Val Thr Asp Asn
 725 730 735

Leu Val Leu Ser Ile His Lys Leu Pro Ala Ser Gly Ala Thr Asp Ile
 740 745 750

Ser Phe Pro Met Lys Gly Trp Arg Ala Thr Gly Asp Trp Ala Lys Val
 755 760 765

Pro Glu Asp Arg Val Thr Val Ser Lys Ser Val Phe Ser Thr Gly Leu
 770 775 780

Thr Glu Ala Asp Glu Ala Ser Val Phe Val Val Gly Thr Val Leu Tyr
 785 790 795 800

Arg Asn Leu Gly Ser Phe Leu Ala Leu Gln Arg Asn Thr Thr Val Leu
 805 810 815

Asn Ser Lys Val Ile Ser Val Thr Val Lys Pro Pro Pro Arg Ser Leu
 820 825 830

ES 2 569 484 T3

Arg Thr Pro Leu Glu Ile Glu Phe Ala His Met Tyr Asn Gly Thr Thr
835 840 845

Asn Gln Thr Cys Ile Leu Trp Asp Glu Thr Asp Val Pro Ser Ser Ser
850 855 860

Ala Pro Pro Gln Leu Gly Pro Trp Ser Trp Arg Gly Cys Arg Thr Val
865 870 875 880

Pro Leu Asp Ala Leu Arg Thr Arg Cys Leu Cys Asp Arg Leu
885 890

<210> 5

<211> 296

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 569 484 T3

Gly Ala Asp Ala Gly Pro Gly Pro Glu Pro Cys Ala Thr Leu Val Gln
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Phe Gly Tyr Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Pro Ala Asn
 20 25 30

Ala Ser Arg Cys Ser Trp Thr Leu Arg Asn Pro Asp Pro Arg Arg Tyr
 35 40 45

Thr Leu Tyr Met Lys Val Ala Lys Ala Pro Val Pro Cys Ser Gly Pro
 50 55 60

Gly Arg Val Arg Thr Tyr Gln Phe Asp Ser Phe Leu Glu Ser Thr Arg
 65 70 75 80

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

Pro Ser Ala Pro Leu Ala Phe Leu Gln Ala Ser Lys Gln Phe Leu Gln
 100 105 110

Met Arg Arg Gln Gln Pro Pro Gln His Asp Gly Leu Arg Pro Arg Ala
 115 120 125

Gly Pro Pro Gly Pro Thr Asp Asp Phe Ser Val Glu Tyr Leu Val Val
 130 135 140

Gly Asn Arg Asn Pro Ser Arg Ala Ala Cys Gln Met Leu Cys Arg Trp
 145 150 155 160

ES 2 569 484 T3

Leu Asp Ala Cys Leu Ala Gly Ser Arg Ser Ser His Pro Cys Gly Ile
165 170 175

Met Gln Thr Pro Cys Ala Cys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Gly Pro Ala
180 185 190

Ala Gly Pro Leu Ala Pro Arg Gly Asp Val Cys Leu Arg Asp Ala Val
195 200 205

Ala Gly Gly Pro Glu Asn Cys Leu Thr Ser Leu Thr Gln Asp Arg Gly
210 215 220

Gly His Gly Ala Thr Gly Gly Trp Lys Leu Trp Ser Leu Trp Gly Glu
225 230 235 240

Cys Thr Arg Asp Cys Gly Gly Gly Leu Gln Thr Arg Thr Arg Thr Cys
245 250 255

Leu Pro Ala Pro Gly Val Glu Gly Gly Gly Cys Glu Gly Val Leu Glu
260 265 270

Glu Gly Arg Gln Cys Asn Arg Glu Ala Cys Gly Pro Ala Gly Arg Thr
275 280 285

Ser Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
290 295

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido que comprende un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona entre el grupo de la SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 5, y variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3 o SEQ ID NO.: 5, con lo que el polipéptido se une a CD36 a través de la repetición de trombospondina de tipo 1 e inhibe la angiogénesis.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 3.
3. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico heterólogo unido de forma operativa a una región de regulación genética, codificando dicho ácido nucleico heterólogo un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 5, o variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3 o SEQ ID NO.: 5, en el que el polipéptido consiste en un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1, y con lo que el polipéptido se une a CD36 a través de la repetición de trombospondina de tipo 1 e inhibe la angiogénesis.
4. Un procedimiento de preparación de un polipéptido que inhibe la angiogénesis, que comprende:
- proporcionar un primer polipéptido, en el que el primer polipéptido es BAI1 que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 1, o un fragmento extracelular del mismo, en el que el fragmento extracelular tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 4, y variantes conservativas de las mismas que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 4; y poner en contacto el primer polipéptido con furina formando de ese modo un segundo polipéptido que consiste en un dominio de unión a integrina y una repetición de trombospondina de tipo 1.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el primer polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 2, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 2, y el segundo polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 3 y variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 3, o el primer polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 4, o variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 4, y el segundo polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.: 5, y variantes conservativas de la misma que tienen una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO.: 5.

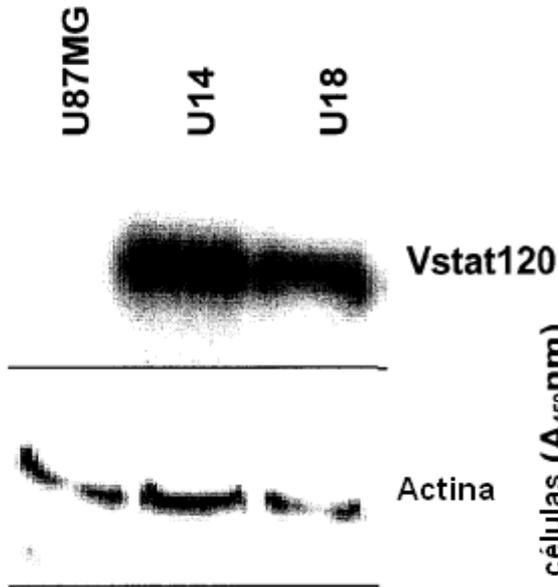


Fig. 1A

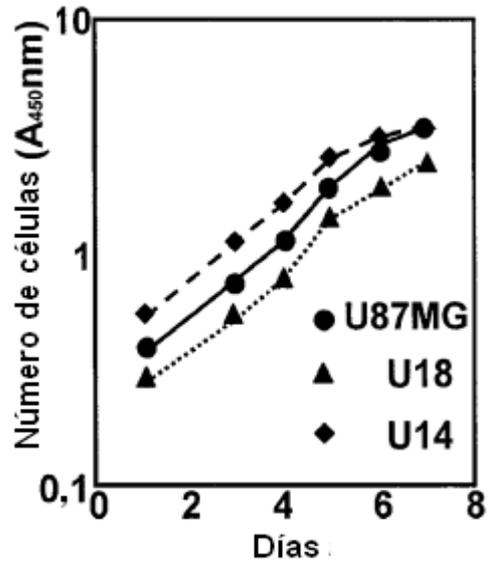


Fig. 1B

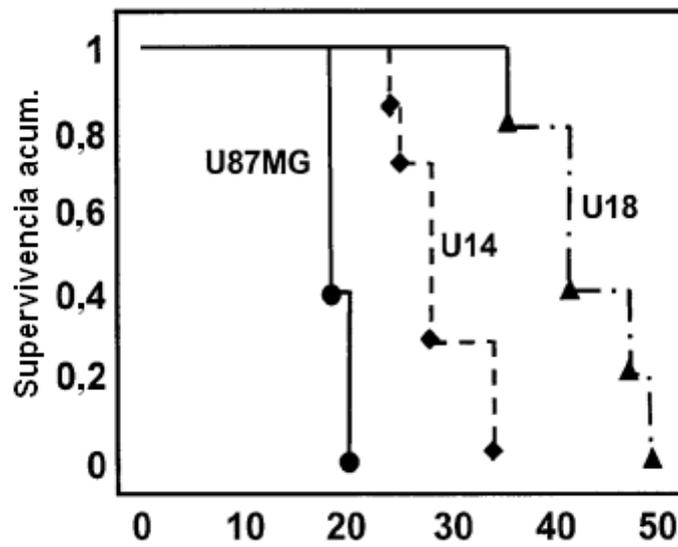
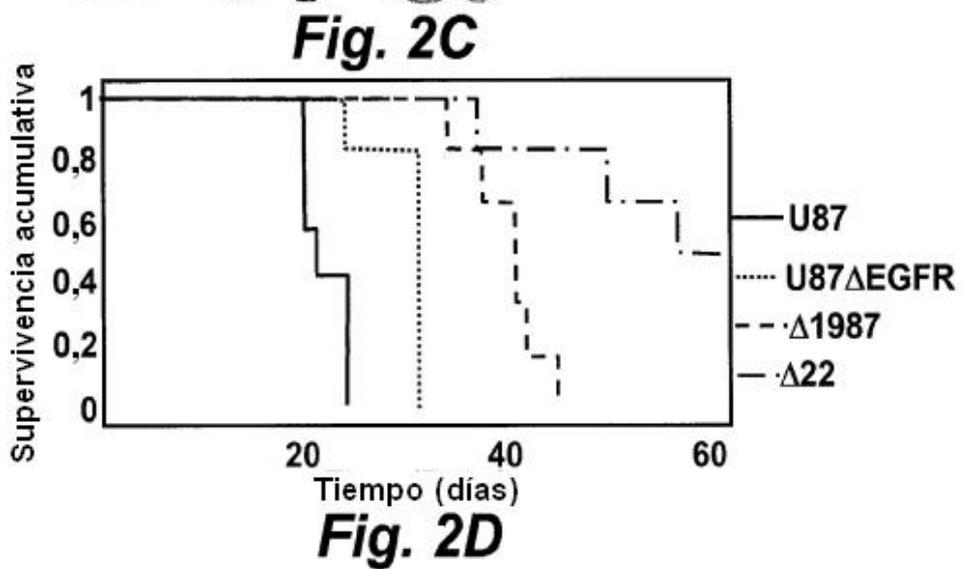
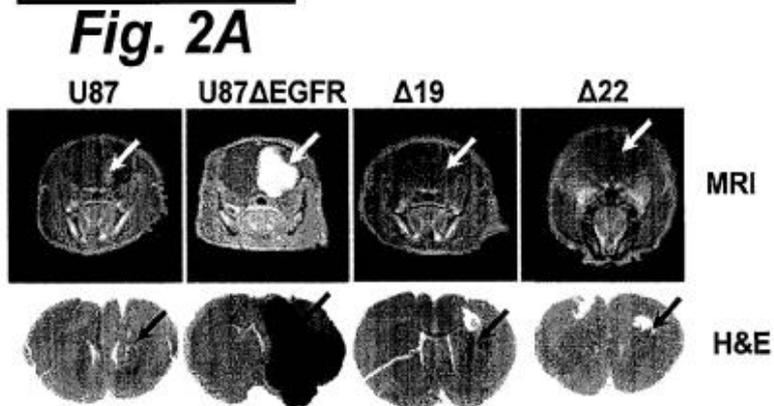
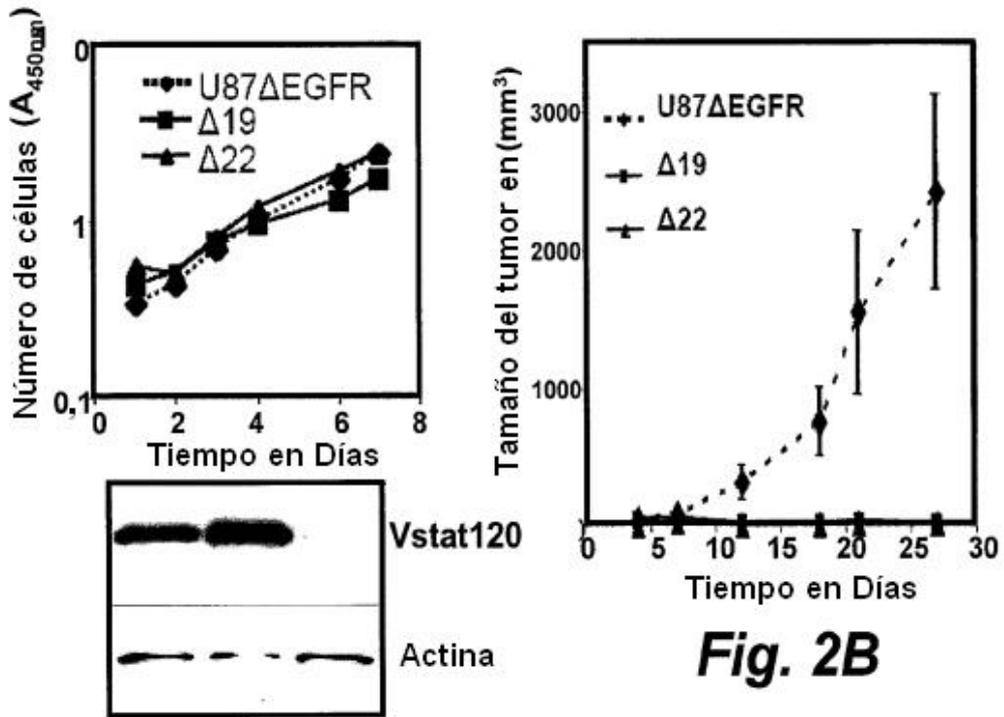
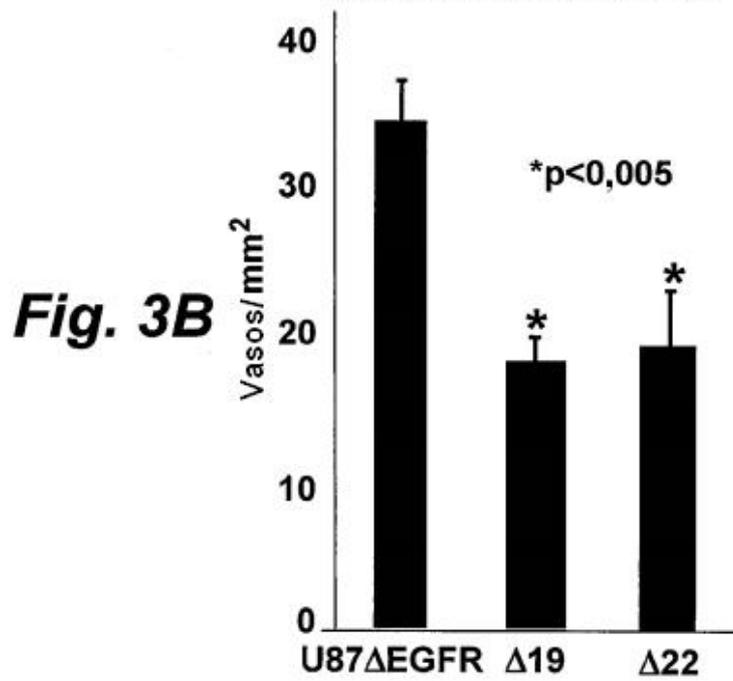
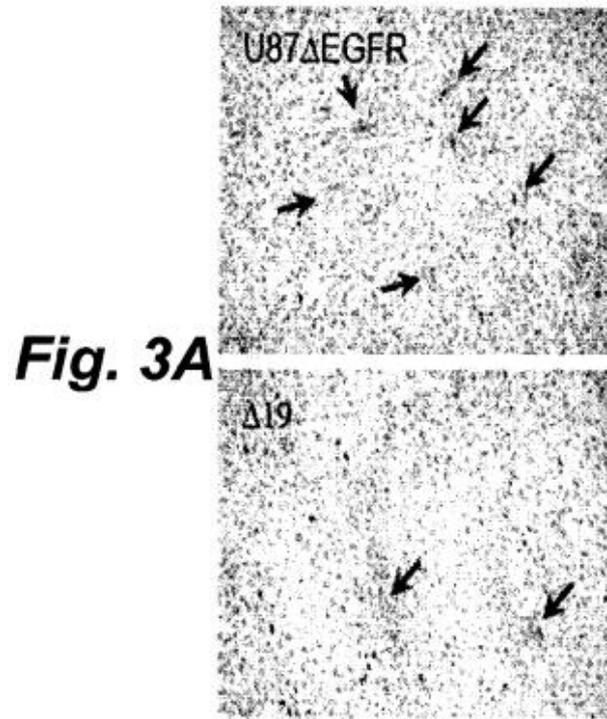


Fig. 1C





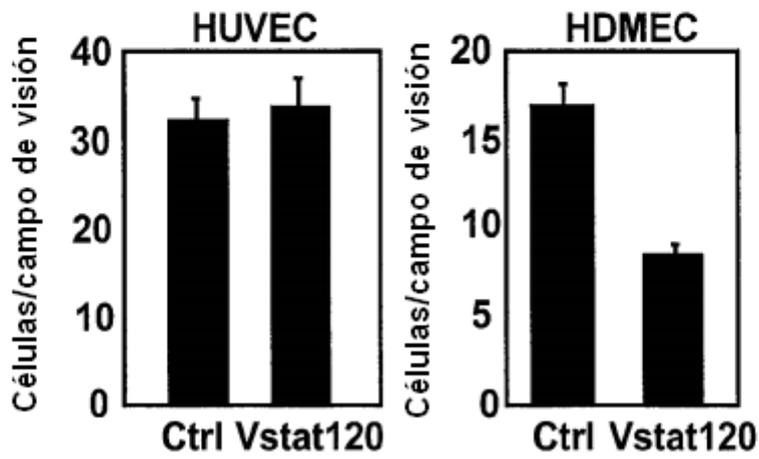
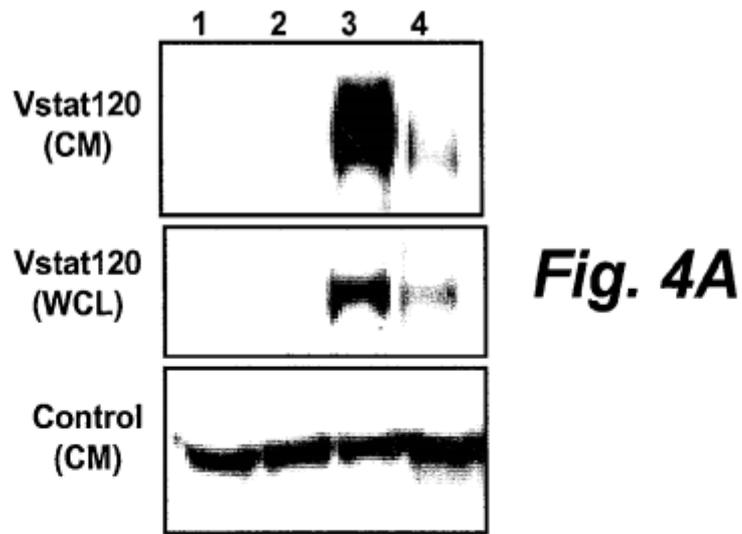


Fig. 4B

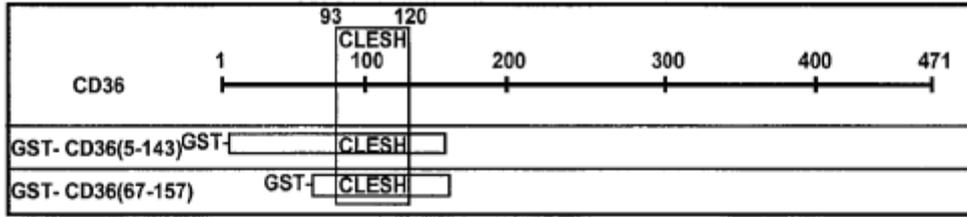


Fig. 5A

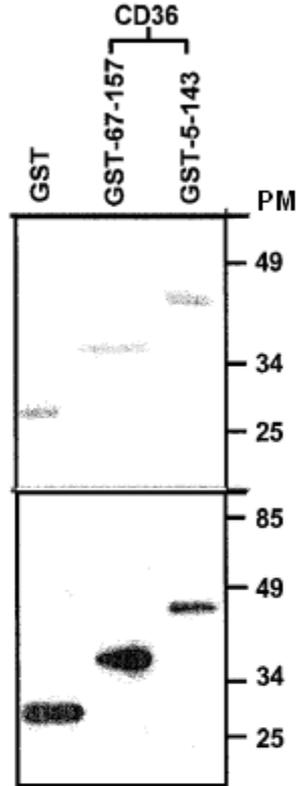


Fig. 5B

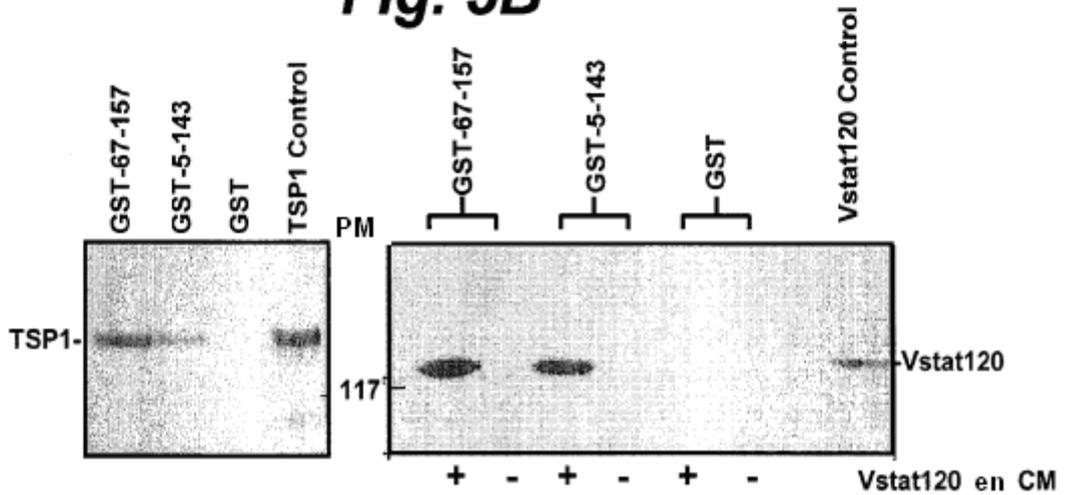


Fig. 5C

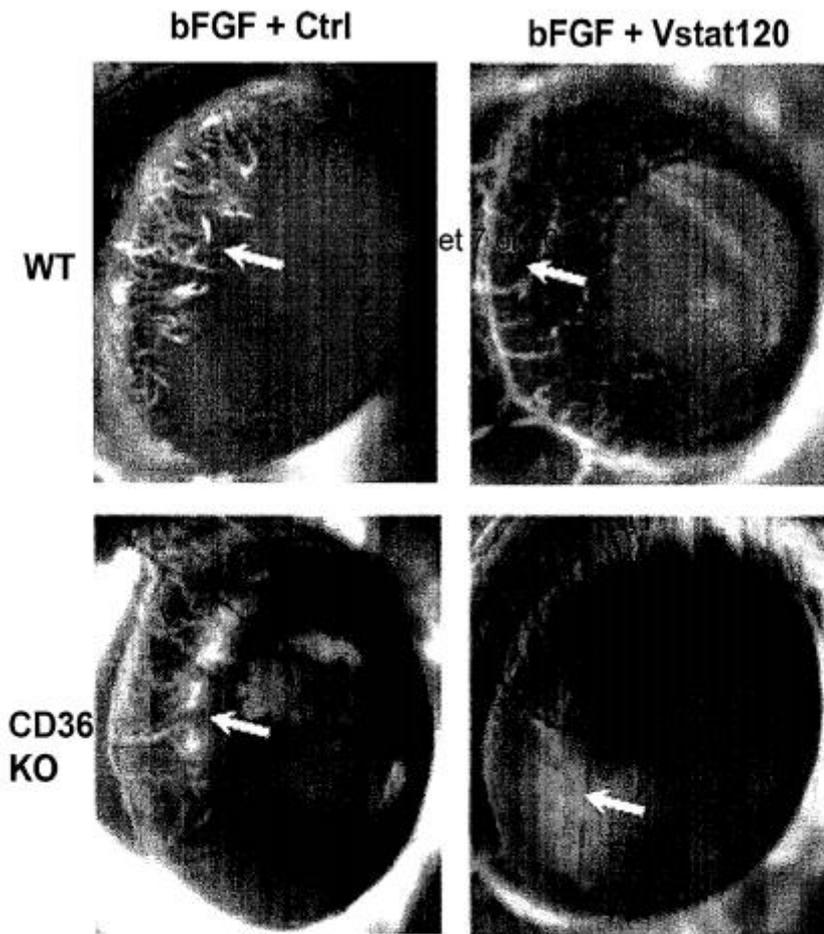


Fig. 6A

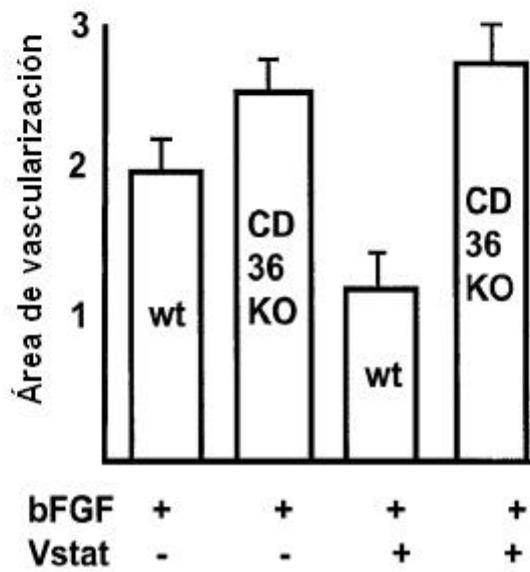


Fig. 6B

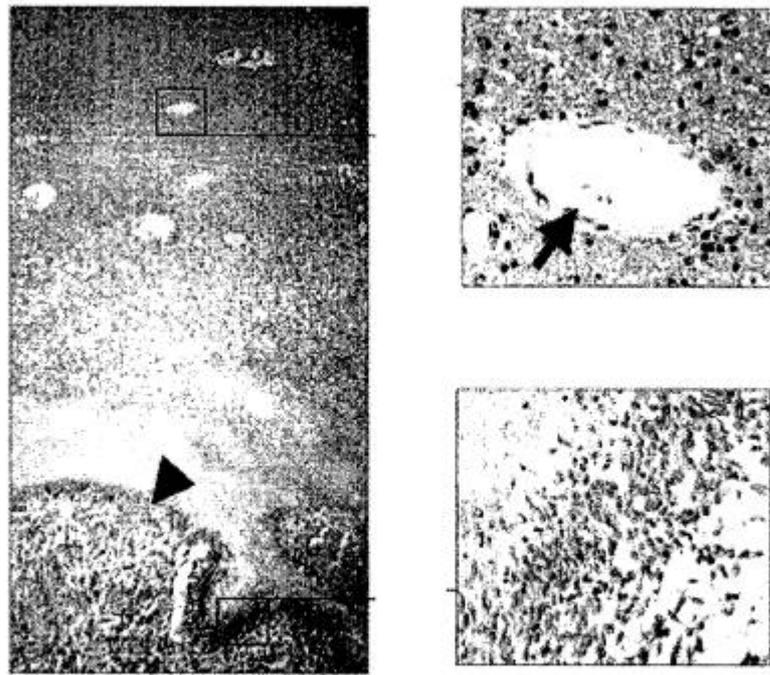


Fig. 7

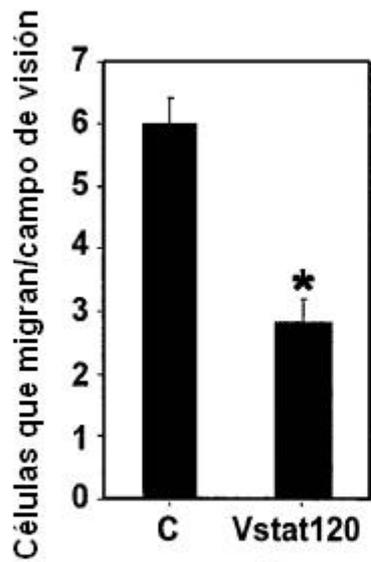


Fig. 8A

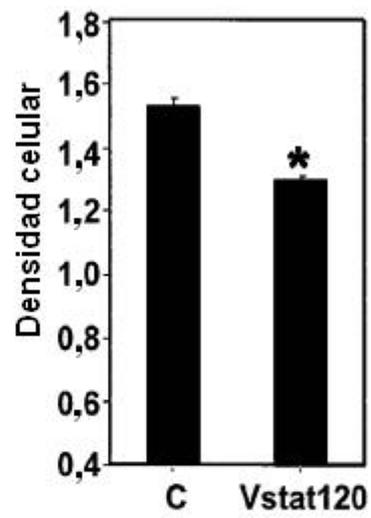


Fig. 8B

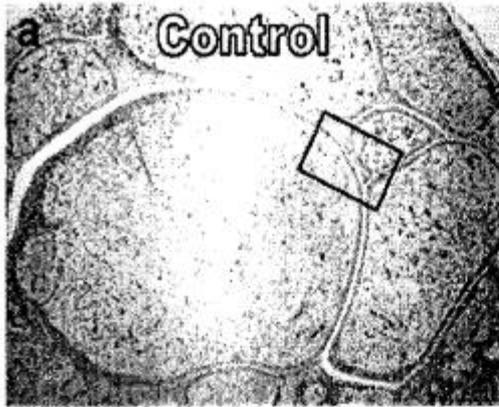


Fig. 9A

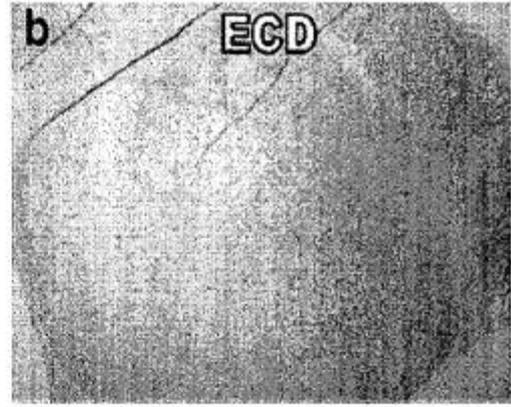


Fig. 9B

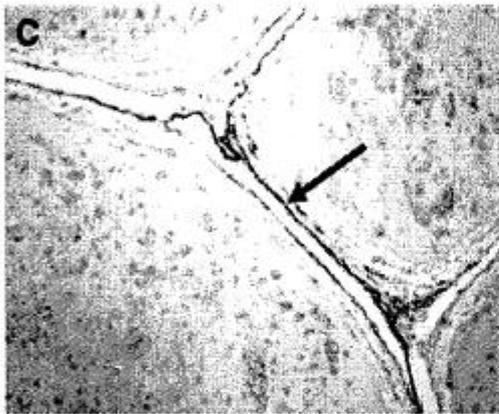


Fig. 9C

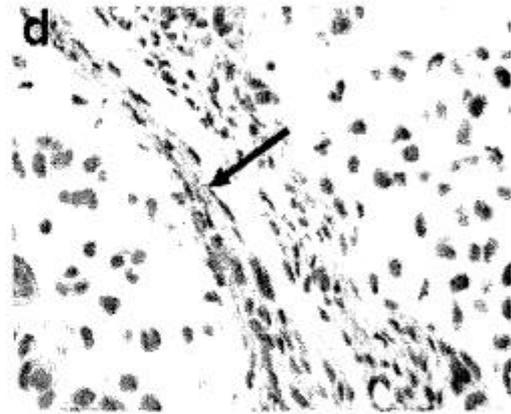


Fig. 9D

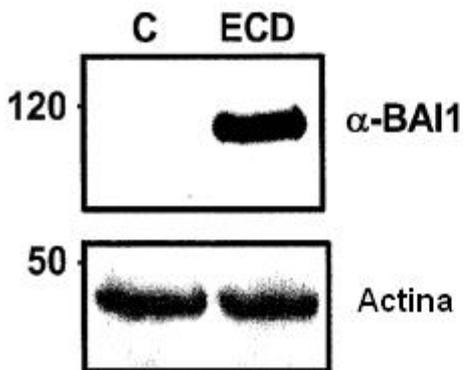


Fig. 9E

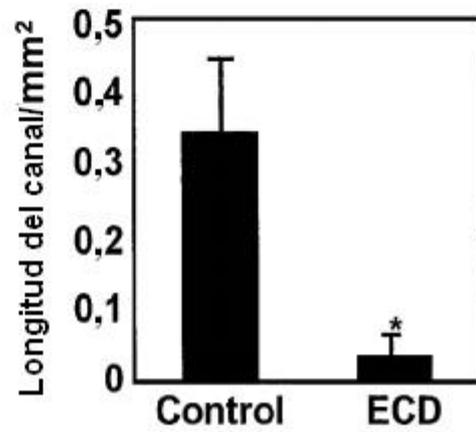


Fig. 9F

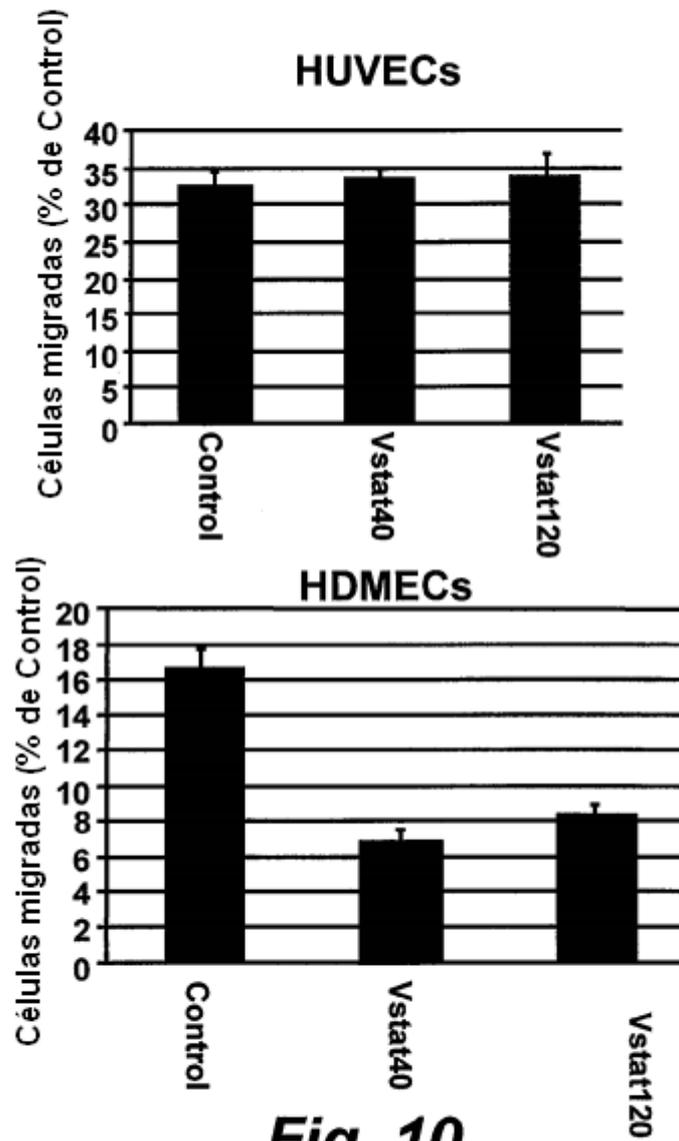


Fig. 10

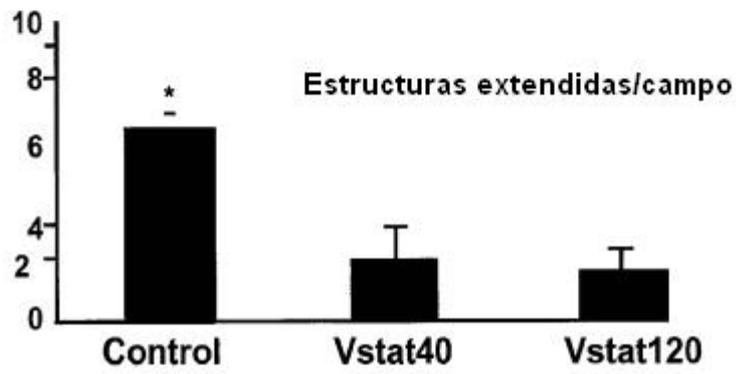
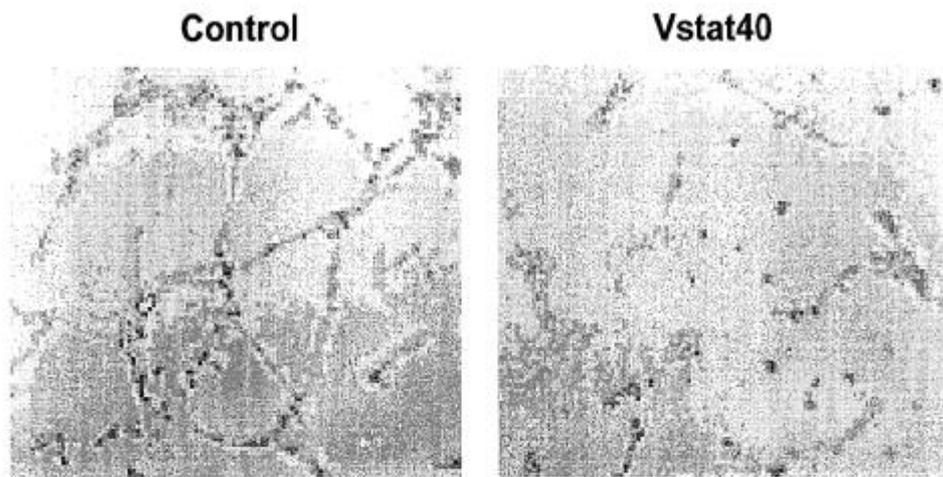


Fig. 11A

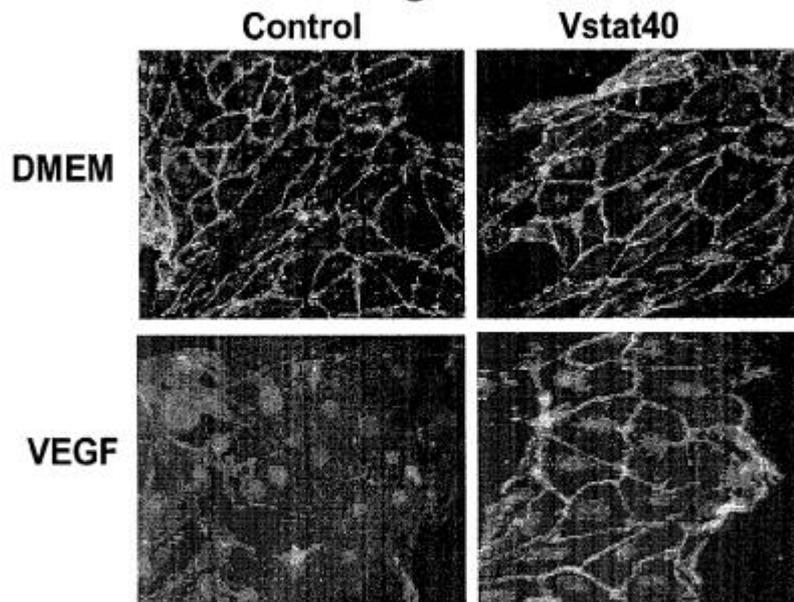


Fig. 11B

SEQ ID NO.: 1

1 mrgqaaagppvwilaplllllllllgrrraraaagadagpppepcatlvggkffgyfssaav
 61 fpanasrcswtlrnpdprrytlymkvakapvpcsgpgrvrttyqfdfsflestrtylgvesf
 121 devlrlcdpsaplaflqaskqflqmrqqppqhdglrpragppgptddfsveylvvgnrn
 181 psraacqmlcrwldaclagsrsshpcgimqtpcaclggeagppaagplaprgdvclrdav
 241 aggpenciltsltqdrghgatggWKLWSLWGECTRDGGLQTRTRTCLPAPGVEGGGCE
 301 GVLEEGRQCNREACgpagrtssrs~~qslrst~~darrreelgdellqqfgfpapqtdpaaeEW
 361 SPWSVCSSTCGEGWQTRTRFCVSSSYSTQCSGPLREQrlcnNSAVCPVHGAWDEWSPWSL
 421 CSSTCGRGRDRTRTRCRPPQFGGNPCEGPEKQtkfcniacpgravdgnwnewsswsacs
 481 ascsgRQQRTRRECNGPSYGAECQGHWVEtrdcfLQQCPVDGKWQAWASWGSCSVTCGA
 541 GSQRRERVCSGPFFFGGAACQGPQDEYrqcgtqrcpepheicdednfgaviwketpageva
 601 avrcprnatglilrrceldeegiaywepptyircvsidyrniqmmtrehlakaqrglpge
 661 gvseviqtlveisqdgtsysgdllstidvlrnmteifrraysptpgdvqnfvqilsnll
 721 aeenrdkweeaqlagpnakelfrlvedfvdvigfrmkdldrdayqvtndnlvlsihklpasg
 781 atdisfpmkgwratgdwakvpedrvtvsksvfstglteadeasfvvgtvlyrnlgfsla
 841 lqrnttvlnskvisvtvkppprslrtpleiefahmyngttn~~qtcilwdetdvpssappq~~
 901 ~~lgpwsrgcrtvpldalrtrclcdr~~lstfailaqlsadanmekatlpstlivgcgvssl
 961 tllmlviiyvsvwryirsersvilinfcslsiissnaliliggtqrnkvvctlvaaflhf
 1021 fflssfcwvltewqsymavtghlrnlirkrfclqwgplalvvaisvgftkakgystm
 1081 nycwlslegglyafvgpaaavlvnmvigilvfnklvskdgitdkklkeragaslwssc
 1141 vvlplllaltwmsavlavtdrrsalfqilfavfdfslegfviwvhcilorrevqdvkcrvv
 1201 drqeegnsgsggsfqnghaqlmtdfekdvdlacrsvlnkdiaacrtatitgtlkrpslpe
 1261 eekklalahakgpptnfnsipanvsklhhlhgspryppgplpdfpnhsltlkrdkapksfv
 1321 gdgdifkkldeelsraqekaldtsyvilptatatlrpkpkeepkysihidqmpqtrlihl
 1381 stapeaslparsppsrqppsggpeappaqpppppppppppppppppppppppppppppppp
 1441 dpgepaahppgstgpkstknenvatlsvsslerrksryaeldfekimhtrkrhqdmfkdln
 1501 rklqhaaekdkevlqpdskpekqqtgnkrpweslrkahgtptwvkeleplqpsplelrs
 1561 vewersgatiplvgqdiidlqtev

Fig. 12

SEQ ID NO.: 2

1 mrgqaaagppvwilaplllllllllgrrraraaagadagpppepcatlvggkffgyfssaav
 61 fpanasrcswtlrnpdprrytlymkvakapvpcsgpgrvrttyqfdfsflestrtylgvesf
 121 devlrlcdpsaplaflqaskqflqmrqqppqhdglrpragppgptddfsveylvvgnrn
 181 psraacqmlcrwldaclagsrsshpcgimqtpcaclggeagppaagplaprgdvclrdav
 241 aggpenciltsltqdrghgatggWKLWSLWGECTRDGGLQTRTRTCLPAPGVEGGGCE
 301 GVLEEGRQCNREACgpagrtssrs~~qslrst~~darrreelgdellqqfgfpapqtdpaaeEW
 361 SPWSVCSSTCGEGWQTRTRFCVSSSYSTQCSGPLREQrlcnNSAVCPVHGAWDEWSPWSL
 421 CSSTCGRGRDRTRTRCRPPQFGGNPCEGPEKQtkfcniacpgravdgnwnewsswsacs
 481 ascsgRQQRTRRECNGPSYGAECQGHWVEtrdcfLQQCPVDGKWQAWASWGSCSVTCGA
 541 GSQRRERVCSGPFFFGGAACQGPQDEYrqcgtqrcpepheicdednfgaviwketpageva
 601 avrcprnatglilrrceldeegiaywepptyircvsidyrniqmmtrehlakaqrglpge
 661 gvseviqtlveisqdgtsysgdllstidvlrnmteifrraysptpgdvqnfvqilsnll
 721 aeenrdkweeaqlagpnakelfrlvedfvdvigfrmkdldrdayqvtndnlvlsihklpasg
 781 atdisfpmkgwratgdwakvpedrvtvsksvfstglteadeasfvvgtvlyrnlgfsla
 841 lqrnttvlnskvisvtvkppprslrtpleiefahmyngttn~~qtcilwdetdvpssappq~~
 901 ~~lgpwsrgcrtvpldalrtrclcdr~~l

Fig. 13

SEQ ID NO.: 3

1 mrgqaaapgpvwilapllllllllgrrraaaagadagpppepcatlvggkffgyfsaaav
61 fpanasrcswtlrnpdprrytlymkvakapvpcsgpgrvrtyqfdsflestrtylgvesf
121 devlrlcdpsaplaflqaskqflqmrrqppqhdglrpragppgptddfsveylvvgnrn
181 psraacqmlcrwldaclagsrsshpcgimqtpcaclggeaggaagplaprgdvclrdav
241 aggpenciltsltqdrghgatggWKLWSLWGECTRDCGGGLQTRTRTCLPAPGVEGGGCE
301 GVLEEGRQC NREACgpagrtssrs~~qslr~~

Fig. 14

SEQ ID NO.: 4

gadagpppepcatlvggkffgyfsaaavfpanasrcswtlrnpdprrytlymkvakapvpcsg
pgrvrtyqfdsflestrtylgvesfdevlrlcdpsaplaflqaskqflqmrrqppqhdglrpr
ragppgptddfsveylvvgnrnpsraacqmlcrwldaclagsrsshpcgimqtpcaclggeag
gpaagplaprgdvclrdavaggpenciltsltqdrghgatggWKLWSLWGECTRDCGGGLQTR
TRTCLPAPGVEGGGCEGVLEEGRQC NREACgpagrtssrs~~qslr~~stdarrreelgdelqqfgf
papqtgdpaaeEWSFWSVCSSTCGEGWQTRTRFCVSSSYSTQCSGPLREQrlcnNSAVCPVHG
AWDEWSPWSLCSSTCGRGFRDRTRTRCRPPQFGGNPCEGPEKQtkfcniacpgravdgnwnew
sswsacsascsqGRQORTRECNGPSYGGAEQGHVVEtrdcfLQQCPVDGKQAWASWGSCSV
TCGAGSQRRERVC SGPPFFGGAACQGPQDEyrqcgtrcpepheicdednfgaviwketpagev
aavrcprnatglilrrceldeegiaywepptyircvsidyrniqmmtrehlakaqrglpgegv
seviqtlveisqdgtsysgdllstidvlrnmteifrrayysptpgdvqnfvqilsnllaeenr
dkweeaqlagpnakelfrlvedfvdvigfrmkdldayqvtdnlvlsihklpasgatdisfpm
kgwratgdwakvpedrvtvsksvfstglteadeasfvvgtvlyrnlgsflalqrnttvlnsk
visvtvkppprslrtpleiefahmyngttn~~qtcilwdetdvpssappqlgpwswrgcrtvpl~~
~~dalrtrclcdr1~~

Fig. 15

SEQ ID NO.: 5

adagpppepcatlvggkffgyfsaaavfpanasrcswtlrnpdprrytlymkvakapvpcsgp
grvrtyqfdsflestrtylgvesfdevlrlcdpsaplaflqaskqflqmrrqppqhdglrpr
agppgptddfsveylvvgnrnpsraacqmlcrwldaclagsrsshpcgimqtpcaclggeagg
paagplaprgdvclrdavaggpenciltsltqdrghgatggWKLWSLWGECTRDCGGGLQTRT
RTCLPAPGVEGGGCEGVLEEGRQC NREACgpagrtssrs~~qslr~~

Fig. 16

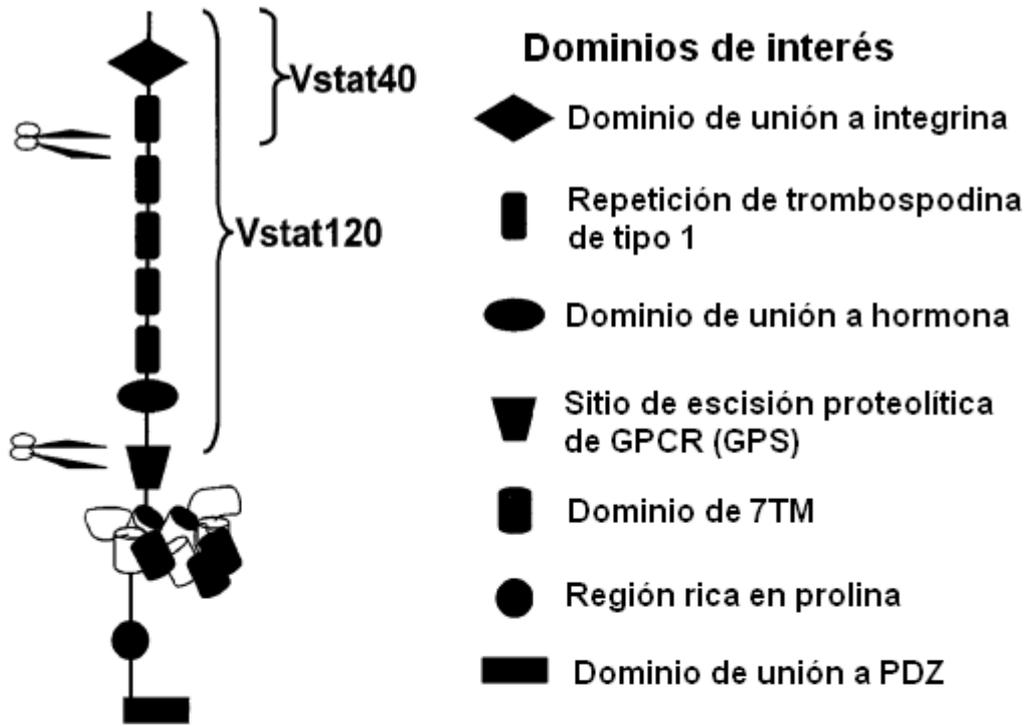
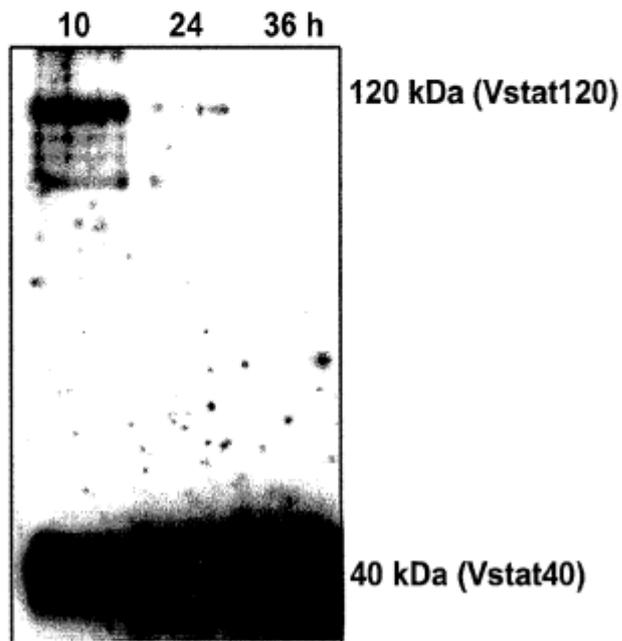


Fig. 17A



Medios acondicionados

Fig. 17B

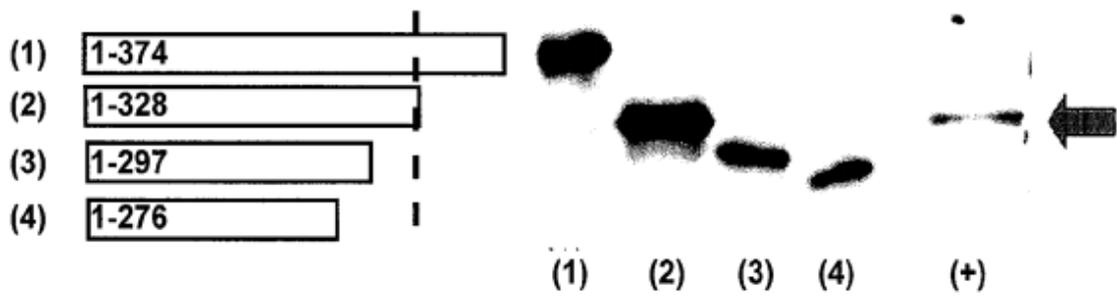


Fig. 18A



Fig. 18B

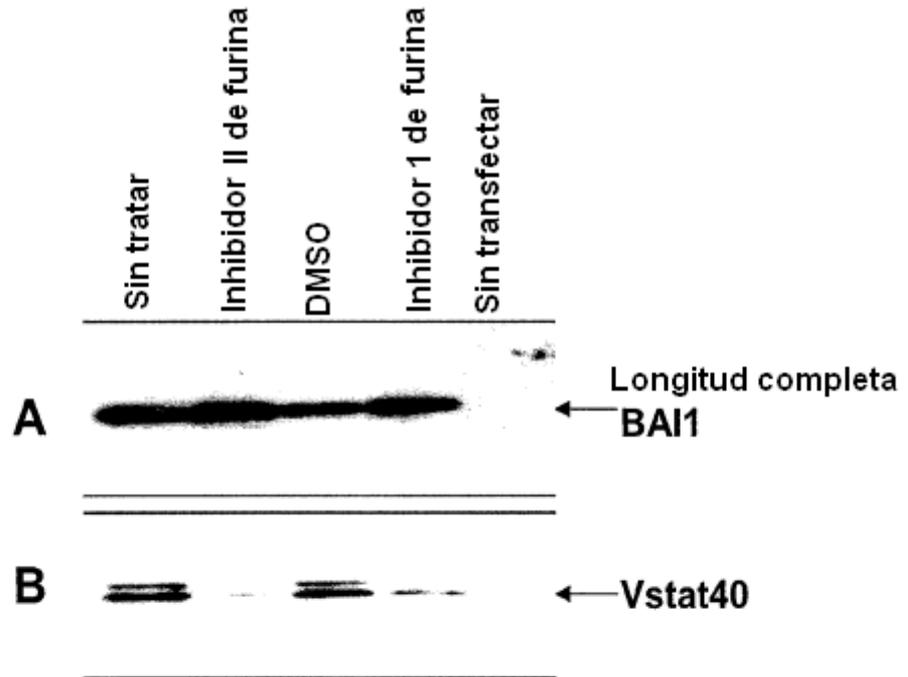


Fig. 19

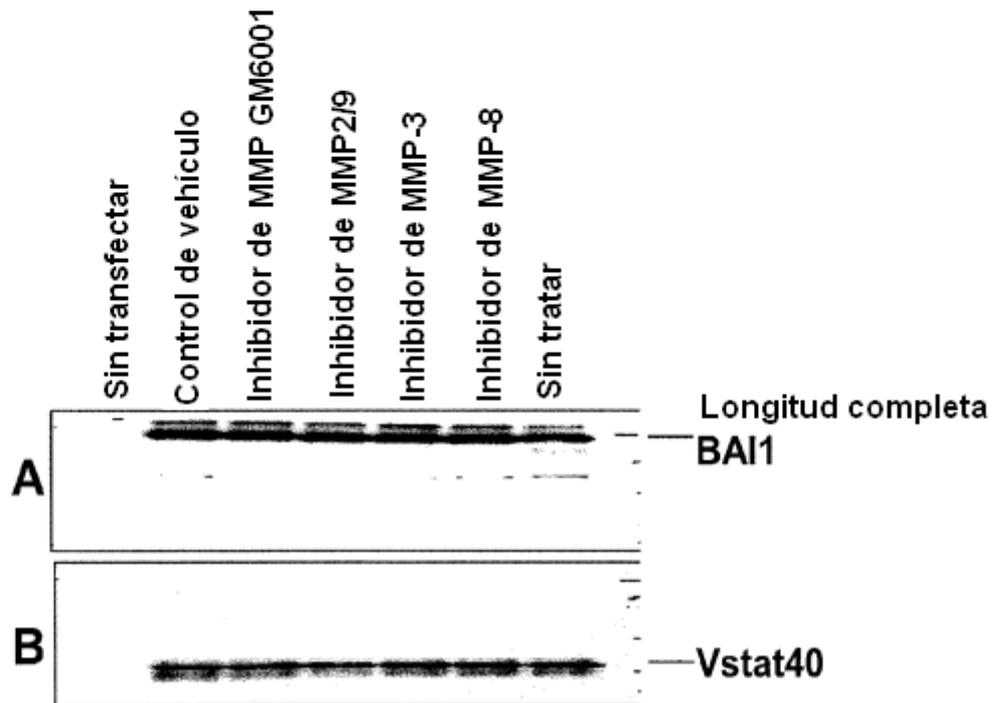


Fig. 20

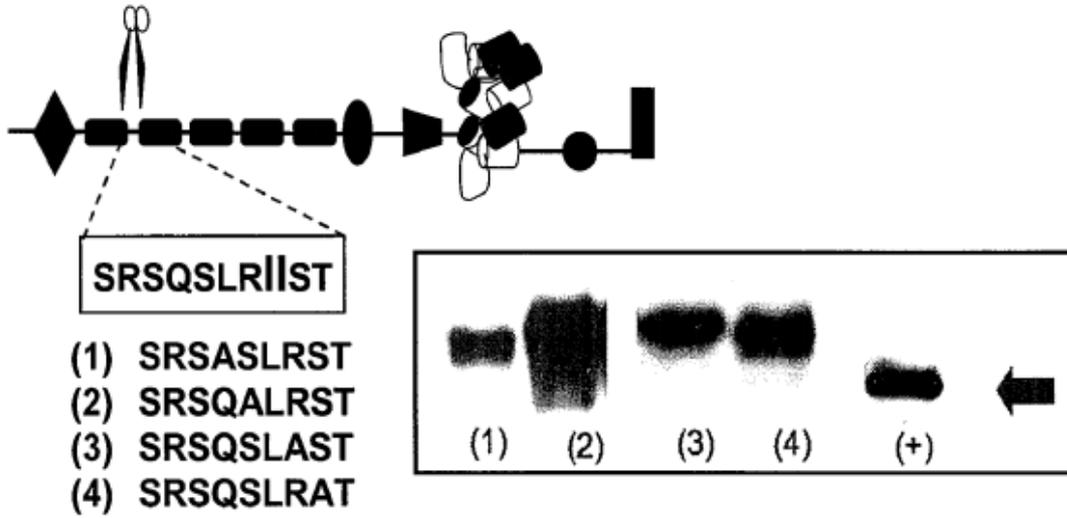


Fig. 21

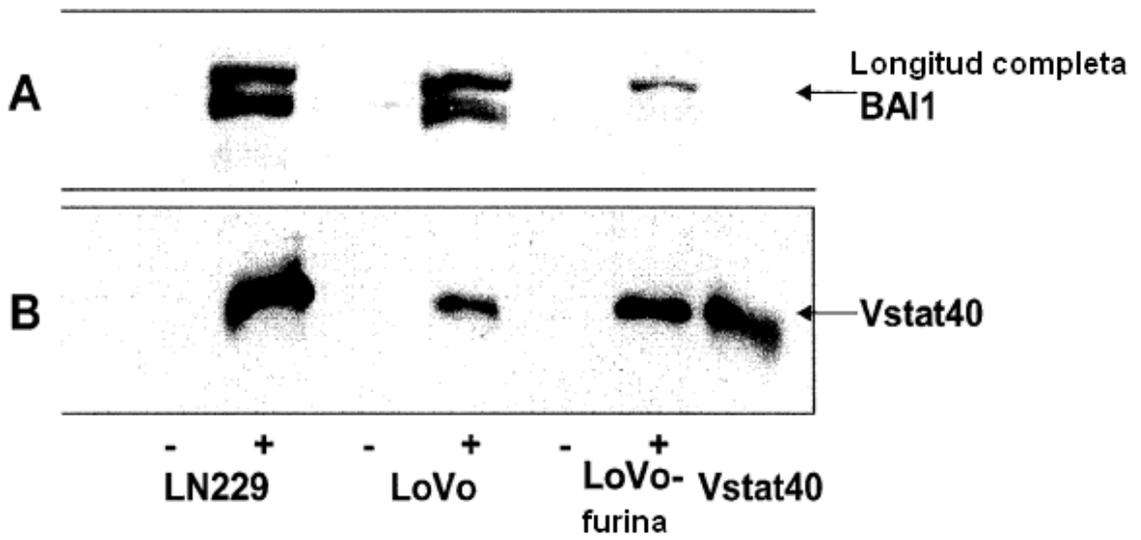
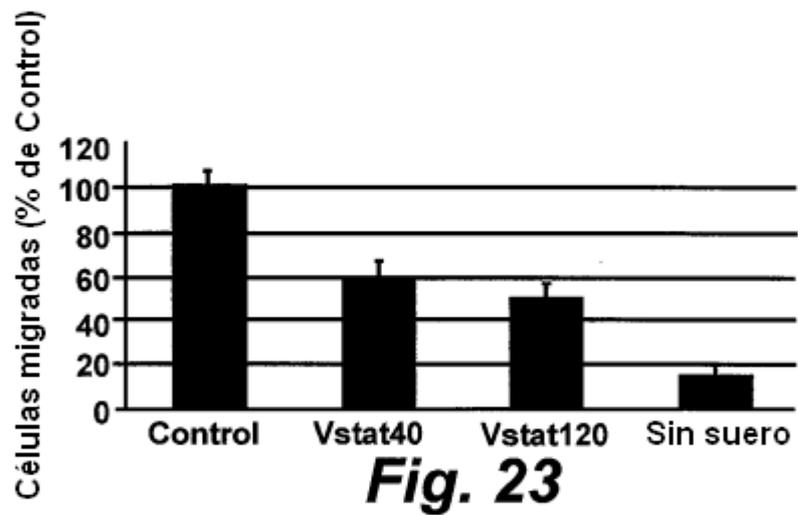


Fig. 22



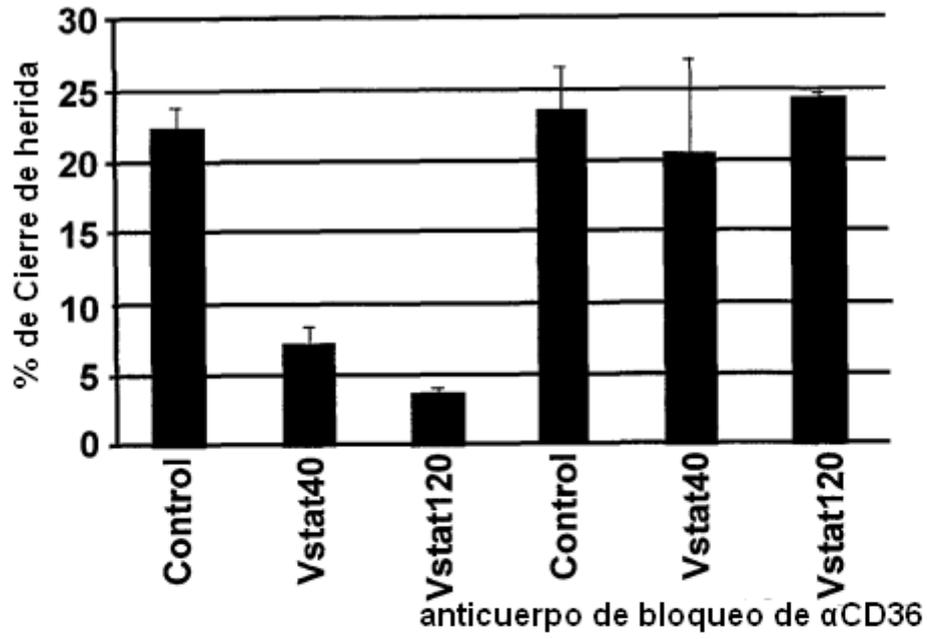


Fig. 24A

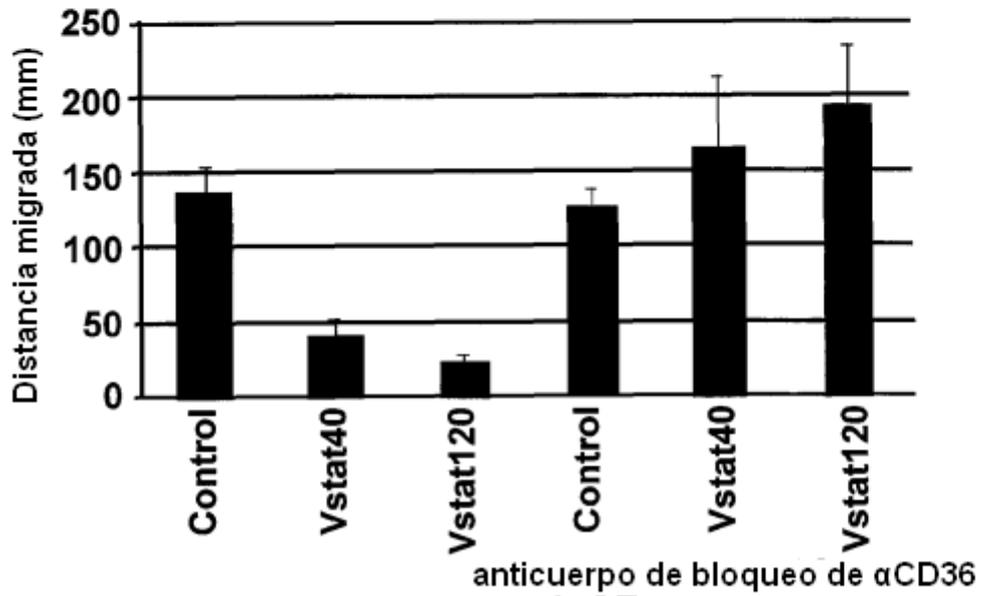


Fig. 24B

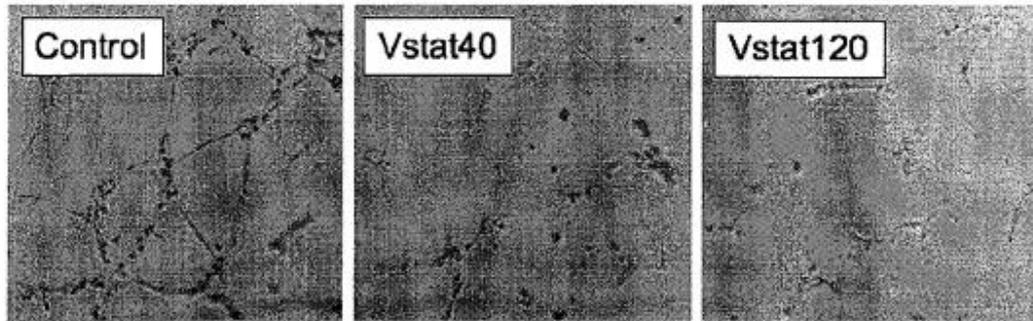


Fig. 25A

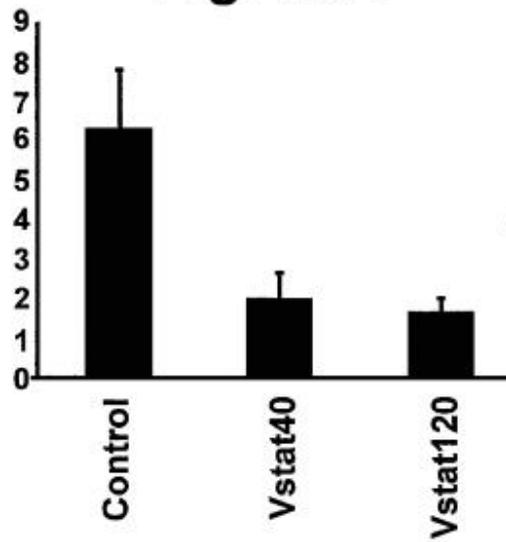


Fig. 25B

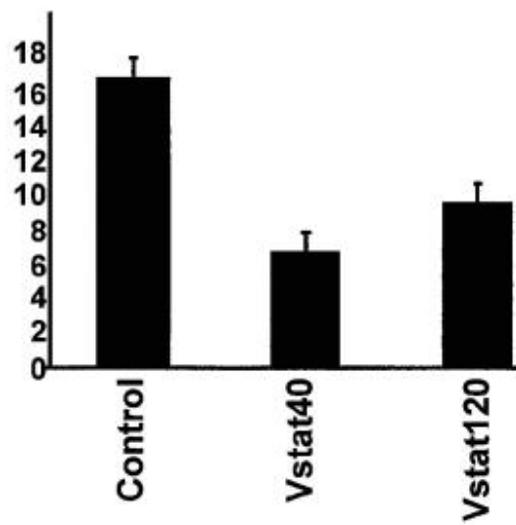


Fig. 25C