

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

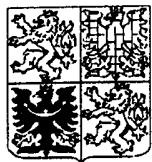
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**3122-96**

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26. 04. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.04.94, 20.10.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/248629, 94/326785**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 05. 97**

**(Věstník č. 5/97)**

(86) PCT číslo: **PCT/US95/05107**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/29242**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N15/57**  
**C 12 N9/68**  
**C 12 N15/85**  
**C 12 N5/06**  
**G 01 N33/68**  
**A 61 K38/48**  
**C 07 K16/40**

(71) Přihlašovatel:

**THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER  
CORPORATION, Boston, MA, US;**

(72) Původce:

**O reilly Michael S., Winchester, MA, US;**  
**Folkman Judah M., Brookline, MA, US;**  
**Sim Kim Lee, Gaitherburg, MD, US;**  
**Cao Yihai, Stockholm, SE;**

(74) Zástupce:

**Andera Jiří Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,  
17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Angiostatin a způsob jeho použití pro  
inhibici angiogeneze**

(57) Anotace:

Předložený vynález se týká endotheliálního inhibitoru a způsobu jeho použití. Endotheliální inhibitor je protein izolovaný z krve nebo moči, který je obsažen v jedním píku z vysokotlakové kapalinové chromatografie s C4-reverzní fází. Endotheliální inhibitor je molekula, zahrnující protein, mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony stanovenou redukční polyakrylamid gelovou elektroforézou a mající aminokyselínovou sekvenci v podstatě podobnou sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínající při aminokyselině číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.

**CZ 3122-96 A3**

|                             |      |           |       |         |
|-----------------------------|------|-----------|-------|---------|
| PRŮMYSLOVÉHO<br>VLASTNICTVÍ | URAD | 24. X. 96 | 78074 | 3122-96 |
| Příl.                       |      |           | č.j.  |         |
|                             |      |           | Došlo |         |

Angiostatin a způsob jeho použití pro inhibici angiogeneze

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká endotheliálních inhibitorů nazývaných angiostatin, které reverzibilně inhibují proliferaci endotheliálních buněk. Přesněji se předložený vynález týká angiostatinových proteinů, které mohou být izolovány z tělesných kapalin jako je krev nebo moč nebo mohou být syntetizovány rekombinantními, enzymatickými nebo chemickými metodami. Angiostatin je schopen inhibovat choroby spojené s angiogenesí a zmírňovat procesy angiogeneze. Dále se předložený vynález týká diagnostických esejí a kitů pro stanovení angiostatinu, histochemických kitů pro lokalizaci angiostatinu, DNA sekvencí, kodujících angiostatin a molekulárních sond pro sledování biosyntézy angiostatinu, protilátek, které jsou specifické pro angiostatin, vývoje peptidových agonistů a antagonistů k angiostatinovému receptoru, agonistů a antaginistů anti-angiostatinový receptor-specifická protilátka a cytotoxických činidel připojených k angiostatinovým peptidům.

### Dosavadní stav techniky

Výraz "angiogeneze" jak je zde použit, znamená vznik nových krevních cév ve tkáni nebo orgánu. Za normálních fyziologických podmínek probíhá u lidí nebo zvířat angiogeneze pouze ve velmi specificky omezených podmínkách. Angiogeneze je normálně pozorována při hojení ran, fetálním a embryonálním vývoji a tvorbě corpus luteum, endometria a placenty. Výraz "endothelium" znamená tenkou

vrstvu plochých epitheliálních buněk, kterými jsou vyloženy serózní dutiny, lymfatické cévy a krevní cévy.

Předpokládá se, že jak kontrolovaná tak nekontrolovaná angiogenese probíhají podobným způsobem. Endotheliální buňky a pericyty, obklopené základní membránou, tvoří kapilární krevní cévy. Angiogenese začíná erozí základní membrány enzymy uvolňovanými endotheliálními buňkami a leukocyty. Endotheliální buňky, která vykládají lumen krevních cév, pak prostupují základní membránou. Angiogenní stimuly vyvolávají migraci endotheliálních buněk erodovanou základní membránou. Migrace buněk tvoří "výhon" z rodičovské krevní cévy, kde endotheliální buňky procházejí mitozou a proliferují. Endotheliální výhonky spolu splývají za tvorby kapilárních smyček, vytvářejících nové krevní cévy.

Perzistentní, neregulovaná angiogenese se objevuje u více chorobných stavů, tumorových metastáz a abnormálního růstu endotheliálních buněk a podporuje patologické poškození zřejmé u těchto stavů. Škodlivé patologické stavy, ve kterých je přítomna neregulovaná angiogenese byly rozděleny na angiogenně závislé nebo s angiogenesí spojené choroby.

Hypotéza, že tumorový růst je závislý na angiogenesi, byla prvně zmíněna v roce 1971. (Folkman J., Tumor angiogenesis: Therapeutic implications., N.Engl.Jour.Med. 285:1182 1186, 1971). Nejjednodušeji shrnuto je zde uvedeno: "Jakmile bylo objeveno 'ujmutí' tumoru, každému zvýšení populace tumorových buněk musí předcházet zvýšení nových kapilár přeměňujících se na tumor". 'Ujmutím' tumoru je v současnosti míněna indikace prevaskulární fáze tumorového růstu, ve které populace tumorových buněk obsadila objem

několika málo krychlových milimetrů a nepřesáhla několik milionů buněk a může přežít na existujících hostitelových mikrocévách. Expanze tumorového objemu nad tuto fázi vyžaduje indukci nových kapilárních krevních cév. Například plicní mikrometastázy v časně prevaskulární fázi u myši by byly nedetekovatelné s výjimkou velmi citlivé mikroskopie histologických řezů.

Příklady nepřímé evidence, které podporují tento koncept, zahrnují:

(1) Rychlost růstu tumorů implantovaných do subkutánních transparentních komor u myši je pomalá a lineární před neovaskularizací a rychlá a téměř exponenciální po neovaskularizaci (Algire GH, a spol., Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J.Natl.Cancer Inst. 6:73-85, 1945).

(2) Růsty tumorů v izolovaných perfundovaných orgánech, kde krevní cévy neproliferují, jsou omezeny na 1-2 mm<sup>3</sup>, ale rychle expandují na > 1000násobek tohoto objemu, když jsou transplantovány myši a stávají se neovaskularizovanými.

(Folkman J. a spol., Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segments. Annals of Surgery 164:491-502, 1966).

(3) Růst tumorů v avaskulárním corneu probíhá pomalu a lineární rychlostí, ale po neovaskularizaci přechází do exponenciálního růstu. (Gimbrone M.A., Jr. a spol., Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. J.Natl.Cancer Institute 52:41-427, 1974).

(4) Tumory suspendované ve vodné kapalině anteriorní komory králičího oka, zůstávají viditelné, avaskulární a omezené na velikost  $< 1 \text{ mm}^3$ . Jakmile jsou implantovány do iris vaskulárního lože, stávají se neovaskularizovanými a rostou rychle, dosahují 16000násobku svého původního objemu během 2 týdnů (Gimbrone MA Jr. a spol., Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization, J.Exp.Med. 136:261-276).

(5) Jsou-li tumory implantovány do kuřecí embryonální chorioallantoiové membrány, rostou pomalu během avaskulární fáze  $> 72$  hodin, ale nepřesáhnou průměrný průměr  $0,93 \pm 0,29$  mm. Rychlá tumorová expanze se objevuje během 24 hodin po začátku neovaskularizace a 7.den tyto vaskularizované tumory dosahují středního průměru  $8,0 \pm 2,5$  mm. (Knighton D., Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo, British J.Cancer, 35:347-356, 1977).

(6) Vaskulární výskyt metastáz v králičích játrech vykazuje heterogenitu ve velikosti metasáz, ale vykazuje relativní jednotnost hranice velikosti, při které je přítomna vaskularizace. Tumory jsou obecně avaskulární až do 1 mm v průměru, ale nad tímto průměrem jsou neovaskularizovány. (Lien W. a spol., The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber. Surgery 68:334-340, 1970).

(7) U transgenní myši, která vyvíjí karcinomy v beta buňkách pankreatických ostrůvků, jsou prevaskulární hyperplastické ostrůvky omezeny na velikost  $< 1$  mm. Ve stáří 6-7 týdnů se 4-10 % ostrůvků stává neovaskularizovanými a z těchto ostrůvků vznikají velké vaskularizované tumory o objemu více než

1000násobku objemu prevaskulárních ostrůvků. (Folkman J., a spol., Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, Nature 339:58-61, 1989).

(8) Specifické protilátky proti VEGF (vaskulární endotheliální růstový faktor - vascular endothelial growth factor) redukuje mikrocévní hustotu a vyvolává "významnou nebo dramatickou" inhibici růstu tří lidských tumorů, které se spoléhají na VEGF jako jejich jediný mediátor angiogeneze (u holé myši). Protilátka neinhibuje růst nádorových buněk in vitro. (Kim K.J. a spol., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 362:841-844, 1993).

(9) Anti bFGF monoklonální protilátka působí 70% inhibici růstu myšího tumoru, který je závislý na sekreci bFGF jako svém jediném mediátoru angiogeneze. Protilátka neinhibuje růst tumorových buněk in vitro. (Hori A. a spol., Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. Cancer Research, 51:6180-6184, 1991).

(10) Intraperitoneální injekce bFGF zvyšuje růst primárního tumoru a jeho metastáz stimulací růstu kapilárních endotheliálních buněk v tumoru. Tumorové buňky samy postrádají receptory pro bFGF a bFGF není mitogen pro tumorové buňky in vitro. (Gross J.L., a spol. Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF. Proc.Amer.Assoc.Canc.Res. 31:79, 1990).

(11) Specifický angiogenesní inhibitor (AGM-1470) inhibuje tumorový růst a metastázy in vivo, ale je méně aktivní v

inhibici proliferace tumorových buněk in vitro. Inhibuje vaskulární endoteliální proliferaci z poloviny maxima při 4log nižší koncentraci než která inhibuje proliferaci tumorových buněk. (Ingber D. a spol., Angiostatin: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature*, 48:555-557, 1990). Je zde také nepřímo klinicky zřejmé, že tumorový růst je závislý na angiogenezi.

(12) Lidské retinoblastomy, které jsou metastatické do sklivce, se vyvíjejí do avaskulárních sferoidů, které jsou omezeny na méně než 1 mm<sup>3</sup> vzhledem ke skutečnosti, že jsou viditelné a inkorporují <sup>3</sup>H-thymidin (jsou-li odstraněny z enukleovaného oka a analyzovány in vitro).

(13) Karcinom vaječnickových metastáz do peritoneální membrány jako droboučká avaskulární bílá semena (1-3 mm<sup>3</sup>). Tyto implantáty vzácně rostou více dokud se jeden nebo více z nich nestane neovaskularizovaným.

(14) Intenzita neovaskularizace v rakovině prsu (Weidner N. a spol., Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma, *N.Engl.J.Med.* 324:1-8, 1991, a Weidner N. a spol., Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma, *J.Natl.Cancer Inst.* 84:1875-1887, 1992) a v rakovině prostaty (Weidner N., Carroll PR, Flax J., Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *American Journal of Pathology*, 143(2):401-409, 1993) je vysoce v souladu s rizikem budoucích metastáz.

(15) Metastázy z lidského kutánního melanomu jsou před neovaskularizací vzácné. Výskyt neovaskularizace vede ke zvýšené tloušťce lézí a zvýšení rizika metastáz. (Srivastava A. a spol., The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0,76-4,0 mm thick) skin melanoma. Amer.J.Pathol. 133:419-423, 1988).

(16) Při rakovině měchýře je hladina angiogenního peptidu, bFGF, v moči citlivějším indikátorem stavu a rozsahu choroby než je cytologie (Nguyen M. a spol., Elevated levels of angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. J.Natl.Cancer Inst. 85:241-242, 1993).

Je tedy zřejmé, že angiogenese hraje hlavní roli v metastázách rakoviny. Jestliže by tato angiogenní aktivita mohla být potlačena nebo eliminována, pak by tumory, i když jsou přítomny, nemohly růst. V chorobném stavu prevence angiogenese by mohla zabránit poškození způsobenému invazí nového mikrovaskulárního systému. Terapie řízené na kontrolu angiogenních procesů by mohly vést k odstranění nebo zmírnění těchto chorob.

Proto je nezbytná kompozice a způsob, který může inhibovat neočekávaný růst krevních cév, zejména v tumorech. Potřebná je také metoda detekce, měření a lokalizace kompozice. Kompozice by měla být schopna překonat aktivitu endogenních růstových faktorů a zabránit tvorbě kapilár v tumorech a tím inhibovat růst tumorů. Kompozice, fragmenty kompozice a protilátky specifické ke kompozici by měly být také schopny zmírnit tvorbu kapilár v jiných angiogenních procesech, jako je hojení ran a reprodukce. Kompozice a

způsob inhibice angiogenese by výhodně neměly být toxické a měly by produkovat málo vedlejších účinků. Potřebný je také způsob detekce, měření a lokalizace vazebných míst pro kompozici jakož i míst biosyntézy kompozice. Kompozice a fragmenty kompozice by měly být schopny být konjugovány k jiným molekulám jak pro účely radioaktivního tak neradioaktivního značení.

### Podstata vynálezu

V souladu s předloženým vynálezem jsou poskytnuty kompozice a metody, které jsou účinné pro zmírnění angiogenese a inhibici neočekávané angiogenese, zejména angiogenese spojené s tumorovým růstem. Předložený vynález zahrnuje protein, který byl nazván "angiostatin", definovaný svojí schopností překonávat angiogenní aktivitu endogenních růstových faktorů jako je bFGF in vitro a aminokyselinovou sekvenční homologií a strukturální podobností se vnitřní částí plasminogenu, začínající přibližně u 98. plasminogenové aminokyseliny. Angiostatin zahrnuje protein, mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltonů a 45 kilodaltonů jak stanoveno redukční polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a mající aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou sekvenci fragmentu myšího plasminogenu začínající u aminokyseliny číslo 98 intaktní myší plasminogenové molekuly (SEQ ID NO:2).

Aminokyselinová sekvence angiostatinu se mírně mezi druhy liší. Například v lidském angiostatinu je aminokyselinová sekvence v podstatě podobná sekvenci výše popsaného myšího plasminogenového fragmentu, ačkoliv aktivní lidská angiostatinová sekvence může začít buď na

aminokyselině číslo 97 nebo 99 intaktní lidské plasminogenové aminokyselinové sekvence. Dále fragmenty lidského plasminogenu mají podobnou anti-angiogenní aktivitu jak je ukázáno v myším tumorovém modelu. Je třeba chápat, že počet aminokyselin v aktivní angiostatinové molekule se může měnit a že všechny aminokyselinové sekvence, které mají endotheliální inhibiční aktivitu jsou považovány za zahrnuté v předloženém vynálezu.

Předložený vynález poskytuje metody a kompozice pro léčení chorob a procesů zprostředkovaných nežádoucí a nekontrolovanou angiogenesí podáním kompozice člověku nebo zvířeti, která obsahuje podstně čištěný angiostatin nebo angiostatinové deriváty v dávce dostatečné pro inhibici angiogenese. Předložený vynález je zvláště vhodný pro léčbu nebo represí růstu tumorů. Podání angiostatinu člověku nebo zvířeti s prevaskularizovanými metastázovanými tumory bude bránit růstu nebo expanzi těchto tumorů.

Předložený vynález také zahrnuje DNA sekvence, kodující angiostatin, expresní vektory, obsahující DNA sekvence, kodující angiostatin a buňky, obsahující jeden nebo více vektorů, obsahujících DNA sekvence, kodující angiostatin. Předložený vynález dále zahrnuje metody genové terapie, kdy jsou DNA sekvence, kodující angiostatin zaváděny do pacienta pro modifikaci in vivo angiostatinových hladin.

Předložený vynález také zahrnuje diagnostické metody a kity pro detekci a měření angiostatinu v biologických kapalinách a tkáních a pro lokalizaci angiostatinu ve tkáních a buňkách. Diagnostická metoda a kit mohou být v jakékoliv konfiguraci dobře známé odborníkům v oboru. Předložený

vynález také zahrnuje protilátky specifické pro angiostatinovou molekulu a její části a protilátky, které inhibují vazbu protilátek specifických pro angiostatin. Tyto protilátky mohou být polyklonální protilátky nebo monoklonální protilátky. Protilátky specifické pro angiostatin mohou být použity v diagnostických kitech k detekci přítomnosti a množství angiostatinu, který je diagnostický nebo prognostický pro výskyt nebo znovu objevení se rakoviny nebo jiné choroby spojené s angiogenesí. Protilátky specifické pro angiostatin mohou být také podávány člověku nebo zvířeti pro pasivní imunizaci člověka nebo zvířete proti angiostatinu a redukovat tak angiogenní inhibici.

Předložený vynález také zahrnuje diagnostické metody a kity pro detekci přítomnosti a množství protilátek, které vážou angiostatin, v tělesných kapalinách. Diagnostická metoda a kit mohou být v jakékoliv konfiguraci dobře známé odborníkům v oboru.

Předložený vynález také zahrnuje anti-angiostatin receptor-specifické protilátky, které se vážou k angiostatinovému receptoru a přenášejí vhodný signál k buňce a působí jako agonisté nebo antagonisté.

Předložený vynález také zahrnuje fragmenty a analogy angiostatinového peptidu, které mohou být značeny isotopicky nebo s jinými molekulami nebo proteiny pro použití v detekci a vizualizaci angiostatinových vazebných míst technikami, zahrnujícími, ale neomezuujícími se tak, pozitronovou emisní tomografií, autoradiografií, tokovou cytometrií, radioreceptorové vazebné eseje a imunohistochemií.

Tyto angiostatinové peptidy a analogy působí také jako agonisté a antagonisté při angiostatinovém receptoru, čímž zvyšují nebo blokují biologickou aktivitu angiostatinu. Takové peptidy jsou použity v izolaci angiostatinového receptoru.

Předložený vynález také zahrnuje angiostatin, angiostatinové fragmenty, angiostatinová antisera nebo angiostatin receptor agonisty a angiostatin receptor antagonisty připojené k cytotoxickým činidlům pro terapeutické a výzkumné použití. Ještě dále jsou angiostatin, angiostatinové fragmenty, angiostatinová antisera nebo angiostatin receptor agonisté a angiostatin receptor antagonisté kombinovány s farmaceuticky přijatelnými přísadami a popřípadě udržovaně uvolňujícími sloučeninami nebo kompozicemi, jako jsou biodegradabilní polymery, za vzniku terapeutických kompozic.

Předložený vynález zahrnuje molekulární sondy pro ribonukleovou kyselinu a deoxyribonukleovou kyselinu zahrnuté ve transkripci a translaci angiostatinu. Tyto molekulární sondy poskytují prostředky pro detegování a měření angiostatinové biosyntézy ve tkáních a buňkách.

V souladu s tím je objektem předloženého vynálezu poskytnutí kompozice, obsahující angiostatin.

Dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí způsobu léčení chorob a procesů, které jsou zprostředkovány angiogenesí.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí diagnostické nebo prognostické metody a kitu pro detegování přítomnosti a množství angiostatinu v tělesné kapalině nebo tkáni.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí metody a kompozice pro léčení chorob a procesů, které jsou zprostředkovány angiogenesí, zahrnujících, aniž by tak byly omezeny, hemangiom, pevné tumory, krevní tumory, leukemii, metastázy, telangiectasii, psoriasis, skleroderma, pyogenní granulom, myokardiální angiogenesis, Crohnovu chorobu, plakovou neovaskularizaci, koronární kolateraly, cerebrální kolaterály, arteriovenózní malformace, ischemickou limbickou angiogenezi, korneální chorobu, rubeosis, neovaskulární glaukom, diabetickou retinopatii, retrolentální fibroplazii, arthritisi, diabetickou neovaskularizaci, makulární degeneraci, hojení ran, peptický vřed, choroby spojené s *Helicobacter*, fraktury, keloidy, vaskulogeneze, hematopoiesis, ovulace, menstruace, placentace a horečka kočičího škrábnutí.

Dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí kompozice pro léčení nebo potlačení růstu rakoviny.

Objektem předloženého vynálezu je poskytnutí sloučenin, které modulují nebo napodobují produkci nebo aktivitu enzymů, které produkují angiostatin in vivo nebo in vitro.

Dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí antiostatin nebo anti-angiostatin protilátek přímou injekcí angiostatinové DNA do člověka nebo zvířete v případě potřeby takových angiostatin nebo anti-angiostatin protilátek.

Objektem předloženého vynálezu je poskytnout metodu pro detekci a kvantifikaci přítomnosti protilátek specifických pro angiostatin v tělesné kapalině.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnout kompozici, obsahující protilátky k angiostatinu, které jsou selektivní pro specifické regiony angiostatinové molekuly, které nerozpoznávají plasminogen.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnout metodu pro detekci nebo prognozu rakoviny.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnout kompozici pro použití ve vizualizaci a kvantifikaci míst vazby angiostatinu in vivo a in vitro.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnout kompozici pro použití při detekci a kvantifikaci biosyntézy angiostatinu.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnout terapii rakoviny s minimálními vedlejšími účinky.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnout kompozici, obsahující angiostatin nebo angiostatin peptid napojený k cytotoxickému činidlu pro léčení nebo represi růstu rakoviny.

Ještě dalším objektem vynálezu je poskytnutí kompozic a metod vhodných pro genovou terapii pro zmírnění angiogeních procesů.

Tyto a další objekty, rysy a výhody předloženého vynálezum budou zřejmé po seznámení se s následujícím podrobným popisem provedení a připojenými nároky.

#### Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 představuje SEQ ID NO:1, aminokyselinovou sekvenci celého myšího plasminogenu.

Obr. 2 představuje začátek sekvence myšího angiostatinu (SEQ ID NO:2) a porovnává myší sekvenci s odpovídající lidskými (SEQ ID NO:3), opičími Rhesus (SEQ ID NO:4), prasečími (SEQ ID NO:5) a hovězími (SEQ ID NO:6) plasminogenovými peptidovými fragmenty. Myší sekvence je uvedena jako první, následuje lidská, Rhesus, prasečí a hovězí.

Obr. 3 představuje BrDU značící index tumorových buněk v plicích za přítomnosti nebo nepřítomnosti primárního tumoru.

Obr. 4 představuje Matrigel analýzu vlivu Lewisova plicního primárního tumoru na bFGF řízenou angiogenesis in vivo.

Obr. 5 představuje křivku dávkové odezvy pro serum získané z myši, nesoucí Lewisův plicní karcinom (LLC-Low) proti seru z normální myši. Hovězí kapilární endotheliální buňky byly sledovány v bFGF-řízené 72-hodinové proliferační eseji.

Obr. 6 ukazuje, že jak nízko tak vysoko metastazující tumory obsahují endotheliální mitogenickou aktivitu ve svých ascitech, ale pouze nízko metastazující tumorová linie má endotheliální inhibiční aktivitu v seru.

Obr. 7 představuje profil chromatografie s C4 reverzní fází částečně čištěného sera nebo moči ze zvířat, nesoucích nádor.

Obr.8 představuje povrchové plicní metastázy po 13 dnech léčení myši s intaktní plasminogenovou molekulou, aktivní frakcí z lysin vazebného místa I přípravku lidského plasminogenu, koncentrované moči z nádor nesoucí myši a koncentrované moči z normální myši.

Obr. 9 představuje hmotnost plic po 13 dnech léčení myši s intaktní plasminogenovou molekulou lidského plasminogenu, aktivní frakcí z lysin vazebného místa I přípravku, koncentrované moči z tumor nesoucí myši a koncentrované moči z normální myši.

Obr.10 je schematické znázornění pTrcHis vektoru.

Obr.11 představuje imunoblot E.coli exprimovaného lidského angiostatinu z 10L fermentace ve velkém, sondovaný monoklonální protilátkou proti lidskému plasminogenovému kringle regionu 1-3. Šipky ukazují rekombinantní lidský angiostatin. A) představuje rekombinantní angiostatin eluovaný 0,2M aminokaprovou kyselinou; B) ukazuje poslední promytí lysinové kolony s 1 X PBS; a C) ukazuje čištěný lyzát z rozbitých buněk.

Obr. 12 je graf, znázorňující procenta inhibice růstu hovězích kapilárních endotheliálních buněk jako funkci ředění zásobního roztoku; A1, A2, B1, B2 a E jsou rekombinantní klony, které exprimují lidský angiostatin anti-angiogenesní aktivitu; C1, C2, D1 a D2 kontroly jsou negativní kontrolní

klony, obsahující vektor pouze bez lidské DNA sekvence, kodující angiostatin.

Obr. 13 představuje inhibiční vliv na proliferaci rekombinantního lidského angiostatinu na hovězí kapilární endotheliální buňky in vitro.

Obr. 14 představuje index růstu proliferace a apoptický index po odstranění primárního tumoru a ošetření salinickým roztokem nebo fumagillinovým analogem s antiangiogenní aktivitou.

Obr. 15 představuje inhibici růstu T241 primárního tumoru v myši ošetřením s lidským angiostatinem in vivo s jedinou injekcí 40 mg/kg/den.

Obr. 16 představuje inhibici růstu LLC-LM primárního tumoru u myši při ošetření lidským angiostatinem in vivo ve dvou dávkách 40 mg/kg na dávku (80 mg/kg/den).

Obr. 17 představuje vliv odstranění primárního tumoru Lewisova plicního karcinomu na růst jeho plicních metastáz.

Obr. 18 představuje růst proliferčního a apoptického indexu po resekci tumoru.

Obr. 19 představuje vliv podání angiostatinového proteinu myši, mající implantované T241 fibrosarkomové buňky, na celkový objem tumoru jako funkci času.

Obr. 20 představuje vliv podání angiostatinového proteinu myši, mající implantované buňky Lewisova plicního sarkomu (LM) na celkový objem tumoru jako funkci času.

Obr. 21 představuje vliv podání angiostatinového proteinu myši, mající implantované buňky sarkomu buněk retikula (LM) na celkový objem tumoru jako funkci času.

Obr. 22 představuje vliv podání angiostatinového proteinu imunodeficientní SCID myši, mající implantované buňky PC-3 karcinomu lidské prostaty na celkový objem tumoru jako funkci času po 24denní periodu.

Obr. 23 představuje vliv podání angiostatinového proteinu imunodeficientní SCID myši, mající implantované buňky MDA-MB lidského karcinomu prsu, na celkový objem tumoru jako funkci času po 24denní periodu.

Obr. 24 představuje schematicky klonování myší DNA sekvence, kodující myší angiostatin protein odvozený z myší plasminogen cDNA. Myší angiostatin zahrnuje myší plasminogen kringle regiony 1-4. PCR znamená polymerasovou řetězovou reakci; P1 je 5'-konec oligonukleotidového primeru pro PCR; P2 je 3'-konec oligonukleotidového primeru pro PCR; SS znamená signální sekvenci; ATG je translační iniciační kodon; TAA je translační stop kodon; HA představuje hemaglutininový epitop tag (YPYDVFPDYASL); K1, K2, K3 a K4 představují myší plasminogen kringle regiony 1, 2, 3 a 4. CMV je cytomegalovirový promotor, T7 je bakteriofágový promotor, PA představuje preaktivační peptidy a SP6 je Sp 6 promotor.

Obr. 25 představuje počet buněk jako funkci dnů pro netransfektované buňky (falešné); buňky transfektované vektorem samotným, bez DNA sekvence, kodující angiostatin (vektor 5) a dva angiostatin exprimující klony (AST 31 a AST 37). Panel (a) představuje výsledky transfekce T241 buněk. Panel (b) představuje výsledky LL2 buněk.

Obr. 26 představuje výsledky kultivačního media získaného z E.coli buněk, obsahujících angiostatin klon na počet buněk. Netransfektované buňky (napodobenina); buňky transfektované se samotným vektorem, bez DNA sekvence, kodující angiostatin (vektor 5) a tři angiostatin exprimující klony (AST 25, AST 31 a AST 37). Panel (a) představuje výsledky inkubace kultivace kontroly (simulace) a všech angiostatin klonů (exprimujících a neexprimujících) v počtu buněk. Panel (b) představuje výsledky inkubace kultivačního media z kontroly (napodobenina), samotného vektoru (vektor 6) a angiostatinových klonů exprimujících myši angiostatin na počet buněk. Panel (c) představuje výsledky inkubace čištěného kultivačního media z kontroly (simulace) a angiostatinových klonů exprimujících myši angiostatin na počet buněk, přičemž kultivační medium bylo čištěno přes lysin-sepharosovou kolonu za získání lysin vázajících složek.

Obr. 27 představuje vliv celkového objemu tumoru jako funkci času implantovaných T241 fibrosarkomových buněk do myši, kde fibrosarkomové buňky byly transfektovány vektorem, obsahujícím DNA sekvenci, kodující angiostatinový protein a kde vektor je schopen exprimovat angiostatin protein. "Netransfektované" představuje nezměněné T241 fibrosarkomové buňky implantované do myši. "Vektor 6" představuje T241 fibrosarkomové buňky transfektované pouze vektorem, který

neobsahuje DNA sekvenci, kodující angiostatin protein, implantované do myši. "Klon 25, klon 31 a klon 37" představují tři angiostatin-produkující klony T241 fibrosarkomových buněk transfektovaných vektorem, obsahujícím DNA sekvenci, kodující angiostatin protein, implantované do myši.

Předložený vynález zahrnuje kompozice a způsoby detekce a léčby chorob a procesů, které jsou zprostředkovány nebo spojeny s angiogenesí. Kompozice je angiostatin, který může být izolován z tělních kapalin zahrnujících, ale takto neomezených, serum, moč a ascity, nebo syntetizovaných chemickými nebo biologickými metodami (např. buněčnou kulturou, rekombinantní genovou expresí, peptidovou syntézou a in vitro enzymatickou katalýzou plasminogenu nebo plasminu za získání aktivního angiostatinu. Rekombinantní techniky zahrnují genovou amplifikaci z DNA zdrojů za použití polymerasové řetězové reakce (PCR) a genovou amplifikaci z RNA zdrojů za použití reverzní transkriptasy/PCR. Angiostatin inhibuje růst krevních cév do tkání jako jsou nevaskularizované nebo vaskularizované tumory.

Předložený vynález také zahrnuje kompozici, obsahující vektor, obsahující DNA sekvenci, kodující angiostatin, kde vektor je schopen exprimovat angiostatin, je-li přítomen v buňce, kompozici, zahrnující buňku, obsahující vektor, kde vektor obsahuje DNA sekvenci, kodující angiostatin nebo jeho fragmenty nebo analogy a kde vektor je schopen exprimovat angiostatin, je-li přítomen v buňce a metodu, zahrnující implantaci buňky, obsahující vektor do člověka nebo živočicha, kterým není člověk, kde vektor obsahuje DNA

sekvenci, kodující angiostatin a kde vektor je schopen exprimovat angiostatin, je-li přítomen v buňce.

Ještě dále zahrnuje předložený vynález angiostatin, angiostatinové fragmenty, angiostatinové antisera, angiostatin receptor agonisty nebo angiostatin receptor antagonisty, které jsou kombinovány s farmaceuticky přijatelnými přísadami a popřípadě udržovaně uvolňujícími sloučeninami nebo kompozicemi, jako jsou biodegradabilní polymery, za vzniku terapeutických kompozic. Zejména vynález zahrnuje kompozici, obsahující protilátku, která se specificky váže k angiostatinu, přičemž se protilátka neváže k plasminogenu.

Přesněji, předložený vynález zahrnuje protein nazvaný angiostatin, který má molekulovou hmotnost přibližně 38 až 45 kilodaltonů (kD), který je schopen překonat angiogení aktivitu endogenních růstových faktorů jako je bFGF in vitro. Angiostatin je protein, mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltonů a 45 kilodaltonů stanoveno redukční polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a mající aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou aminokyselinové sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínající u aminokyseliny číslo 98 intaktní myší plasminogenové molekuly. Výraz "v podstatě podobnou", je-li použit ve vztahu k angiostatin aminokyselinovým sekvencím, znamená aminokyselinovou sekvenci, mající anti-angiogenní aktivitu a mající molekulovou hmotnost přibližně 38 kD až 45 kD, která také má vysoký stupeň sekvenční homologie k peptidovému fragmentu myšího plasminogenu, začínajícího přibližně u aminokyseliny číslo 98 v myším plasminogenu a o hmotnosti 38 kD až 45 kD. Vysoký stupeň homologie znamená alespoň

přibližně 60% aminokyselinovou homologii, žádoucí je alespoň přibližně 70% aminokyselinová homologie, a nejvíce je žádoucí přibližně 80% aminokyselinová homologie. Výraz "endotheliální inhibiční aktivita" jak je zde použit, znamená schopnost molekuly inhibovat angiogenesi obecně a , například, inhibovat růst hovězích kapilárních endotheliálních buněk v kultuře za přítomnosti fibroblastového růstového faktoru.

Aminokyselinová sekvence kompletní myší plasminogenové molekuly je uvedena na obr. 1 a v SEQ ID NO:1. Sekvence pro angiostatin začíná přibližně u aminokyseliny 98. Aktivní lidský angiostatin může začít buď při aminokyselině 97 nebo 99 intaktní lidské plasminogenové molekuly. Aminokyselinová sekvence prvních 339 aminokyselin angiostatinu z myši je uvedena na obr. 2 (SEQ ID NO:2) a je porovnána se sekvencemi odpovídajících plasminogen peptidových fragmentů z lidského (SEQ ID NO:3), Rhesus opice (SEQ ID NO:4), prasečího (SEQ ID NO:5) a hovězího (SEQ ID NO: 6) plasminogenu. Protože tyto sekvence jsou shodné z více než 50 % svých aminokyselin, je třeba vzít v úvahu, že aminokyselinová sekvence angiostatinu je v podstatě podobná mnoha druhům, Celkový počet aminokyselin v angiostatinu není přesně znám, ale je definován molekulovou hmotností aktivní molekuly. Aminokyselinová sekvence angiostatinu podle předloženého vynálezu se může měnit podle toho, ze kterých druhů je odvozena plasminogenová molekula. Tak ačkoliv angiostatin podle předloženého vynálezu, který je odvozen od lidského plasminogenu má slabě odlišnou sekvenci než angiostatin odvozený od myši, má antiangiogenní aktivitu jak je to ukázáno v modelu myšího tumoru.

Angiostatin se prokázal jako schopný inhibovat růst endotheliálních buněk in vitro. Angiostatin neinhibuje růst buněčných linií odvozených od jiných buněčných typů. Specificky nemá angiostatin žádný vliv na buněčné linie Lewisova plicního sarkomu, epitel plic norka, 3T3 fibroblasty, buňky hladkých svalů hovězí aorty, hovězí retinální pigmentové epithelium, MDCK buňky (psí renální epithelium), W138 buňky (lidské fetální plicní fibroblasty) EFN buňky (myší fetální fibroblasty) a LM buňky (myší konektivní tkáň). Endogenní angiostatin v myši nesoucí tumor, je účinný při inhibici metastáz při systémové koncentraci přibližně 10 mg angiostatinu/kg tělesné hmotnosti.

Angiostatin má specifickou trojrozměrnou konformaci, která je definována "kringle" regionem plasminogenové molekuly (Robbins K.C., "The plasminogen-plasmin enzyme system" Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Practice, 2.vydání, vyd. Colman R.W a spol., J.B.Lippincott Company, str. 340-357, 1987). Je pět takových kringle oblastí, které jsou konformačně příbuznými motivy a mají podstatnou sekvenční homologii, v NH<sub>2</sub> koncové části plasminogenové molekuly. Trojrozměrná kombinace angiostatinu se považuje za zahrnující plasminogen kringle oblasti 1 až 3 a část kringle oblasti 4. Každý kringle region plasminogenové molekuly obsahuje přibližně 80 aminokyselin a obsahuje 3 disulfidové vazby. Tento cysteinový motiv je znám jako existující v jiných biologicky aktivních proteinech. Tyto proteiny zahrnují, ale nejsou tak omezeny, prothrombin, hepatocytový růstový faktor, scatter faktor a makrofágy stimulující protein. (Yoshimura T. a spol., "Cloning, sequencing and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MSTI) confirms MSP as a member of the family of

kringle proteins and locates the MSP gene on Chromosome 3" J.Biol.Chem. Vol.268, č. 21, str. 15461-15468, 1993). Uvažuje se, že jakýkoliv izolovaný protein nebo peptid, mající trojrozměrnou preclíku podobnou konformaci nebo cysteinový motiv, který má anti-angiogenní aktivitu in vivo, je část předloženého vynálezu.

Předložený vynález také zahrnuje detekci angiostatinu v tělesných kapalinách a tkáních pro účely diagnózy nebo prognózy chorob jako je rakovina. Předložený vynález také zahrnuje detekci angiostatin vazebných míst a receptorů v buňkách a tkáních. Předložený vynález také zahrnuje metody léčení nebo prevence angiogenních chorob a procesů, zahrnujících, aniž by tak byly omezeny, arthritida a tumory, stimulací produkce angiostatinu nebo angiostatin agonistů nebo antagonistů a/nebo angiostatin antisera nebo antisera řízeného proti angiostatin antiseru, pacientovi. Další metody léčení zahrnují podání angiostatinu, angiostatin fragmentů, angiostatin analogů, angiostatin antisera nebo angiostatin receptor agonistů a antagonistů podobných cytotoxickým činidlům. Angiotensin může být živočišného nebo lidského původu. Angiostatin může být také produkován synteticky chemickou reakcí nebo rekombinantními technikami ve spojení s expresními systémy. Angiostatin může být také produkován enzymatickým štěpením izolovaného plasminogenu nebo plasminu pro tvorbu peptidů, majících antiangiogenní aktivitu. Angiostatin může také být produkován sloučeninami, které napodobují působení endogenních enzymů, které štěpí plasminogen na angiostatin. Produkce angiostatinu může být také zmírněna sloučeninami, které ovlivňují aktivitu plasminogen štěpících enzymů.

Pasivní protilátková terapie za použití protilátek, které specificky vážou angiostatin, může být použita ke zmírnění angiogenně-závislých procesů jako je reprodukce, vývoj, a hojení ran a tkáňové náhrady. Dále antisera řízená k Fab regionům angiostatin protilátek mohou být podávána pro blokování schopnosti andogenního angiostatin antisera vázat angiostatin.

Předložený vynález také zahrnuje genovou terapii, kdy je gen kodující angiostatin regulován v pacientovi. Různé metody přenosu nebo doručení DNA do buněk pro expresi genového produktového proteinu, jinak nazývané jako genová terapie, jsou popsány v Gene Transfer into Mammalian Somatic Cells in vivo, N.Yang. Crit.Rev.Biotechn. 12(4): 335-356 (1992), proce je zde zahrnuta jako odkaz. Genová terapie zahrnuje inkorporaci DNA sekvencí do somatických buněk nebo zárodečných buněčných linií pro použití buď v terapii ex vivo nebo in vivo. Genová terapie působí nahrazení genů, zvětšení normální nebo abnormální genové funkce a potlačení infekčních chorob a jiných patologií.

Strategie léčby těchto medicinských problémů genovou terapií zahrnuje terapeutické strategie jako je identifikace defektního genu a pak přidání funkčního genu buď k nahrazení funkce defektního genu nebo k posílení slabě funkčního genu; nebo profylaktickou strategií, jako je přidání genu pro produktový protein, který bude léčit stav nebo který učiní tkáň nebo orgán citlivějším k léčebnému režimu. Příkladem profylaktické strategie je, že se gen jako angiostatin může umístit do pacienta a tak bránit výskytu angiogenese; nebo by gen, který činí tumorové buňky citlivější k záření, mohl být

inzertován a pak by ozáření tumoru mohlo způsobit zvýšené usmrcení tumorových buněk.

Mnoho protokolů pro transfer angiostatin DNA nebo angiostatin regulátorových sekvencí bylo použito v tomto vynálezu. Transfekce promotorovými sekvencemi jinými než ty, které byly shledány normálně specificky spojené s angiostatinem nebo jiné sekvence, které by mohly zvyšovat produkci angiostatin proteinu jsou také považovány za metody genové terapie. Příklad této technologie lze nalézt v Transkaryotic Therapies, Inc. of Cambridge, Massachusetts, používajících homologní rekombinaci k inzertu "genetického obrácení", která obrací erythropoietinový gen do buněk. Viz Genetics Engeneering News, 15.duben 1994. Taková "genetická obrácení" by mohla být použita k aktivaci angiostatinu (nebo angiostatin receptoru) v buňkách normálně neexprimujících angiostatin (nebo angiostatin receptor).

Genové transfer metody pro genovou terapii spadají do tří širokých kategorií - fyzikální (např. elektroporace, přímý genový transfer a částicové bombardování), chemické (nosiče na bázi lipidů nebo jiné nevirální vektory) a biologické (vektor odvozený od viru a receptorový příjem). Například mohou být použity nevirální vektory, které zahrnují liposomy potažené DNA. Takové komplexy liposom/DNA mohou být přímo injikovány intravenózně do pacienta. Předpokládá se, že komplexy liposom/DNA jsou koncentrovány v játrech, kde doručují DNA k makrofágům a Kupfferovým buňkám. Tyto buňky jsou dlouhožijící a tak poskytují dlouhodobou expresi doručené DNA. Navíc vektory nebo "holé" DNA genu mohou být přímo injikovány do požadovaného orgánu, tkáně nebo tumoru pro cílené doručení terapeutické DNA.

Metodologie genové terapie může být také popsána místem doručení. Základní cesta pro doručení genů zahrnují ex vivo genový transfer, in vivo genový transfer a in vitro genový transfer. V ex vivo genovém transferu jsou buňky odejmuty z pacienta a rostou v buněčné kultuře. DNA je transfektována do buněk, transfektované buňky jsou ponechány zvětšit svůj počet a pak jsou znovu implantovány do pacienta. V in vitro genovém transferu jsou transformované buňky buňky rostoucí v kultuře, jako jsou buňky tkáňové kultury a ne jednotlivé buňky z jednotlivého pacienta. Tyto "laboratorní buňky" jsou transfektovány, transfektované buňky jsou selektovány a expandovány buď pro implantaci do pacienta nebo pro jiná použití.

In vivo genový transfer zahrnuje zavedení DNA do buněk pacienta, když buňky jsouv pacientovi. Metody zahrnují použití virálně zprostředkovaného genového transferu za použití neinfekčního viru pro doručení genu do pacienta nebo injikování holé DNA do místa v pacientovi a DNA je přijata procentem buněk, ve kterých je exprimován genový proteinový produkt. Dále zde popsané jiné metody jako je použití "genového děla" mohou být použity pro in vitro inzerci angiostatin DNA nebo angiostatin regulátorových sekvencí.

Chemické metody genové terapie mohou zahrnovat sloučeniny na bázi lipidů, ne nezbytně liposomy, pro převedení DNA přes buněčnou membránu. Lipofektiny nebo cytofektiny, pozitivní ionty na bázi lipidů, které se vážou k negativně nabitě DNA, tvoří komplex, který může přecházet buněčnou membránou a poskytovat DNA do vnitřku buňky. Jiná chemická metoda používá na receptoru založenou endocytosu, která zahrnuje vazbu specifického ligandu k buněčnému

povrchovému receptoru a jeho obalení a transport přes buněčnou membránu. Ligand se váže k DNA a celý komplex je transportován do buňky. Komplex ligand-gen je injikován do krevního proudu a pak cílové buňky, které mají receptor se budou specificky vázat k ligandu a transportovat komplex ligand-DNA do buňky.

Mnoho metod genové terapie používá virové vektory k inzertování genů do buněk. Například změněné retrovirové vektory byly použity v ex vivo metodách k zavedení genů do periferních a tumor infiltrujících lymfocytů, hepatocytů, epidermálních buněk, myocytů nebo jiných somatických buněk. Tyto změněné buňky se pak zavedou do pacienta pro poskytnutí genového produktu z inzertované DNA.

Virové vektory byly také použity k inzertování genů do buněk za použití in vivo protokolů. K přímé tkáňově specifické expresi cizích genů mohou být použity cis-působící regulátorové prvky nebo promotory, které jsou známy jako tkáňově specifické. Alternativně toho může být dosaženo použitím in situ doručení DNA nebo virálních vektorů ke specifickým anatomickým místům in vivo. Například genový transfer do krevních cév in vivo byl dosažen implantací in vitro transdukovaných endotheliálních buněk do zvolených míst arteriálních stěn. Virem infikovaná okolní buňky také exprimují genový produkt. Virální vektor může být doručován přímo do in vivo místa, například katetrem a tak se umožní, že je pouze určitá plocha infikována virem a poskytne se dlouhodobá, místně specifická genová exprese. In vivo genový transfer za použití retrovirus vektorů byl také demonstrován ve tkáni mléčných žláz a jaterní tkáni injekcí změněného viru do krevních cév, vedoucích k orgánům.

Virální vektory, které byly použity pro protokoly genové terapie, zahrnují, ale nejsou tak omezeny, retroviry, jiné RNA viry jako je poliovirus nebo Sindbis virus, adenovirus, adeno-asociovaný virus, herpes viry, SV 40, vakcína a jiné DNA viry. Replikačně-defektní myší retrovirální vektory jsou nejšíře použitelné vektory genového transferu. Myší leukemie retroviry jsou složeny z jediného řetězce RNA komplexované s nukleárním jadrovým proteinem a polymerasovými (pol) enzymy, zapouzdřenými proteinovým jádrem (gag) a obklopené glykoproteinovým obalem (env), který determinuje hostitelovo rozmezí. Genomická struktura retrovirů zahrnuje gag, pol a env geny zakončené na 5' a 3' dlouhými terminálními opakováními (long terminal repeats - LTR). Retrovirální vektorové systémy využívají skutečnost, že minimální vektor, obsahující 5' a 3' LTR a obalový signál jsou dostatečné pro umožnění vektorového balení, infekce a integrace do cílových buněk za podmínky, že virové strukturální proteiny jsou dodávány in trans do balené buněčné linie. Základní výhody retrovirálních vektorů pro genový transfer zahrnují účinnou infekci a genovou expresi ve většině buněčných typů, přesnou jednokopiovou vektorovou integraci do cílové buněčné chromosomální DNA a snadnou manipulaci retrovirálního genomu.

Adenovirus je složen z lineární, dvojřetězcové DNA komplexované s jadrovými proteiny a obklopené kapsidovými proteiny. Výhody v molekulární virologii vedly ke schopnosti využít biologii těchto organismů k vytvoření vektorů, schopných transdukce nových genetických sekvencí do cílových buněk in vivo. Vektory na bázi adenovirů budou exprimovat genové produktové peptidy ve vysokých hladinách. Adenovirové vektory mají vysokou účinnost infekčnosti, i s nízkými titry viru. Navíc je virus plně infekční jako buněk prostý virion

takže injekce produkčních buněčných linií není nutná. Jinou potenciální výhodou adenovirových vektorů je schopnost dosáhnout dlouhodobé exprese heterologních virů *in vivo*.

Mechanické metody DNA doručení zahrnují fuzogenní lipidové vesikly jako liposomy nebo jiné vesikly pro membránovou fuzi, lipidové částice DNA inkorporující kationtové lipidy jako je lipofektin, polylysinem zprostředkovaný transfer DNA, přímou injekci DNA jako je mikroinjekce DNA do zárodku nebo somatických buněk, pneumaticky doručované DNA-potažené částice jako jsou zlaté částice použité v "genovém dělu" a anorganická chemická řešení jako je transfekce fosforečnanem vápenatým. Jiná metoda, ligandem-zprostředkovaná genová terapie, zahrnuje komplexování DNA se specifickými ligandy za vzniku ligand-DNA konjugátů, k řízení DNA do specifické buňky nebo tkáně.

Bylo nalezeno, že injekce plasmidové DNA do svalových buněk poskytuje vysoké procento buněk, které jsou transfektovány a mají udržovanou expresi marker genů. DNA plasmidu může nebo nemusí integrovat do genomu buněk. Neintegrace transfektované DNA by mohla umožnit transfekci a expresi proteinů genových produktů v koncově diferencionovaných, neproliferativních tkáních po prodlouženou časovou periodu bez obavy z mutačních inzercí, delecí nebo alterací v buněčném nebo mitochondriálním genomu. Dlouhodobý, ale nezbytně nepermanentní, transfer terapeutických genů do specifických buněk může poskytnout léčení genetických chorob nebo profylaktické použití. DNA by měla být reinjektována periodicky pro udržení hladiny genového produktu bez mutací, objevujících se v genomech příjemcových buněk. Neintegrace exogenních DNA může umožnit

přítomnost několika různých exogenních DNA konstruktů v jedné buňce, kde všechny konstrukty exprimují různé genové produkty.

Částicově zprostředkované metody genového transferu byly prvně použity ve transformaci rostlinné tkáně. Se zařízením pro částicové bombardování, nebo "genovým dělem", je generována pohybová síla pro urychlení DNA-potažených částic s vysokou hustotou (jako je zlato nebo wolfram) na vysokou rychlost, která umožňuje penetraci cílových orgánů, tkání nebo buněk. Částicové bombardování může být použito v in vitro systémech nebo s ex vivo nebo in vivo technikami pro zavedení DNA do buněk, tkání nebo orgánů.

Elektroporace pro genový transfer používá elektrický proud pro přípravu buněk nebo tkání citlivých ke genovému transferu zprostředkovanému elektroporací. Krátký elektrický impulz s danou intenzitou pole se používá ke zvýšení permeability membrány tak, že mohou DNA molekuly penetrovat do buněk. Tato technika může být použita v in vitro systémech nebo s ex vivo nebo in vivo technikami pro zavedení DNA do buněk, tkání nebo orgánů.

Nosičem zprostředkovaný genový transfer in vivo může být použit ke transfekci cizí DNA do buněk. Komplex nosič-DNA může být výhodně zaveden do tělesných kapalin nebo krevního proudu a pak místně specificky řízen k cílovému orgánu nebo tkáni v těle. Mohou být použita jak liposomy tak polykationty jako je polylysin, lipofektiny nebo cytofektiny. Mohou být vyvinuty liposomy, které jsou buněčně specifické nebo orgánově specifické a tak bude cizí DNA nesená liposomem přijata cílovými buňkami. Injekce imunoliposomů,

které jsou cíleny ke specifickému receptoru určitých buněk může být použita jako výhodná metoda pro inzerci DNA do buněk, nesoucích receptor. Jiný nosičový systém, který byl použit, je asialoglykoprotein/polylysin konjugátový systém pro vnesení DNA do hepatocytů pro in vivo genový transfer.

Transfektovaná DNA může být také komplexována s jinými typy nosičů tak, že DNA je nesena k buňkám příjemce a pak se usadí v cytoplasmě nebo nukleoplasmě. DNA může být kopulována k nosičovým nukleárním proteinům ve specificky sestavených vesiklových komplexech a nesena přímo do jádra.

Genová regulace angiotstatinu může být uskutečněna podáním sloučenin, které se vážou k angiotstatinovému genu, nebo kontrolním regionům spojeným s angiotstatinovým genem, nebo jeho odpovídajícím RNA transkriptem pro modifikaci rychlosti transkripce nebo translace. Dále buňky transfektované DNA sekvencí, kodující angiotstatin mohou být podány pacientovi pro poskytnutí in vivo zdroje angiotstatinu. Například mohou být buňky transfektovány vektorem, obsahujícím nukleokyselinovou sekvenci, kodující angiotstatin.

Výraz "vektor" jak je zde použit, znamená nosič, který může obsahovat nebo být spojen se specifickými nukleokyselinovými sekvencemi, který působí transport specifických nukleokyselinových sekvencí do buňky. Příklady vektorů zahrnují plasmidy a neinfekční mikroorganismy jako jsou viry nebo nevirální vektory jako jsou konjugáty ligand-DNA, liposomy, komplexy lipid-DNA. Může být žádoucí, aby rekombinantní DNA molekula, obsahující angiotstatin DNA sekvenci, byla operativně připojena ke kontrolní sekvenci exprese za vzniku expresního vektoru schopného exprese

angiostatinu. Transfektované buňky mohou být buňky získané z normální tkáně pacientů, nemocných tkání pacientů nebo to mohou být buňky, které nejsou od pacientů.

Například tumorové buňky získané z pacienta mohou být transfektovány vektorem schopným exprese angiostatinového proteinu podle předloženého vynálezu a znovu zavedeny do pacienta. Transfektované tumorové buňky produkují angiostatinové hladiny, které inhibují růst tumoru, v pacientovi. Pacienti mohou být lidé nebo živočichové, kterými nejsou lidé. Buňky mohou také být transfektovány ne-vektorem, nebo fyzikálními nebo chemickými metodami známými v oboru jako je elektroporace, ionoporace nebo "genovým dělem". Navíc angiostatin DNA může být přímo injektována, bez potřeby nosiče, do pacienta. Zejména angiostatin DNA může být injektována do kůže, svalů nebo krve.

Protokol genové terapie pro transfekci angiostatinu do pacienta může být buď přes integraci angiostatin DNA do genomu buněk, do minichromosomů nebo jako separátní replikační nebo neraplikační DNA konstrukt v cytoplasmě nebo nukleoplasmě buňky. Angiostatinová exprese může pokračovat po dlouhé časové období nebo může být provedeno reinjektování periodicky pro udržení požadované hladiny angiostatinového proteinu v buňce nebo orgánu nebo stanovené krevní hladině.

Angiostatin může být izolován na HPLC C4 koloně (viz tabulka 3). Angiostatinový protein je eluován ze 30 až 35 % v acetonitrilovém gradientu. Při natriumdodecylsulfát polyakrylamidové gelové elektroforéze (PAGE) za redukčních podmínek se eluuje proteinový pruh s aktivitou jako jediný pík při přibližně 38 kilodaltonech.

Vynálezci ukázali, že růst primárního tumoru je spojen s uvolněním specifického inhibitoru(ů) endotheliální buněčné proliferace, zahrnujících angiostatin, který může potlačovat angiogenesi s metastázami, do krevního proudu a tím inhibovat růst samotných metastáz. Původ angiostatinu spojeného s primárním tumorem není znám. Sloučenina může být produkována degradací plasminogenu specifickou proteásou nebo by angiostatin mohl být produkován expresí specifického genu, kodujícího angiostatin.

Angiogenní fenotyp primárního tumoru závisí na produkci angiogenních peptidů v přebytku endotheliálních buněčných inhibitorů, které jsou zpracovány normálními buňkami, ale jsou považovány za potlačované během transformace na neoplasii. Zatímco produkce angiostatinu může být regulována směrem dolů v individuální tumorové buňce vzhledem k produkci jejím rodičovským typem, celkové množství inhibitoru zpracované celým tumorem může být dostačující ke vstupu do oběhu a potlačení endotheliálního růstu na vzdálených místech metastáz. Angiostatin zůstává v oběhu po mnohem delší dobu než angiogenní peptid(y) uvolněný(é) primárním tumorem. Proto se angiogenní peptidy jeví jako působící lokálně, zatímco angiostatin působí globálně a cirkuluje v krvi s relativně dlouhým poločasem životnosti. Poločas angiostatinu je přibližně 12 hodin až 5 dnů.

Bez vazby na následující hypotézu se předpokládá, že když se tumor stane angiogenním, uvolňuje jeden nebo více angiogenních peptidů (např. aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GM-CSF atd.), které působí lokálně, cílí endothelium v blízkosti primárního tumoru z extravaskulárního směru a necirkulují (nebo cirkulují s krátkým poločasem). Tyto angiogenní peptidy

musí být produkovány v množství dostačujícím k překonání působení endotheliálního buněčného inhibitoru (inhibitorů angiogeneze) pro primární tumor pro pokračování expanze jejich populace. Jakmile se objeví růst primárního tumoru, pokračuje uvolňování endotheliálních buněk do oběhu. Podle této hypotézy působí tyto inhibitory daleko od primárního tumoru, cílovém kapilárním endotheliu metastáz z intravaskulárního směru, a pokračuje do oběhu. Právě v době, kdy mohou metastázy začít iniciovat angiogenesi, může být kapilární endothelium v jeho blízkosti inhibováno přicházejícím angiostatinem.

Jakmile primární tumor dosáhne dostatečné velikosti ke způsobení toho, aby angiostatin byl uvolňován kontinuálně do oběhu, je obtížné pro druhý tumorový implantát (nebo mikrometastázy) iniciovat nebo zvýšit svoji vlastní angiogenesi. Jestliže druhý tumorový implantát (např. do subkutánní mezery, nebo do cornea, nebo intravenózně do plic) se objeví krátce po implantaci primárního tumoru, nebude primární tumor schopen potlačit sekundární tumor (protože angiogeneze v sekundárním tumoru bude vždy nedostatečná). Jestliže jsou implantovány dva tumory současně (např. v protilehlých bocích) mohou mít inhibitory ekvivalentní inhibující vzájemný účinek.

Angiostatin podle předloženého vynálezu může být:

- (i) podáván tumor nesoucím lidem nebo živočichům jako antiangiogenní terapie,
- (ii) sledován v lidském nebo živočišném seru, moči nebo tkáni jako prognostický marker a
- (iii) použit jako základ k analýze sera a moči pacientů s rakovinou pro podobné angiostatické molekuly.

Za část předloženého vynálezu je považováno, že angiotatin může být izolován z tělesné kaliny jako je krev nebo moč pacientů nebo angiotatin může být produkován rekombinantními DNA metodami nebo chemickými metodami syntézy peptidů, které jsou dobře známé odborníkům v oboru. Metody čištění proteinu jsou dobře v oboru známé a specifický příklad metody čištění angiotatinu a hodnocení aktivity inhibitoru je poskytnut v příkladech uvedených dále. Izolace lidského endogenního angiotatinu se provádí za použití podobných technik.

Jedním z příkladů metody produkce angiotatinu za použití rekombinantních DNA technik zahrnuje stupně (1) identifikace a čištění angiotatinu jak je diskutováno výše a jak bude podrobněji popsáno dále, (2) stanovení N-koncové aminokyselinové sekvence čištěného inhibitoru, (3) syntetickou přípravu 5' a 3' DNA oligonukleotidových primerů pro angiotatinovou sekvenci, (4) amplifikace angiotatinové genové sekvence za použití polymerasy, (5) inzertování amplifikované sekvence do vhodného vektoru jako je expresní vektor, (6) inzertování gen obsahujícího vektoru do mikroorganismu nebo jiného expresního systému schopného exprese inhibitoru genu a (7) izolaci rekombinantně produkováného inhibitoru. Vhodné vektory zahrnují virální, bakteriální a eukaryotické (jako kvasinkové) expresní vektory. Výše popsané techniky jsou plně popsány v laboratorních manuálech jako je "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" druhé vydání Sambrook a spol., Cold Spring Harbor Press, 1989. DNA sekvence lidského plasminogenu byla publikována (Browne M.J. a spol., "Expression of recombinant human plasminogen and aglycoplasminogen in HeLa cells"

Fibrinolysis sv.5(4). 257-260, 1991) a tato práce je zde uvedena jako odkaz.

Gen pro angiostatin může být také izolován z buněk nebo tkáně (jako jsou tumorové buňky), které exprimují vysoké hladiny angiostatinu (1) izolací mediátorové RNA ze tkáně, (2) použitím reverzní transkriptasy pro vytvoření odpovídající DNA sekvence a pak (3) použitím polymerasové řetězové reakce (PCR) se vhodnými primery pro amplifikaci DNA sekvence, kodující aktivní angiostatin aminokyselinovou sekvencí.

Ještě další metoda produkce angiostatinu nebo jeho biologicky aktivních fragmentů, je peptidová syntéza. Jakmile byl biologicky aktivní fragment angiostatinu nalezen za použití zkušebního systému popsanému plně dále, může být sekvencován, například metodami automatizovaného peptidového sekvencování. Alternativně, jakmile jsou gen nebo DNA sekvence, která koduje angiostatin, izolovány, například metodami popsanými výše, může DNA sekvence být stanovena za použití manuálních nebo automatizovaných sekvenačních metod dobře v oboru známých. Nukleokyselinová sekvence naopak poskytuje informaci o aminokyselinové sekvenci. Tak, je-li generován biologicky aktivní fragment specifickými metodami takto je tryptické štěpení, nebo je-li fragment N-koncově sekvencován, může být zbývající aminokyselinová sekvence stanovena z odpovídající DNA sekvence.

Jakmile je známa aminokyselinová sekvence peptidu, může být syntetizován fragment technikami dobře v oboru známými jak jsou například uvedeny například v "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" E.Atherton a R.C.Sheppard, IRL Press, Oxford, Anglie. Podobně může být syntetizováno

více fragmentů, které jsou následně vzájemně navázány za tvorby velkých fragmentů. Tyto syntetické peptidové fragmenty mohou být také vyrobeny aminokyselinovými substitucemi na specifických místech pro zkoušku aginistické a antagonistické aktivity in vitro a in vivo. Peptidové fragmenty, které vykazují vysokou afinitní vazbu ke tkáním, mohou být použity pro izolaci angiostatin receptoru na afinitních kolonách. Izolace a čištění angiostatin receptoru je podstatný stupeň pro vysvětlení mechanismu působení angiostatinu. Izolace angiostatinového receptoru a identifikace angiostatinových agonistů a antagonistů bude usnadňovat vývoj léčiv ke zmírnění aktivity angiostatin receptoru, finální cesty k biologické aktivitě. Izolace receptoru umožňuje konstrukci nukleosidových sond pro sledování umístění a syntézu receptoru, za použití in situ a roztokové hybridizační technologie. Dále může být izolován gen pro angiostatin receptor, inkorporován do expresního vektoru a transfektován do buněk, jako jsou tumorové buňky pacienta, pro zvýšení schopnosti buněčného typu, tkáně nebo tumoru vázat angiostatin a inhibovat lokální angiogenesi.

Angiostatin je účinný při léčbě chorob nebo procesů, které jsou zprostředkovány, nebo zahrnují, angiogenesi. Předložený vynález zahrnuje metodu léčení angiogenesi zprostředkované choroby účinným množstvím angiostatinu nebo jeho biologicky aktivního fragmentu, nebo kombinací angiostatinových fragmentů, které společně vykazují anti-angiogenní aktivitu nebo angiostatin agonistů a antagonistů. Angiogenesi zprostředkované choroby zahrnují, ale nejsou tak omezeny: pevné tumory, krevní tumory jako jsou leukemie; tumorové metastázy; benigní tumory, například hemangiomy, akustické neuromy, neurofibromy, trachomy a pyogenní

granulomy; reumatoidní artritida; psoriasis; oční angiogenní choroby, například diabetická retinopatie, retinopatie předčasné, makulární degeneraci, odmítnutí corneálního transplantátu, neovaskulární glaukom, retrolentální fibroplasie, rubeosis; Osler-Webberův syndrom; myokardiální angiogenese; plaková neovaskularizace; telangiectasie; hemofilní klouby; angiofibrom a granulace ran. Angiostatin je vhodný pro léčbu chorob nadměrné nebo abnormální stimulace endotheliálních buněk. Tyto choroby zahrnují, ale nejsou tak omezeny, intestinální adhezi, Crohnovu chorobu, atherosklerosu, skleroderm a hypertrofické škáry tj. keloidy. Angiostatin může být použit jako činidlo kontroly porodu prevencí vaskularizace vyžadované pro implantaci embrya. Angiostatin je vhodný při léčbě chorob, které mají angiogenesi jako patologický následek jako je choroba kočičího poškrábání (*Rochele minalia quintosa*) a vředy (*Helicobacter pylori*).

Syntetické peptidové fragmenty angiostatinu mají různá použití. Peptid, který se váže k angiostatinovému receptoru s vysokou specifitou a aviditou, je radioaktivně značen a použit pro vizualizaci a kvantifikaci vazebných míst za použití autoradiografických a membránově vazebných technik. Tato aplikace poskytuje důležitý diagnostický a výzkumný nástroj. Znalost vazebných vlastností angiostatinového receptoru usnadňuje hodnocení transdukčních mechanismů navázaných k receptorům.

Navíc značení angiostatinových peptidů isotopy s krátkou životností umožňují vizualizaci receptorových vazebných míst in vivo za použití pozitronové emisní tomografie nebo jiných

moderních radiografických technik pro lokalizaci tumorů s angiostatinovými vazebnými místy.

Systematická náhrada aminokyselin v těchto syntetizovaných peptidech poskytuje vysoce afinitní peptidové agonisty a antagonisty k angiostatinovým receptorům, které zvyšují nebo snižují angiostatinovou vazbu k jeho receptorům. Takoví agonisté jsou používány k potlačení růstu mikrometastáz, čímž omezují rozšíření rakoviny. Antagonisté k angiostatinu jsou aplikovány v situacích neadekvátní vaskularizace, pro blokování inhibičních účinků angiostatinu a napomáhání angiogenesi. Například toto ošetření může mít terapeutické účinky při napomáhání hojení ran u diabetiků.

Angiostatinové peptidy se používají k vývoji afinitních kolon pro izolaci angiostatinových receptorů z kultivovaných tumorových buněk. Izolace a čištění angiostatinového receptoru je následováno aminokyselinovým sekvencováním. Použitím této informace mohou být gen nebo geny, kodující angiostatinový receptor, identifikovány nebo izolovány. Dále jsou klonované nukleokyselinové sekvence vyvinuty pro inzerci do vektorů schopných exprese receptoru. Tyto techniky jsou dobře známé odborníkům v oboru. Transfekce nukleokyselinové sekvence(í), kodující angiostatinový receptor do tumorových buněk, a exprese receptoru transfektovanými tumorovými buňkami zvyšuje odpověď těchto buněk na endogenní nebo exogenní angiostatin a tím snižuje rychlost metastatického růstu.

Cytotoxická činidla jako je ricin, jsou podobná angiostatinu a vysoce afinitním angiostatinovým peptidovým fragmentům, čímž poskytují prostředek pro destrukci buněk,

které vážou angiostatin. Tyto buňky mohou být nalezeny ve mnoha místech, zahrnujících, aniž by tak byly omezeny, mikrometastázy a primární tumory. Peptidy připojené k cytotoxickým činidlům jsou infundovány mnoha způsoby pro maximální doručení do požadovaného místa. Například ricin-napojené vysoce afinitní angiostatinové fragmenty jsou doručovány kanylou do cév zásobujících cílové místo nebo přímo do cíle. Taková činidla jsou také doručována řízeným způsobem přes osmotické pumpy spojené s infuzní kanylou. Kombinace angiostatinových antagonistů může být současně aplikována se stimulatory angiogenese pro zvýšení vaskularizace tkáně. Tento léčebný režim poskytuje účinný prostředek destrukce metastatické rakoviny.

Angiostatin může být použit v kombinaci s jinými kompozicemi a postupy pro léčbu chorob. Například tumor může být výhodně ošetřen chirurgicky, ozařováním nebo chemoterapií kombinovanými s angiostatinem a pak může být angiostatin následně podáván pacientovi pro zklidnění mikrometastáz a pro stabilizaci a inhibici růstu jakéhokoli zbytkového primárního tumoru. Dále jsou angiostatin, angiostatinové fragmenty, angiostatinová antisera, angiostatin receptor agonisté, angiostatin receptor antagonisté nebo jejich kombinace, kombinovány s farmaceuticky přijatelnými přísadami a popřípadě matricí s udržovaným uvolňováním jako jsou biodegradabilní polymery za vzniku terapeutických kompozic.

Matrice s udržovaným uvolňováním, jak je zde použita, je matrice vyrobená z materiálů, obvykle polymerů, které jsou degradabilní enzymatickou nebo kyselou/bázickou hydrolýzou nebo disolucí. Jakmile je inzertována do těla, působí na matrici enzymy a tělesné kapaliny. Matrice s udržovaným

uvolňováním je výhodně zvolena z biokompatibilních materiálů jako jsou liposomy, polylaktidy (polymléčná kyselina), polyglykolidy (polymer glykolové kyseliny), polylaktid ko-glykolidy (ko-polymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové) polyanhydridy, poly(ortho)estery, polypeptidy, hyaluronová kyselina, kolagen, chondroitin sulfát, karboxylové kyseliny, mastné kyseliny, fosfolipidy, polysacharidy, nukleové kyseliny, polyaminokyseliny, aminokyseliny jako je fenylalanin, tyrosin, isoleucin, polynukleotidy, polyvinylpropylen, polyvinylpyrrolidon a silikon. Výhodná biodegradabilní matrice je matrice z jednoho buď polylaktidu, polyglykolidu, nebo polylaktid ko-glykolidu (kopolymery kyseliny mléčné a glykolové).

Angiogenesi modulující terapeutická kompozice podle předloženého vynálezu může být pevná, kapalná nebo aerosol a může být podávána jakýmkoliv známým způsobem podání. Příklady pevných terapeutických kompozic zahrnují pilulky, krémy, a implantovatelné dávkové jednotky. Pilulky mohou být podávány orálně, terapeutické krémy mohou být podávány topicky. Implantovatelné dávkové jednotky mohou být podávány lokálně, například na místo tumoru, nebo mohou být implantovány pro systémové uvolňování terapeutické angiogenesi modulující kompozice, například subkutánně. Příklady kapalné kompozice zahrnují formulace upravené pro subkutánní, intravenozní, intraarteriální injekci a formulace pro topické a intraoční podání. Příklady aerosolových formulací zahrnují inhalační formulace pro podání do plic.

Angiostatin podle předloženého vynálezu může být také použit k vyvolání protilátek, které jsou specifické pro inhibitor a jeho receptor. Protilátky mohou být buď

polyklonální protilátky nebo monoklonální protilátky. Tyto protilátky, které se specificky vážou k angiostatinu nebo angiostatinovým receptorům mohou být použity v diagnostických metodách a kitech, které jsou dobře známé odborníkům v oboru pro detekci nebo kvantifikaci angiostatinu nebo angiostatinových receptorů v tělesné kapalině nebo tkáni. Výsledky těchto testů mohou být použity pro diagnózu nebo předpověď výskytu nebo znovu objevení se rakoviny a jiných angiogeně zprostředkovaných chorob.

Angiostatin může být také použit v diagnostické metodě a kitu pro detekci a kvantifikaci protilátek schopných vázat angiostatin. Tyto kity by měly umožnit detekci cirkulujících angiostatin protilátek, které indikují výskyt mikrometastáz za přítomnosti angiostatinu sekretovaného primárními tumory in situ. Pacienti, kteří mají takové cirkulující anti-angiostatin protilátky mohou být s větší pravděpodobností postiženi vývojem násobných tumorů a rakovin a může u nich s větší pravděpodobností docházet k opakovanému výskytu rakoviny po léčbách nebo periodách remise. Fab fragmenty těchto anti-angiostatin protilátek mohou být použity jako antigeny pro generování anti-angiostatin Fab-fragment antisera, které může být použito pro neutralizaci anti-angiostatin protilátek. Taková metoda by měla redukovat odstranění cirkulujícího angiostatinu anti-angiostatinovými protilátkami a tím účinně snižovat cirkulující angiostatinové hladiny.

Jiným aspektem předloženého vynálezu je metoda blokování působení nadbytku endogenního angiostatinu. Toto může být provedeno pasivní imunizací člověka nebo živočicha s protilátkami specifickými pro nežádoucí angiostatin v

systému. Toto léčení může být důležité při léčení abnormální ovulace, menstruace a placentace a vaskulogenese. Poskytuje vhodný prostředek pro hodnocení vlivů odstranění angiostatinu na metastatické procesy. Fab fragment angiostatinových protilátek obsahuje vazebné místo pro angiostatin. Tento fragment se izoluje z angiostatinových protilátek za použití technik, které jsou známe v oboru. Fab fragmenty angiostatinového antisera se používají jako antigeny ke generování produkce anti-Fab fragment sera. Infuze tohoto antisera proti Fab fragmentům angiostatinu brání angiostatinu ve vazbě k angiostatinovým protilátkám. Terapeutický přínos se získá neutralizací endogenních anti-angiostatinových protilátek při blokování vazby angiostatinu k Fab fragmentům anti-angiostatinu. Přínosem této léčby je usnadnění schopnosti endogenního cirkulujícího angiostatinu dosáhnout cílových buněk a tím zmenšit rozptyl metastáz.

Je třeba pochopit, že předložený vynález je zamýšlen jako zahrnující jakékoliv deriváty angiostatinu, které mají endotheliální inhibiční aktivitu. Předložený vynález zahrnuje celý angiostatin protein, deriváty angiostatin proteinu a biologicky aktivní fragmenty angiostatin proteinu. Tyto zahrnují proteiny s angiostatinovou aktivitou, které mají aminokyselinové substituce nebo mají k aminokyselinovým funkčním skupinám připojené cukry nebo jiné molekuly. Předložený vynález také zahrnuje geny, které kodují angiostatin a angiostatin receptor a proteiny, které jsou těmito geny exprimovány.

Proteiny a proteinové fragmenty s angiostatinovou aktivitou popsanou výše mohou být poskytnuty jako izolované a v podstatě čištěné proteiny a proteinové fragmenty ve

farmaceuticky přijatelných formulacích za použití způsobů formulování známých odborníkům v oboru. Tyto formulace mohou být podávány standardními metodami. Obecně mohou být podávány kombinace topicky, transdermálně, intraperitoneálně, intrakraniálně, intracerebroventrikulárně, intracerebrálně, intravaginálně, intraneurinálně, orálně, rektálně nebo parenterálně (např. intravenózně, intraspinálně, subkutánně nebo intramuskulárně). Dále může být angiostatin inkorporován do biodegradabilních polymerů, umožňujících udržované uvolňování sloučeniny, a polymery jsou implantovány do blízkosti místa, kam je žádoucí doručovat léčivo, například na místo tumoru nebo implantovány tak, že se angiostatin pomalu systémově uvolňuje. Osmotické minipumpy mohou být také použity pro poskytnutí kontrolovaného doručení vysokých koncentrací angiostatin přes kanylu do místa zájmu jako je přímo do metastatického růstu nebo do vaskulárního zásobování tumoru. Biodegradabilní polymery a jejich použití je například popsáno podrobně v práci Brema a spol., J.Neurosurg. 74:441-446 (1991), který je zde zahrnut jako reference v celém svém rozsahu.

Dávka angiostatinu podle předloženého vynálezu bude záviset na stavu choroby nebo podmínkách, které jsou léčeny a dalších klinických faktorech jako je hmotnost a stav člověka nebo živočicha a způsob podání sloučeniny. Pro léčení lidí nebo živočichů může být podáváno mezi přibližně 0,5 mg/kilogram až 500 mg/kilogram angiostatinu. V závislosti na poločasů životnosti angiostatinu v živočiších nebo lidech, může být angiostatin podáván v intervalech mezi několikrát denně až jednou týdně. Předložený vynález je třeba chápat jako použitelný jak pro humánní i veterinární použití. Metody předloženého vynálezu zahrnují jednotlivá i násobná podání,

podávaná buď současně nebo během prodlouženého časového období.

Angiostatinové formulace zahrnují ty, které jsou vhodné pro orální, rektální, oftalmické (zahrnující intravitreální nebo intrakamerální), nasální, topické (zahrnující bukální a sublinguální), intrauterinární, vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intraperitoneální, intramuskulární, intravenozní, intradermální, intrakraniální, intratracheální a epidurální) podání. Angiostatinové formulace mohou být výhodně provedeny v jednotkové dávkové formě a mohou být připraveny běžnými farmaceutickými technikami. Takové techniky zahrnují stupeň uvedení účinné složky do spojení s farmaceutickým nosičem(nosiči) nebo přísadou (přísadami). Obecně se formulace připraví jednotným a těsným uvedením účinné složky do spojení s kapalnými nosiči nebo jemně dělenými pevnými nosiči nebo oběma a pak, je-li to nutné, tvarováním produktu.

Formulace vhodné pro parenterální podání zahrnují vodné a nevodné sterilní injekční roztoky, které mohou obsahovat antioxidanty, pufrý, bakteriostaty a roztoky, které činí formulaci isotonickou s krví zamýšleného příjemce; a vodné a nevodné sterilní suspenze, které mohou zahrnovat suspenzační činidla a zahušťovací činidla. Formulace mohou být obsaženy v jednodávkových nebo vícedávkových kontejnerech, uzavřených ampulích a lahvičkách a mohou být uchovávány ve vymražení sušené (lyofilizovaném) stavu, vyžadujícím pouze přídavek sterilního kapalného nosiče, například vody pro injekce, bezprostředně před použitím. Extemporální injekční roztoky a suspenze mohou být připraveny ze sterilních prášků, granulí a tablet dříve popsáného typu.

Preferované jednotkové dávkové formulace jsou ty, které obsahují denní dávku nebo jednotku, denní sub-dávku, nebo její vhodné frakce, podávané složky. Je třeba mít na zřeteli, že navíc ke složkám uvedeným výše mohou formulace podle předloženého vynálezu obsahovat další činidla běžná v oboru podle typu požadované formulace. Popřípadě mohou být cytotoxická činidla inkorporována nebo jinak spojena s angiostatinovými proteiny nebo jejich biologicky funkčními peptidovými fragmenty, pro poskytnutí dvojité terapie pacientovi.

Angiogenesi inhibující peptidy podle předloženého vynálezu mohou být syntetizovány ve standardních mikrochemických zařízeních a čištění ověřeno pomocí HPLC a hmotové spektrofotometrie. Metody peptidové syntézy, HPLC čištění a hmotová spektrofotometrie jsou běžně známé odborníkům v oboru. Angiostatinové peptidy a angiostatin receptorové peptidy jsou také produkovány v rekombinantní *E.coli* nebo kvasinkových expresních systémech a čištěny sloupcovou chromatografií.

Různé fragmenty intaktní angiostatinové molekuly mohou být syntetizovány pro použití v některých aplikacích, zahrnujících, ale neomezuujících se na, následující: jako antigeny pro vývoj specifických antiser, jako agonisty a antagonisty aktivní na angiostatin vazebných místech, jako peptidy připojované nebo použité v kombinaci s cytotoxickými činidly pro cílené usmrcení buněk, které vážou angiostatin. Aminokyselinové sekvence, které obsahují tyto peptidy jsou vybrány na základě jejich polohy v exterior regionech molekuly a jsou dosažitelné pro vazbu k antiseru. Amino a karboxylové konce angiostatinu, jakož i střední region

molekuly jsou představovány separátně mnoha fragmenty, které byly syntetizovány.

Tyto peptidové sekvence jsou porovnány se známými sekvencemi za použití proteinových sekvenčních databází jako je GenBank, Brookhaven Protein, SWISS-PROT a PIR pro stanovení potenciálních sekvenčních homologií. Tato informace usnadňuje eliminaci sekvencí, které vykazují vysoký stupeň sekvenční homologie k jiným molekulám, čímž se zvyšuje potenciál pro vysokou specifickou při vývoji antisera, agonistů a antagonistů k angiotatinu.

Angiotatin a peptidy odvozené od angiotatinu mohou být kopulovány k jiným molekulám za použití standardních metod. Amino a karboxylové konce angiotatinu obsahují jak tyrosinové tak lysinové zbytky a jsou isotopicky a neisotopicky značeny různými technikami, například radioaktivně značeny za použití obvyklých technik (tyrosinové zbytky - chloramin T, jodogen, laktoperoxidasa; lysinové zbytky - Bolton-Hunterovo činidlo). Tyto kopulační techniky jsou v oboru dobře známy. Alternativně se tyrosin nebo lysin adují k fragmentům, které nemají tyto zbytky pro usnadnění značení reaktivních amino a hydroxylových skupin peptidu. Kopulační technika je zvolena podle funkčních skupin dostupných na aminokyselinách, zahrnujících, ale neomezujících se na amino, sulfhydryl, karboxyl, amid, fenol a imidazol. Různá činidla použitá k uskutečnění těchto kopulací zahrnují mezi jiným glutaraldehyd, diazotizovaný benzidin, karbodiimid a p-benzochinon.

Angiotatinové peptidy jsou chemicky kopulovány k isotopům, enzymům, nosičovým proteinům, cytotoxickým

činidlům, fluorescentním molekulám, chemiluminiscentům, bioluminiscentům a jiným sloučeninám pro různé aplikace. Účinnost kopulační reakce je determinována různými technikami vhodnými pro specifickou reakci. Například radioaktivní značení angiotatinu peptidu pomocí  $^{125}\text{I}$  se provádí za použití chloraminu T a  $\text{Na}^{125}\text{I}$  s vysokou specifickou aktivitou. Reakce se ukončí metabisulfitem sodným a směs se odsolí na jednorázových kolonách. Značený peptid se eluuje z kolony a frakce se shromáždí. Z každé frakce se odeberou podíly a měří se radioaktivita na gama čítači. Tímto způsobem se nezreagovaný  $\text{Na}^{125}\text{I}$  oddělí od značeného angiotatinu peptidu. Peptidové frakce s nejvyšší specifickou radioaktivitou se uchovávají pro následné použití jako je analýza schopnosti se vázat k angiotatinu antiseru.

Jinou aplikací peptidové konjugace je produkce polyklonálního antisera. Například angiotatin peptidy, obsahující lysinové zbytky jsou navázány k čištěnému hovězímu serovému albuminu za použití glutaraldehydu. Účinnost reakce je determinována měřením inkorporace radioaktivně značeného peptidu. Nezreagovaný glutaraldehyd a peptid jsou odděleny dialýzou. Konjugát je uchováván pro následné použití.

Může být připraveno antiserum proti angiotatinu, angiotatinovým analogům, peptidovým fragmentům angiotatinu a angiotatinu receptoru. Po peptidové syntéze a čištění se jak monoklonálního tak polyklonálního antisera dosáhne použitím technik, které jsou známy odborníkům. Například mohou být polyklonální antisera vyvolána u králíků, ovcí, koz nebo jiných zvířat. Angiotatinové peptidy konjugované k nosičové molekule jako je hovězí serový albumin, nebo samotný angiotatin, jsou kombinovány se směsí pomocných látek,

emulgovány a injektovány subkutánně na více míst zad, krku, boků a někdy paty. V pravidelných intervalech jako jsou 2 až 4 týdny, se podávají boosterové injekce. Krevní vzorky se získají venipunkturou, například za použití marginálních ušních vén po dilataci, přibližně 7 až 10 dnů po každé injekci. Krevní vzorky byly ponechány se srazit při 4 °C přes noc a odstřeďují se přibližně při 2400 x g při 4 °C po asi 30 minut. Serum se odstraní, odeberou se podíly, a skladuje se při 4 °C pro bezprostřední použití nebo při -20 až 90 °C pro následující analýzu.

Všechny vzorky z přípravy polyklonálního antisera nebo vzorky media z produkce monoklonálního antisera se analyzují pro stanovení titru protilátek. Titr se stanoví několika způsoby, například použitím tečkových blotů a hustotní analýzy a také srážením radioaktivně značených komplexů peptid-protilátka za použití proteinu A, sekundárního antisera, studeného ethanolu nebo aktivního uhlí-dextranu následovaného měřením aktivity gama čítačem. Antisera s nejvyšším titrem se také čistí na afinitních kolonách, které jsou komerčně dostupné. Angiostatinové peptidy jsou kopulovány ke gelu v afinitní koloně. Vzorky antisera procházejí kolonou a anti-angiostatin protilátky zůstávají navázané ke koloně. Tyto protilátky jsou následně eluovány, shromážděny a hodnoceny stanovením titru a specifčnosti.

Antiserum s nejvyšším titrem se testuje pro stanovení následujícího: a) optimální antiserové ředění pro nejvyšší specifickou vazbu antigenu a nejnižší nespecifickou vazbu, b) schopnost vázat zvyšující se množství angiostatin peptidu ve standardní vytěšňovací křivce, c) potenciální křížová reaktivita s příbuznými peptidy a proteiny, zahrnujícími

plasminogen a také angiotatin příbuzných druhů, d) schopnost detegovat angiotatin peptidy v extraktech plasmy, moči, tkání a v buněčném kultivačním mediu.

Kity pro měření angiotatinu a angiotatin receptoru, jsou také považovány za část předloženého vynálezu. Antisera, které vykazují nejvyšší titr a specifčnost a mohou detegovat angiotatin peptidy v extraktech plasmy, moče, tkání a v buněčném kultivačním mediu se dále hodnotí pro stanovení snadnosti použití kitů pro rychlé, pohodlné, citlivé a specifické měření a lokalizaci angiotatinu. Tyto zkušební kity zahrnují, ale nejsou tak omezeny, následující techniky: kompetitivní a nekompetitivní eseje, radioimunoeseje, bioluminiscenční a chemiluminiscenční eseje, fluorometrické eseje, sendvičové eseje, imunoradiometrické eseje, tečkové bloty, s enzymy spojené eseje jako je ELISA, mikrotitrační destičky, protilátkou potažené pásy nebo namáčecí pásy pro rychlé monitorování moče nebo krve a imunocytochemii. Pro každý kit se stanoví rozmezí, citlivost, přesnost, pohodlnost, specifčnost a reprodukovatelnost eseje. Intraesejová a interesejová variace je stanovena v bodech, odpovídajících 20 %, 50 % a 80 % standardních křivek vytěsnění nebo aktivity.

Jedním příkladem esejového kitu obvykle používaného ve výzkumu a klinické praxi je radioimunoesejový (RIA) kit. Angiotatin RIA je ilustrován dále. Po úspěšné radiojodaci a čištění angiotatinu nebo angiotatin peptidu se přidá antiserum, vykazující nejvyšší titr v několika ředěních do zkumavek, obsahujících relativně konstantní množství radioaktivity, jako 10000 cpm, ve vhodném pufrovém systému. Další zkumavky obsahují pufr nebo preimunní serum pro

stanovení nespecifické vazby. Po inkubaci při 4 °C po 24 hodin se přidá protein A a zkumavky se vortexují, inkubují se při teplotě místnosti 90 minut a odstřeďují přibližně při 2000 - 2500 x g při 4 °C pro vysrážení komplexů protilátky navázané ke značenému antigenu. Supernatant se odstraní odsátím a radioaktivita pelet se spočte na gama čítači. Ředění antisera, které váže přibližně 10 až 40 % značeného peptidu po odečtení nespecifické vazby, je dále charakterizováno.

Potom se rozmezí ředění (přibližně 0,1 pg až 10 ng) angiotatin peptidu použité pro vývoj antisera hodnotí přidavkem známých množství peptidu do zkumavek, obsahujících radioaktivně značený peptid a antiserum. Po další inkubační periodě, například 24 až 49 hodin, se přidá protein A a zkumavky se odstřeďují, supernatant se odstraní a radioaktivita v peletě se spočte. Vytěsnění vazby radioaktivně značeného angiotatin peptidu neznačeným angiotatin peptidem (standard) poskytne standardní křivku. Určité koncentrace jiných angiotatin peptidových fragmentů, plasminogenu, angiotatinu z jiných druhů, a homologní peptidy se přidávají ke zkušebním zkumavkám pro charakterizaci specifity angiotatinového antisera.

Extrakty různých tkání, zahrnují, ale nejsou tak omezeny, primární a sekundární tumory, Lewisův plicní karcinom, kultury angiotatin produkujících buněk, placenta, děloha a jiné tkáně jako je mozek, játra a intestinum, se připraví použitím technik, které jsou úspěšně použity pro extrakci angiotatinu. Po lyofilizaci nebo Speed Vac tkáňových extraktů, se přidá esejový pufr a různé podíly se umístí do RIA zkumavek. Extrakty známých angiotatin

produkujících buněk produkují vytěšňovací křivky, které jsou paralelní se standardní křivkou, zatímco extrakty tkání, které neprodukují angiotatin nevytěšňují radioaktivně značený angiotatin z angiotatinového sera. Navíc extrakty moči, plasmy a cerebrospinální kapaliny z živočichů s Lewisovým plicním karcinomem se přidávají do esejových zkumavek ve zvýšených množstvích. Paralelní vytěšňovací křivky indikují použitelnost angiotatinové esej pro měření angiotatinu ve tkáních a tělesných kapalinách.

Tkáňové extrakty, které obsahují angiotatin jsou dále charakterizovány tím, že se podíly podrobí HPLC s reverzní fází. Eluované frakce se odeberou, suší ve Speed Vac, rekonstituují v RIA pufru a analyzují v angiotatinové RIA. Maximální množství angiotatinové imunoreaktivity je umístěno ve frakcích, odpovídajících eluční poloze angiotatinu.

Esejový kit poskytuje instrukce, antiserum, angiotatin nebo angiotatin peptid, a popřípadě radioaktivně značený angiotatin a/nebo činidla pro srážení vázaných komplexů angiotatin-angiotatin protilátka. Kit je použitelný pro měření angiotatinu v biologických kapalinách a tkáňových extraktech živočichů a lidí s nebo bez tumorů.

Další kit je použit pro lokalizaci angiotatinu ve tkáních a buňkách. Tento angiotatin imunohistochemický kit poskytuje instrukce, angiotatin antiserum a popřípadě blokující serum a sekundární antiserum připojené ke fluorescentní molekule jako je fluorescein isothiokyanát, nebo k některému jinému činidlu použitému pro vizualizaci primárního antisera. Imunohistochemické techniky jsou dobře známé odborníkům v oboru. Tento angiotatin

ve tkáňových řezech a kultivovaných buňkách za použití jak světelné tak elektronové mikroskopie. Používá se jak pro výzkumné tak klinické účely. Například se provedou biopsie tumorů nebo se tyto odeberou a tkáň se nařežou mikrotomem pro hodnocení míst produkce angiostatinu. Taková informace je použitelná pro diagnostické a popřípadě terapeutické účely při detekci a léčbě rakoviny. Další metodou pro vizualizaci míst angiostatinové biosyntézy zahrnují radioaktivní značení nukleových kyselin pro použití v in situ hybridizaci k sondě pro angiostatin messenger RNA. Podobně může být lokalizován angiostatin receptor, vizualizován a kvantifikován imunohistochemickými technikami.

Tento vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které nejsou v žádném případě tento vynález omezující. Naopak je třeba zdůraznit, že je možno uskutečnit různá jiná provedení, modifikace a jejich ekvivalenty, které po přečtení popisu mohou samy o sobě být zřejmé odborníkům v oboru aniž by byla překročena myšlenka tohoto vynálezu a/nebo rozsah připojených nároků.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

Volba zvířecího tumorového systému, ve kterém je růst metastáz inhibován primárním tumorem a je urychlen po odstranění primárního tumoru.

Screeningem různých myších tumorů schopných inhibice svých vlastních metastáz, byl vybrán Lewisův plicní karcinom, ve kterém primární tumor účinně inhibuje plicní metastázy. Syngenní C57B16/J šest týdnů staří samečkové myši byly

injikování (subkutánní dorsum)  $1 \times 10^6$  tumorových buněk. Viditelné tumory se nejprve objevují po 3-4 dnech. Když tumory měly velikost přibližně  $1500 \text{ mm}^3$ , byly myši náhodně rozděleny na dvě skupiny. Primární tumor byl úplně vyříznut v první skupině a ponechán netknut ve druhé skupině po simulované operaci. Ačkoliv tumory od  $500 \text{ mm}^3$  do  $3000 \text{ mm}^3$  inhibují růst metastáz,  $1500 \text{ mm}^3$  byl největší primární tumor, který mohl být bezpečně resekován s vysokým přežitím a ne lokálním znovu výskytem.

Po 21 dnech byly všechny myši usmrceny a provedena autopsie. V myši s netknutým primárním tumorem bylo čtyři +2 viditelné metastázy, ve srovnání s padesáti +5 metastázami v myši, které byl tumor odstraněn ( $p < 0,0001$ ). Tyto údaje byly potvrzeny hmotností plic, která je v těsném souladu s tumorovým zatížením, jak bylo dříve demonstrováno. Bylo zde 400% zvýšení ve hmotnosti vlhkých plic u myší, které měly své tumory odstraněny ve srovnání s myši, ve kterých tumory zůstaly intaktní ( $p < 0,0001$ ).

Tento experimentální model poskytl reprodukovatelná data a popsáný pokus je reprodukovatelný. Tento tumor je označen "Lewisův plicní karcinom - nízko metastatický (Lewis lung carcinoma -low metastatic) (LLC-Low). Tumor také potlačuje metastázy téměř shodným způsobem v SCID myších, které jsou deficientní jak v B tak T lymfocytech.

## Příklad 2

Izolace varianty Lewisova plicního karcinomu, která je vysoce metastatická, ať je či není primární tumor odstraněn

Vysoce metastatická varianta Lewisova plicního karcinomu vyrostla spontánně z LLC-Low buněčné linie z příkladu 1 v jedné skupině myši a byla izolována podle metod popsaných v příkladu 1 a opakovaně transplantována. Tento tumor (LLC-High) tvoří více než 30 viditelných metastáz ať je či není přítomen primární tumor.

### Příklad 3

Velikost metastáz a proliferační rychlosti tumorových buněk v nich. Vliv primárního tumoru, který inhibuje metastázy (LLC-Low)

Ve všech pokusech byly použity myši C57B16/J. Myši byly inokulovány subkutánně LLC-Low buňkami a o 14 dnů později byly odstraněny primární tumory u poloviny myši. 5., 10. a 15.den po odstranění tumoru, myši byly usmrceny. Byly získány histologické sekce plicních metastáz. Myši s netknutým primárním tumorem měly mikrometastázy v plicích, které nebyly neovaskularizovány. Tyto metastázy byly omezeny na průměrně 12 až 15 buněčné vrstvy a nevykazují významnou velikost zvýšení ani 15 dnů po odstranění tumoru. Naopak, živočichové ze kterých byl primární tumor odstraněn, vykazují velké vaskularizované metastázy již 5 dnů po operaci. Tyto metastázy procházejí dalším 4-násobným zvýšením objemu 15.den po odstranění tumoru (jak je potvrzeno hmotností plic a histologií). Přibližně 50 % zvířat, která měla odstraněna primární tumor, uhynulo před koncem pokusu následkem metastáz. Všechna zvířata s netknutým primárním tumorem přežívají do konce pokusu.

Replikační rychlost tumorových buněk s metastázami byla stanovena spočtením jader vybarvených pomocí BrdU, která byla předem injektována do myši. Vysoké procento tumorových buněk inkorporujících BrdU do malých, avaskulárních metastáz zvířat s netknutým primárním tumorem bylo ekvivalentní BrdU inkorporaci tumorových buněk do velkých vaskularizovaných metastáz myši, ze kterých byl odstraněn primární tumor (obr. 3). Toto zjištění potvrzuje, že přítomnost primárního tumoru nemá přímý vliv na rychlost replikace tumorových buněk v metastázách.

Na obr.3 levý panel představuje BrdU značící index tumorových buněk v plicích za přítomnosti nebo nepřítomnosti primárního tumoru. Před imunohistochemickým vybarvením byly řezy permeabilizovány s 0,2M HCl po 10 minut a štěpeny s 1 µg/ml proteinasy K (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Německo) v 0,2M Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> při 37 °C 15 minut. Index značení byl hodnocen spočtením procent pozitivních jader při hodnotě 250 . Pravý panel na obr. 3 znázorňuje analýzu celkové plicní hmotnosti tumorů s primárními tumory netknutými nebo odstraněnými 5., 10. a 15.den po operaci. Zvířata byla usmrcena 6 hodin po intraperitoneální injekci BrdU (0,75 mg/myš).

#### Příklad 4

Inhibice angiogeneze v plicních metastázách za přítomnosti netknutého primárního tumoru

Pro měření stupně vaskularizace v plicních metastázách byly tkáně vybarveny protilátkami proti von Willebrandovu faktoru (endotheliální specifický marker, dostupný od Dako Inc. Carpinteria, CA). Metastázy ze zvířat s netknutými

tumory tvořící tenký obal (8-12 vrstev tumorových buněk) kolem existujících pulmonárních cév. S výjimkou endotheliálních buněk cévní výstelky nebyly žádné buňky nebo bylo málo buněk pozitivních pro von Willebrandův faktor. Naopak, plicní metastázy zvířat 5.dnů po odstranění primárního tumoru nebyly jen větší, ale byly také infiltrovány s kapilárními výběžky, obsahujícími endotheliální buňky, které jsou vybarveny von Willebrandovým faktorem.

V imunohistochemické analýze za přítomnosti endotheliálních buněk v plicních metastázách, měly plicní metastázy s primárním plicním tumorem netknutým 19 dnů po inokulaci, měl obal tumorových buněk, obklopující již existující mikrocévy v plicích. Metastázy byly limitovány 8 až 12 buněčnými vrstvami. Nebyla zde zřejmá žádná neovaskularizace kolem mikrocév a neobsahují žádné nové mikrocévy. Toto byla typická maximální velikost avaskulárních preangiogenních metastáz.

V imunohistochemické analýze tkáně odebrané pět dnů po resekci primárního tumoru (19 dnů po inokulaci primárního tumoru), obklopují metastázy již existující cévy v plicích. Naopak ve vzorku, kde nebyl primární tumor odejmut, byl tumor neovaskularizován. Netknutý primární tumor tak inhibuje tvorbu nových kapilárních krevních cév v metastázách, ale proliferace tumorových buněk v metastázách není neovlivněna primárním tumorem.

#### Příklad 5

Primární tumor inhibuje angiogenesi druhého tumoru implantovaného do myšího cornea. Růst tohoto druhého tumoru je inhibován.

0,25 až 0,5 mm<sup>2</sup> Lewisova plicního tumoru (LLC-Low) bylo implantováno do myšího cornea v den 0. (Muthukkaruppan Vr., a spol., Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205:1416-1418, 1979). Primární tumor byl vytvořen inokulací  $1 \times 10^6$  LLC-Low buněk subkutánně do dorsa, buď 4. nebo 7.den před corneálním implantem; nebo v den corneálního implantu; nebo 4. nebo 7.den po corneálním implantu. Kontrolní myši dostaly corneální implant ale ne subkutánní tumor. Další kontrolní myši dostaly corneální implant a inokulaci LLC-Hogh tumorových buněk do dorsa 4 dny před corneálním implantem. Cornea byla hodnocena denně stereomikroskopií s klouzavou lampou na růst corneálního tumoru (měřeno očním mikrometrem) a na růst nových kapilárních cév z okraje corneálního limbu.

U kontrolních myší, nenesoucích primární subkutánní tumor většina corneí (6/8) vyvinula neovaskularizaci, začínající 6. až 7.den po corneální implantaci a pokračující do 10.dne. 10. den dosáhly vaskularizované corneální tumory přibližně čtvrtiny objemu celého oka. Za přítomnosti primárních subkutánních LLC-Low tumorů, corneální implanty se neovaskularizovaly, jestliže primární tumor byl na místě alespoň 4 dny nebo více před corneálním implantem (tabulka 1). Za nepřítomnosti neovaskularizace rostly corneální tumory pomalu jako tenké, bílé, avaskulární disky v corneu.

Nicméně, jestliže nebyl primární tumor implantován do 4 dnů po corneálním implantu, cornea vaskularizovala a 3/3 corneální tumory rostly podobnými rychlostmi jako u tumor nenesoucích kontrol. Za přítomnosti primárního subkutánního LLC-High tumoru většina corneí (2/3) vyvinula neovaskularizaci, začínající 7.den po corneální implantaci a

pokračující do 10.dne. 10.den opět vaskularizované corneální tumory dosáhly přibližně čtvrtiny objemu celého oka.

#### Tabulka 1

Inhibice tumorové angiogenese v corneu primárním subkutánním tumorem. [Všechny primární tumory jsou LLC-Low s výjimkou (\*), který je LLC-High].

|                                        |      |     |     |     |       |     |     |
|----------------------------------------|------|-----|-----|-----|-------|-----|-----|
| den očního implantu                    | 0    | 0   | 0   | 0   | 0     | 0   | 0   |
| den implantu primárního tumoru         | -7   | -4  | -4* | 0   | žádný | +4  | +7  |
| počet myši s novými corneálními cévami | 2/10 | 0/9 | 2/3 | 2/3 | 6/8   | 3/3 | 2/2 |
| 10.den                                 |      |     |     |     |       |     |     |

Bylo by možno očekávat, že 0/10 corneí by mohlo vykazat neovaskularizaci, jestliže byl implantován primární LLC-Low subkutánní tumor 7 dní před implantem očního tumoru (t.j. - 7). Nicméně 2 z tumorů (2/10) se staly nekrotickými protože byly příliš velké ( $> 3 \text{ cm}^3$ ).

#### Příklad 6

Primární netknutý tumor inhibuje angiogenesi indukovanou sekundárním subkutánním implantem bázeického faktoru fibroblastového růstu (basic fibroblast growth factor - bFGF).

I když experimenty popsané v příkladech V a VI ukazují, že primární tumor inhibuje angiogenesi v sekundárních metasázích, tyto studie neprozrazují, zda primární tumor: (i) inhibuje endotheliální proliferaci (nebo angiogenesi) přímo, nebo (ii) nepřímo potlačováním angiogenní aktivity

metastatických tumorových buněk. Pro rozlišení mezi těmito dvěma možnostmi bylo ohnisko angiogeneze indukováno impletem matrigelu, obsahujícího bázeický fibroblastový růstový faktor (bFGF). (Passanti A. a spol., A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. Lab.Invest. 67:519, 1992).

Matrigel (extrakt základních membránových proteinů), obsahující buď 25 nebo 50 ng/ml bFGF za přítomnosti heparinu, byl injektován subkutánně do ventrálního povrchu normální a tumor nesoucí myši (LLC-Low). Myši byly usmrceny o 4 dny později a koncentrace hemoglobinu v gelu byla měřena pro kvantifikaci tvorby krevních cév. Již dříve bylo zjištěno, že počet nových cév, které vstupují do matrigelu je v souladu s koncentrací hemoglobinu. (Folkman J., Angiogenesis and its inhibitors in "Important Advances in Oncology 1985", VT DeVita, S. Hellman a S. Rosenberg, vyd., J.B. Lippincott, Philadelphia 1985). Některé gely byly také připraveny pro histologické hodnocení. U normální myši byly úplně červené matrigelové pelety, které obsahují 50 ng/ml bFGF. Byly těžce invadovány novými kapilárními cévami a obsahují 2,4 g/dl hemoglobinu. Matrigel, který postrádá bFGF byl translucenční a šedý a obsahuje pouze 0,4 g/dl hemoglobinu (6-násobný rozdíl). Naopak, matrigel z myši s primárním tumorem obsahuje pouze 0,5 g/dl (obr. 4).

Téměř úplná inhibice angiogeneze v tomto pokuse potvrzuje, že přítomnost Lewisova plicního primárního tumoru může inhibovat přímo bFGF-indukovanou angiogenesi.

## Příklad 7

Transfer sera ze zvířete nesoucího tumor do zvířeti, kterému byl odstraněn primární tumor potlačuje metastázy

Myším byl implantován Lewisův plicní karcinom jak je popsáno výše. Po 15 dnech když tumory byly velikosti přibližně  $1500 \text{ mm}^3$ , byly myši náhodně rozděleny do čtyř skupin, Tři skupiny byly podrobeny kompletnímu chirurgickému vynětí primárního tumoru; v jedné skupině byly tumory ponechány na místě (po simulaci chirurgického postupu). Myši ve třech resekčních skupinách pak denně dostávaly intraperitoneální injekce salinického roztoku, sérum z normální tumor nenesoucí myši nebo serum z myši se  $1500 \text{ mm}^3$  Lewisovým plicním karcinomem. Skupina myši s tumory ponechány netknutými dostávala salinické injekce. Všechny myši byly ošetřovány 21 dny, pak byla zvířata usmrcena a byly spočteny plicní metastázy (tabulka 2).

Tabulka 2

|                                     | odstraněný primární<br>tumor |                  | primární tumor<br>netknutý |           |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------|-----------|
| léčba                               | sal.                         | serum z          | serum z                    | salinické |
| (intraperi-<br>toneální<br>injekce) |                              | normální<br>myši | myši ne-<br>soucí<br>tumor | injekce   |
| počet                               | 55+5                         | 50+4             | 7+2                        | 3+1       |

Tyto výsledky byly potvrzeny hmotností plic.  $p < 0,0001$  pro rozdíl mezi dvěma skupinami [(55&50) vs. (7&3)]. Podobné výsledky byly získány za použití angiostatinu z moči zvířat nesoucích tumor.

## Příklad 8

Hovězí kapilární endotheliální (BCE) buněčná esej

BCE buňky se použijí poue mezi pasážemi 9 a 14. V den 0 byly buňky umístěny na plotnu do želatinizované (1,5 % želatiny v PBS při 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> po 24 hodin a pak opláchnuty 0,5 ml PBS) 24 jamkových destiček v koncentraci 12500 buněk/jamka. Buňky byly spočteny za použití hemocytometru. Buňky byly umístěny na plotnu v 500 µl DMEM s 10 % teplem inaktivovaného (56 °C 20 minut) bovinního telcího sera a 1 % glutamin-pen-strep (GPS).

## Příklad 8

## Bovinní kapilární endotheliální (BCE) buněčná esej

BCE buňky byly použity pouze mezi pasážemi 9 a 14. V den 0 byly buňky BCE umístěny do želatinované (1,5 % želatiny v PBS při 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> po 24 hodin a pak promyty 0,5 ml PBS) 24jamkových destiček v koncentraci 12500 buněk/jamka. Buňky byly spočteny za použití hemocytometru. Buňky byly umístěny na plotnu v 500 µl DMEM s 10 % teplem inaktivovaného (56 °C na 20 min) bovinního telecího sera a 1 % glutamin-pen-strep (GPS).

BCE buňky byly podníceny následovně: Medium se odstraní a nahradí se 250 µl DMEM/5% BCS/1 % GPS. Pak se do jamek přidá testovaný vzorek. (Množství se mění v závislosti na testovaném vzorku). Plotny se umístí při 37 °C/10 % CO<sub>2</sub> na přibližně 10 minut. 250 µl DMEM/5% BCS/1% GPS se 2 ng/ml bFGF se přidá do každé jamky. Konečné medium je 500 µl DMEM/5 % BCS/1 % GPS/ s 1 ng/ml bFGF. Plotna se vrátí do 37 °C/10 % CO<sub>2</sub> inkubátoru na 72 hodin.

4.den jsou buňky spočteny odstraněním media a pak tryptinizací všech jamek (0,5 ml trypsinu/EDTA) na 2 až 3 minuty. Suspndované buňky se pak transferují do scintilačních lahvíček s 9,5 ml Hemetallu a spočtou za použití Coulter counteru. Jednotka aktivity je množství sera, obsahujícího angiostatin, které je schopné produkovat poloviční maximální inhibici kapilární endotheliální proliferace, jsou-li endotheliální buňky inkubován v bFGF 1 ng/ml po 72 hodin.

## Příklad 9

Serum z myši, nesoucí nízkometastatický Lewisův plicní tumor (LLC-Low) inhibující kapilární endotheliální buněčnou proliferaci in vitro

Hovězí kapilární endotheliální buňky byly stimulovány bázickým fibroblastovým růstovým faktorem (bFGF 1 ng/ml) v 72-hodinové proliferační esejí. Serum z myši, nesoucích tumor, přidané k těmto kulturám inhibuje endotheliální buněčnou proliferaci dávkově závislým a reverzibilním způsobem. Normální serum nebylo inhibiční (obr. 5). Endotheliální buněčná proliferace byla inhibována podobným způsobem (vzhledem ke kontrolám) serem získaným z tumor nesoucích nu/nu myši a SCID myši. Po odstranění primárního tumoru angiostatinová aktivita zmizela ze sera během 3-5 dnů.

Tumor nesoucí serum také inhibuje bovinní aortické endotheliální buňky a endotheliální buňky získané ze spontánního myšího hemangioendotheliomu. (Obeso a spol., "Methods in Laboratory Investigation, A Hemangioendothelioma-derived cell line; Its use as a Model for the Study of Endothelial Cell Biology", Lab. Invest., 63(2), str. 259-269, 1990), ale neinhibuje buňky Lewisova plicního tumoru, 3T3, fibroblastů, buňky aortických hladkých svalů, epithelia plic norka nebo fibroblastů W138 plic lidského fetu.

## Příklad 10

Serum z myši, nesoucí Lewisův plicní tumor (LLC-High), které neinhibuje metastazy, neinhibuje kapilární endotheliální buněčnou proliferaci in vitro

Serum z myši, nesoucí primární tumor LLC-High významně neinhibuje proliferaci bFGF-stimulovaných hovězích kapilárních endotheliálních buněk vzhledem ke kontrole. Také, jestliže bylo toto serum podrobeno prvním dvěma stupňům čištění (heparin-Sepharosová chromatografie a gelová filtrace), nebyla angiostatinová aktivita nalezena v žádných frakcích.

#### Příklad 11

Ascity z Lewisova plicního karcinomu (nízko metastatická), také generuje angiostatinové serum

Myši dostaly intraperitoneální injekce buď LLC-Low nebo LLC-High tumorové buňky ( $10^6$ ) a o jeden týden později 1-2 ml byl krevní ascit získán od každé z 10-20 myší. Byl pozorován výsev mesenterického tumoru. Myši byly pak usmrceny. Bylo získáno serum srdeční punkcí. Serum bylo také získáno z normální, tumor nenesoucí myši jako kontroly. Serum a ascity byly odstředěny pro odstranění buněk, a supernatanty byly hodnoceny na hovězí kapilární endotheliální buňky stimulované bFGF (1 ng/ml) (viz příklad IX). Ascity, pocházející jak z tumorových typů stimulujících významně proliferaci kapilárních endotheliálních buněk (např. 100% proliferace) proti kontrole po 72 hodin (obr. 6). naopak serum z nízkometastatických myší inhibuje endotheliální buněčnou proliferaci (inhibice 79 % kontroly). Serum z vysokometastatické linie bylo stimulující ze 200 %.

Tato data ukazují, že ascity z nízkometastatické linie obsahují převahu stimulatoru endotheliálního růstu vůči angiostatinu. Tento stav je analogický pevnému primárnímu tumoru. Navíc angiostatinová aktivita se objevuje v seru, jak

byla bez stimulační aktivity. Tento způsob je podobný jako u pevného primárního tumoru (LLC-Low). Ascity z vysoce metastatického tumoru (LLC-High) se také jeví jako obsahující převahu endotheliálního buněčného stimulátoru, ale angiostatin nemohl být v seru identifikován.

#### Příklad 12

Frakcionace angiostatinu ze sera sloupcovou chromatografií a analýza růst inhibujících frakcí pomocí SDS-PAGE

Pro čištění angiostatinového(ých) ser, bylo spojeno serum z myši, nesoucích tumor. Inhibiční aktivita, hodnocená podle výše popsané in vitro esejí inhibitorové aktivity, bylo postupně chromatografováno za použití heparin-Sepharosy, Biogel AO,5 mm agarosy a několika cyklů vysokotlakové kapalinové chromatografie s C4-reverzní fází (HPLC). SDS-PAGE HPLC frakce, která obsahuje endotheliální inhibitorovou aktivitu, poskytuje oddělený pás o zjevně redukované  $M_r$  38000 Daltonů, který byl čištěn přibližně 1 milion-násobně (viz tabulka 3) na specifickou aktivitu přibližně  $2 \times 10^7$ . V různých stadiích čištění byly spojené frakce testovány se specifickými protilátkami na přítomnost známých endotheliálních inhibitorů. Destičkový faktor-4, thrombospondin, nebo transformační růstový faktor beta, nebyly nalezeny v částečně čištěných nebo čištěných frakcích.

Tabulka 3

|                   | specifická aktivita<br>(jednotky*/mg) | násobek<br>čištění |
|-------------------|---------------------------------------|--------------------|
| serum             | 1,69                                  | 1                  |
| heparin sepharosa | 14,92                                 | 8,8                |
| Bio-gel AO,5m     | 69,96                                 | 41,4               |

HPLC/C4

 $2 \times 10^7$  $1,2 \times 10^6$ 

\*Jednotka aktivity je takové množství sera, obsahujícího angiotatin, které je schopno produkovat polovinu maximální inhibice kapilární endotheliální proliferace, jsou-li endotheliální buňky inkubovány v bFGF 1 ng/ml po 72 hodin.

### Příklad 13

Frakcionace angiotatinu z moči sloupcovou chromatografií a analýza růst inhibujících frakcí pomocí SDS-PAGE

Čištění endotheliálního buněčného inhibitoru(ů) ze sera je znesnadněno malým objemem sera, které bylo získáno z každé myši a velkým množstvím proteinu v seru.

Moč z myší, nesoucích tumor, byla analyzována a shledáno, že obsahuje inhibitor endotheliální buněčné proliferace, který není přítomen v moči tumor nenesoucích myší a z myší s LLG-High tumory. Čištění endotheliální buněčné aktivity bylo provedeno stejnou strategií, která byla použita pro čištění sera (popsáno výše) (obr.7).

Obr. 7 představuje chromatografii s C4 reverzní fází částečně čištěného sera nebo moči z tumor nesoucích zvířat. Všechny frakce byly hodnoceny na bovinní kapilární endotheliální buňky s bFGF v eseji 72-hodinové proliferace jak je popsáno v příkladu IX. Oddělený pík inhibice byl zřejmý v obou případech eluujících ve 30 až 35 % acetonitrilu ve frakci 23. SDS-polyakrylamidová gelové elektroforéza inhibiční frakce ze třetího cyklu chromatografie s C4 reverzní fází sera z tumor nesoucích zvířat ukazuje jediný pás při asi 38000 Daltonech.

## Příklad 14

## Charakterizace cirkulujícího angiostatinu

Endotheliální inhibice byla studována postupem popsáním v příkladu 9. Angiostatin byl izolován na koloně Synchropak HPLC C4. (Synchrom, Inc. Lafayette, IN). Inhibitor byl eluován při 30 až 35% acetonitrilovém gradientu. Při natrium dodecylsulfátové polyakrylamidové gelové elektroforézním (PAGE) gelu za redukčních podmínek ( $\beta$ -merkapt ethanol (5% obj./obj.), proteinové pásy s aktivitou eluují při 38 kilodaltoních. Za neredukujících podmínek eluuje protein s aktivitou při 28 kilodaltoních. Aktivita byla nalezena v podobných bodech, kdy byl počáteční vzorek izolován z moči nebo ze sera. Aktivita nebyl detegována v žádném z jiných pásů.

Aktivita spojená s pásy zmizela při zahřátí (100 °C na 10 minut) nebo zpracování s trypsinem. Když byl pás s aktivitou extrahován směsí voda/chloroform (1:1), byla aktivita nalezena pouze ve vodné fázi.

## Příklad 15

## Čištění inhibičních fragmentů z lidského plasminogenu

Plasminogenné lysin vazebné místo I bylo získáno od Sigma Chemical Company. Přípravek je čištěný lidský plasminogen po štěpení elastasou. Lysin vazebné místo I získané tímto způsobem je populace peptidů, které obsahují, ve spojení, alespoň tři trojitě-smyčkové struktury (čísla 1 až 3) v plasmin A-řetězci (Kringle 1+2+3). (Sotrup-Jensen L., a spol., v Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, díl.3, 191, Davidson J.F. a spol. vyd. Raven

Press, New York 1978 a Wiman B. a spol., Biochemica et Biophysica Acta, 579, 142 (1979)). Plasminogenové lysin vazebné místo I (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) bylo resuspendováno ve vodě a nanášeno na kolonu s C4-reverzní fází, která byla ekvilibrována s HPLC-grade vodou/0,1 % TFA. Kolona byla eluována gradientem voda/0,1 % TFA až acetonitril/0,1 % TFA a frakce byly odebrány do polypropylenových zkumavek. Podíl každé byl odpařen ve speed vac, resuspendován s vodou a aplikován na BCE v proliferační eseji. tento postup byl opakován dvakrát pro inhibiční frakce za použití podobného gradientu pro eluci. Inhibiční aktivita eluuje při 30-35 % acetonitrilu v konečném průchodu C4 kolonou. SDS-PAGE inhibiční frakce poskytuje tři oddělené pásy zjevně redukované molekulové hmotnosti 40, 42,5 a 45 kd. SDS-PAGE za neredukčních podmínek poskytuje tři pásy molekulové hmotnosti 30, 32,5 a 35 kd.

#### Příklad 16

##### Extrakce inhibiční aktivity z SDS-PAGE

Čištěné inhibiční frakce z čištění na bázi lidského plasminogenu byly děleny pomocí SDS-PAGE za nedenaturujících podmínek. Plochy gelu, odpovídající pásům viditelným v sousedních drahách s nanesenými stejnými vzorky při vabarvení stříbrem byly vyříznuty z gelu a inkubovány v 1 ml salinického fosfátového pufru při 4 °C po 12 hodin v polypropylenových zkumavkách. Supernatant byl odstraněn a dialyzován dvakrát proti salinickému roztoku po 6 hodin (MWCO = 6-8000) a dvakrát proti destilované vodě po 6 hodin. Dialyzáty byly odpařeny vakuovým odstředěním. Produkt byl resuspendován v salinickém roztoku a aplikován k bovinním kapilárním endotheliálním buňkám stimulovaným 1 ng/ml

bázického fibroblastového růstového faktoru v 72 hodinové eseji. Protein extrahovaný z každého ze tří pásů inhibuje kapilární endotheliální buňky.

#### Příklad 17

##### Studie léčby plasminogenovým fragmentem

Myši byly implantovány Lewisovými plicními karcinomy a podrobeny resekci při velikosti tumorů 1500-2000 mm<sup>3</sup>. V den operace byly myši náhodně rozděleny na 6 skupin po 6 myších. Myši denně dostávaly intraperitoneální injekce se třemi čištěnými inhibičními fragmenty lidského plasminogenu, celého lidského plasminogenu, moči ze zvířat nesoucích tumor, moči z normálních myší nebo salinický roztok. Jedna skupina zvířat nesoucích tumor, která dostala pouze simulovaný postup, byla ošetřována salinickými injekcemi. Ihned po odstranění primárního tumoru myši dostaly intraperitoneální injekci 24 µg (1,2 mg/kg/den/myš) inhibičních plasminogenových fragmentů jako nástupní dávku. Potom dostávaly denně intraperitoneální injekce 12 µg inhibičního fragmentu (0,6 mg/kg/den/myš) po dobu trvání pokusu. Kontrolní myši dostaly stejnou dávku celé plasminogenové molekuly po odstranění tumoru. Pro ošetření močí se moč od normální nebo tumor nesoucí myši filtruje, dialyzuje intenzivně, lyofilizuje a pak resuspenduje ve sterilní vodě pro získání 250 násobné koncentrace. Myším se podává 0,8 ml dialyzovaného myšího koncentrátu, buď od myší, nesoucích tumor nebo normálních myší, ve dvou intraperitoneálních injekcích v den odstranění tumoru jako nástupní dávce. Tyto potom dostávají denní intraperitoneální injekce 0,4 ml dialyzované a koncentrované moči v průběhu pokusu. V léčení se pokračuje 13 dnů a pak byly myši usmrceny a provedena autopsie.

Výsledky pokusů jsou uvedeny na obr. 8 a 9. Obr. 8 představuje povrch plicních metastáz po 13 dnech léčení. Povrchové plicní metastázy označují počet metasáz, které jsou viditelné v plicích myši při autopsii. Ke stanovení počtu metasáz byl použit stereomikroskop. Obr. 8 představuje průměrný počet povrchových plicních metasáz, které byly spočteny a byla stanovena standardní chyba měření. Jak je uvedeno, nevykazuje skupina myši s přítomným primárním tumorem metastázy. Myši ve kterých primární tumor byl resektován a byly ošetřeny se salinickým roztokem, vykazují intenzivní metasázy. Myši ošetřené fragmentem lidského plasminogenu nevykazovaly žádné metastázy. Myši ošetřené celým plasminogenem vykazovaly rozsáhlé metastázy indikující, že celá plasminogenová molekula neměla žádnou endotheliální inhibiční aktivitu. Ty myši, které byly ošetřeny dialyzovanou a koncentrovanou močí myši, nesoucích tumor, nevykazovaly žádné metastázy. Myši ošetřené koncentrovanou močí z normální myši vykazovaly rozsáhlé metasázy. Při stanovení hmotnosti plic byly získány podobné výsledky (obr. 9).

#### Příklad 18

Aminokyselinová sekvence myšího a lidského angiostatinu.

Aminokyselinová sekvence angiostatinu izolovaného z myší moči a angiostatinu izolovaného z přípravku fragmentu lidského lysin vazebného místa, byly stanoveny na Applied Biosystem Model 477A protein sekvenátoru.

Fenylthiohydantoinové aminokyselinové frakce byly identifikovány pomocí on-line ABI Model 120A HPLC.

Aminokyselinová sekvence stanovená od N-terminální sekvence a tryptických digestů myšího a lidského angiostatinu indikuje, že sekvence angiostatinu je podobná sekvenci začínající při

aminokyselinové sekvenci 98 myšího plasminogenu. Tedy aminokyselinová sekvence je molekula, obsahující protein, mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelové elektroforézy a mající aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou sekvenci fragmentu myšího plasminogenu začínající při aminokyselině číslo 98 intaktního myšího plasminogenu. Začínající aminokyselinová sekvence myšího angiostatinu (SEQ IN NO: 2) je uvedena na obr. 1. Délka aminokyselinové sekvence může být mírně delší nebo kratší než je uvedeno na obr. 1.

Analýza N terminální aminokyselinové kyseliny a tryptických digestů aktivní frakce lidského lysin vazebného místa I (viz příklad 15) ukazuje, že sekvence frakce začíná při přibližně aminokyselině 97 nebo 99 lidského plasminogenu a lidského angiostatinu je homologní s myším angiostatinem. Začínající aminokyselinová sekvence lidského angiostatinu (start při aminokyselině 98) je uvedena na obr. 2, (SEQ ID NO:3). Aminokyselinová sekvence myšího a lidského angiostatinu je porovnána na obr. 2 s odpovídajícími aminokyselinovými sekvencemi z plasminogenu jiných druhů, zahrnujících prasečí, hovězí a Rhesus opičí plasminogen, a indikuje přítomnost angiostatinu v těchto druzích.

#### Příklad 19

##### Exprese lidského angiostatinu v E.coli

pTrcHisA vektor (Invitrogen) (obr.10) byl použit k dosažení vysoké hladiny regulované transkripce z trc promotoru pro zvýšenou translační účinnost eukaryotických genů v E.coli. Angiostatin je exprimován fuzovaný k N-

terminálnímu nikl-vázajícímu polyhistidinovému konci pro jednostupňové čištění využívající pryskyřic s afinitou ke kovům. Enterokinasové štěpící rozpoznávací místo ve fuzním peptidu umožňuje následné odstranění N-terminálního histidinového fuzního peptidu z čištěného rekombinantního proteinu. Rekombinantní lidský angiostatin protein byl zjištěn jako vázající lysin; je křížově reaktivní s monoklonálními protilátkami specifickými pro kringle regiony 1, 2 a 3 a inhibuje bFGF-řízenou endoteliální buněčnou proliferaci in vitro.

Pro konstrukci inzertu se získá genový fragment, kodující lidský angiostatin z lidské jaterní mRNA, která se reverzně transkribuje a amplifikuje za použití polymerasové řetězové reakce (PCR) a specifických primerů. Produkt 1131 bázových párů koduje aminokyseliny 93 až 470 lidského plasminogenu. Amplifikovaný fragment byl klonován do XhoI/KpnI místa pTrcHisA a výsledný konstrukt transformován do XL-1B (dostupný od Stratagene) E.coli hostitelské buňky. Kontrolní klon, obsahující plasmidový vektor pTrcHisA samotný byl transformován také do XL-1B E.coli hostitelských buněk. Tento klon je označován jako vektorový kontrolní klon. Oba klony byly čištěny shodně jak je popsáno dále.

Exprimující kolonie byly zvoleny následujícím způsobem. Kolonie vzniklé z E.coli transformované genem, kodujícím angiostatin rostly na IPTG impregnovaných nitrocelulozových filtrech a převrstveny na LB agarové plotny. Po IPTG vyvolání exprese byly kolonie lyzovány na nitrocelulozových filtrech. Nitrocelulozové přenosy byly blokovány, promyty a sondovány se dvěma monoklonálními protilátkami (mAbs Dcd a Vap; S.G.McCance a F.J.Castellino, University of Notre Dame),

které rozpoznávají specifickou konformaci angiostatinu. Byly selektovány silně exprimující kolonie rozpoznávané mAbs.

K identifikaci optimální doby pro maximální expresi byly buňky odebrány v různých časech před a po vyvolání IPTG a vystaveny opakovaným cyklům zmrazení-tání, následovaným analýzou s SDS-PAGE, imunoblotingem a sondováním s mAbs Dcd a Vap.

Z nich byl selektován pTrcHisA/HAsH4. Indukce s IPTG byla 4 hodiny, pak byly pelety buněk odebrány a resuspendovány v 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 5% glycerolu a 200 mg/ml lysozymu a míchány 30 min při 4 °C. Kaše byla odstřeďována při 1400 ot./min po 25 min a pelety byly resuspendovány v 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 5% glycerolu a 0,1 % DOC. Tato suspenze byla míchána 1 h při 4 °C a pak odstřeďována při 14000 ot./min. 25 min. Supernatantová frakce v tomto stupni obsahuje exprimovaný angiostatin. E.coli exprimovaný lidský angiostatin byl zjištěn jako vykazující fyzikální vlastnost nativního angiostatinu, to jest schopnost vázat lysin. E.coli exprimovaný angiostatin byl tak čištěn přes lysin-sepharose (Pharmacia nebo Sigma) kolonu v jediném stupni. Eluce angiostatinu z kolony byla 0,2M epsilon-amino-n-kapronovou kyselinou pH 7,5.

Po těchto pokusech byla provedena 10l fermentační vsádka klonu pTrcHisA/HAsA4. Buňky získané z této indukce ve velkém byly peletovány a resuspendovány v 50 mM Tris pH 7,5, rozlámány při 10000 psi, třikrát zchlazen na 10 °C v mezi pasážích. Získaný lyzát byl odstřeďován při 10000 ot/min po 30 min při 4 °C a exprimovaný angiostatin byl izolován přes lysin-sepharosu (obr. 11).

Čištěný *E.coli* exprimovaný lidský angiostatin byl dialyzován odsáváním proti vodě a lyofilizován. Exprimovaný lidský angiostatin byl resuspendován v mediu (DMEM, 5% BCS, 1% gentamycin/penicilin/streptomycin) k hodnocení koncentrace 3 µg/ml a použit v hovězích kapilárních endotheliálních (BCE) buněčných esejích in vitro, jak je popsáno v příkladu 8. Podobně kontrolní klon, obsahující vektor samotný byl zpracováván stejným způsobem jako klon pTrcHisA/HASH4. Byl indukován shodně s IPTG, a bakteriální lyzát byl použit k vázání lysinu, eluován s 0,2M aminokapronovou kyselinou, dialyzován odsáváním a lyofilizován. Tento kontrolní přípravek byl resuspendován v mediu také při hodnocené koncentraci 3 µg/ml. Vzorky rekombinantního angiostatinu a kontroly byly získány z různých indukčních a fermentačních vsádek jakož i separátních čištění a byly kodovány v EntreMed, Maryland. BCE eseje byly provedeny s těmito kodovanými vzorky ve slepém způsobu v Children's Hospital, Boston.

Výsledky BCE esejí rekombinantního lidského angiostatinu ukazují, že lidský angiostatin exprimovaný v *E.coli* inhibuje proliferaci BCE buněk díky bFGF (použitý v 1 ng/ml) (obr. 12). Zásobní rekombinantní angiostatin v mediu (asi 3 µg/ml) byl použit v ředění 1:5, 1:10 a 1:20. Procenta inhibice byla vypočtena následovně:

$$1 - \frac{\text{počet buněk s angiostatinem} - \text{počet buněk v den 0}}{\text{počet buněk s bFGF samotným} - \text{počet buněk v den 0}}$$

Procenta inhibice BCE buněčné proliferace byla srovnatelná nebo vyšší než z plasminogenu získaného

angiostatinu v jiných koncentracích. Výsledky z opakovaných provedení BCE eseje jsou znázorněny na obr. 13, kde při ředění 1:5 zásobního roztoku poskytuje rekombinantní angiostatin podobná procenta inhibice jako se získají s angiostatinem získaným z plasminogenu. Obr. 13 představuje překvapující výsledek, že lidská rekombinantní angiostatin protein inhibuje více než ze 60 % a i nad 75 % BCE proliferace v kultuře.

#### Příklad 20

Angiostatin udržuje latentost mikrometasáz při zvýšení rychlosti apoptozy

Následující subkutánní inokulace C57 BL6/J myši s buňkami Lewisova plicního karcinomu ( $1 \times 10^6$ ), se vyvinuly primární tumory přibližně velikosti 1,5 cm<sup>3</sup>. Zvířata byla podrobeny buď chirurgickému odstranění primárního tumoru nebo simulovanému chirurgickému zákroku. 5., 10. a 15. den po chirurgickém zákroku byly myši usmrceny a jejich plíce připraveny pro histologické hodnocení. Zvířata s odejmutými tumory vykazují masivní proliferaci mikrometastáz ve srovnání se kontrolami se simulovanou operací (obr. 14). Tyto změny byly spojeny s významným zvýšením hmotnosti plic. Analýza proliferace tumorových buněk, měřeno podle příjmu brom-deoxyuridinu (BrdU) nevykazuje žádné rozdíly mezi zvířaty s netknutými primárními tumory nebo odňatými tumora 5., 9. a 13. den, což znamená, že zvýšení hmoty tumoru by nemohlo být vysvětleno zvýšenou proliferací (obr. 15). V souladu s tím byla u těchto zvířat hodnocena buněčná smrt. Apoptosa, proces buněčné smrti je závislá na změnách v genové expresi a podíl na eliminaci buněk během vývoje a v rychle proliferujících tkáních jako je tenké střevo, byl hodnocen imunohistochemicky

značenou fragmentovanou DNA technikou terminální deoxynukleotidyl transferasy (TdT). Apoptický index byl stanoven v každém čase usmrcení. Odstranění primárních tumorů působí statisticky významné zvýšení (přibližně 3 až 4krát) indexu apoptozy ve všech hodnocených časech (obr. 15).

Toto je podpořeno ošetřením myši s odstraněnými primárními tumory exogenním supresorem angiogenese. Tato substance, TNP-1470 (O-chloracetylkarbamoyl fumagillol, dříve nazývaný AGM-1470) je analogem fumagillinu s uváděnou antiangiogenní aktivitou. Subkutánní injekce TNP-1470 (30 mg/kg každé dva dny) poskytuje výsledky, které byly velmi podobné výsledkům popsaným výše pro zvířata, která měla netknuté primární tumory. Tato zvířata vykazují menší hmotnost plic, ekvivalentní proliferační index a zvýšený apoptický index ve srovnání se salinickými ijektovanými kontrolami (obr.16).

Tyto hodnoty indikují, že metasázy zůstávají latentní, je-li proliferace tumorových buněk v rovnováze s ekvivalentní rychlostí buněčné smrti. Odstranění primárního tumoru působí rychlé zvýšení růstu metastáz, pravděpodobně díky odstranění inhibitorů angiogenese (angiostatin), které kontrolují metastatický růst zvýšením apoptozy v tumorových buňkách. Tyto účinky jsou podobné těm, které je možno pozorovat po odstranění primárních tumorů a podání exogenního inhibitoru angiogenese. Souhrnně, tyto údaje naznačují, že primární tumor uvolňuje angiostatin, který udržuje latentnost mikrometasáz.

#### Příklad 21

Ošetření primárních tumorů s angiostatinem in vivo

Angiostatin byl čištěn z lidského plasminogenu limitovaným elastasovým štěpením jak je popsáno v příkladu 15 výše. Angiostatin byl resuspendován ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku pro podání šest týdnů starým samcům myši C57Bl6/J. Zvířata byla implantována subkutánně  $1 \times 10^6$  tumorovými buňkami buď Lewisova plicního karcinomu nebo T241 fibrosarkomu. Ošetření angiostatinem započalo po čtyřech dnech, kdy velikost tumorů je 80-160 mm<sup>3</sup>. Myši dostaly angiostatinové injekce buď v jediné injekci 40 mg/kg nebo dvou 80 mg/kg injekcích intraperitoneálně (ip) nebo subkutánně (sc). Zvířata byla usmrcena v různých časech po ošetření v rozmezí 19 dnů.

Angiostatin podávaný v denní dávce 40 mg/kg ip, produkuje vysoce významnou inhibici růstu T241 primárních tumorů (obr. 17). Tento inhibiční vliv na růst byl viditelně zřejmý během 2 dnů a zvýšený řádově během časového průběhu studie. 18.den měly myši ošetřené angiostatinem tumory, které činily přibližně 38 % objemu u salinickým roztokem injektovaných kontrol. Tyto rozdíly byly statisticky významné ( $p < 0,001$ , Studentův t-test).

Angiostatinové ošetření (celková dávka 80 mg/kg/den, podáno dvakrát denně v dávce 40 mg/kg ip nebo sc) také významně redukuje růstovou rychlost LLC-LM primárních tumorů (obr. 17). Tento inhibiční účinek byl zřejmý po 4 dnech a po celou následující dobu hodnocení byl řádově zvýšen. V poslední den pokusu (19.den) vykazovaly angiostatinem ošetřené myši objem tumoru, který byl pouze 20 % objemu u salinicky injektovaných kontrol, což je významný rozdíl ( $p < 0,001$  Studentův t-test).

V dalších seriích pokusů byl angiostatin podáván (50 mg/kg q12h) myši s implantovanými buňkami T241 fibrosarkomu, Lewisova plicního karcinomu (LM) nebo sarkomu retikulárních buněk. Pro každý typ tumorových buněk měly myši, které dostaly angiostatin podstatně redukovanou velikost tumoru. Obr. 19 demonstruje, že pro T241 fibrosarkom angiostatinem ošetřené myši měly objemy tumorů, které činily pouze 15 % objemu u neošetřené myši 24.den. Obr. 20 demonstruje, že pro Lewisův plicní karcinom (LM) angiostatinem ošetřené myši měly průměrné objemy tumorů, které činily pouze 13 % objemu u neošetřené myši 24.den. Obr. 21 demonstruje, že pro sarkom retikula měly angiostatinem ošetřené myši objemy tumorů, které byly pouze 19 % objemů u neošetřených myši ve 24.den. Data představují průměr ze 4 myši v daném časovém bodě.

Tyto výsledky demonstrují, že angiostatin je extrémně potentním inhibítozem růstu tří různých primárních tumorů in vivo.

#### Příklad 22

Ošetření in vivo angiostatinem myši s primárními tumory získanými z lidských buněk

Byl studován vliv angiostatinu na dvě lidské tumorové buněčné linie, karcinom lidské prostaty PC-3 a lidský karcinom prsu MDA-MB. Imunodeficientním myším SCID byly implantovány lidské tumorové buňky a myši byly ošetřeny 50 mg/kg angiostatinu každých 12 hodin v podstatě jak je popsáno v příkladu 21. Výsledky demonstrují, že angiostatin protein podle předloženého vynálezu je potentní inhibitor růstu lidských nádorových buněk. Obr. 22 ukazuje, že u lidského karcinomu prostaty PC-3 angiostatinem ošetřené myši měly

pouze 2 % průměrného objemu tumoru ve srovnání s neošetřenou kontrolou myši 24.den. Obrázek 23 ukazuje, že u karcinomu MDA-MB lidského prsu měly angiostatinem ošetřené myši pouze 8 % průměrného objemu tumoru ve srovnání s neošetřenou kontrolou myši 24.den.

### Příklad 23

Genová terapie - Vliv transfekce angiostatin genu na objem tumoru

DNA sekvence o 1380 párech bází pro angiostatin získaný z myši plasminogenové cDNA (získaná z American Type Culture Collection (ATCC)), kodující myši plasminogenové aminokyseliny 1-460, byla generována za použití PCR a inzertována do expresního vektoru. Expresní vektor byl transfektován do T241 fibrosarkomových buněk a transfektované buňky byly implantovány do myši. Kontrolní myši dostaly buď netransfektované T241 buňky nebo T241 buňky transfektované pouze vektorem (tj. angiostatin neexprimujícími buňkami). Tři klony buněk exprimujících angiostatin byly použity v tomto pokuse. V průběhu času byl stanoven průměrný objem tumoru. Výsledky vykazují překvapivou a výraznou redukci průměrného objemu tumoru u myši s buněčnými klony, exprimujícími angiostatin ve srovnání s netransfektovanými a neexprimujícími kontrolními buňkami.

Myši DNA skvence, kodující myši A protein je získána z myši plasminogenové cDNA. Myši angiostatin zahrnuje myši plasminogen kringle regiony 1-4. Schematická konstrukce tohoto klonu je uvedena na obr. 24.

Myši angiostatin proteinové klony byly transfektovány do T241 fibrosarkomových buněk za použití LIPOFECTIN<sup>TM</sup>

transfekčního systému (dostupný od Life Technologies, Gaithersburg, MD). LIPOFECTIN<sup>TM</sup> činidlo je 1:1 (hmotn./hmotn.) liposomový přípravek kationtového lipidu N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamoniumchlorid (DOTMA) a diolekoyl fosfatidylethanolaminu (DOPE) v membránově filtrované vodě.

Postup přechodné transfekce buněk je následující:

1. T241 buňky rostou v 60 cm<sup>2</sup> miskách pro tkáňovou kulturu s výsevem  $\approx 1-2 \times 10^5$  buněk ve 2 ml vhodného růstového media doplněného serem.
2. Buňky se inkubují při 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru až jsou buňky ze 40-70 % konfluentní, což je obvykle za 18-24 hodin, ale doba se mění podle různých buněčných typů. T241 tumorové buňky byly konfluentní z přibližně 70 %.
3. Připraví se následující roztok ve 12 x 75 mm sterilních zkumavkách:  
 Roztok A: pro každou transfekci se zředí 5 µg DNA ve 100 µl sera prostého OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (dostupné od Life Technologies) (může být také použita deionizovaná voda čistoty pro tkáňovou kulturu).  
 Roztok B: pro každou transfekci se zředí 30 µg LIPOFECTINU ve 100 µl OPTI-MEM media.
4. Spojí se dva roztoky, opatrně promíchají a inkubují se při teplotě místnosti 10-15 min.
5. Buňky se promyjí sera prostým mediem.

6. Pro každou transfekci se přidá 0,8 ml sera prostého media do každé zkumavky, obsahující komplex LIPOFECTIN. činidlo-DNA. Opatrně se promíchá a komplex se převrství na buňky.

7. Buňky se inkubují přibližně při 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

8. DNA obsahující medium se nahradí selekčním mediem, obsahujícím 1 mg/ml sera a buňky se inkubují při 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru po celkem 48 až 72 h.

9. Buněčné extrakty se hodnotí na genovou aktivitu 48 až 72 hodin po transfekci.

Transfektované buňky byly hodnoceny na expresi angiostatin proteinu za použití angiostatin-specifických protilátek. Alternativně, po asi 10-14 dnech se objevují G418 rezistentní kolonie v CMV-angiostatin transfektovaných T241 buňkách. Také bylo viditelných mnoho klonů v buňkách transfektovaných samotným vektorem ale ne v netransfektovaných klonech. G418 rezistentní buňky byly selektovány na svoji expresi angiostatinu za použití imunofluorescenční metody.

Je zajímavé, že in vitro buněčný růst T241 buněk a Lewisových plicních buněk transfektovaných angiostatinem nebyl inhibován nebo jinak nežádoucím způsobem ovlivněn jak je uvedeno na obr. 25 a 26.

Obr. 27 představuje výsledky transfekčního pokusu. Všechny tři angiostatin-exprimující T241 transfektované klony produkují průměrné objemy tumorů u myší, které byly podstatně menší vzhledem k tumorovému objemu u kontrolních myší. Průměrný tumorový objem u myší implantovaných s klonem 37 byl

pouze 13 % kontroly zatímco objemy tumoru klonu 31 a klonu 25 byly pouze 21 % a 34 % objemu kontrolních tumorů. Tyto výsledky demonstrují, že DNA sekvence, kodující angiostatin mohou být transfektovány do buněk, že transfektované DNA sekvence jsou schopné exprimovat angiostatin protein implantovanými buňkami a že exprimovaný angiostatin působí in vivo redukci tumorového růstu.

#### Příklad 24

##### Lokalizace in vivo místa exprese angiostatinu

K lokalizaci in vivo místa exprese angiostatin proteinu, celková RNA z různých buněčných typů, buňky Lewisova plicního karcinomu (myši), buňky T241 fibrosarkomu (myši) a buňky Burkittova lymfomu, jak z čerstvého tumoru nebo buněčné kultury po několika pasážích, byly analyzovány pro stanovení přítomnosti angiostatinových transkriptů. Northern analýza vzorků ukazuje nepřítomnost jakéhokoliv signálu, hybridizujícího s touto sekvencí ze všech vzorků s výjimkou normální myší jaterní RNA, vykazující jediný signál při přibližně 2,4 kb, odpovídající myším plasminogenu. Northern analýza lidských vzorků vykazuje nepřítomnost jakéhokoliv signální hybridizace s lidskou angiostatinovou sekvencí ze všech vzorků s výjimkou vzorků normální lidské jaterní RNA, vykazující jediný signál při přibližně 2,4 kb, odpovídající lidskému plasminogenu.

Analýza reverzní transkripční polymerasové řetězové reakce (RT-PCR) ukazuje nepřítomnost jakéhokoliv produktu ze všech vzorků sondovaných se sekvencemi myších angiostatinu s výjimkou normálních myších jater. RT-PCR analýza vykazuje nepřítomnost jakéhokoliv produktu ze všech lidských vzorků

sondovaných s lidskými angiostatinovými sekvencemi s výjimkou normálních lidských jater (s výjimkou velikosti 1050 bp pro myši a 1134 bp pro lidský).

Jeví se tak, že myši angiostatin transkripty (za předpokladu shody s aminokyselinami 97 až 450 myšního plasminogenu), nejsou produkovány všemi výše uvedenými myšími vzorky a lidskými angiostatin transkripty (za předpokladu identity a aminokyselinami 93 až 470 lidského plasminogenu), nejsou produkovány výše uvedenými lidskými vzorky. Pozitivní signály získané v normálních myších/lidských játrech jsou z hybridizace s plasminogenem.

#### Příklad 25

Exprese angiostatinu ve kvasinkách

Genový fragment, kodující aminokyseliny 93 až 470 lidského plasminogenu byl klonován do XhoI/EcoRI místa pHIL-SI (Invitrogen), což umožnilo sekretovat expresi proteinů za použití PHO1 sekrečního signálu ve kvasince *Pichia pastoris*. Podobně genový fragment, kodující aminokyseliny 93 až 470 lidského plasminogenu byl klonován do SnaBI/EcoRI místa pPIC9 (Invitrogen), což umožnilo sekreční expresi proteinů za použití alfa-faktor sekrečního signálu ve kvasince *Pichia pastoris*. Exprimované lidské angiostatin proteiny v těchto systémech budou mít mnoho předností oproti těm, které jsou exprimovány v *E.coli* jako je zpracování proteinu, skládání proteinů a posttranslační modifikace včetně glykosylace.

Exprese genu v *P.pastoris*: je popsána v práci Sreekrishna K. a spol. (1988) High level expression of heterologous proteins in myelotropic yeast *Pichia pastoris*.

J.Basic.Microbiol. 29(4): 265-278 a Clarre J.J. a spol.  
(1991) Production of epidermal growth factor in yeast: High-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies, Gene 105:205-212. Tyto práce jsou zde zahrnuty jako odkazy.

#### Příklad 26

Expres angiotatin proteinů ve transgenních zvířatech a rostlinách

Vytvoří se transgenní zvířata druhu hovězího dobytka nebo prasat, která exprimují angiotatin genový transkript. Transgenní zvířata exprimují angiotatin protein například v mléku těchto zvířat. Dále jsou konstruovány požitelné rostliny, které exprimují angiotatin genový transkript.

Konstrukce transgenních zvířat, která exprimují cizí DNA je popsána v práci Smithe H. Phytochrome transgenic: functional, ecological and biotechnical applications: Semin.Cell.Biol. 1994 5(5):315-325, práce je zde zahrnuta jako odkaz.

Výše uvedený popis se týká výhodných provedení a tak je také třeba jej chápat a rovněž je třeba si uvědomit, že je možno provést mnoho modifikací nebo změn, aniž by byla překročena myšlenka a rozsah vynálezu, který je dán připojenými nároky.

## Seznam sekvencí

## (1) Obecná informace:

- (i) Přihlašovatel: THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER  
CORPORATION
- (ii) Název vynálezu: Angiostatin a způsob jeho použití
- (iii) Počet sekvencí: 6
- (iv) Korespondenční adresa:
  - (A) Adresa: Jones & Askew
  - (B) Ulice: 191 Peachstreet, 37.poschodí
  - (C) Město: Atlanta
  - (D) Stát: Georgia
  - (E) Země: U.S.
  - (F) ZIP: 30303-1769
- (v) Počítačově čtecí forma:
  - (A) Typ media: Floppy disk
  - (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
  - (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1,30
- (vi) Současné údaje o přihlášce:
  - (A) Přihláška číslo: US
  - (B) Datum podání:
  - (C) Klasifikace:
- (vii) Prioritní data:
  - (A) Číslo přihlášky: US 08/248629
  - (B) Datum podání: 26.duben 1994
- (vii) Prioritní data:
  - (A) Číslo přihlášky: US 08/326785
  - (B) Datum podání: 20.říjen 1994
- (viii) Informace o zástupci/agentovi:
  - (A) jméno: Johnson James D.
  - (B) Číslo registrace: 31771
  - (C) Referenční/spisová značka: 05213-0122
- (ix) Telekomunikační informace:
  - (A) telefon: 404-818-3700
  - (B) telefax: 404-818-3799

## (2) Informace o sekvenci SEQ ID NO:1:

## (i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 812 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetická: ne

(vi) Zdroj původu:

(A) organismus: myš

## (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

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

Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys  
 180 185 190  
 Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala  
 195 200 205  
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe  
 210 215 220  
 Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu  
 225 230 235 240  
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr  
 245 250 255  
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr  
 260 265 270  
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser  
 275 280 285  
 Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro  
 290 295 300  
 His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr  
 325 330 335  
 Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys  
 340 345 350  
 Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu  
 355 360 365  
 Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser  
 370 375 380  
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe  
 405 410 415  
 Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp  
 420 425 430  
 Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr  
 435 440 445  
 Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu  
 450 455 460

Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp  
 465 470 475 480  
 Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr  
 485 490 495  
 Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg  
 500 505 510  
 His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys  
 515 520 525  
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr  
 530 535 540  
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys  
 545 550 555 560  
 Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys  
 565 570 575  
 Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser  
 580 585 590  
 Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe  
 595 600 605  
 Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His  
 610 615 620  
 Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly  
 625 630 635 640  
 Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val  
 645 650 655  
 Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys  
 660 665 670  
 Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu  
 675 680 685  
 Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr  
 690 695 700  
 Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu  
 705 710 715 720  
 Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr  
 725 730 735  
 Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala  
 740 745 750

Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys  
755 760 765

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu  
770 775 780

Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg  
785 790 795 800

Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn  
805 810

(2) Informace o SEQ ID NO:2:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 339 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetická: ne

(vi) Zdroj původu:

(A) organismus: myš

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:2:

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly  
1 5 10 15

Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala  
20 25 30

Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu  
35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln Gly  
50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn  
65 70 75 80

Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr  
85 90 95

Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp  
100 105 110

Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro  
115 120 125

80-91

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

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

45

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 339 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (C) STRANDEDNESS:  
 (D) TOPOLOGY: linear

50

(ii) MOLECULE TYPE: protein

55

- (iii) HYPOTHETICAL: NO  
 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
 (A) ORGANISM: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:3:

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser  
 20 25 30  
 Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu  
 35 40 45  
 Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly  
 50 55 60  
 Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp  
 65 70 75 80  
 Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr  
 85 90 95  
 Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp  
 100 105 110  
 Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro  
 115 120 125  
 Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu  
 130 135 140  
 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr  
 165 170 175  
 Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val  
 180 185 190  
 Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His  
 195 200 205  
 Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu  
 210 215 220  
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp  
 245 250 255  
 Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr  
 275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp  
 290 295 300  
 Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro  
 305 310 315 320  
 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys  
 325 330 335  
 Gly Pro Trp

(2) Informace o SEQ ID NO:4:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 339 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetická: ne

(vi) Zdroj původu:

(A) organismus: opice Rhesus

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:4:

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

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

(2) Informace o SEQ ID NO:5:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 339 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetická: ne

(vi) Zdroj původu:  
(A) organismus: prase

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:5:

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

Gln Thr Pro Val Ala Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Glu Ser Tyr  
275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp  
290 295 300

Val Ser Met Thr Pro His Arg His Glu Lys Thr Pro Gly Asn Phe Pro  
305 310 315 320

Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys  
325 330 335

Ser Pro Trp

(2) Informace o SEQ ID NO:6:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 339 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetická: ne

(vi) Zdroj původu:

(A) organismus: hovězí

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:6:

Ile Tyr Leu Leu Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly  
1 5 10 15

Thr Thr Ala Glu Thr Lys Ser Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala  
20 25 30

Thr Ser Pro His Val Pro Lys Phe Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala  
35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly  
50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp  
65 70 75 80

Ile Pro Glu Cys Glu Asp Lys Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr  
85 90 95

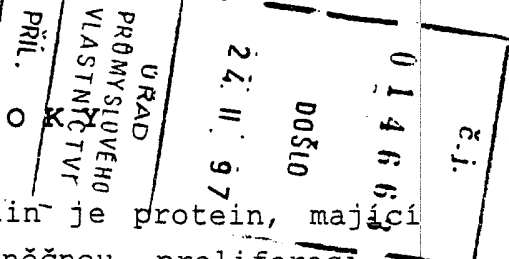
Glu Gly Lys Ile Ala Lys Thr Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp  
100 105 110

Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro

W. G. Sullivan

náhradní list

PATENTOVÉ NÁROKY



1. Izolovaný angiostatin, kde angiostatin je protein, mající aktivitu, inhibující endotheliální buněčnou proliferaci a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamidovou gelovou elektroforézou.
2. Angiostatin podle nároku 1, angiostatin dále má aminokyselinovou v podstatě podobnou sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínajícího přibližně u aminokyseliny číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.
3. Angiostatin podle nároku 2, kde aminokyselinová sekvence je plasminogenový fragment získaný z lidského plasminogenu, myšího plasminogenu, hovězího plasminogenu, Rhesus plasminogenu nebo prasečího plasminogenu.
4. Angiostatin podle nároku 2, kde aminokyselinová sekvence je vybrána ze skupiny, zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:6.
5. Angiostatin podle nároku 1, kde angiostatin je schopen inhibice angiogenese.
6. Angiostatin podle nároku 1, kde angiostatin je schopen inhibice s angiogenezí spojených chorob.
7. Angiostatin podle nároku 6, kde chorobou spojenou s angiogenezí je rakovina.
8. Izolovaný angiostatin, kde angiostatin je protein, mající aktivitu inhibující proliferaci endotheliálních buněk a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony podle stanovení polyakrylamid gelovou elektroforézou, protein je schopný vázat lysin a protein je schopný inhibice angiogenese.

9. Způsob diagnózy choroby nebo stanovení prognozy choroby zprostředkované s angiogenezí, prováděné in vitro, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje stupeň stanovení koncentrace angiostatinu, kde angiostatin je protein, mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony podle stanovení polyakrylamid gelovou elektroforézou.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že angiostatin dále má aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínající u aminokyseliny číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.

11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že chorobou je rakovina.

12. Izolovaný angiostatin, kde angiostatin je protein, mající aktivitu, inhibující endotheliální buněčnou proliferaci a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelovou elektroforézou pro použití jako léčivo.

13. Angiostatin pro použití jako léčivo podle nároku 12, kde angiostatin dále má aminokyselinovou v podstatě podobnou sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínajícího přibližně u aminokyseliny číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.

14. Angiostatin pro použití jako léčivo podle nároku 13, kde aminokyselinová sekvence, kde aminokyselinová sekvence je vybrána ze skupiny, zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:6.

15. Použití angiostatinu, kde angiostatin je protein, mající aktivitu, inhibující endotheliální buněčnou proliferaci a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelovou

elektroforézou pro výrobu léčiva pro léčení lidí nebo zvířat s angiogenně zprostředkovanou chorobou.

16. Použití angiostatinu podle nároku 15, kde angiostatin dále má aminokyselinovou v podstatě podobnou sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínajícího přibližně u aminokyseliny číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.

17. Použití podle nároku 16, kde aminokyselinová sekvence je plasminogenový fragment získaný lidského plasminogenu, myšího plasminogenu, hovězího plasminogenu, Rhesus plasminogenu nebo prasečího plasminogenu.

18. Použití podle nároku 16, kde aminokyselinová sekvence je vybrána ze skupiny, zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:6.

19. Použití podle nároku 15, kde angiogenní choroba je vybrána ze skupiny, zahrnující rakovinu, arthritidu, makulární degeneraci a diabetickou retinopatii.

20. Kompozice, obsahující izolovanou DNA sekvenci, která koduje angiostatin, kde angiostatin je protein, mající aktivitu, inhibující endotheliální buněčnou proliferaci a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelovou elektroforézou.

21. Kompozice podle nároku 20, kde angiostatin dále má aminokyselinovou v podstatě podobnou sekvenci myšího plasminogenového fragmentu, začínajícího přibližně u aminokyseliny číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.

22. Kompozice podle nároku 21, kde DNA sekvence koduje aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny, zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:6.

23. Kompozice podle nároku 20, obsahující dále vektor obsahující DNA sekvenci, kodující angiostatin, kde vektor je schopen exprimovat angiostatin, je-li přítomen v buňce.

24. Kompozice podle nároku 23, v jednobuněčném organismu schopném exprese angiostatinu.

25. Použití DNA sekvence kodující angiostatin, kde angiostatin je protein, mající aktivitu, inhibující endotheliální buněčnou proliferaci a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelovou elektroforézou pro přípravu léčiva na léčení s angiogenesi spojených chorob u lidí a zvířat.

26. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že angiostatin má dále aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou sekvenci fragmentu myšího plasminogenu, začínající přibližně při aminokyselině číslo 98 molekuly myšího plasminogenu.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že, DNA sekvence koduje aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny, zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:6.

28. Kompozice, obsahující farmaceuticky přijatelnou přísadu a angiostatin, kde angiostatin je protein, mající aktivitu, inhibující endotheliální buněčnou proliferaci a mající molekulovou hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelovou elektroforézou.

29. Kompozice podle nároku 28, obsahující dále matici s udržovaným uvolňováním.

30. Kompozice, obsahující protilátku, která se specificky váže k angiostatinu, kde angiostatin je protein, mající molekulovou

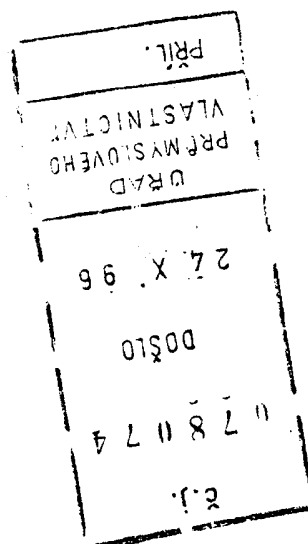
hmotnost mezi přibližně 38 kilodaltony a 45 kilodaltony jak je stanoveno redukční polyakrylamid gelovou elektroforézou.

1/27

Obrázek 1

Myší plasminogenová sekvence:

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



2/27

```

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

```

3/27

Obrázek 2

myš

člověk

opice Rhesus

prase

hovězí dobytek

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

4/27

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

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

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

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

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

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

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

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

5/27

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

ser ser ala ser pro asp gln ser asp ser ser val pro pro glu glu  
ser ser pro val ser thr glu gln leu ala pro thr ala pro pro glu  
ser ser pro val ser thr glu pro leu asp pro thr ala pro pro glu  
ser ser thr thr ser thr glu his leu asp ala pro val pro pro glu  
ser ser pro leu ser thr glu arg met asp val pro val pro pro glu

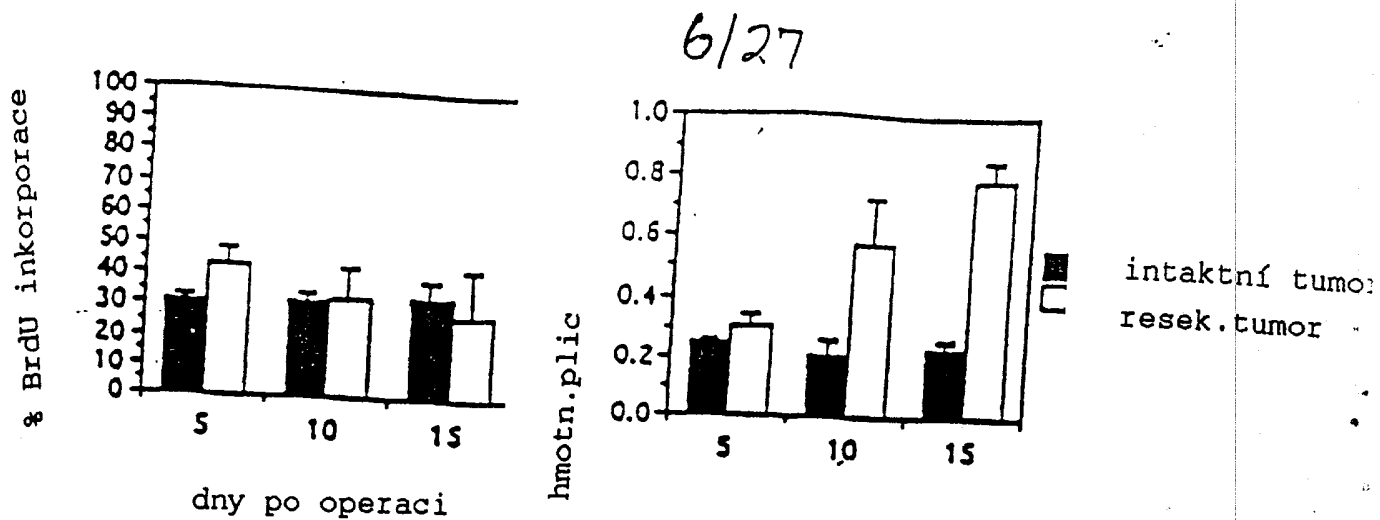
gln thr pro val val gln glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr  
leu thr pro val val gln asp cys tyr his gly asp gly gln ser tyr  
leu thr pro val val gln glu cys tyr his gly asp gly gln ser tyr  
gln thr pro val ala gln asp cys tyr arg gly asn gly glu ser tyr  
gln thr pro val pro gln asp cys tyr his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

arg gly thr ser ser thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp  
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp  
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp  
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp  
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp

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

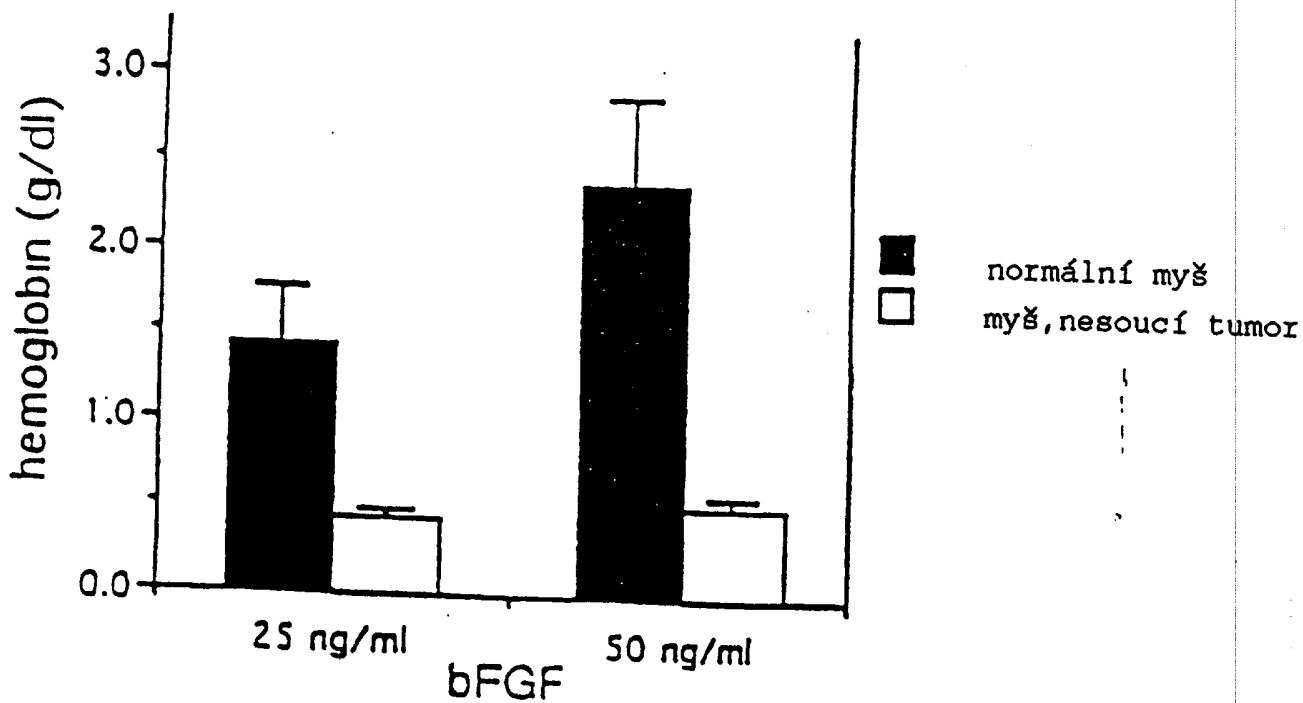
asp ala gly leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys  
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys  
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys  
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys  
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys

gly pro trp  
gly pro trp  
gly pro trp  
ser pro trp  
ser pro trp

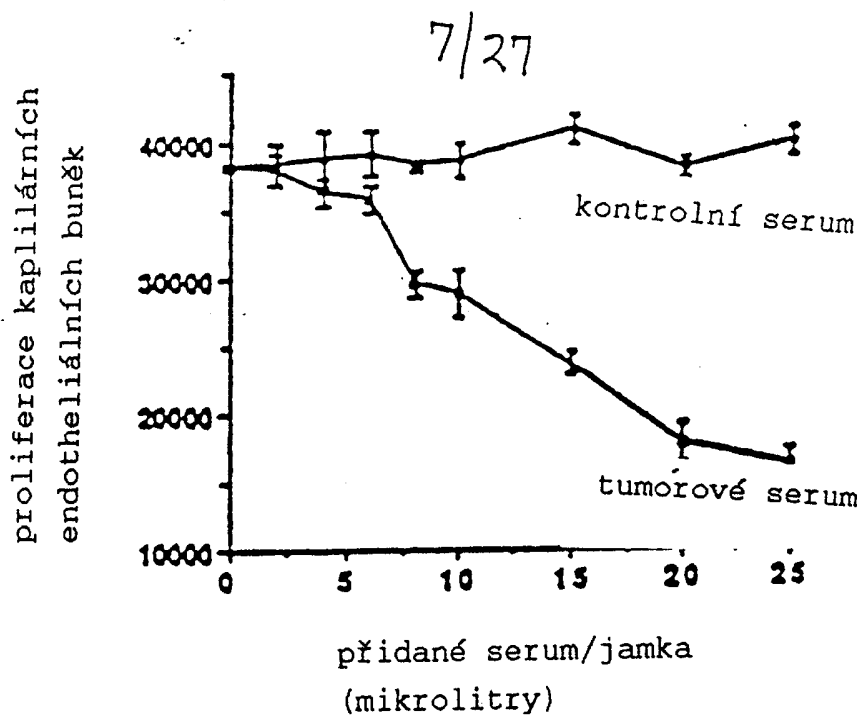


Obrázek 3A

Obrázek 3B



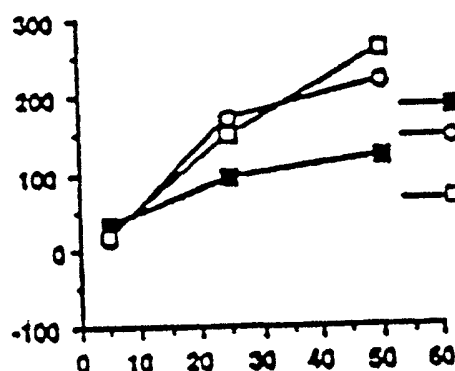
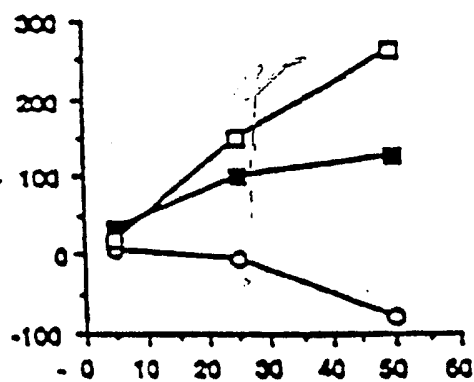
Obrázek 4



Obrázek 5

nízko metastatický

vysoce metastatický



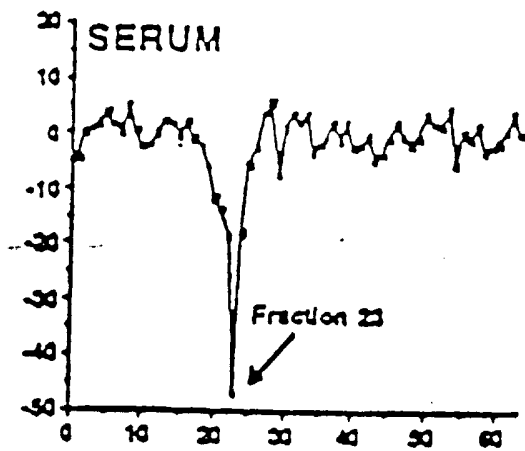
ascity  
serum z myši s  
ascity  
serum z normální  
myši

Obrázek 6A

Obrázek 6B

8/27

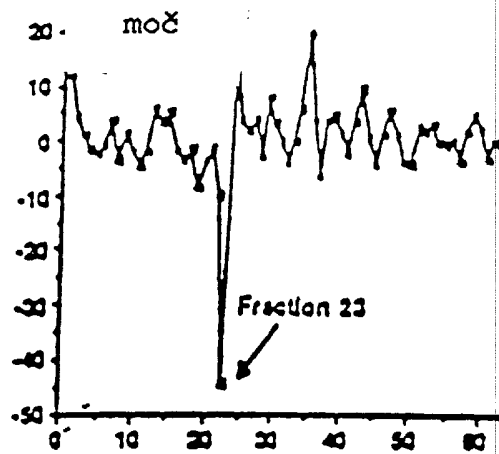
proliferace kapilárních hovězích  
endotheliálních buněk (% proti kontrole)



Frakce číslo

Obrázek 7A

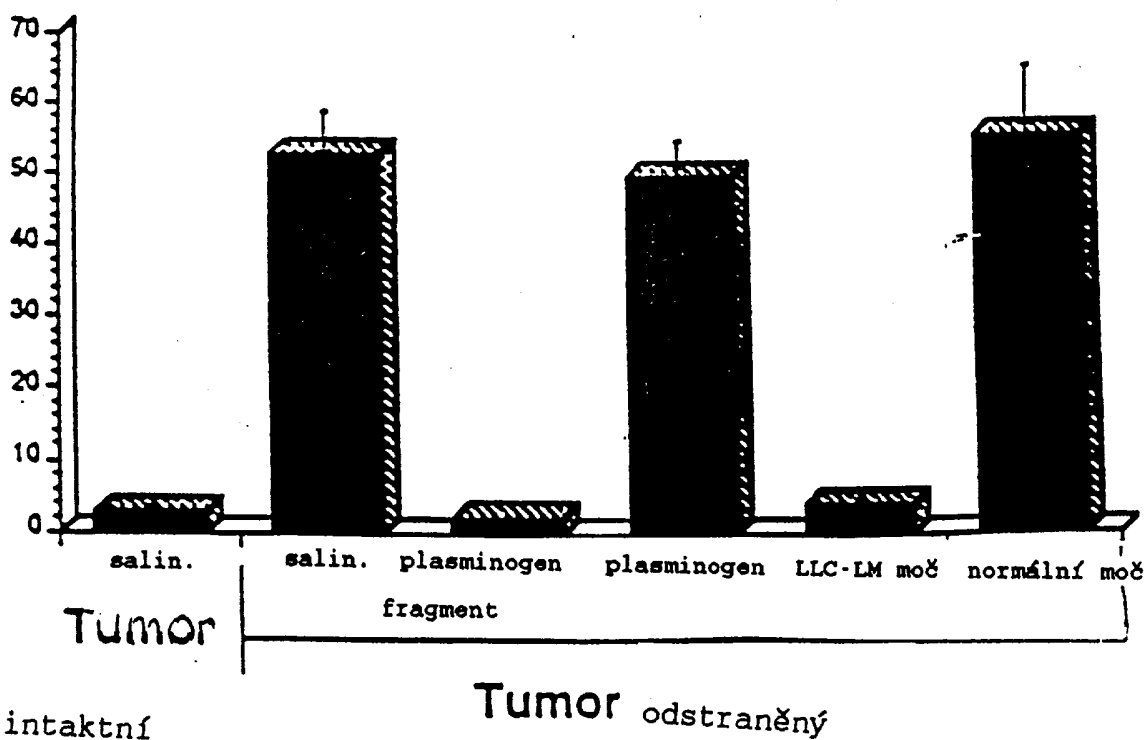
proliferace kapilárních hovězích  
endotheliálních buněk (% proti kontrole)



Frakce číslo

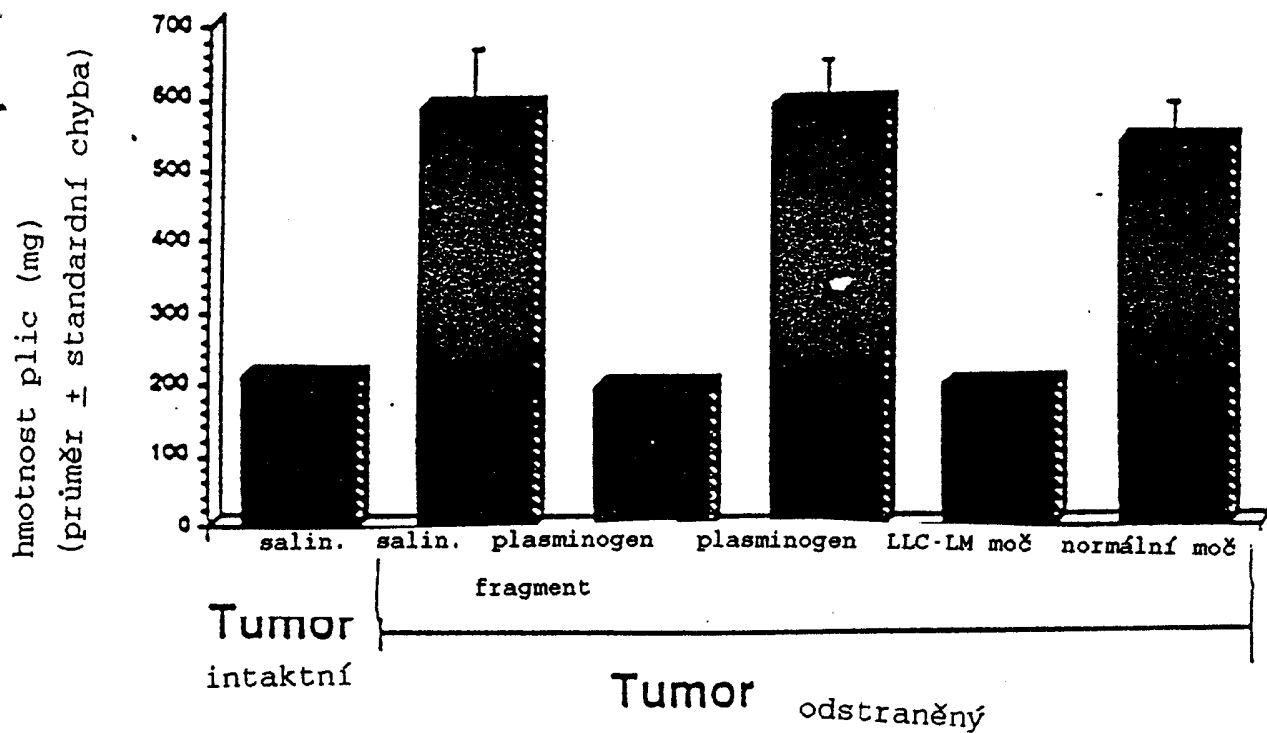
Obrázek 7B

Počet povrchových plicních metastáz  
(průměr ± standardní chyba)



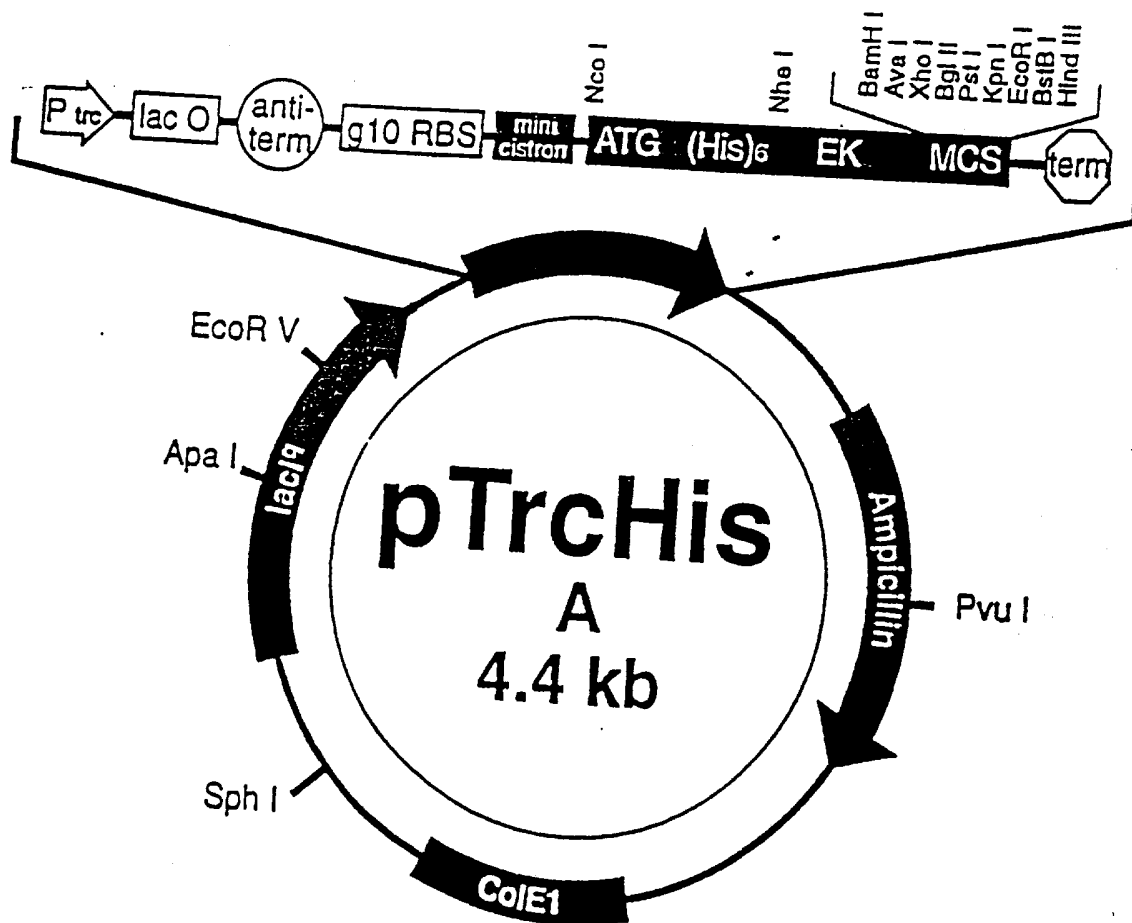
Obrázek 8

9/27



Obrázek 9

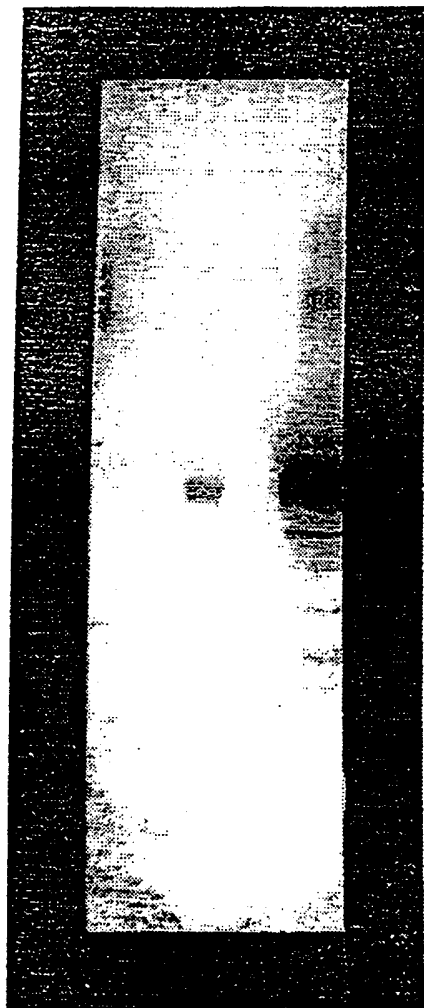
10/27



V2.4-140105sa

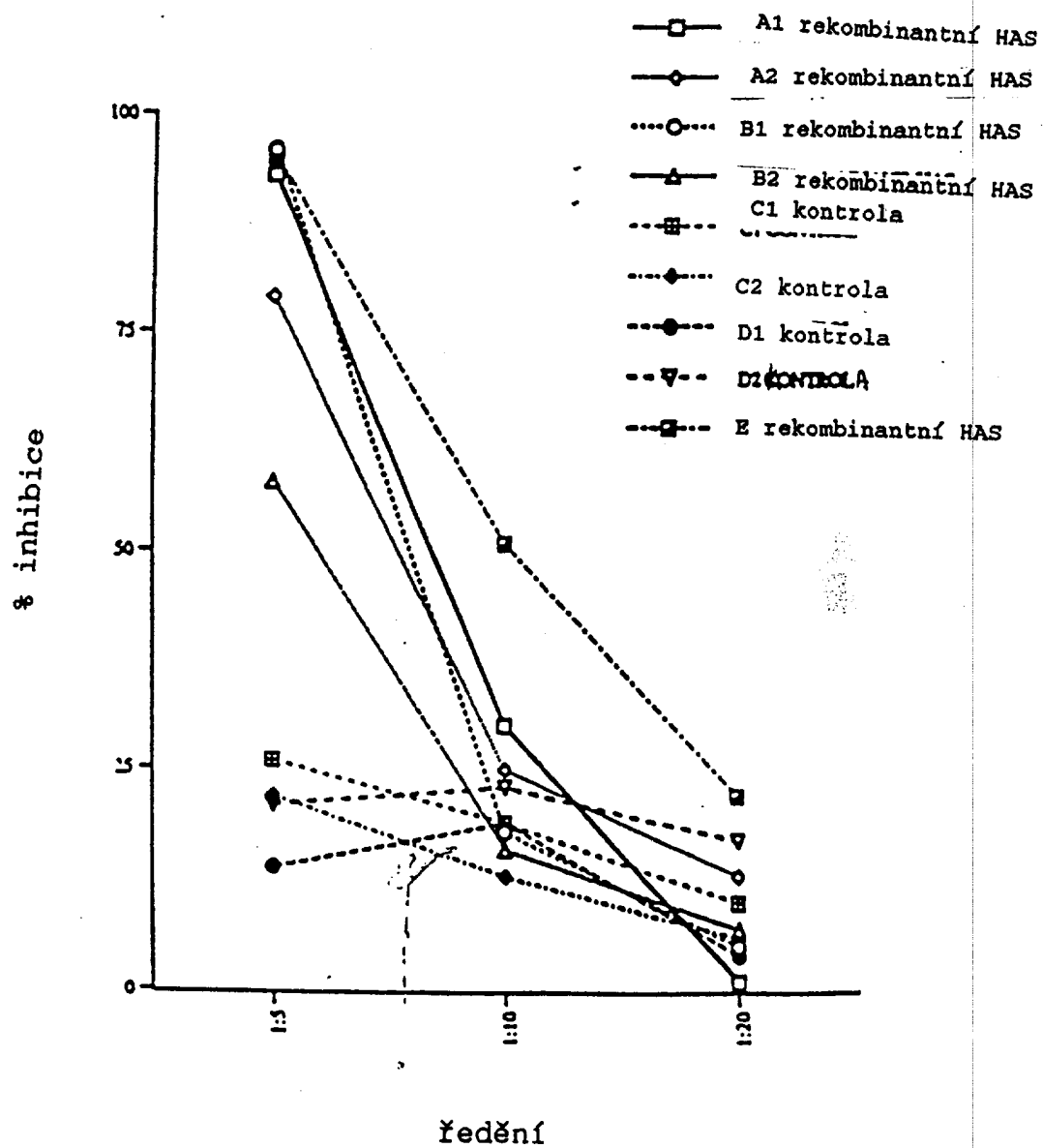
Obrázek 10

11/27



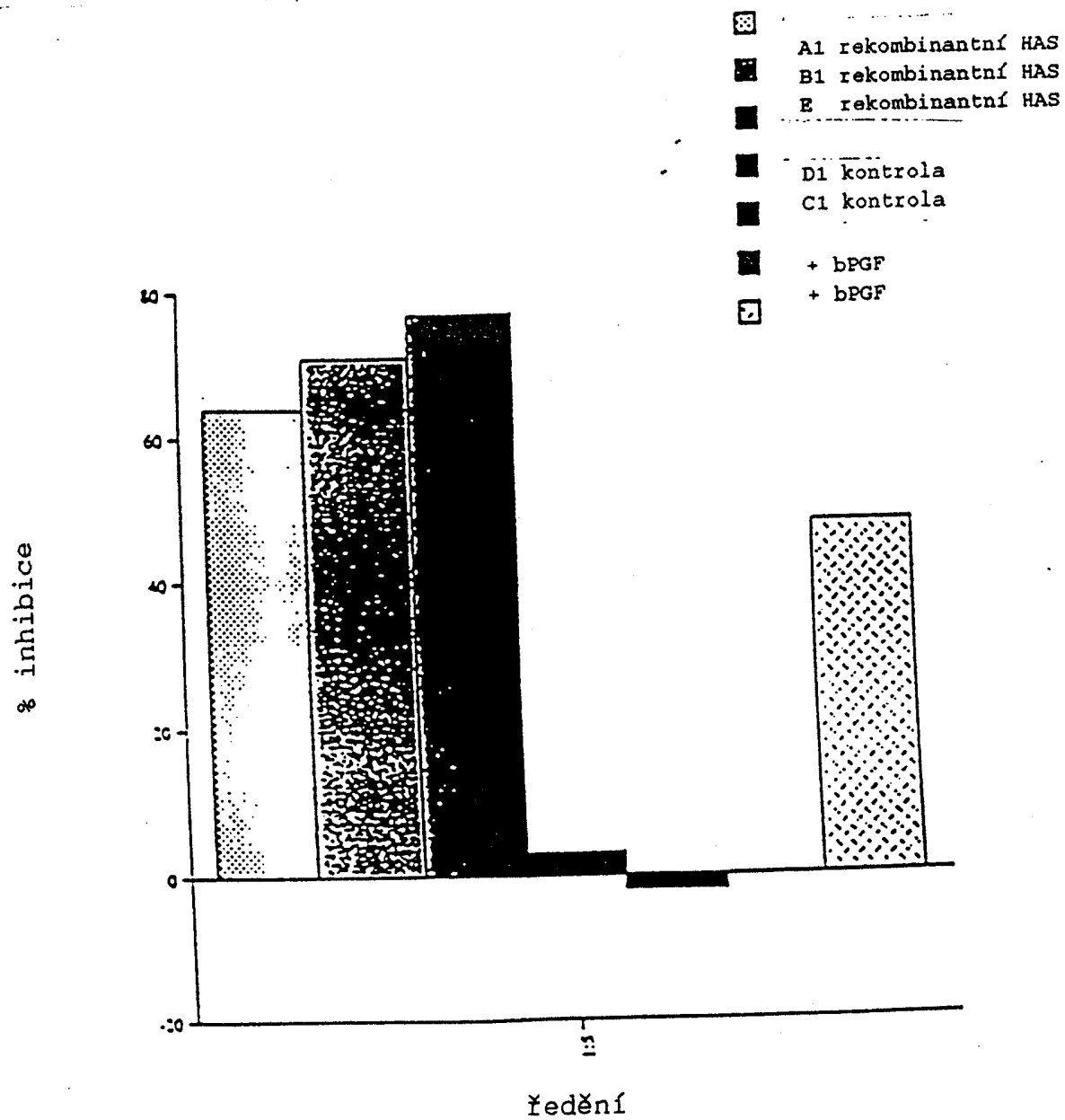
Obrázek 11

12/27



Obrázek 12

13/27



14/27

primární tumor  
odstraněn

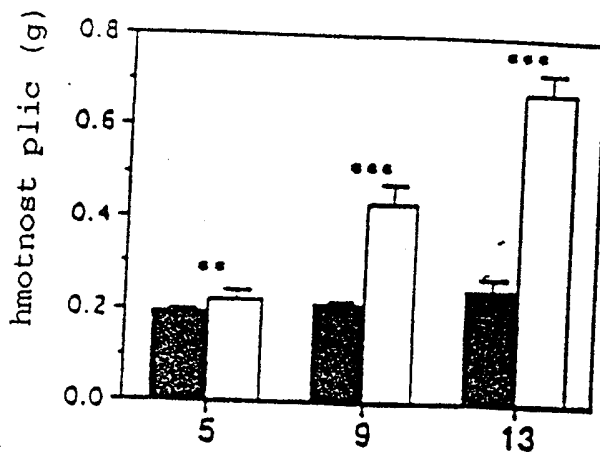


primární tumor  
etknut

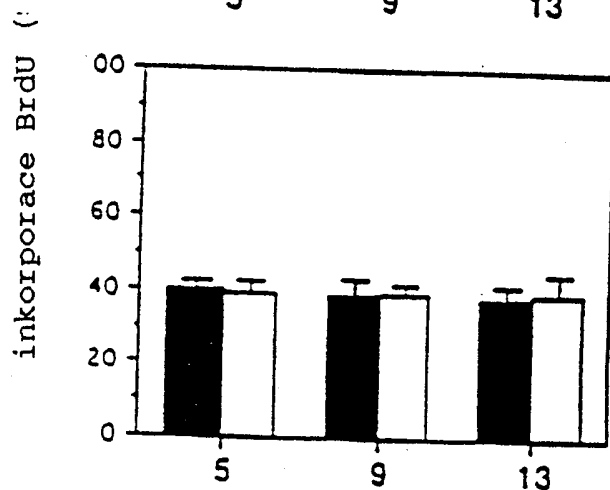


Obrázek 14

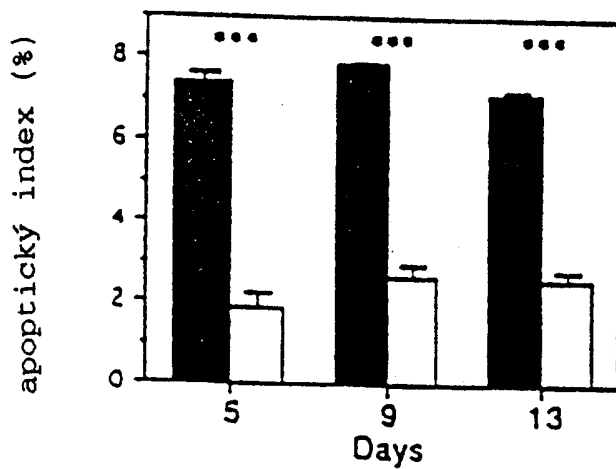
15/27



Obr. 15A

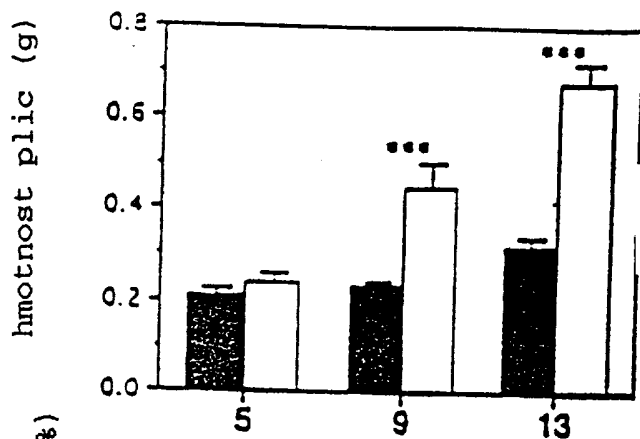


Obr. 15B

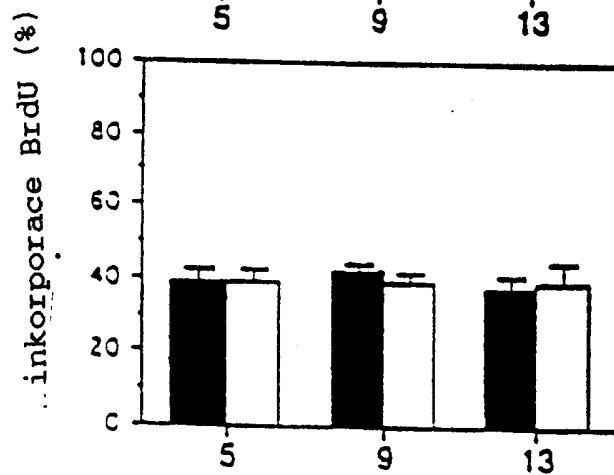


Obr. 15C

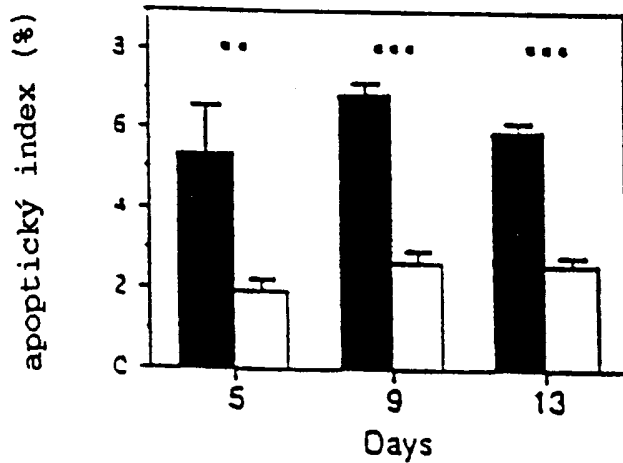
16/27



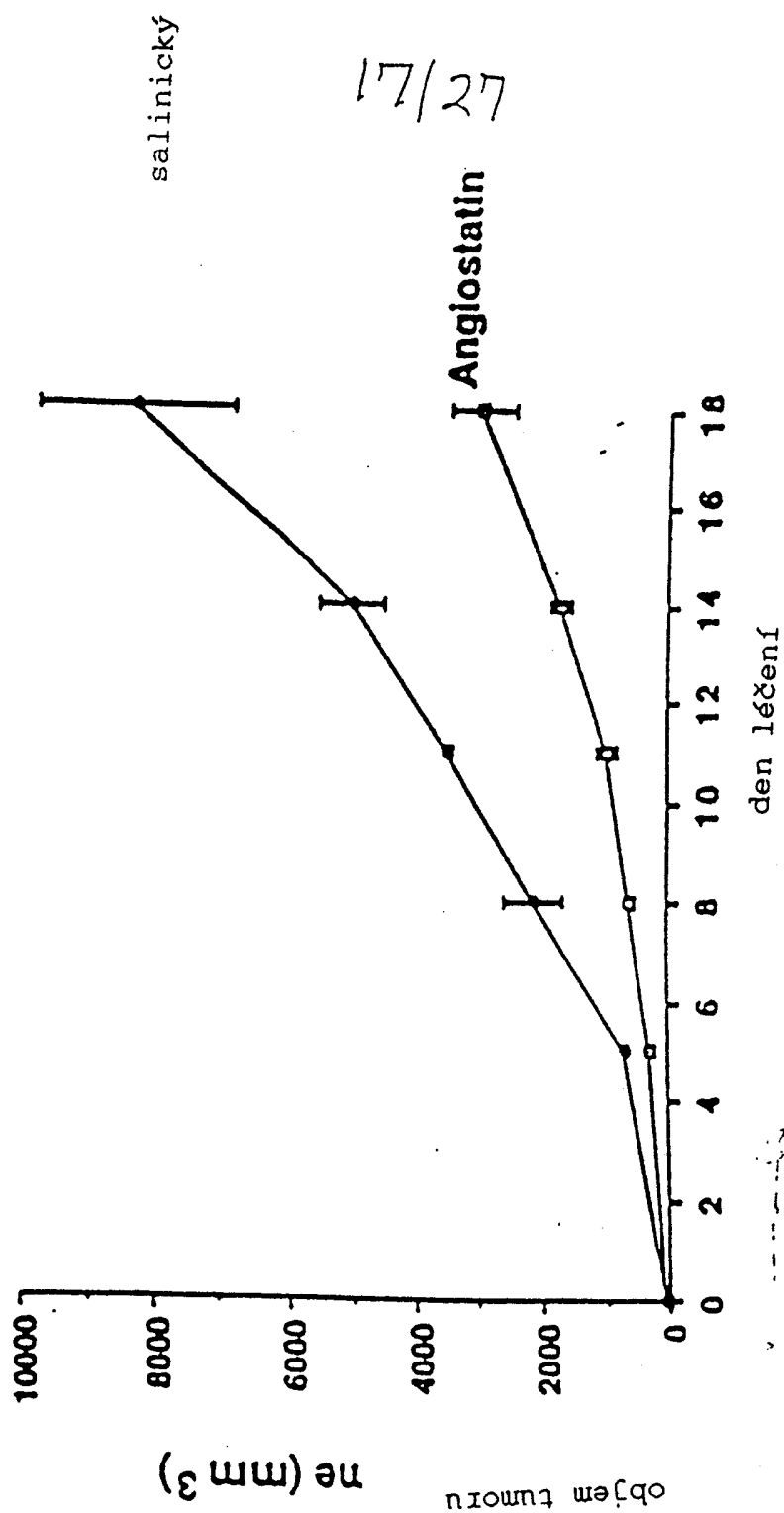
Obr. 16A



Obr. 16B

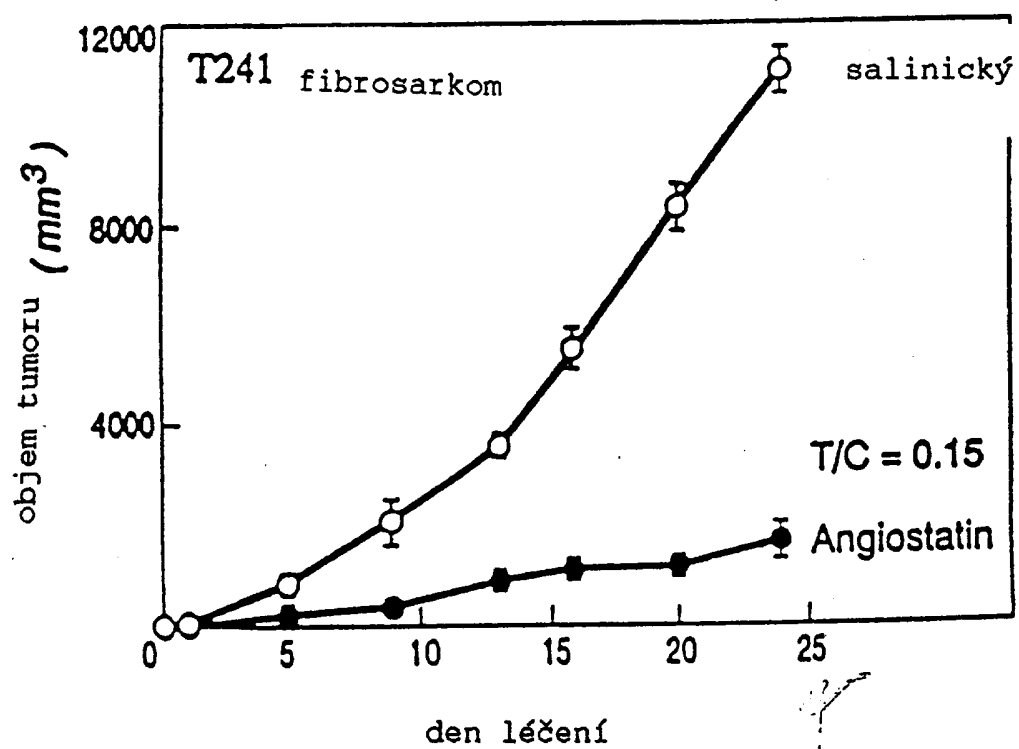


Obr. 16C

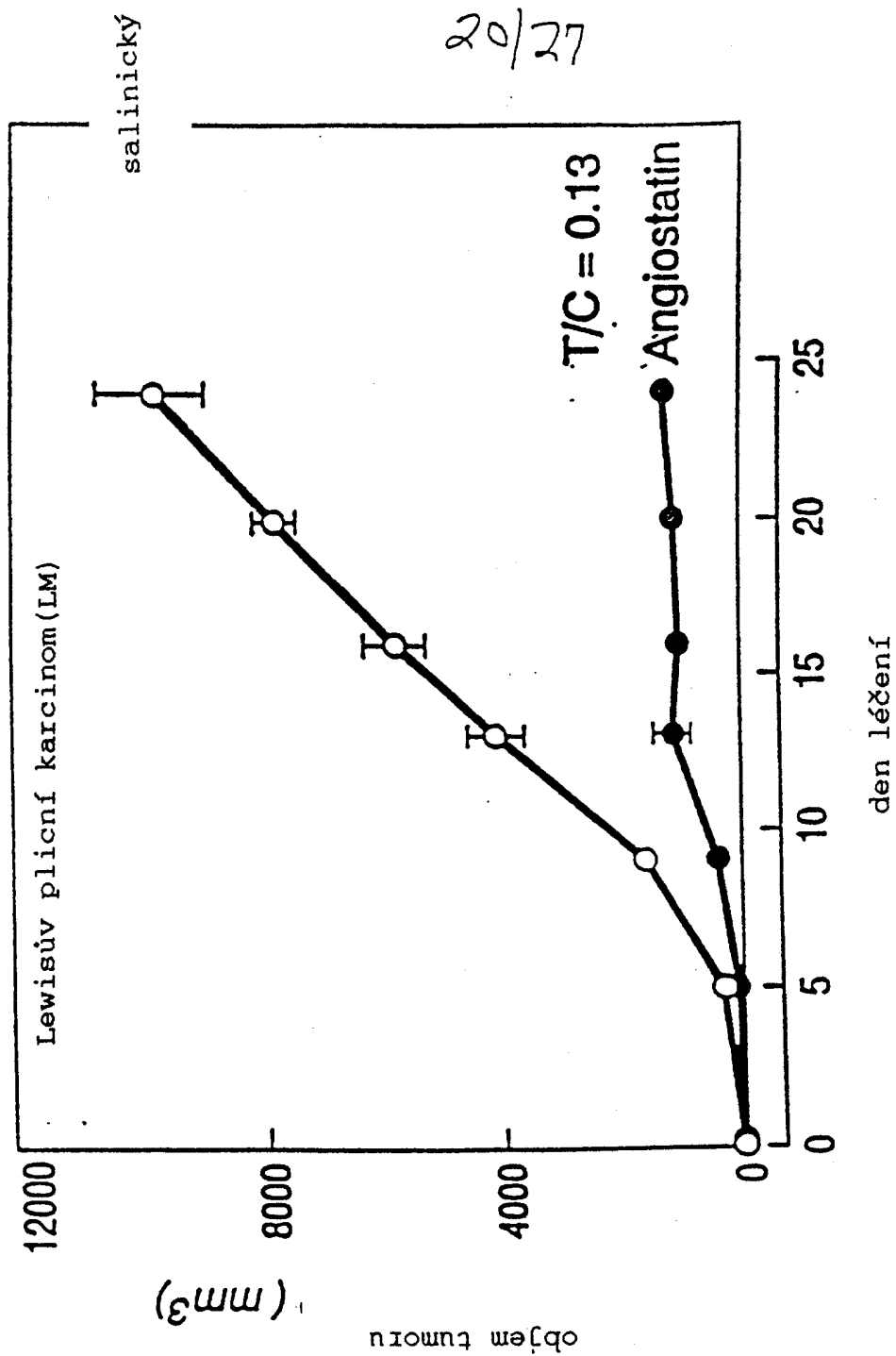


Obrázek 17

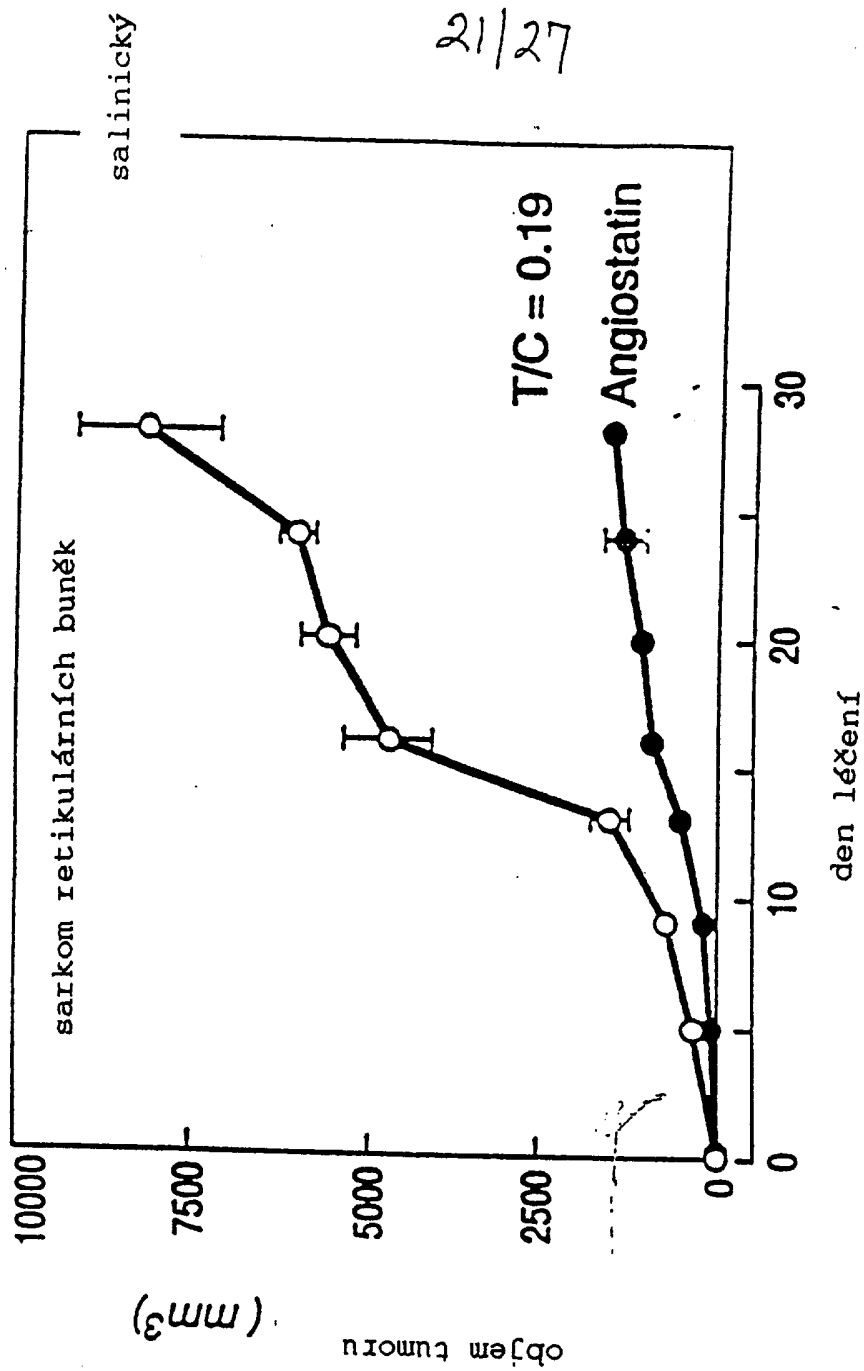
19/27



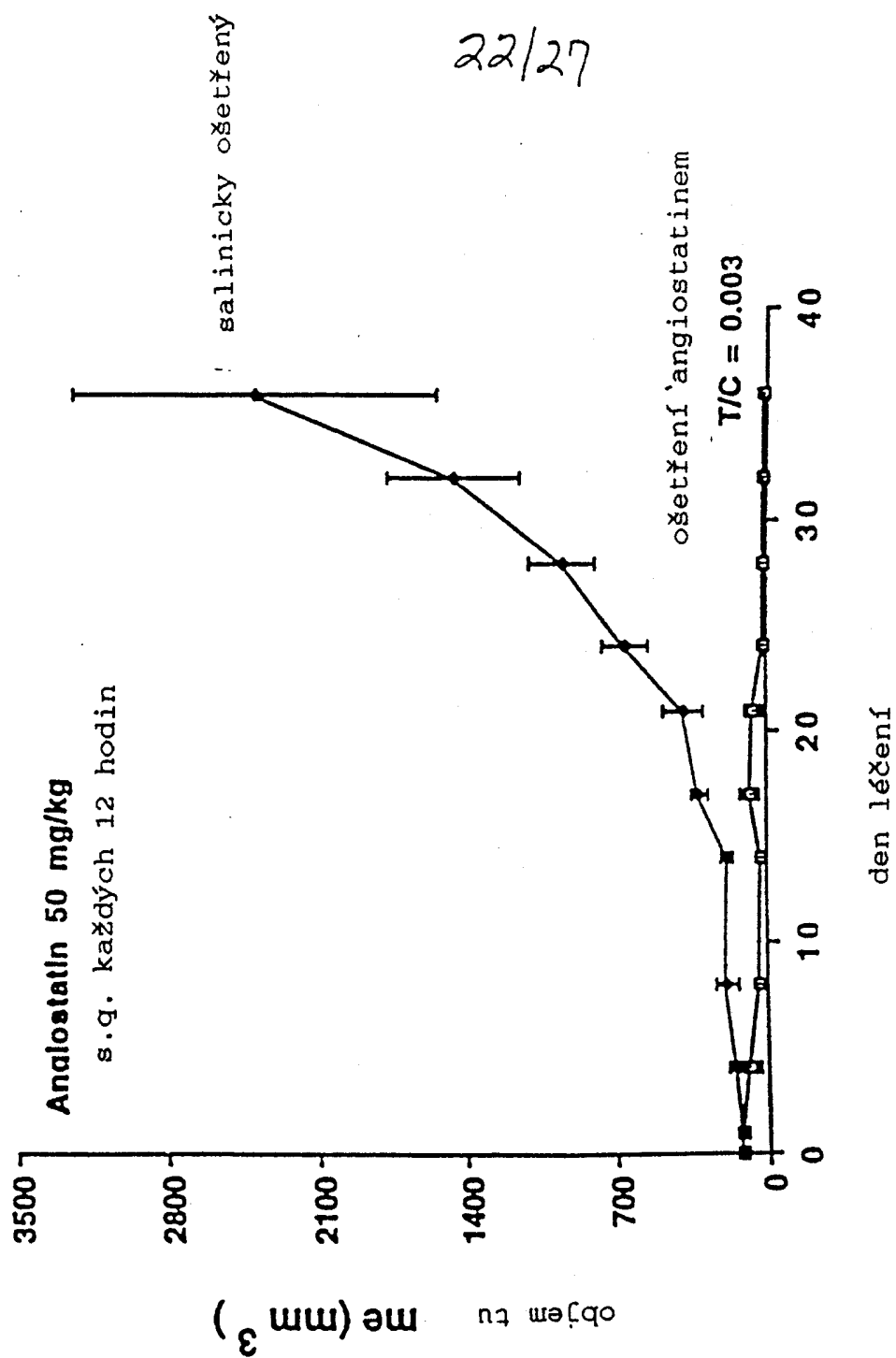
Obrázek 19



Obrázek 20

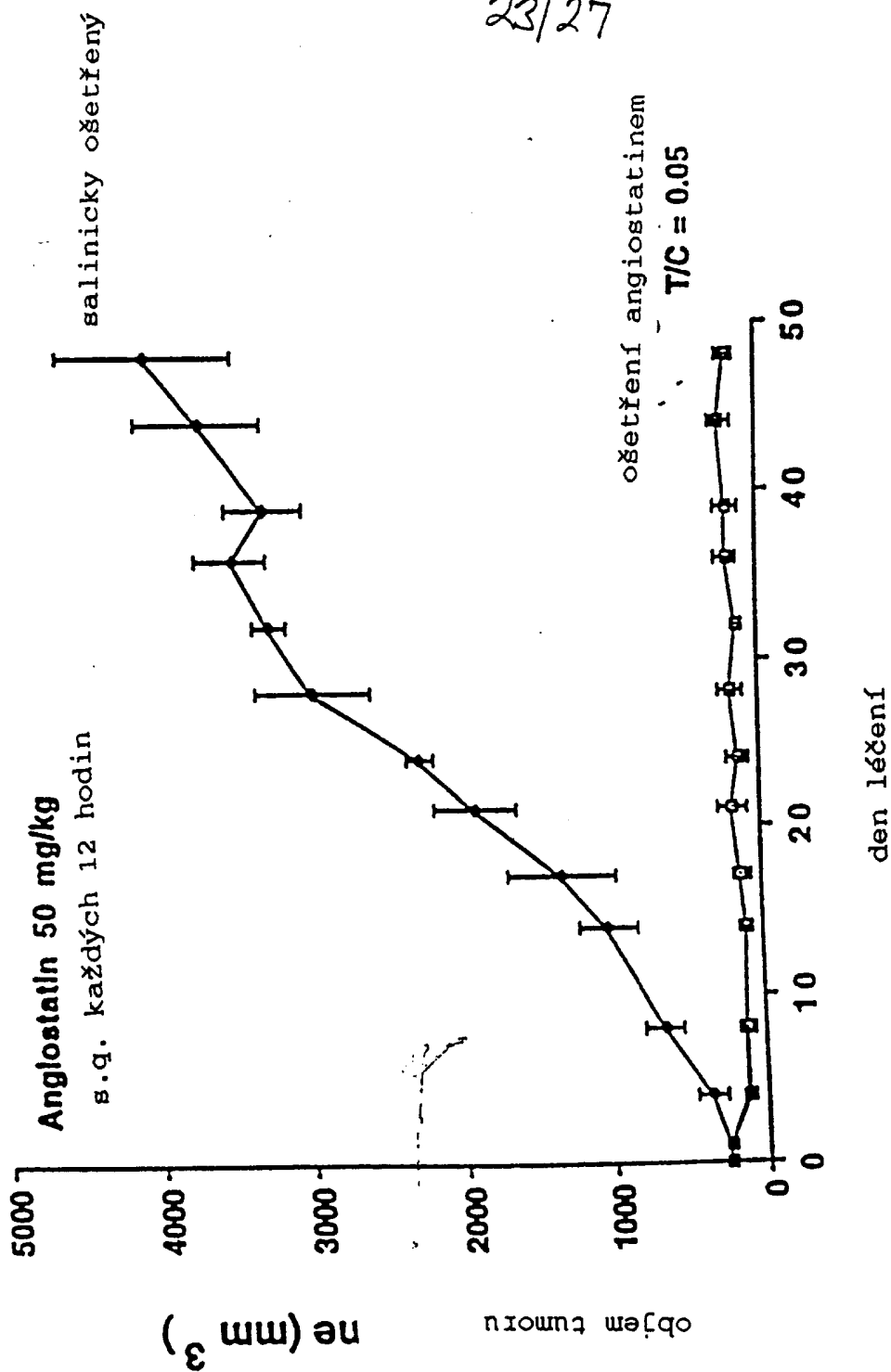


Obrázek 21



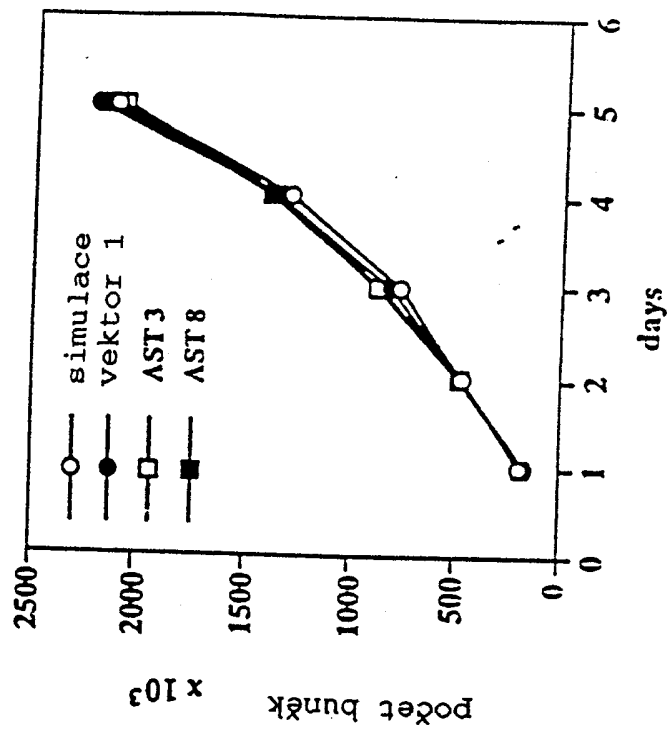
Obrázek 22

23/27

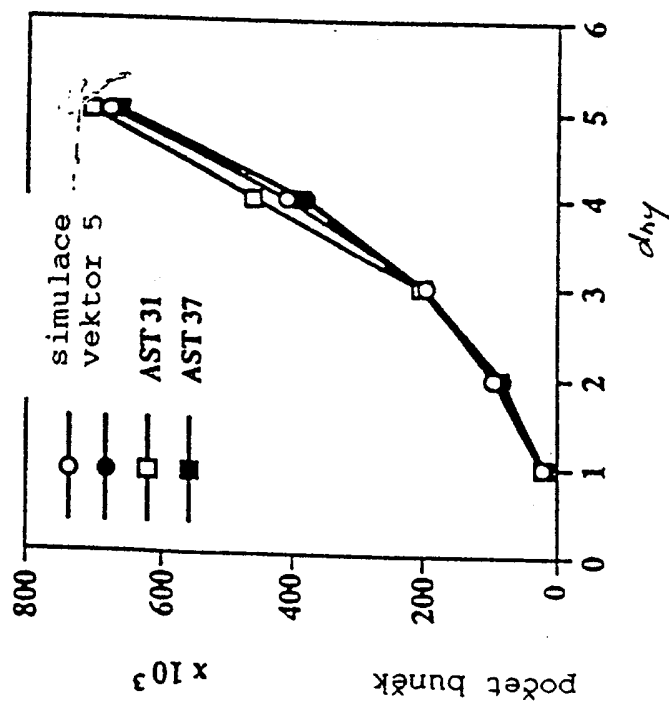


Obrázek 23

25/27



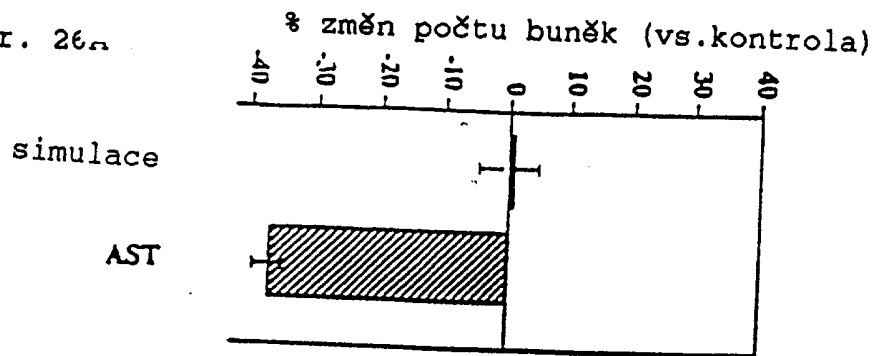
Obr. 25B



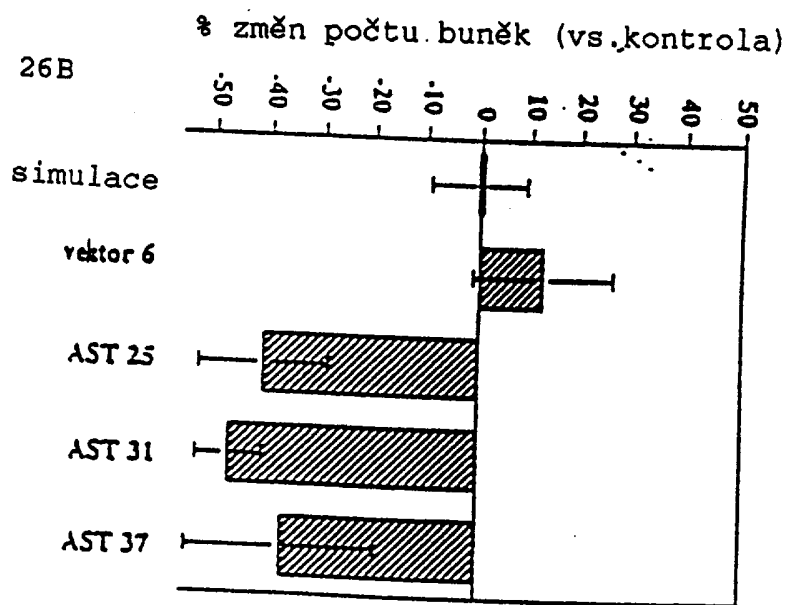
Obr. 25A

26/27

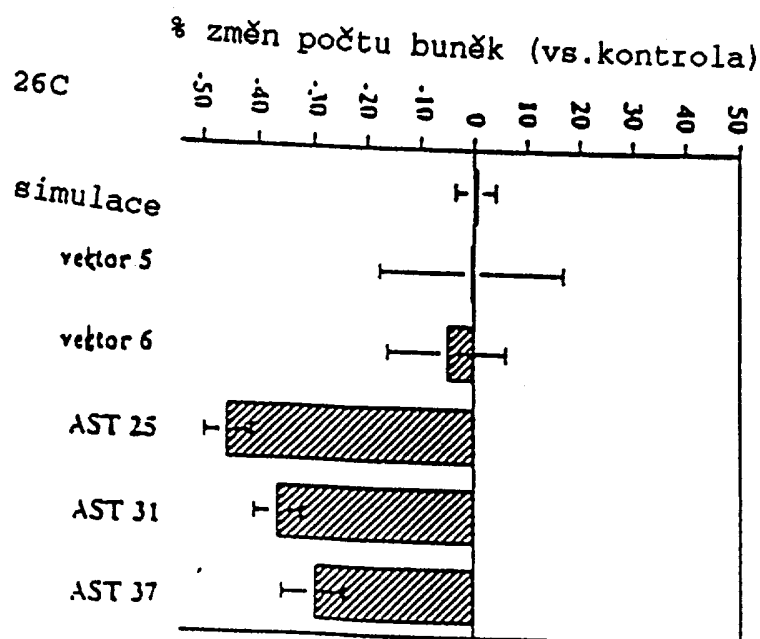
Obr. 26A



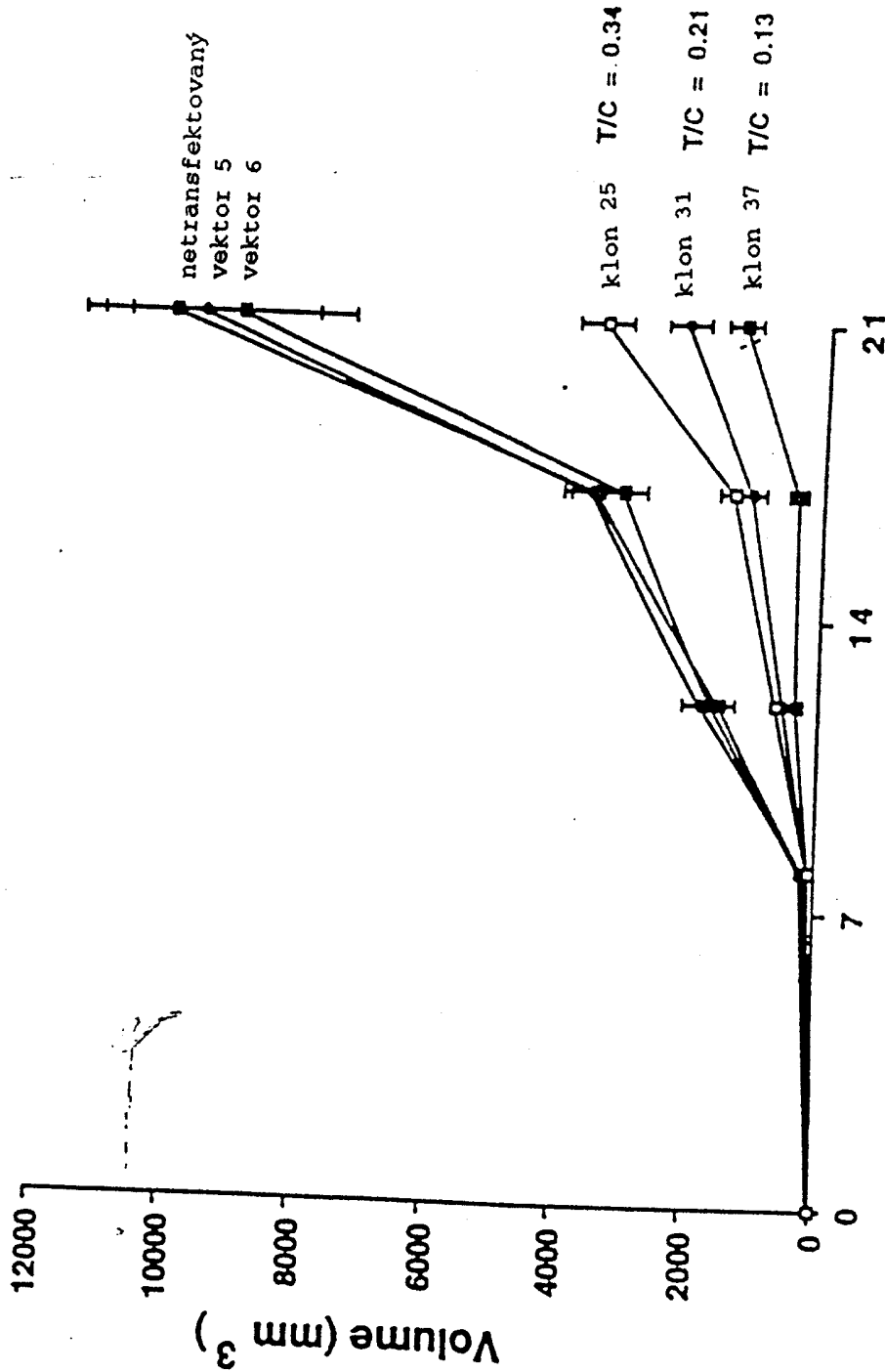
Obr. 26B



Obr. 26C



27/27



den po implantaci

Obr. 27