



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 174**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96913208 .3**

86 Fecha de presentación : **26.04.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0824546**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.1998**

54 Título: **Fragmentos de angiotatina y procedimientos de utilización.**

30 Prioridad: **26.04.1995 US 429743**
22.02.1996 US 605598
08.03.1996 US 612788

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es:
The Children's Medical Center Corporation
300 Longwood Avenue
Boston, Massachusetts 02115, US

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

74 Agente: **Buceta Facorro, Luis**

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de angiostatina y procedimientos de utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inhibidores endoteliales, denominados angiostatina, que inhiben reversiblemente la proliferación celular endotelial. Más particularmente, la presente invención se refiere a proteínas de angiostatina que pueden aislarse a partir de líquidos corporales tales como sangre u orina, o que pueden sintetizarse mediante métodos químicos, enzimáticos o recombinantes. La angiostatina puede inhibir las enfermedades relacionadas con angiogénesis y modular los procesos angiogénicos. además, la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico y kits para la medición de angiostatina, a kits histoquímicos para la localización de angiostatina, a secuencias de ADN que codifican para angiostatina y a sondas moleculares para monitorizar la biosíntesis de angiostatina, a anticuerpos que son específicos para a la angiostatina, al desarrollo de agonistas y antagonistas de proteína para el receptor de angiostatina, a agonistas y antagonistas de anticuerpos anti-angiostatina específicos de receptor, y a agentes citotóxicos unidos a las proteínas de angiostatina.

Antecedentes de la invención

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

Se piensa que tanto la angiogénesis controlada como no controlada se realizan de una manera similar. Las células endoteliales y pericitos, rodeados por una membrana basal, forman vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal mediante enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que recubren la luz de los vasos sanguíneos, sobresalen entonces a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células que migran forman un “brote” fuera del vaso sanguíneo original, en el que las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

La angiogénesis no regulada, persistentes se produce en una multiplicidad de estados patológicos, metástasis tumoral y crecimiento anómalo mediante células endoteliales y sustenta el daño patológico observado en estos estados. Los diversos estados patológicos en los que está presente la angiogénesis no regulada se han agrupado juntos como enfermedades dependientes angiogénicas o asociadas angiogénicas.

La hipótesis de que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis se propuso por primera vez en 1971. (Folkman J., Tumor angiogenesis: Therapeutic implications., N. Engl. Jour. Med. 285:1182-1186, 1971). En sus términos más simples plantea: “Una vez que se ha producido el “prendimiento” del tumor, cada aumento de la población de células tumorales debe estar precedido por un aumento en nuevos capilares que convergen en el tumor”. Se entiende actualmente que “prendimiento” del tumor indica una fase prevascular del crecimiento tumoral en la que una población de células tumorales que ocupan un volumen de unos pocos milímetros cúbicos y no exceden de unos pocos millones de células, puede sobrevivir en microvasos del huésped existentes. La expansión del volumen del tumor más allá de esta fase requiere la inducción de nuevos vasos sanguíneos capilares. Por ejemplo, las micrometástasis pulmonares en la fase prevascular temprana en ratones sería indetectable salvo mediante microscopía de alta potencia en secciones histológicas.

Ejemplos de la evidencia indirecta que apoya este concepto incluyen:

- (1) La velocidad de crecimiento de tumores implantados en cámaras transparentes subcutáneas en ratones es lenta y lineal antes de la vascularización, y rápida y casi exponencial tras la neovascularización. (Algire GH, *et al.* Vascular reactions of normal and malignant tumors *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6:73-85, 1945)
- (2) El crecimiento de tumores en órganos perfundidos aislados en los que los vasos sanguíneos no proliferan está limitado a 1-2 mm³ pero se expanden rápidamente hasta >1000 veces este volumen cuando se transplantan a ratones y se vuelven neovascularizados. (Folkman J, *et al.*, Tumor behavior in isolated perfused organs: *In vitro* growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segments. Annals of Surgery 164:491-502, 1966)
- (3) El crecimiento tumoral en la córnea avascular se realiza lentamente y a una velocidad lineal, pero cambia a crecimiento exponencial tras la neovascularización. (Gimbrone, M. A., Jr. *et al.*, Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. J. Natl. Cancer Institute 52:41-427, 1974)

- (4) Los tumores suspendidos en el líquido acuoso de la cámara anterior del ojo de conejo, permanecen viables, avasculares y limitados en tamaño a $< 1 \text{ mm}^3$. Una vez están implantados en el lecho vascular del iris, se vascularizan y crecen rápidamente, alcanzando 16.000 veces su volumen original en el plazo de 2 semanas. (Gimbrone MA Jr., *et al.*, Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. J. Exp. Med. 136:261-276)
- (5) Cuando se implantan los tumores en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, crecen lentamente durante una fase avascular de >72 horas, pero no exceden un diámetro medio de $0,93 \pm 0,29 \text{ mm}$. Se produce expansión rápida del tumor en el plazo de 24 horas tras el comienzo de la neovascularización, y en el día 7 estos tumores vascularizados alcanzan un diámetro medio de $8,0 \pm 2,5 \text{ mm}$. (Knighton D., Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. British J. Cancer, 35:347-356, 1977)
- (6) Las impresiones vasculares de la metástasis en el hígado del conejo revelan heterogeneidad en el tamaño de las metástasis, pero muestran un punto de corte relativamente uniforme para el tamaño en el que está presente la vascularización. Los tumores son generalmente avasculares hasta 1 mm de diámetro, pero están neovascularizados más allá de ese diámetro. (Lien W., *et al.*, The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber. Surgery 68:334-340, 1970)
- (7) En ratones transgénicos que desarrollan carcinomas en las células beta de los islotes pancreáticos, los islotes hiperplásicos prevasculares están limitados en tamaño a $< 1 \text{ mm}$. A las 6-7 semanas de edad, el 4-10% de los islotes se vuelven neovascularizados, y a partir de estos islotes surgen grandes tumores vascularizados de más de 1000 veces el volumen de los islotes prevasculares. (Folkman J., *et al.*, Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339:58-61, 1989)
- (8) Un anticuerpo específico frente VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) reduce la densidad de los microvasos y provoca una inhibición "significativa o drástica" del crecimiento de tres tumores humanos que dependen de VEGF como su mediador único de angiogénesis (en ratones desnudos). El anticuerpo no inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vitro*. (Kim K J., *et al.*, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. Nature 362:841-844, 1993)
- (9) Anticuerpo monoclonal anti-bFGF provoca una inhibición del 70% del crecimiento de un tumor de ratón que depende de la secreción de bFGF como su mediador único de angiogénesis. El anticuerpo no inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vitro*. (Hori A., *et al.*, Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. Cancer Research, 51:6180-6184, 1991)
- (10) La inyección intraperitoneal de bFGF aumenta el crecimiento de un tumor primario y su metástasis estimulando el crecimiento de células endoteliales capilares en el tumor. Las propias células tumorales carecen de receptores para bFGF, y bFGF no es un mitógeno para las células tumorales *in vitro*. (Gross JL., *et al.* Modulation of solid tumor growth *in vivo* by bFGF. Proc. Amer. Assoc. Canc. Res. 31:79, 1990)
- (11) Un inhibidor de angiogénesis específico (AGM-1470) inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*, pero es mucho menos activo inhibiendo la proliferación celular tumoral *in vitro*. Inhibe a la mitad del máximo la proliferación de células endoteliales vasculares a una concentración inferior de 4 logs de lo que inhibe la proliferación de células tumorales. (Ingber D., *et al.*, Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature, 48:555-557, 1990). También existe evidencia clínica indirecta de que el crecimiento tumoral depende de angiogénesis.
- (12) Los retinoblastomas humanos que son metastásicos para el humor vítreo se desarrollan en esferoides avasculares que están restringidos a menos de 1 mm^3 a pesar del hecho de que son viables e incorporan ^3H -timidina (cuando se retiran de un ojo enucleado y se analizan *in vitro*).
- (13) El carcinoma del ovario experimenta metástasis hacia la membrana peritoneal como diminutas semillas blancas avasculares ($1-3 \text{ mm}^3$). Estos implantes raramente crecen más hasta que uno o más de ellos se vuelve neovascularizado.
- (14) La intensidad de neovascularización en cáncer de mama (Weidner N., *et al.*, Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. 324:1-8, 1991, y Weidner N., *et al.*, Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma, J Natl. Cancer Inst. 84:1875-1887, 1992) y en cáncer de próstata (Weidner N., Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. American Journal of Pathology, 143(2):401-409, 1993) se correlaciona en gran medida con el riesgo de futura metástasis.

- (15) La metástasis de melanoma cutáneo humano es rara antes de la neovascularización. El comienzo de la neovascularización da lugar a un aumento de espesor de la lesión y un aumento del riesgo de metástasis. (Srivastava A, *et al.*, The prognostic significance of tumor vascularity in :Intermediate thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. Amer. J. Pathol. 133:419-423, 1988)

- (16) En el cáncer de vejiga, el nivel en la orina de una proteína angiogénica, bFGF, es un indicador más sensible del estado y extensión de una enfermedad de lo que es la citología. (Nguyen M, *et al.*, Elevated levels of an angiogenic protein, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 85:241-242, 1993).

El documento WO 95/29242 da a conocer secuencias de ADN que codifican para angiostatina, que corresponden a un fragmento kringle 1-4 de un plasminógeno. No se hace mención a las secuencias de ADN que codifican para regiones kringle 1, 2, 3, 1-2 ó 2-3.

Por tanto, está claro que la angiogénesis desempeña un papel importante en la metástasis de un cáncer. Si pudiera reprimirse o eliminarse esta actividad angiogénica, entonces el tumor, aunque presente, no crecería. En el estado patológico, la prevención de angiogénesis podría impedir el daño provocado por la invasión del nuevo sistema microvascular. Las terapias dirigidas a controlar los procesos angiogénicos podrían dar lugar a la abrogación o mitigación de estas enfermedades.

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

Sumario de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos que son eficaces para modular la angiogénesis, y para inhibir angiogénesis no deseada, especialmente angiogénesis relacionada con crecimiento tumoral. La presente invención se refiere a una proteína, que se ha denominado "angiostatina", definida por su habilidad para superar la actividad angiogénica de factores de crecimiento endógenos tales como bFGF, *in vitro*, y por su homología de secuencia de aminoácidos y similitud estructural con una parte interna del plasminógeno que 1 comienza aproximadamente en el aminoácido 98 del plasminógeno. La angiostatina comprende una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons tal como se determinó mediante electroforesis reductora en gel de poliacrilamida y que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta (SEQ ID NO: 2).

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre especies. Por ejemplo, en la angiostatina humana la secuencia de aminoácidos es sustancialmente similar a la secuencia del fragmento de plasminógeno murino descrito anteriormente, aunque una secuencia de angiostatina humana activa puede empezar o bien en el aminoácido número 97 o bien el 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano. Además, los fragmentos de plasminógeno humano tienen actividad antiangiogénica similar tal como se muestra en un modelo tumoral de ratón. Debe entenderse que el número de aminoácidos en la molécula de angiostatina activa puede variar y se contempla que todas las secuencias de aminoácidos que tienen actividad inhibidora endotelial están incluidas en la presente invención. La presente invención proporciona una composición farmacéutica tal como se define en la reivindicación 1-13.

La presente invención proporciona métodos y composiciones para tratar enfermedades y procesos mediados por angiogénesis no deseada y no controlada administrando a un ser humano o animal una composición que comprende una angiostatina sustancialmente purificada, un derivado de angiostatina, un fragmento de angiostatina, o un agregado de angiostatina en una dosificación suficiente para inhibir la angiogénesis. La presente invención es particularmente útil para tratar o para reprimir el crecimiento de tumores. La administración de angiostatina a un ser humano o animal con tumores que han experimentado metástasis prevascularizados, evitará el crecimiento o expansión de esos tumores.

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

La presente invención también describe kits y métodos de diagnóstico para la detección y medición de angiostatina en líquidos biológicos y tejidos, y para la localización de angiostatina en tejidos y células. El kit y método de diagnóstico pueden estar en cualquier configuración bien conocida por los expertos habituales en la técnica. La presente invención también describe anticuerpos específicos frente a la molécula de angiostatina y partes de la misma, y anticuerpos que inhiben la unión de anticuerpos específicos para la angiostatina. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Pueden usarse los anticuerpos específicos para la angiostatina en kits de diagnóstico para detectar la presencia y cantidad de angiostatina, lo que es un diagnóstico o un pronóstico de la existencia o reaparición de cáncer u otra enfermedad mediada por angiogénesis. También pueden administrarse anticuerpos específicos frente a angiostatina a un ser humano o animal para inmunizar de manera pasiva al ser humano o animal frente a la angiostatina, reduciendo así la inhibición angiogénica.

La presente invención también describe kits y métodos de diagnóstico para detectar la presencia y cantidad de anticuerpos que se unen a angiostatina en líquidos corporales. El kit y método de diagnóstico pueden estar en cualquier configuración bien conocida por los expertos habituales en la técnica.

La presente invención también describe anticuerpos anti-angiostatina específicos de receptor que se unen al receptor de angiostatina y transmiten la señal apropiada a la célula y actúan como agonistas o antagonistas.

La presente invención también describe fragmentos y análogos de proteína de angiostatina que pueden marcarse isotópicamente o con otras moléculas o proteínas para su uso en la detección y visualización de los sitios de unión a angiostatina con técnicas que incluyen, pero no se limitan a, tomografía por emisión de positrones, autorradiografía, citometría de flujo, ensayos de unión a radioreceptor e inmunohistoquímica.

Estas proteínas y análogos de angiostatina también actúan como agonistas y antagonistas en el receptor de angiostatina, aumentando o bloqueando de esta manera la actividad biológica de la angiostatina. Se usan tales proteínas en el aislamiento del receptor de angiostatina.

La presente invención también incluye fragmentos de angiostatina para aplicaciones terapéuticas y de investigación. Todavía adicionalmente, se combina un fragmento de angiostatina con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente compuestos o composiciones de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

La presente invención describe sondas moleculares para el ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico implicados en la transcripción y traducción de angiostatina. Estas sondas moleculares proporcionan medios para detectar y medir la biosíntesis de angiostatina en tejidos y células.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición que comprende un fragmento de angiostatina.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para tratar enfermedades y procesos que están mediados por angiogénesis.

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

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

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar fragmentos de angiostatina mediante inyección directa de ADN que codifica para fragmentos de angiostatina en un ser humano o animal que necesita tales fragmentos de angiostatina.

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

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

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar composiciones y métodos útiles para terapia génica para la modulación de procesos angiogénicos.

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

Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

La figura 5 muestra la curva de respuesta de dosis para un ratón que lleva carcinoma pulmonar de Lewis (LLC-
20 LOW) frente al suero de ratones normales. Se sometieron a ensayo las células endoteliales capilares bovinas en un ensayo de proliferación de 72 horas dirigida por bFGF.

La figura 6 muestra que los tumores con metástasis tanto alta como baja contienen actividad mitogénica endotelial en sus ascitis, pero no sólo la línea tumoral de metástasis baja tiene actividad inhibidora endotelial en el suero.

25 La figura 7 muestra un perfil cromatográfico de fase inversa C4 de suero purificado parcialmente o de orina a partir de animales que portan tumores.

La figura 8 muestra metástasis pulmonar superficial tras el tratamiento de 13 días de ratones con molécula de plasminógeno intacta de plasminógeno humano, preparación de fracción activa de un sitio I de unión a lisina, orina concentrada de ratones que portan tumor y orina concentrada de ratones normales.

30 La figura 9 muestra el peso del pulmón tras el tratamiento de 13 días de ratones con molécula de plasminógeno intacta de plasminógeno humano, preparación de fracción activa de sitio I de unión a lisina, orina concentrada de ratones que portan tumor y orina concentrada de ratones normales.

La figura 10 es una representación esquemática del vector pTrcHis.

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

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

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

La figura 14 muestra el índice de proliferación de crecimiento y el índice apoptótico tras la extirpación del tumor primario y tratamiento con solución salina o un análogo de fumagilina con la actividad anti-angiogénica.

55 La figura 15 muestra la inhibición del crecimiento de un tumor primario T241 en ratones mediante tratamiento con angiostatina humana *in vivo* con una única inyección de 40 mg/kg/día.

La figura 16 muestra la inhibición del crecimiento de un tumor primario LLC-LM en ratones mediante tratamiento con angiostatina humana *in vivo* con dos dosis de 40 mg/kg por dosis (80 mg/kg/día).

La figura 17 muestra el efecto de la extirpación de un tumor primario de carcinoma pulmonar de Lewis sobre el crecimiento de su metástasis de pulmón.

65 La figura 18 muestra la proliferación de crecimiento e índice apoptótico tras la resección tumoral.

La figura 19 muestra el efecto de la administración de proteína de angiostatina a ratones que tienen implantadas células de fibrosarcoma T241 sobre el volumen tumoral total como una función del tiempo.

La figura 20 muestra el efecto de la administración de proteína de angiostatina a ratones que tienen implantadas células de carcinoma pulmonar de Lewis (LM) sobre el volumen tumoral total como una función del tiempo.

La figura 21 muestra el efecto de la administración de proteína de angiostatina a ratones que tienen implantadas células del sarcoma celular del retículo sobre el volumen tumoral total como una función del tiempo.

La figura 22 muestra el efecto de la administración de proteína de angiostatina a ratones SCID inmunodeficientes que tienen implantadas células PC-3 de carcinoma de próstata humanas sobre el volumen tumoral total como una función del tiempo durante un periodo de 24 días.

La figura 23 muestra el efecto de la administración de proteína de angiostatina a ratones SCID inmunodeficientes que tienen implantadas células MDA-MB de carcinoma de mama humanas sobre el volumen tumoral total como una función del tiempo durante un periodo de 24 días.

La figura 24 es una representación esquemática de la clonación de la secuencia de ADN de ratón que codifica para proteína de angiostatina de ratón derivada de ADNc de plasminógeno de ratón. La angiostatina de ratón abarca las regiones kringle 1-4 de plasminógeno de ratón. PCR significa reacción en cadena de la polimerasa; P1 es el cebador oligonucleotídico del extremo 5' para la PCR; P2 es el cebador oligonucleotídico del extremo 3' para la PCR; SS denomina la secuencia señal; ATG es el codón de iniciación de la traducción; TAA es el codón de parada de traducción; HA representa la etiqueta del epítipo de hemaglutinina (YPYDVPDYASL); K1, K2, K3 y K4 representan las regiones kringle 1, 2, 3 y 4 de plasminógeno de ratón respectivamente. CMV es el promotor de citomegalovirus; T7 es el promotor del bacteriófago; PA representa proteínas previas a la activación; y SP6 es el promotor de Sp 6.

La figura 25 representa el número de células como una función de los días para células sin transfectar (ensayo); células transfectadas sólo con el vector, sin la secuencia de ADN que codifica para angiostatina (Vector 5), y dos clones que expresan angiostatina (AST 31 y AST 37). El panel (a) representa los resultados de la transfección de células T241. El panel (b) representa los resultados de las células LL2.

La figura 26 muestra los resultados del medio de cultivo derivado de células de *E. coli* que contienen el clon de angiostatina sobre el número de célula. Células no transfectadas (ensayo); células transfectadas sólo con el vector, sin la secuencia de ADN que codifica para angiostatina (Vector 5) y tres clones que expresan angiostatina (AST 25, AST 31 y AST 37). El panel (a) representa los resultados de la incubación del medio de cultivo a partir de clones control (ensayo) y todos los de angiostatina (que expresan y que no expresan) en el número de célula. El panel (b) representa los resultados de la incubación del medio de cultivo de clones control (ensayo), sólo vector (vector 6) y de angiostatina que expresan angiostatina de ratón en número de célula. El panel (c) representa los resultados de la incubación de medio de cultivo purificado para clones control (ensayo) y de angiostatina que expresan angiostatina de ratón en número de célula, en el que se purificó el medio de cultivo sobre una columna de lisina-sepharose para rendir componentes de unión a lisina.

La figura 27 muestra el efecto en el volumen tumoral total como una función del tiempo de implantación de células de fibrosarcoma T241 en ratones, en la que las células de fibrosarcoma se han transfectado con un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica para proteína de angiostatina, y en la que el vector puede expresar proteína de angiostatina. "No transfectadas" representa células de fibrosarcoma T241 inalteradas implantadas en ratones. "Vector 6" representa células de fibrosarcoma T241 transfectadas sólo con el vector, que no contiene la secuencia de ADN que codifica para proteína de angiostatina, implantadas en ratones. "Clon 25, Clon 31 y Clon 37" representan tres clones que producen angiostatina de células de fibrosarcoma T241 transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica para proteína de angiostatina implantada en ratones.

La figura 28 muestra una representación esquemática de la estructura de plasminógeno humano y sus fragmentos de kringle. El plasminógeno humano es una proteína de cadena sencilla que contiene 791 aminoácidos con un lado de N-glicosilación unido en Asn²⁸⁹. La región de no unión a proteasa del plasminógeno humano que consiste en los 561 aminoácidos N-terminal que existen en cinco dominios separados, denominados kringles tal como se muestra en los círculos (K1, K2, K3, K4 y K5), junto con las proteínas que separan estas estructuras. Cada kringle con triple puente disulfuro contiene 80 aminoácidos. La angiostatina cubre los 4 primeros de estos dominios kringle (K1-4), kringle 1-3 (K1-3) y kringle 4 (K4) se obtienen mediante digestión de plasminógeno humano con elastasa. El resto de los fragmentos de kringle son proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. SS = secuencia señal. PA = proteína previa a la activación.

La figura 29 muestra un análisis SDS-PAGE de fragmentos de kringle nativos y recombinantes purificados de plasminógeno en condiciones reductoras. (A) se cargaron fragmentos de kringle recombinantes individuales purificados de lisados bacterianos de *E. coli* en un gel de SDS al 15% seguido por tinción con azul de Coomassie. Se cargaron aproximadamente 5 µg de cada proteína por carril (carril 2 = kringle 1 (K1); carril 3 = kringle 2 (K2); carril 4 = kringle 3 (K3); carril 5 = kringle 4 (K4); carril 1 = marcadores de peso molecular). (B) Se tiñeron grandes fragmentos de kringle con azul de Coomassie. Se obtuvieron kringles 1-4 (carril 2) y kringles 1-3 (carril 3) mediante digestión de plasminógeno humano con elastasa y se purificaron mediante cromatografía en lisina-sepharose. El fragmento recombinante de kringles 2-3 (carril 4) se expresó en *E. coli* y se volvió a plegar *in vitro*. Se indican los marcadores de peso molecular en la izquierda (carril 1).

La figura 30 muestra una inhibición de proliferación celular endotelial mediante fragmentos de kringle individuales recombinantes de angiostatina. Se sometieron a ensayo fragmentos de kringle en células endoteliales capilares bovinas en presencia de bFGF 1 ng/ml durante 72 horas. (A) Efectos proliferativos celulares anti-endoteliales de dos kringles de unión a lisina, rK1 y rK4. El kringle de unión a lisina de alta afinidad, K1 (-○-), inhibió la proliferación celular de BCE de una manera dependiente de la dosis. El kringle de unión a lisina de afinidad intermedia, K4 (-●-), mostró sólo poco efecto inhibidor a concentraciones elevadas. (B) Inhibición de proliferación celular de BCE no mediante unión a lisina K2 y K3. Tanto K2 (-■-) como K3 (-□-) inhibieron la proliferación celular de BCE de una manera dependiente de la dosis. Los datos representan la media +/- EEM de triplicados.

La figura 31 muestra una actividad de proliferación anti-endotelial de grandes fragmentos de kringle de angiostatina. Los fragmentos proteolíticos, K1-4 (angiostatina) (-○-) y K1-3 (-■-), inhibieron la proliferación celular de BCE de una manera dependiente de la dosis. Los fragmentos K2-3 (-●-) recombinantes mostraron una inhibición menos potente que los K1-3 y K1-4. Los datos representan la media de tres determinaciones (+/- EEM) como porcentajes de inhibición.

La figura 32 muestra una actividad inhibidora aditiva de kringle 2 y kringle 3 recombinantes. (A) El fragmento intacto de rK2-3 (véase también la figura 31) mostraron un efecto inhibidor débil sólo a la concentración de 320 nM. A la misma concentración, se observó una inhibición aditiva cuando los fragmentos mutantes de cisteína de rK2 se sustituyeron por serina en la posición de 169 y K3 (cisteína sustituida por serina en la posición de 297) se sometieron a ensayo juntos en células BCE. Cada valor representa la media +/- EEM de triplicados. (B) Estructura esquemática y secuencia de aminoácidos de K2 y K3. Previamente se notificó que un puente disulfuro entre cadenas kringle estaba presente entre la cisteína¹⁶⁹ de K2 y la cisteína²⁹⁷ de K3 (Söhndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M., y Rickli, E.E. (1996) Biochem. en prensa).

La figura 33 muestra una inhibición de la proliferación endotelial mediante fragmentos de kringle combinatorios. Se realizó el ensayo con una concentración de 320 nM para cada fragmento de kringle. Los fragmentos representan la media de tres determinaciones (+/- EEM) como porcentajes de inhibición. (A) Efectos inhibidores de fragmentos mediante la combinación de varios kringles individuales. (B) Actividad inhibidora combinatoria de fragmentos de kringle combinados.

La figura 34 muestra una actividad inhibidora de angiostatina sobre células endoteliales tras la reducción y alquilación. (A) Análisis SDS-PAGE de las formas reducida (carril 2) y no reducida (carril 1) de angiostatina humana. Se redujo angiostatina humana purificada con DTT seguido por alquilación de la proteína con una cantidad en exceso de yodoacetamida. Se sometieron a diálisis las muestras tratadas y se sometieron a ensayo en células BCE. (B) Inhibición de la proliferación celular de BCE mediante formas reducida y no reducida de angiostatina a una concentración de 320 nM. Los datos representan la media de inhibición +/- EEM de triplicados.

La figura 35 muestra un alineamiento de una secuencia de aminoácidos de dominios kringle posibles de angiostatina humana. Se alinearon las secuencias de cuatro dominios kringle según sus cisteínas conservadas. Los aminoácidos idénticos y conservados están sombreados. Los aminoácidos recuadrados en el kringle 4 muestran las lisinas dobles cargadas positivamente adyacentes a los residuos de cisteína conservados de 22 y 80.

La figura 36 muestra características de unión a lisina y reactividad de angiostatina expresada.

La figura 36A muestra un gel teñido con Coomassie (carga de 40 µl).

La figura 36B muestra una inmunotransferencia (carga de 20 µl) de un gel similar. Carril: 1 muestra caldo de matraces con agitación de cultivos inducidos que muestran proteína de angiostatina a aproximadamente 50 kD y otras pocas proteínas. Se diluye 1:1 el caldo de cultivos inducidos con tampón y se carga directamente sobre lisina-sepharose. Carril: 2 muestra la fracción sin unir que pasó a través de la columna de lisina. Toda la proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* se une a la columna de lisina. Carril: 3 muestra elución específica con ácido aminocaproico 0,2 M que muestra que la proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* se une a la lisina y puede purificarse en una única etapa para obtener homogeneidad sobre lisina-sepharose. Además, se reconoce la proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* mediante un anticuerpo monoclonal dependiente de manera conformacional (VAP) crecido frente a los kringles 1 a 3.

La figura 37 muestra proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* observada como un doblete que migra a 49 kD y 51,5 kD en geles teñidos con Coomassie SDS-PAGE no reducidos desnaturalizados. La eliminación de la cadena compleja unida en N sencilla de la proteína de angiostatina expresada con N-glicanasa específica para estructuras ricas en manosa da como resultado una única banda de 49,5 kD. El panel A y el panel B muestran un gel teñido con Coomassie y una inmunotransferencia de un gel similar respectivamente. Carril: 1 muestra una proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* purificada. Carril: 2 muestra una proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* purificada incubada en condiciones de digestión sin N-glicanasa. Carril: 3 muestra proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* purificada digerida con N-glicanasa.

La figura 38A muestra 4 µg de proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* purificada como un doblete en un gel de Coomassie.

La figura 38B muestra que la recombinante purificada inhibe la proliferación de BCE. Se muestra el recuento de células del ensayo de BCE obtenido tras 72 horas, en presencia (●) o ausencia (○) de bFGF, y en presencia de bFGF con PBS como control (Δ), y en presencia de bFGF con proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* (Δ).

5 La figura 38C muestra que la inhibición depende de la dosis.

La figura 39 muestra que se administró angiostatina purificada expresada por *P. pastoris* por vía sistémica (subcutánea) a ratones con tumores primarios.

10 Las figuras 39A y B muestran el número de metástasis y los pesos del pulmón respectivamente de ratones tratados diariamente con solución salina o angiostatina expresada por *P. pastoris* o con proteína de angiostatina derivada de plasminógeno. Al contrario que los pulmones de ratones tratados con solución salina, los pulmones de ratones tratados con proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* o con proteína de angiostatina derivada de plasminógeno no estaban vascularizados y la metástasis se suprimió de manera potente.

15 La figura 40 muestra que los pulmones de ratones tratados con angiostatina expresada por *P. pastoris* eran rosas con micrometástasis mientras que los pulmones del grupo control de solución salina estaban totalmente cubiertos con metástasis vascularizada.

20 La figura 41 muestra una fotografía de electroforesis en gel de poliacrilamida reductora (SDS-PAGE) de angiostatina de ratón recombinante en diversas fases de purificación y agregación en cromatografía en columna de afinidad de níquel (carriles 1-3 lavados de cuerpo de inclusión, carril 4 fracción insoluble en urea, carril 5 materiales de partida en columna de afinidad, carril 6 flujo a través de columna, carril 7 angiostatina eluyente).

25 La figura 42 muestra el efecto de administrar angiostatina de ratón recombinante agregada, sobre las células endoteliales capilares bovinas.

La figura 43 muestra el efecto sobre el volumen tumoral de administrar 2 mg/kg/día de angiostatina agregada en ratones inoculados con carcinoma pulmonar de Lewis.

30 La figura 44 muestra el efecto sobre el volumen tumoral de administrar 10 mg/kg/día de angiostatina agregada en ratones inoculados con carcinoma pulmonar de Lewis.

Descripción detallada

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

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

60 Aún adicionalmente, la presente invención abarca fragmentos de angiostatina que están combinados con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente compuestos o composiciones de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. Además, la invención describe una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a angiostatina, en la que el anticuerpo no se une al plasminógeno.

Más particularmente, la presente invención describe una proteína denominada angiostatina que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 a 45 kilodaltons (kD) que puede superar la actividad angiogénica de factores de crecimiento endógenos tal como bFGF, *in vitro*. La angiostatina es una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons tal como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que empieza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta. El término “sus-

tancialmente similar”, cuando se usa en referencia a las secuencias de aminoácidos de angiostatina, significa una secuencia de aminoácidos que tiene actividad anti-angiogénica y que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kD a 45 kD que también tiene un alto grado de homología de secuencia con el fragmento proteico de plasminógeno de ratón que empieza aproximadamente en el aminoácido número 98 en plasminógeno de ratón y que pesa de 38 kD a 45 kD. Un alto grado de homología significa una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 60%, deseablemente una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 70%, y más deseablemente una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%. El término “actividad inhibidora endotelial” tal como se usa en el presente documento significa la capacidad de una molécula para inhibir la angiogénesis en general y, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de células endoteliales capilares bovinas en un cultivo en presencia del factor de crecimiento de fibroblasto.

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

Se ha demostrado que la angiostatina quede inhibir el crecimiento de células endoteliales *in vitro*. La angiostatina no inhibe el crecimiento de líneas celulares derivadas de otros tipos de células. Específicamente, la angiostatina no tiene ningún efecto sobre las líneas celulares del carcinoma pulmonar de Lewis, epitelio de pulmón de visón, fibroblastos 3T3, células del músculo liso aórticas bovinas, epitelio del pigmento retinal bovino, células MDCK (epitelio renal canino), células WI38 (fibroblastos de pulmón fetal humano), células EFN (fibroblastos fetales murinos) y células LM (tejido conjuntivo murino). La angiostatina endógena en un ratón que porta un tumor es eficaz inhibiendo la metástasis a una concentración sistémica de aproximadamente 10 mg de angiostatina/kg peso corporal.

La angiostatina tiene una conformación tridimensional que se define mediante la región kringle de la molécula de plasminógeno. (Robbins, K. C., “The plasminogen-plasmin enzyme system” Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Practice, 2ª Edición, ed. por Colman, R. W. *et al.* J. B. Lippincott Company, páginas 340-357, 1987). Hay cinco regiones kringle de este tipo, las cuales son motivos relacionados conformacionalmente y tiene homología de secuencia sustancial, en la parte NH₂ terminal de la molécula de plasminógeno. Se cree que la conformación tridimensional de la angiostatina abarca regiones kringle 1 a 3 y una parte de la región kringle 4 de plasminógeno. Cada región kringle de la molécula de plasminógeno contiene aproximadamente 80 aminoácidos y contiene 3 puentes disulfuro. Se sabe que este motivo de cisteína existe en otras proteínas biológicamente activas. Estas proteínas incluyen, pero no se limitan a, protrombina, factor de crecimiento del hepatocito, factor de dispersión y proteína estimulante de macrófago. (Yoshimura, T, *et al.*, “Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MST1) confirms MSP as a member of the family of kringle proteins and locates the MSP gene on Chromosome 3” J. Biol. Chem, Vol. 268, No. 21, págs. 15461-15468, 1993). Se contempla que cualquier proteína aislada o proteína que tiene una conformación de tipo kringle tridimensional o motivo de cisteína que tiene una actividad anti-angiogénica *in vivo*, es parte de la presente invención.

La presente invención también describe la detección de la angiostatina en líquidos y tejidos corporales con el fin de diagnóstico o pronóstico de enfermedades tales como cáncer. La presente invención también describe la detección de sitios de unión a angiostatina y receptores en células y tejidos. La presente invención también incluye métodos para tratar o prevenir enfermedades y procesos angiogénicos incluyendo, pero sin limitarse a, artritis y tumores estimulando la producción de angiostatina, y/o administrando angiostatina, fragmentos a un paciente. Métodos de tratamiento adicionales incluyen la administración de fragmentos de angiostatina, unidos a agentes citotóxicos. Debe entenderse que la angiostatina puede ser de origen animal o humano. Los fragmentos de angiostatina también pueden producirse sintéticamente mediante reacción química o mediante técnicas recombinantes junto con sistemas de expresión. Los fragmentos de angiostatina también pueden producirse escindiendo enzimáticamente plasmina o plasminógeno aislado para generar proteínas que tienen actividad anti-angiogénica. La angiostatina también puede producirse mediante compuestos que imitan la acción de enzimas endógenas que escinden el plasminógeno para dar angiostatina. La producción de angiostatina también puede estar modulada por compuestos que afectan la actividad de enzimas que escinden plasminógeno.

Puede emplearse la terapia con anticuerpos pasivos usando anticuerpos que se unen específicamente a angiostatina para modular los procesos que dependen de angiogénesis tales como reproducción, desarrollo y cicatrización de heridas y reparación tisular. Además, pueden administrarse antiseros dirigidos hacia las regiones Fab de anticuerpos frente a angiostatina para bloquear la capacidad de los antiseros de angiostatina endógena para unirse a angiostatina.

La presente invención también abarca terapia génica mediante la cual se regula en un paciente el gen que codifica para angiostatina. Se dan a conocer diversos métodos para transferir o administrar ADN a células para la expresión de la proteína de producto génico, denominada de otra manera como terapia génica, en Gene Transfer into Mammalian Somatic Cells *in vivo*, N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12(4): 335-356 (1992), que se incorpora al presente documento como referencia. La terapia génica abarca la incorporación de secuencias de ADN en células somáticas o células de líneas germinales no humanas en terapia o bien *ex vivo* o bien *in vivo*. La terapia génica funciona para, sustituir genes, aumentar la función génica normal o anómala y combatir enfermedades infecciosas y otras patologías.

Las estrategias para tratar estos problemas médicos con terapia génica incluyen estrategias terapéuticas tales como identificar el gen defectuoso y después añadir un gen funcional para o bien sustituir la función del gen defectuoso o bien para aumentar un gen ligeramente funcional; o estrategias profilácticas, tales como añadir un gen para la proteína de producto que tratará el estado o que volverá al tejido u órgano más susceptible a un régimen de tratamiento. Como un ejemplo de estrategia profiláctica, puede colocarse un gen tal como angiostatina en un paciente y así prevenir la producción de angiogénesis; o podría insertarse un gen que vuelve a las células tumorales más susceptibles frente a la radiación y entonces la irradiación del tumor provocaría un aumento de la destrucción de las células tumorales.

En esta invención se prevén muchos protocolos para la transferencia de ADN de angiostatina o secuencias reguladoras de angiostatina. También se prevén como métodos de terapia génica la transfección de secuencias promotoras, distintas de una encontrada habitualmente asociada de manera específica con angiostatina, u otras secuencias que podrían aumentar la producción de proteína de angiostatina. Se encuentra un ejemplo de esta tecnología en Transkaryotic Therapies, Inc., de Cambridge, Massachusetts, que usa la recombinación homóloga para insertar una “conmutación genética” que se activa en un gen de eritropoyetina en células. Véase Genetic Engineering News, 15 de abril, 1994. Tales “conmutadores genéticos” podrían usarse para activar angiostatina (o el receptor de angiostatina) en células que normalmente no expresan angiostatina (o el receptor de angiostatina).

Los métodos de transferencia génica para terapia génica se encuentran en tres amplias categorías, física (por ejemplo, electroporación, transferencia génica directa y bombardeo de partículas), química (vehículos basados en lípidos, u otros vectores no virales) y biológica (vector derivado de virus y captación de receptor). Por ejemplo, pueden usarse vectores no virales que incluyen liposomas recubiertos con ADN. Tales complejos liposoma/ADN pueden inyectarse directamente por vía intravenosa en el paciente. Se cree que los complejos liposoma/ADN se concentran en el hígado donde administran el ADN a los macrófagos y a las células de Kupffer. Estas células tienen larga vida y por tanto proporcionan expresión a largo plazo del ADN administrado. Adicionalmente, los vectores o el ADN “desnudo” del gen pueden inyectarse directamente en el órgano, tejido o tumor deseado para la administración dirigida del ADN terapéutico.

También pueden describirse las metodologías de terapia génica mediante el sitio de administración. Las vías fundamentales para administrar genes incluyen transferencia génica *ex vivo*, transferencia génica *in vivo* y transferencia génica *in vitro*. En la transferencia génica *ex vivo*, se cogen células del paciente y se hacen crecer en cultivo. Se transfecta el ADN en las células, se expanden las células transfectadas en número y después se reimplantan en el paciente. En la transferencia génica *in vitro*, las células transformadas son células que crecen en cultivo, tal como células de cultivo tisular, y no células particulares de un paciente particular. Se transfectan estas “células de laboratorio”, se seleccionan las células transfectadas y se expanden o bien para su implantación en un paciente o bien para otros usos.

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

Los métodos químicos de terapia génica pueden implicar un compuesto basado en lípido, no necesariamente un liposoma, transportar el ADN a través de la membrana celular. Las lipofectinas o citofectinas, iones positivos basados en lípidos que se unen a ADN cargado negativamente, forman un complejo que puede cruzar la membrana celular y proporcionar el ADN en el interior de la célula. Otro método químico usa endocitosis basada en receptor, que implica unir un ligando específico a un receptor de superficie celular y envolverlo y transportarlo a través de la membrana celular. El ligando se une al ADN y el complejo completo se transporta hacia dentro de la célula. Se inyecta el complejo ligando gen en el torrente sanguíneo y entonces las células diana que tiene el receptor se unirán específicamente al ligando y transportarán el complejo ligando-ADN hacia el interior de la célula.

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

También se han usado vectores virales para insertar genes en células usando protocolos *in vivo*. Para dirigir la expresión específica de tejido de genes foráneos, pueden usarse promotores o elementos reguladores que actúan en cis que se sabe que son específicos de tejido. Alternativamente, esto puede lograrse usando administración *in situ* de ADN o vectores virales a sitios anatómicos específicos *in vivo*. Por ejemplo, se logró la transferencia génica a vasos

sanguíneos *in vivo* implantando células endoteliales transducidas *in vitro* en sitios elegidos en paredes arteriales. El virus infectó células circundantes que también expresaban el producto génico. Puede administrarse un vector viral directamente al sitio *in vivo*, mediante un catéter por ejemplo, permitiendo así que sólo se infecten determinadas zonas por el virus, y proporcionando expresión génica a largo plazo, específica de sitio. También se ha demostrado la transferencia génica *in vivo* usando vectores de retrovirus en tejido de mamífero y tejido hepático mediante inyección de virus alterado en vasos sanguíneos que conducen a los órganos.

Los vectores virales que se han usado para protocolos de terapia génica incluyen pero no se limitan a, retrovirus, otros virus de ARN tales como poliovirus o virus Sindbis, adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, SV 40, vacunas y otros virus de ADN. Los vectores retrovirales murinos defectuosos en replicación son los vectores de transferencia génica más ampliamente utilizados. Los retrovirus de leucemia murinos están compuestos por un ARN de cadena sencilla complejo con una proteína del núcleo nuclear y enzimas polimerasa (pol), recubiertas por un núcleo de proteína (gag) y rodeadas por una envoltura de glicoproteína (env) que determina el intervalo de huésped. La estructura genómica de retrovirus incluye los genes gag, pol y env encerrados por las repeticiones terminales largas (LTR) en 5' y 3'. Los sistemas de vectores retrovirales explotan el hecho de que un vector mínimo que contiene las LTR en 5' y 3' y la señal de empaquetamiento son suficientes para permitir el empaquetamiento, infección e integración del vector en células diana siempre y cuando las proteínas estructurales virales se suministren *in trans* en la línea celular de empaquetamiento. Las ventajas fundamentales de los vectores retrovirales para la transferencia génica incluyen infección eficaz y expresión génica en la mayoría de tipos de células, integración de vector de copia sencilla precisa en ADN cromosómico de célula diana, y facilidad de manipulación del genoma retroviral.

El adenovirus está compuesto de ADN de cadena doble, lineal complejo con proteínas de núcleo y rodeado con proteínas de cápside. Las ventajas en virología molecular han conducido a la capacidad para explotar la biología de estos organismos para producir vectores que pueden transducir secuencias genéticas novedosas en células diana *in vivo*. Los vectores basados en adenovirus expresarán proteínas de producto génico a altos niveles. Los vectores adenovirales tienen elevadas eficacias de infecciosidad, incluso con pocos títulos de virus. Adicionalmente, el virus es totalmente infeccioso como un virión libre de célula de manera que no es necesaria la inyección de líneas celulares productoras. Otra posible ventaja para los vectores adenovirales es la capacidad para lograr expresión a largo plazo de genes heterólogos *in vivo*.

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

Se ha encontrado que la inyección de ADN de plásmido en células musculares rinde un alto porcentaje de las células que se transfectan y tienen expresión sostenida de genes marcadores. El ADN del plásmido puede integrarse o no en el genoma de las células. La no integración de ADN transfectado permitiría la transfección y expresión de proteínas de producto génico en tejidos no proliferativos, diferenciados de manera terminal durante un periodo de tiempo prolongado sin miedo de inserciones mutacionales, deleciones, o alteraciones en el genoma celular o mitocondrial. La transferencia a largo plazo, pero no necesariamente permanente, de genes terapéuticos en células específicas puede proporcionar tratamientos para enfermedades genéticas o para uso profiláctico. El ADN podría reinyectarse periódicamente para mantener el nivel de producto génico sin que se produzcan mutaciones en los genomas de las células receptoras. La no integración de ADN exógenos puede permitir la presencia de varios constructos de ADN exógenos diferentes dentro de una célula expresando todos los constructos diversos productos génicos.

Los métodos de transferencia génica mediada por partículas se usaron en primer lugar para transformar tejidos vegetales. Con un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola de genes," se genera una fuerza motriz para acelerar las partículas de alta densidad recubiertas con ADN (tal como oro o wolframio) hasta una velocidad alta que permite la penetración de los órganos, tejidos o células diana. Puede usarse el bombardeo de partículas en sistemas *in vitro*, o con técnicas *ex vivo* o *in vivo* para introducir ADN en células, tejidos u órganos.

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

Puede usarse la transferencia génica mediada por vehículo *in vivo* para transfectar ADN foráneo en células. Puede introducirse de manera conveniente el complejo vehículo-ADN en fluidos corporales o el torrente sanguíneo y después dirigirse específicamente al órgano o tejido diana en el organismo. Pueden usarse tanto liposomas como policonjugados, tales como polilisina, lipofectinas o citofectinas. Pueden desarrollarse liposomas que son específicos de célula o específicos de órgano y por tanto el ADN foráneo transportado por el liposoma será captado por células diana. Puede usarse la inyección de inmunoliposomas que están dirigidos a un receptor específico en determinadas células como un método conveniente para insertar el ADN en las células que portan el receptor. Otro sistema de vehículo que se ha usa-

do es el sistema conjugado asialoglicoproteína/polilisina para transportar el ADN hasta hepatocitos para transferencia génica *in vivo*.

También puede complejarse el ADN transfectado con otros tipos de vehículos de manera que se transporta el ADN a la célula receptora y entonces reside en el citoplasma o en el nucleoplasma. Puede acoplarse el ADN a proteínas nucleares portadoras en complejos de vesículas obtenidas mediante ingeniería genética y transportarse directamente al núcleo.

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

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

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

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

Los inventores han mostrado que un tumor primario que crece está asociado con la liberación en el torrente sanguíneo de inhibidor(es) específico(s) de proliferación celular endotelial, incluyendo angiostatina que puede suprimir la angiogénesis en una metástasis y por tanto inhibir el crecimiento de la propia metástasis. Se desconoce la fuente de la angiostatina asociada con el tumor primario. Puede producirse el compuesto mediante degradación de plasminógeno mediante una proteasa específica, o podría producirse la angiostatina mediante expresión de un gen específico que codifica para angiostatina.

El fenotipo angiogénico de un tumor primario depende de la producción de proteínas angiogénicas en exceso de inhibidores celulares endoteliales que se elaboran por células normales, pero se cree que están reguladas por disminución durante la transformación a neoplasia. Mientras que la producción de angiostatina puede estar regulada por disminución en una célula tumoral individual con respecto a la producción por su tipo de célula original, la cantidad total de inhibidor elaborada por el tumor completo puede ser suficiente para entrar en la circulación y suprimir el crecimiento endotelial en sitios remotos de micrometástasis. La angiostatina permanece en la circulación durante un tiempo significativamente superior que la(s) proteína(s) angiogénica(s) liberada(s) por un tumor primario. Por tanto, parece que las proteínas angiogénicas actúan de manera local, mientras que la angiostatina actúa de manera global y circula en la sangre con una semivida relativamente larga. La semivida de la angiostatina es aproximadamente de 12 horas a 5 días.

Aunque no se quiera limitarse por la siguiente hipótesis, se cree que cuando un tumor se vuelve angiogénico libera una o más proteínas angiogénicas (por ejemplo, aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GN-CSF, etc.), que actúan de manera global, direccionar el endotelio en la vecindad de un tumor primario de una dirección extravascular, y no circulan (o circulan con una semivida corta). Deben producirse estas proteínas angiogénicas en una cantidad suficiente para superar la acción del inhibidor celular endotelial (inhibidores de angiogénesis) para que un tumor primario continúe expandiendo su población. Una vez que tal tumor primario está creciendo bien, continúa liberando inhibidores celulares endoteliales en la circulación. Según esta hipótesis, estos inhibidores actúan de manera remota a una distancia del tumor primario, direccionan el endotelio capilar de una metástasis desde una dirección intravascular y continúan circulando. Por tanto, justo en el momento en que una metástasis remota puede empezar a iniciar la angiogénesis, el endotelio capilar en su proximidad podría estar inhibido por angiostatina entrante.

Una vez que un tumor primario ha alcanzado tamaño suficiente para provocar que se libere de manera continua angiostatina en la circulación, es difícil para un segundo implante tumoral (o una micrometástasis) iniciar o aumentar su propia angiogénesis. Si un segundo implante tumoral (por ejemplo, en el espacio subcutáneo, o en la córnea, o por vía intravenosa al pulmón) se produce justo después de implantarse el tumor primario, el tumor primario no podrá suprimir el tumor secundario (debido a que la angiogénesis en el tumor secundario ya estará en marcha). Si se implantan dos tumores simultáneamente (por ejemplo, en flancos opuestos), los inhibidores pueden tener un efecto inhibidor equivalente el uno sobre el otro.

Los fragmentos de angiostatina de la presente invención pueden:

- (i) Administrarse a seres humanos o animales que portan tumores como terapia anti-angiogénica;
- (ii) Monitorizarse en suero humano o animal, orina, o tejidos como marcadores de pronóstico; y
- (iii) Usarse como la base para analizar suero y orina de pacientes con cáncer para moléculas angiostáticas similares.

Se contempla como parte de la presente invención que puede aislarse la angiostatina a partir de un líquido corporal tal como sangre u orina de pacientes o puede producirse la angiostatina mediante métodos de ADN recombinantes o métodos químicos de proteínas sintéticas que los conocen bien los expertos en la técnica. Se conocen bien en la técnica métodos de purificación de proteínas y se proporciona un ejemplo específico de un método para purificar angiostatina, y someter a ensayo para determinar la actividad del inhibidor en los ejemplos a continuación. El aislamiento de angiostatina endógena humana se logra usando técnicas similares.

Un ejemplo de un método para producir angiostatina usando técnicas de ADN recombinante implica las etapas de (1) identificar y purificar angiostatina tal como se trató anteriormente, y como se describe más en detalle más adelante, (2) determinar la secuencia de aminoácidos N-terminal del inhibidor purificado, (3) generar sintéticamente cebadores oligonucleotídicos de ADN en 5' y 3' para la secuencia de angiostatina, (4) amplificar la secuencia génica de angiostatina usando polimerasa, (5) insertar la secuencia amplificada en un vector apropiado tal como un vector de expresión, (6) insertar el vector que contiene el gen en un microorganismo u otro sistema de expresión que puede expresar el gen inhibidor, y (7) aislar el inhibidor producido de manera recombinante. Vectores apropiados incluyen vectores de expresión viral, bacteriana y eucariotas (tal como levadura). Las técnicas anteriores se describen con más detalle en manuales de laboratorio tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Segunda Edición por Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, 1989. Se ha publicado la secuencia de ADN de plasminógeno humano (Browne, M. J., *et al.*, "Expression of recombinant human plasminogen and a glycoplasminogen in HeLa cells" Fibrinolysis Vol.5 (4). 257-260, 1991) y se incorpora al presente documento como referencia.

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

Todavía otro método para producir angiostatina, o fragmentos biológicamente activos de la misma, es mediante síntesis de proteínas. Una vez se encuentra un fragmento biológicamente activo de una angiostatina usando el sistema de ensayo descrito con más detalle más adelante, puede secuenciarse mediante por ejemplo métodos de secuenciación de proteínas automatizados. Alternativamente, una vez se aísla el gen o secuencia de ADN que codifica para angiostatina, por ejemplo mediante los métodos descritos anteriormente, puede determinarse la secuencia de ADN usando métodos de secuenciación manuales o automatizados bien conocidos en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos a su vez proporciona información relacionada con la secuencia de aminoácidos. Por tanto, si se genera el fragmento biológicamente activo mediante métodos específicos, tales como digestión trípica, o si se secuencian el fragmento N-terminal, puede determinarse la secuencia de aminoácidos restante a partir de la secuencia de ADN correspondiente.

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

La angiostatina es eficaz para tratar enfermedades o procesos que están mediados por, o implican, angiogénesis. La presente invención incluye el método para tratar una enfermedad mediada por angiogénesis con una cantidad eficaz de fragmentos de angiostatina biológicamente activos, o combinaciones de fragmentos de angiostatina que poseen simultáneamente actividad anti-angiogénica. Las enfermedades asediadas por angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos; tumores de transmisión hemática tales como leucemias; metástasis tumoral; tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piogénico; artritis reumatoide; psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, fibroplasia retrolenticular, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización en placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; y granulación de heridas. La angiostatina es útil en el tratamiento de una enfermedad de estimulación excesiva o anómala de células endoteliales. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, adhesiones intestinales, enfermedad de Crohn, arterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas, es decir, queloides. Puede usarse la angiostatina como un agente de control de natalidad impidiendo la vascularización requerida para la implantación del embrión. La angiostatina es útil en el tratamiento de enfermedades que tienen angiogénesis como una consecuencia patológica tal como linforreticulitis benigna (*Rochele minalia quintosa*) y úlceras (*Helicobacter pylori*).

Los fragmentos de proteína sintéticos de angiostatina tienen una variedad de usos. La proteína que se une al receptor de angiostatina con elevada especificidad y avidéz se radiomarca y se emplea para la visualización y cuantificación de sitios de unión usando técnicas de unión a membrana y autorradiográficas. Esta solicitud proporciona herramientas de diagnóstico y de investigación importantes. El conocimiento de las propiedades de unión del receptor de angiostatina facilita la investigación del mecanismo de transducción unido al receptor.

Además, la marcación de proteínas de angiostatinas con isótopos de corta vida permite la visualización de sitios de unión a receptor *in vivo* usando tomografía por emisión de positrones u otras técnicas radiográficas modernas para localizar tumores con sitios de unión a angiostatina.

La sustitución sistemática de aminoácidos en estas proteínas sintetizadas rinde agonistas y antagonistas de proteína de alta afinidad para el receptor de angiostatina que aumentan o disminuyen la unión de angiostatina a su receptor. Se usan tales agonistas para suprimir el crecimiento de micrometástasis, limitando así la propagación del cáncer. Se aplican los antagonistas para la angiostatina en situaciones de vascularización inadecuada, para bloquear los efectos inhibidores de la angiostatina y promover la angiogénesis. Por ejemplo, este tratamiento puede tener efectos terapéuticos para promover la cicatrización de heridas en diabéticos.

Se emplean las proteínas de angiostatina para desarrollar columnas de afinidad para el aislamiento del receptor de angiostatina a partir de células tumorales cultivadas. El aislamiento y la purificación del receptor de angiostatina están seguidos por la secuenciación de aminoácidos. Usando esta información pueden identificarse y aislarse el gen o genes que codifican para el receptor de angiostatina. A continuación, se revelan las secuencias de ácidos nucleicos clonadas para su inserción en vectores que pueden expresar el receptor. Estas técnicas las conocen bien los expertos en la técnica. La transfección de la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifican para el receptor de angiostatina en células tumorales, y la expresión del receptor por las células tumorales transfectadas potencia la responsividad de estas células frente a angiostatina endógena o exógena y disminuye así la tasa de crecimiento metastásico.

Los agentes citotóxicos tales como ricina, están unidos a angiostatina, y fragmentos de proteína de angiostatina de alta afinidad, proporcionando así una herramienta para la destrucción de células que se unen a angiostatina. Pueden encontrarse estas células en muchas ubicaciones, incluyendo pero sin limitarse a, micrometástasis y tumores primarios. Se infunden las proteínas unidas a agentes citotóxicos de una manera diseñada para maximizar la administración en la ubicación deseada. Por ejemplo, se administran fragmentos de angiostatina de alta afinidad unidos a ricina a través de una cánula a los vasos proporcionando el sitio objetivo o directamente en la diana. También se administran tales agentes de una manera controlada a través de bombas osmóticas acopladas a cánulas de infusión. Puede aplicarse de manera conjunta una combinación de antagonistas de angiostatina con estimuladores de angiogénesis para aumentar la vascularización del tejido. Este régimen terapéutico proporciona un medio eficaz para destruir el cáncer metastásico.

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

Una matriz de liberación sostenida, tal como se usa en el presente documento, es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros, que pueden degradarse mediante hidrólisis enzimática o ácida/básica o mediante disolución. Una vez insertada en el organismo, la matriz se activa por enzimas y líquidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige de manera deseable de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólidos (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico) polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliproteínas, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz bio-

degradable preferida es una matriz o bien de polilactida, poliglicólido, o bien de polilactida co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

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

Los fragmentos de angiostatina de la presente invención también pueden usarse para generar anticuerpos que son específicos para el inhibidor y su receptor. Los anticuerpos pueden ser o bien anticuerpos policlonales o bien anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos que se unen específicamente a la angiostatina o receptores de angiostatina pueden usarse en kits y métodos de diagnóstico que son bien conocidos por los expertos en la técnica para detectar o cuantificar la angiostatina o receptores de angiostatina en un líquido o tejido corporal. Pueden usarse los resultados de estas pruebas para diagnosticar o predecir la producción o recurrencia de un cáncer y otras enfermedades mediadas por angiogénesis.

También pueden usarse los fragmentos de angiostatina en un kit y método de diagnóstico para detectar y cuantificar anticuerpos que pueden unirse a angiostatina. Estos kits permitirían la detección de anticuerpos frente a angiostatina en circulación lo que indica la propagación de la micrometástasis en presencia de angiostatina segregada por tumores primarios *in situ*. Los pacientes que tienen tales anticuerpos anti-angiostatina en circulación son más susceptibles de desarrollar múltiples tumores y cánceres, son más susceptibles de presentar recurrencias de cáncer tras tratamientos o periodos de remisión. Pueden usarse los fragmentos Fab de estos anticuerpos anti-angiostatina como antígenos para generar antisuero de fragmento Fab anti-angiostatina que puede usarse para neutralizar los anticuerpos anti-angiostatina. Un método de este tipo reduciría la eliminación de angiostatina en circulación por los anticuerpos anti-angiostatina, elevando eficazmente así los niveles de angiostatina en circulación.

La presente invención describe un método para bloquear la acción de angiostatina endógena en exceso. Esto puede realizarse inmunizando pasivamente un ser humano o animal con anticuerpos específicos para la angiostatina no deseada en el sistema. Este tratamiento puede ser importante para tratar la ovulación, menstruación y placentación anómala y la vasculogénesis. Esto proporciona una herramienta útil para examinar los efectos de la eliminación de angiostatina en procesos metastásicos. El fragmento Fab de anticuerpos frente a angiostatina contiene el sitio de unión para la angiostatina. Este fragmento se aísla a partir de anticuerpos frente a angiostatina usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Se usan los fragmentos Fab de antisuero frente a angiostatina como antígenos para generar la producción de suero de fragmentos anti-Fab. La infusión de este antisuero contra los fragmentos Fab de angiostatina evita que la angiostatina se una a anticuerpos frente a angiostatina. Se obtiene beneficio terapéutico neutralizando anticuerpos anti-angiostatina endógenos mediante el bloqueo de la unión de angiostatina a los fragmentos Fab de anti-angiostatina. El efecto neto de este tratamiento es facilitar la capacidad de la angiostatina en circulación endógena para alcanzar células diana, disminuyendo así la propagación de la metástasis.

Debe entenderse que se contempla que la presente invención incluya derivados de los fragmentos de angiostatina que tienen actividad inhibidora endotelial. La presente invención incluye derivados de los fragmentos biológicamente activos de la proteína de angiostatina. Estos incluyen proteínas con actividad de angiostatina que tienen sustituciones de aminoácidos o tienen azúcares u otras moléculas unidas a grupos funcionales de los aminoácidos.

Pueden proporcionarse los fragmentos de proteína con la actividad de angiostatina descrita anteriormente como proteínas y fragmentos de proteínas sustancialmente purificados y aislados en formulaciones farmacéuticamente aceptables usando métodos de formulación conocidos por los expertos en la técnica. Pueden administrarse estas formulaciones mediante vías convencionales. En general, pueden administrarse las combinaciones por vía tópica, transdérmica, intraperitoneal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterina, oral, rectal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular). Además, los Fragmentos de angiostatina pueden incorporarse en polímeros biodegradables permitiendo una liberación sostenida del compuesto, implantándose los polímeros en la proximidad de donde se desea la administración del fármaco, por ejemplo, en el sitio de un tumor, o implantándose de manera que se libere la angiostatina lentamente por vía sistémica. También pueden usarse mini-bombas osmóticas para proporcionar la administración controlada de altas concentraciones de angiostatina a través de cánulas hasta el sitio de interés, tal como directamente en un crecimiento metastásico o en el suministro vascular a ese tumor. Los polímeros biodegradables y sus usos se describen, por ejemplo, en detalle en Brem *et al.*, J. Neurosurg. 74:441-446 (1991), que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

La dosificación de los fragmentos de angiostatina de la presente invención dependerá del estado patológico o dolencia que se está tratando y de otros factores clínicos tales como el peso y el estado del ser humano o animal y de la vía de administración del compuesto. Para tratar seres humanos o animales, pueden administrarse aproximadamente entre 0,5 mg/kilogramo y 500 mg/kilogramo de los fragmentos de angiostatina. Dependiendo de la semivida de los fragmentos de angiostatina en el animal o ser humano particular, pueden administrarse los fragmentos de angiostatina entre de

varias veces al día y una vez a la semana. Debe entenderse que la presente invención tiene aplicación tanto para seres humanos como para uso veterinario. Los métodos de la presente invención contemplan administraciones individuales así como múltiples, administradas o bien simultáneamente o bien durante un periodo de tiempo prolongado.

5 Las formulaciones de fragmentos de angiostatina incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), intrauterina, vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intracraneal, intratraqueal y epidural). Las formulaciones de fragmentos de angiostatina pueden presentarse de manera conveniente en formas farmacéuticas unitarias y pueden prepararse mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo y el/los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéuticos. En general, se preparan las formulaciones poniendo en asociación uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos divididos finamente o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

15 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes. Pueden presentarse las formulaciones en recipientes de dosis unitarias o múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse las disoluciones y suspensiones de inyección improvisadas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

25 Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una unidad o dosis diaria, subdosis diaria, o una fracción apropiada de la misma, del componente administrado. Debe entenderse que además de los componentes, mencionados de manera particular anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que tienen relación con el tipo de formulación en cuestión. Opcionalmente, pueden incorporarse agentes citotóxicos o combinarse de otra manera con proteínas de angiostatina, o fragmentos proteicos biológicamente funcionales de la misma, para proporcionar una terapia doble al paciente.

30 Pueden sintetizarse las proteínas que inhiben la angiogénesis de la presente invención en una instalación microquímica convencional y verificarse la pureza con HPLC y espectrometría de masas. Los expertos en estas técnicas comúnmente conocen los métodos de síntesis de proteínas, purificación por HPLC y espectrometría de masas. Las proteínas de angiostatina y las proteínas receptoras de angiostatina también se producen en sistemas de expresión de levadura o de *E. coli* recombinantes, y se purifican por cromatografía en columna.

35 Pueden sintetizarse diferentes fragmentos proteicos de la molécula de angiostatina intacta para su uso en diversas aplicaciones incluyendo, pero sin limitarse a lo siguiente; como antígenos para el desarrollo de antisueros específicos, como agonistas y antagonistas activos en los sitios de unión a angiostatina, como proteínas para unirse a, o usarse en combinación con, agentes citotóxicos para la destrucción dirigida de células que se unen a angiostatina. Las secuencias de aminoácidos que comprenden estas proteínas se seleccionan basándose en su posición en las regiones exteriores de la molécula y son accesibles para unirse a los antisueros. Se representan por separado el extremo amino y carboxilo-terminal de la angiostatina, así como la región media de la molécula entre los fragmentos que van a sintetizarse.

45 Se comparan estas secuencias de proteínas con secuencias conocidas usando bases de datos de secuencias de proteína tales como GenBank, Brookhaven Protein, SWISS-PROT y PIR para determinar posibles homologías de secuencia. Esta información facilita la eliminación de secuencias que muestran un alto grado de homología de secuencia con otras moléculas, mejorando así el potencial para una alta especificidad en el desarrollo de antisueros, agonistas y antagonistas frente a angiostatina.

50 La angiostatina y las proteínas derivadas de angiostatina pueden acoplarse a otras moléculas usando métodos convencionales. Los extremos amino y carboxilo-terminal de angiostatina contienen residuos de tirosina y lisina y se marcan isotópicamente y no isotópicamente con muchas técnicas, por ejemplo radiomarcando usando técnicas convencionales (residuos de tirosina - cloramina T, yodogen, lactoperoxidasa; residuos de lisina - reactivo de Bolton-Hunter). Los expertos en la técnica conocen bien estas técnicas de acoplamiento. Alternativamente, se añade tirosina o lisina a los fragmentos que no tienen estos residuos para facilitar el marcaje de grupos amino e hidroxilo en la proteína. Se elige la técnica de acoplamiento basándose en los grupos funcionales disponibles en los aminoácidos incluyendo, pero sin limitarse a, amino, sulfhidrilo, carboxilo, amida, fenol e imidazol. Los diversos reactivos usados para realizar estos acoplamientos incluyen entre otros, glutaraldehído, bencidina diazotizada, carbodiimida y p-benzoquinona.

60 Las proteínas de angiostatina se acoplan químicamente a isótopos, enzimas, proteínas vehículo, agentes citotóxicos, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y otros compuestos para una variedad de aplicaciones. Se determina la eficacia de la reacción de acoplamiento usando diferentes técnicas apropiadas para la reacción específica. Por ejemplo, se logra el radiomarcaje de una proteína de angiostatina con ^{125}I usando cloramina T y Na^{125}I de alta actividad específica. Se termina la reacción con metabisulfito de sodio y se desala la mezcla en columnas desechables. Se eluye la proteína marcada de la columna y se recogen las fracciones. Se eliminan las alícuotas de cada fracción y se mide la radiactividad en un contador gamma. De esta manera, se separa el Na^{125}I sin reaccionar de la proteína de angiostatina marcada. Se almacenan las fracciones de proteína con la mayor radiactividad específica para un uso posterior tal como el análisis de la capacidad para unirse a antisueros frente a angiostatina.

Otra aplicación de la conjugación de proteínas es para la producción de antisueros policlonales. Por ejemplo, las proteínas de angiostatina que contienen residuos de lisina se unen a albúmina sérica bovina purificada usando glutaraldehído. Se determina la eficacia de la reacción midiendo la incorporación de la proteína radiomarcada. La proteína y el glutaraldehído sin reaccionar se determinan mediante diálisis. Se almacena el conjugado para un uso posterior.

Pueden generarse antisuero frente a angiostatina, análogos de angiostatina, fragmentos proteicos de angiostatina y el receptor de angiostatina. Tras la síntesis y purificación de la proteína, se obtienen antisueros tanto monoclonales como policlonales usando técnicas establecidas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden obtenerse antisueros policlonales en conejos, ovejas, cabras u otros animales. Las proteínas de angiostatina conjugadas con una molécula portadora tal como albúmina sérica bovina, o la propia angiostatina, se combinan con una mezcla de adyuvantes, se emulsionan y se inyectan por vía subcutánea en múltiples sitios en el lomo, cuello, costados y algunas veces en las almohadillas plantares. Las inyecciones de refuerzo se realizan a intervalos regulares, tal como cada de 2 a 4 semanas. Se obtienen las muestras de sangre mediante venopunción, por ejemplo usando las venas marginales de la oreja tras la dilatación, aproximadamente de 7 a 10 días tras cada inyección. Se dejan coagular las muestras de sangre durante la noche a 4°C y se centrifugan a aproximadamente 2400 X g a 4°C durante aproximadamente 30 minutos. Se elimina el suero, se extrae una alícuota y se almacena a 4°C para un uso inmediato o a de -20 a -90°C para su posterior análisis.

Se analizan todas las muestras séricas a partir de la generación de antisueros policlonales o muestras de medios de la producción de antisueros monoclonales para la determinación del título del anticuerpo. Se establece el título mediante diversos medios, por ejemplo, usando transferencias de puntos y análisis de densidad, y también con precipitación de complejos proteína-anticuerpo radiomarcados usando proteína A, antisueros secundarios, etanol frío o dextrano en carbón seguido por medición de la actividad con un contador gamma. Los antisueros de mayor título también se purifican en columnas de afinidad que están disponibles comercialmente. Las proteínas de angiostatina se acoplan al gel en la columna de afinidad. Se pasan las muestras de antisuero a través de la columna y los anticuerpos anti-angiostatina permanecen unidos en la columna. Estos anticuerpos se eluyen posteriormente, se recogen y se evalúan para la determinación del título y la especificidad.

Se someten a prueba los antisueros anti-angiostatina de mayor título para establecer lo siguiente; a) dilución de antisuero óptimo para la mayor unión específica del antígeno y la menor unión no específica, b) la capacidad para unir cantidades crecientes de proteína de angiostatina en una curva de desplazamiento convencional, c) posible reactividad cruzada con proteínas relacionadas y proteínas, incluyendo plasminógeno y también angiostatina de especies relacionadas, d) capacidad para detectar proteínas de angiostatina en extractos de plasma, orina, tejidos y en medios de cultivo celular.

También se describen los kits para la medición de angiostatina y el receptor de angiostatina. Se examinan adicionalmente los antisueros que poseen el mayor título y especificidad y que pueden detectar proteínas de angiostatina en extractos de plasma, orina, tejidos y en medios de cultivo celular para establecer un fácil uso de los kits para una medición y localización de angiostatina rápida, fiable, sensible y específica. Estos kits de ensayo incluyen, pero no se limitan a, las siguientes técnicas; ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoanálisis, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos fluorométricos, ensayos de intercalación, ensayos inmunoradiométricos, transferencias de puntos, ensayos asociados a enzimas incluyendo ELISA, placas de microtitulación, tiras recubiertas con anticuerpos o tiras reactivas para la rápida monitorización de orina o sangre, e inmunocitoquímica. Para cada kit se establecen el intervalo, sensibilidad, precisión, fiabilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo. La variación entre ensayos y dentro de un ensayo se establece en el 20%, el 50% y el 80% de puntos en las curvas de desplazamiento o actividad convencionales.

Un ejemplo de un kit de ensayo usado comúnmente en investigación y en medicina es un kit de radioinmunoanálisis (RIA). Más adelante se ilustra un RIA para una angiostatina. Tras la radioyodación y purificación satisfactorias de angiostatina o una proteína de angiostatina, se añade el antisuero que posee el mayor título en diversas diluciones a tubos que contienen una cantidad relativamente constante de radiactividad, tal como 10.000 cpm, en un sistema de tampón adecuado. Otros tubos contienen también un suero preinmunitario para determinar la unión no específica. Tras la incubación a 4°C durante 24 horas, se añade la proteína A y se agitan con vórtex los tubos, se incuban a temperatura ambiente durante 90 minutos, y se centrifugan a aproximadamente 2000 - 2500 X g a 4°C para precipitar los complejos de anticuerpo unido a antígeno marcado. Se elimina el sobrenadante mediante aspiración y se cuenta la radiactividad en el sedimento en un contador gamma. Se caracteriza adicionalmente la dilución de antisuero que se une a aproximadamente del 10 al 40% de la proteína marcada tras la sustracción de la unión no específica.

A continuación, se evalúa un intervalo de dilución (aproximadamente de 0,1 pg a 10 ng) de la proteína de angiostatina usada para el desarrollo del antisuero añadiendo cantidades conocidas de la proteína a los tubos que contienen el antisuero y la proteína radiomarcada. Tras un periodo de incubación adicional, por ejemplo, de 24 a 48 horas, se añade la proteína A y se centrifugan los tubos, se elimina el sobrenadante y se cuenta la radiactividad en el sedimento. El desplazamiento de la unión de la proteína de angiostatina radiomarcada por la proteína de angiostatina sin marcar (patrón) proporciona una curva patrón. Se añaden varias concentraciones de otros fragmentos de proteína de angiostatina, plasminógeno, angiostatina de diferentes especies, y proteínas homólogas a los tubos de ensayo para caracterizar la especificidad del antisuero frente a angiostatina.

Se preparan extractos de diversos tejidos, incluyendo pero sin limitarse a tumores primarios y secundarios, carcinoma pulmonar de Lewis, cultivos de células que producen angiostatina, placenta, útero y otros tejidos tales como

cerebro, hígado e intestino usando técnicas de extracción que se han empleado satisfactoriamente para extraer la angiostatina. Tras la liofilización o Speed Vac de los extractos tisulares, se añade tampón de ensayo y se colocan diferentes alícuotas en los tubos de RIA. Los extractos de células que producen angiostatina conocidas producen curvas de desplazamiento que son paralelas a la curva patrón, mientras que los extractos de tejidos que no producen angiostatina no desplazan la angiostatina radiomarcada del antisuero frente a angiostatina. Además, se añaden a los tubos de ensayo en cantidades crecientes extractos de orina, plasma y líquido céfalo-raquídeo de animales con carcinoma pulmonar de Lewis. Las curvas de desplazamiento paralelas indican la utilidad del ensayo de angiostatina para medir la angiostatina en tejidos y líquidos corporales.

Los extractos tisulares que contienen angiostatina se caracterizan adicionalmente sometiendo a las alícuotas a HPLC en fase inversa. Se recogen las fracciones de eluato, se secan en Speed Vac, se reconstituyen en tampón de RIA y se analizan en el RIA de angiostatina. La cantidad máxima de inmunoreactividad de angiostatina está localizada en las fracciones correspondientes a la posición de elución de angiostatina.

El kit de ensayo proporciona instrucciones, antisuero, angiostatina o proteína de angiostatina y angiostatina y/o reactivos posiblemente radiomarcados para la precipitación de complejos angiostatina - anticuerpo frente a angiostatina unidos. El kit es útil para la medición de la angiostatina en líquidos biológicos y extractos tisulares de animales y seres humanos con y sin tumores.

Se usa otro kit para la localización de la angiostatina en tejidos y células. Este kit de inmunohistoquímica de angiostatina proporciona instrucciones, antisuero frente a angiostatina y posiblemente suero de bloqueo y antisuero secundario unido a una molécula fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína, o a algún otro reactivo usado para visualizar el antisuero primario. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de inmunohistoquímica. Este kit de inmunohistoquímica de angiostatina permite la localización de angiostatina en secciones tisulares y células cultivadas usando microscopía tanto óptica como electrónica. Se usa para fines tanto de investigación como médicos. Por ejemplo, se realizan biopsias de tumores o se recogen y se cortan las secciones tisulares con un microtomo para examinar sitios de producción de angiostatina. Tal información es útil para fines de diagnóstico y posiblemente terapéuticos en la detección y tratamiento de cáncer. Otro método para visualizar sitios de biosíntesis de angiostatina implica el radiomarcado de ácidos nucleicos para su uso en hibridación *in situ* para tratar con sonda para determinar el ARN mensajero de angiostatina. De manera similar, puede localizarse, visualizarse y cuantificarse el receptor de angiostatina con técnicas inmunohistoquímicas.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse de ninguna manera como limitaciones de imposición al alcance de la misma.

Ejemplo 1

Elección de un sistema tumoral animal en el que se inhibe el crecimiento de la metástasis por el tumor primario y se acelera tras la eliminación del tumor primario

Examinando una variedad de tumores murinos que pueden inhibir su propia metástasis, se seleccionó un carcinoma pulmonar de Lewis en el que el tumor primario inhibía de la manera más eficaz la metástasis de pulmón. Se inyectaron ratones macho C57Bl6/J singénicos de seis semanas de edad (lomo subcutáneo) con 1×10^6 células tumorales. Los tumores visibles aparecieron por primera vez tras 3-4 días. Cuando los tumores tenían un tamaño de aproximadamente 1500 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Se extirpó completamente el tumor primario en el primer grupo y se dejó intacto en el segundo grupo tras una operación simulada. Aunque los tumores de desde 500 mm^3 hasta 3000 mm^3 inhibían el crecimiento de las metástasis, 1500 mm^3 fue el mayor tumor primario que pudo reseccionarse con una alta supervivencia y sin recurrencia local.

Tras 21 días, se sacrificaron todos los ratones y se les realizó la autopsia. En ratones con un tumor primario intacto, había cuatro +2 metástasis visibles, comparado con cincuenta +5 metástasis en los ratones en los que se había extirpado el tumor ($p < 0,0001$). Se confirmaron estos datos por el peso del pulmón, que se corresponde íntimamente con la carga tumoral, tal como se ha demostrado previamente. Se produjo un aumento de un 400% en el peso en húmedo del pulmón en los ratones a los que se había extirpado sus tumores comparado con los ratones en los que el tumor permanecía intacto ($p < 0,0001$).

Este modelo experimental proporcionó datos reproducibles y el experimento descrito es reproducible. Este tumor se marca como "carcinoma pulmonar de Lewis - poco metastásico" (LLC-Low). El tumor también suprimió las metástasis en un patrón prácticamente idéntico en ratones SCID, que tienen déficit de linfocitos tanto B como T.

Ejemplo 2

Aislamiento de una variante de tumor de carcinoma pulmonar de Lewis que es sumamente metastásico, se extirpe el tumor primario o no

De manera espontánea surgió una variante sumamente metastásica del carcinoma pulmonar de Lewis a partir de la línea celular de LLC-Low del ejemplo 1 en un grupo de ratones y se ha aislado según los métodos descritos en el ejemplo 1 y se ha transplantado repetidamente. Este tumor (LLC-High) forma más de 30 metástasis de pulmón visibles esté o no presente el tumor primario.

Ejemplo 3

Tamaño de las metástasis y tasa de proliferación de células tumorales en ella. Efecto del tumor primario que inhibe las metástasis (LLC-Low)

Se usaron ratones C57Bl6/J en todos los experimentos. Se inocularon ratones por vía subcutánea con células LLC-Low, y 14 días después se extirpó el tumor primario en la mitad de los ratones. Se sacrificaron los ratones los días 5, 10 y 15 después de que se había extirpado el tumor. Se obtuvieron secciones histológicas de metástasis de pulmón. Los ratones con un tumor primario intacto tenían micrometástasis en el pulmón que -lo estaban neovascularizadas. Estas metástasis se restringían a un diámetro de 12-15 capas celulares y no mostraron un aumento de tamaño significativo incluso 15 días después de la extirpación del tumor. Por el contrario, los animales de los que se extirpó el tumor primario, revelaron grandes metástasis vascularizadas tan pronto como a los 5 días tras la operación. Estas metástasis experimentaron un aumento de 4 veces adicional en volumen el día 15 tras extirpar el tumor (tal como se refleja por la histología y peso del pulmón). Aproximadamente el 50% de los animales a los que se había extirpado un tumor primario murieron de metástasis pulmonar antes del final del experimento. Todos los animales con un tumor primario intacto sobrevivieron hasta el final del experimento.

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

En la figura 3, el panel izquierdo muestra el índice de marcaje con BrdU de células tumorales en el pulmón en presencia o ausencia de un tumor primario. Antes de la tinción inmunohistoquímica, se permeabilizaron las secciones con HCl 0,2 M durante 10 minutos y se digirieron con proteinasa K 1 $\mu\text{g/ml}$ (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) en Tris-HCl 0,2 M, CaCl_2 2 mM a 37°C durante 15 minutos. Se estimó el índice de marcaje contando el porcentaje de núcleos positivos a una potencia de 250. El panel derecho de la figura 3 representa un análisis del peso del pulmón total de los tumores con tumores primarios intactos o extirpados 5, 10 y 15 días después de la operación. Se sacrificaron los animales 6 horas después de la inyección intraperitoneal de BrdU (0,75 mg/ratón).

Ejemplo 4

Inhibición de la angiogénesis en metástasis de pulmón en presencia de un tumor primario intacto

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

En análisis inmunohistoquímico para determinar la presencia de células endoteliales en metástasis de pulmón, una metástasis de pulmón con el tumor de pulmón primario intacto 19 días después de la inoculación, tenía un manguito de células tumorales alrededor de un microvaso preexistente en el pulmón. La metástasis se limitó a 8 a 12 capas celulares. No hubo evidencia de neovascularización alrededor del microvaso, y no contenía ningún microvaso nuevo. Esto fue típico del tamaño máximo de una metástasis preangiogénica avascular.

En un análisis inmunohistoquímico de tejido extraído cinco días tras la resección del tumor primario (19 días tras la inoculación del tumor primario), la metástasis rodeaba un vaso preexistente en el pulmón. Por el contrario, en la muestra en la que no se reseccionó el tumor primario, se neovascularizó el tumor. Por tanto, un tumor primario intacto inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares en la metástasis, pero la proliferación de células tumorales en una metástasis no está afectada por el tumor primario.

Ejemplo 5

Un tumor primario inhibe la angiogénesis de un segundo tumor implantado en la córnea del ratón. Se inhibe el crecimiento de este segundo tumor

Se implantó un tumor de pulmón de Lewis (LLC-Low) de 0,25 a 0,5 mm² en la córnea de un ratón el día 0. (Muthukkaruppan Vr., *et al.*, Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205:1416-1418, 1979) Se formó un tumor primario inoculando 1×10^6 células de LLC-Low por vía subcutánea en el lomo, o bien 4 ó 7 días antes del implante en la córnea; o bien el día del implante en la córnea; o bien 4 ó 7 días tras el implante en la córnea. Los ratones control recibieron el implante en la córnea pero no el tumor subcutáneo. Otros ratones control recibieron el implante en la córnea y una inoculación de células tumorales LLC-High en el lomo 4 días antes del implante en la córnea. Se evaluaron las córneas diariamente por estereomicroscopía para el estudio de la córnea (slit-lamp) para determinar el

crecimiento del tumor de la córnea (medido por un micrómetro ocular) y para determinar el crecimiento de nuevos vasos capilares desde el borde del limbo de la córnea.

En ratones control que no portaban un tumor subcutáneo primario, una gran parte de las córneas (6/8) desarrollaron neovascularización empezando del día 6 a los 7 días después de la implantación de la córnea y continuando hasta el día 10. El día 10, los tumores de la córnea vascularizados habían alcanzado aproximadamente un cuarto del volumen de todo el ojo. En presencia del tumor LLC-Low subcutáneo primario, los implantes en la córnea no se volvían vascularizados si el tumor primario estaba en su lugar durante al menos 4 días o más antes del implante en la córnea (tabla 1). En ausencia de neovascularización, los tumores de la córnea crecieron lentamente como discos delgados, blancos, avasculares en la córnea.

Sin embargo, si el tumor primario no se implantaba hasta 4 días después del implante en la córnea, las córneas se vascularizaban y 3/3 de los tumores de la córnea crecían a tasas similares que los controles que no portaban tumor. En presencia del tumor LLC-High subcutáneo primario, la mayoría de las córneas (2/3) desarrollaron neovascularización empezando el día 7 después de la implantación en la córnea y continuando hasta el día 10. El día 10, los tumores de la córnea vascularizados habían alcanzado de nuevo aproximadamente un cuarto del volumen de todo el ojo.

TABLA 1

20

25

30

35

40

45

50

55

60

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

65

Se esperaba que 0/10 córneas mostrasen neovascularización cuando el tumor subcutáneo LLC-Low primario se implantaba 7 días antes del implante tumoral en el ojo (es decir -7). Sin embargo, 2 de los tumores (2/10) se habían vuelto necróticos debido a que eran demasiado grandes ($> 3 \text{ cm}^3$).

Ejemplo 6

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

Aunque los experimento descritos en los ejemplos 4 y 5 muestran que un tumor primario inhibe la angiogénesis en una metástasis secundaria, estos estudios no revelan si el tumor primario: (i) inhibe la proliferación endotelial (o angiogénesis) directamente, o (ii) indirectamente regulando por disminución la actividad angiogénica de las células tumorales metastásicas. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se indujo un foco de angiogénesis subcutánea mediante un implante de matrigel que contenía factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). (Passaniti A, *et al.*, A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. Lab. Invest. 67:519, 1992).

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

La inhibición casi completa de la angiogénesis en este experimento sugiere que la presencia de un tumor primario pulmonar de Lewis puede inhibir directamente la angiogénesis inducida por bFGF.

Ejemplo 7

La transferencia de suero de un animal que porta tumor a un animal del que se ha extirpado el tumor primario inhibe las metástasis

Se implantaron ratones con carcinoma pulmonar de Lewis tal como se describió anteriormente. Tras 15 días, cuando los tumores eran de aproximadamente de 1500 mm³, se dividieron aleatoriamente los ratones en cuatro grupos. Tres grupos se sometieron a resección quirúrgica completa del tumor primario; en un grupo se dejaron los tumores en su sitio (tras un procedimiento de operación quirúrgica simulada). Entonces los ratones en los tres grupos de resección recibieron diariamente inyecciones intraperitoneales de solución salina, suero de ratones normales que no portaban tumor, o suero de ratones con carcinomas pulmonares de Lewis de 1500 mm³. El grupo de ratones con los tumores dejados intactos recibieron inyecciones de solución salina intraperitoneal. Se trataron todos los ratones durante 21 días, tras lo cual se sacrificaron los animales y se contaron las metástasis de pulmón (tabla 2).

TABLA 2

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

Se confirmaron estos resultados mediante el peso del pulmón. $P = < 0,0001$ para la diferencia entre los dos grupos [(55 & 50) vs. (7 & 3)]. Se han obtenido resultados similares usando angiostatina de la orina de animales que portan tumor.

5 Ejemplo 8

Ensayo de células endoteliales capilares bovinas (BCE)

10 Se usan células BCE entre los pasos 9 y 14 sólo. El día 0, se sembraron las células BCE sobre placas de 24 pocillos gelatinizadas (1,5% de gelatina en PBS a 37°, 10% de CO₂ durante 24 horas y después se aclararon con 0,5 ml de PBS) a una concentración de 12.500 células/pocillo. Los recuentos de células se realizaron usando un hemocitómetro. Las células se sembraron en 500 µl de DMEM con suero de ternera bovino al 10% inactivado por calor (56°C durante 20 minutos) y glutamine-pen-strep (combinación de glutamina, penicilina y estreptomycin) (GPS) al 1%.

15 Se expusieron las células BCE tal como sigue: se elimina el medio y se sustituye con 250 µl de DMEM/BCS al 5%/GPS al 1%. Entonces se añade a los pocillos la muestra que va a someterse a prueba. (La cantidad varía dependiendo de la muestra que se está sometiendo a prueba). Las placas se colocan a 37°C/10% de CO₂ durante aproximadamente 10 minutos. Se añadieron 250 µl de DMEM/BCS al 5%/GPS al 1% con bFGF 2 ng/ml a cada pocillo. El medio final son 500 µl de DMEM/BCS al 5%/GPS 1%/con bFGF 1 ng/ml. Se devuelve la placa al incubador
20 a 37°C/10% de CO₂ durante 72 horas.

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

Ejemplo 9

30 *El suero de ratones que portan el tumor de pulmón de Lewis poco metastásico (LLC-Low) inhibe la proliferación de células endoteliales capilares in vitro*

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

40 El suero que portaba tumor también inhibía las células endoteliales aórticas bovinas y células endoteliales derivadas de un hemangioendotelioma de ratón espontáneo, (Obeso, et al., "Methods in Laboratory Investigation, A Hemangioendothelioma derived cell line; Its use as a Model for the Study of Endothelial Cell Biology", Lab Invest., 63(2), páginas 259-269, 1990) pero no inhibió las células de tumor de pulmón de Lewis, fibroblastos 3T3, células del músculo liso aórtico, epitelio del pulmón de visón, o fibroblastos de pulmón fetal humano W 138.

45 Ejemplo 10

El suero de ratones que portan el tumor de pulmón de Lewis (LLC-High) que no inhibe la metástasis, no inhibe la proliferación de células endoteliales capilares in vitro

50 El suero de ratones que portan un tumor primario del LLC-High no inhibía significativamente la proliferación de células endoteliales capilares bovinas estimuladas por bFGF con respecto a los controles. Además, cuando se sometió este suero a las dos primeras etapas de purificación (cromatografía en heparina-Sepharose y filtración en gel), no se halló actividad de angiostatina en ninguna fracción.

55 Ejemplo 11

La ascitis del carcinoma pulmonar de Lewis (poco metastásico), también genera suero de angiostatina

60 Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de células tumorales o bien LLC-Low o bien LLC-High (10⁶), y una semana más tarde, se obtuvieron 1-2 ml de ascitis hemorrágica de cada uno de los 10-20 ratones. Se observó la siembra de tumor mesentérico. Entonces se sacrificaron los ratones. Se obtuvo suero mediante punción cardíaca. También se obtuvo suero de ratones normales, que no portaban tumor como un control. Se centrifugaron el suero y ascitis para eliminar células, y se sometió a ensayo en sobrenadante en células endoteliales capilares bovinas estimuladas por bFGF (1 ng/ml) (véase el ejemplo 8). La ascitis que se originó a partir de ambos tipos de tumores estimuló una
65 proliferación significativa de células endoteliales capilares (por ejemplo, proliferación del 100%) sobre los controles tras 72 horas (figura 6). Por el contrario, el suero de ratones poco metastásicos inhibió la proliferación celular endotelial (inhibición hasta el 79% de los; controles). El suero de la línea muy metastásica era estimulador en un 200%.

Estos datos muestran que la ascitis de la línea poco metastásica contiene una predominancia de estimulador de crecimiento endotelial sobre angiostatina. Este estado es análogo a un tumor primario sólido. Además, la actividad de angiostatina aparece en el suero, como si no estuviera opuesta a la actividad estimuladora. Este patrón es similar al del tumor primario sólido (LLC-Low). La ascitis de tumor muy metastásico (LLC-High) también parece 5 contener una predominancia de estimulador de células endoteliales, pero no puede identificarse la angiostatina en el suero.

Ejemplo 12

La separación de angiostatina del suero mediante cromatografía en columna y análisis de fracciones inhibidoras de crecimiento mediante SDS-PAGE

Para purificar la(s) angiostatina(s), se combinó suero de ratones que portaban tumor. La actividad inhibidora, sometida a ensayo según el ensayo de actividad inhibidora *in vitro* descrito anteriormente, se trató mediante cromatografía 15 de manera secuencial usando heparina-Sepharose, Biogel de agarosa A0.5 mm, y varios ciclos de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa C4 (HPLC). La SDS-PAGE de la fracción de HPLC que contenía actividad inhibidora endotelial, reveló una banda discreta de M_r reducida aparente de 38.000 Daltons, que se purificó aproximadamente 1 millón de veces (véase la tabla 3) hasta una actividad específica de aproximadamente 2×10^7 . En diferentes 20 fases de la purificación, se sometieron a prueba las fracciones combinadas con anticuerpos específicos para determinar la presencia de inhibidores endoteliales conocidos. No se encontraron factor-4 de plaquetas, trombospondina, ni factor de crecimiento transformante beta, en las fracciones purificadas o parcialmente purificadas.

TABLA 3

Actividad específica (unidades*/mg)		Número de veces de purificación
Suero	1,69	1
Heparina Sepharose	14,92	8,8
Bio-gel AO.5 m	69,96	41,4
HPLC/C4	2×10^7	$1,2 \times 10^6$
*Una unidad de actividad es la cantidad de suero que contiene angiostatina que puede producir la mitad de la inhibición máxima de la proliferación endotelial capilar cuando se incuban las células endoteliales en bFGF 1 ng/ml durante 72 horas.		

Ejemplo 13

Separación de angiostatina de la orina mediante cromatografía en columna y análisis de las fracciones inhibidoras del crecimiento mediante SDS-PAGE

La purificación del/de los inhibidor(es) de células endoteliales del suero se ve impedida por el pequeño volumen de suero que puede obtenerse de cada ratón y por la gran cantidad de proteína en el suero. 55

Se analizó la orina de ratones que portaban tumor y se encontró que contenía un inhibidor de la proliferación celular endotelial que está ausente de la orina de ratones que no portan tumor y de ratones con tumores LLC-high. Se llevó a cabo la purificación de la actividad inhibidora celular endotelial mediante la misma estrategia que se empleó 60 para la purificación de suero (descrita anteriormente) (figura 7).

La figura 7 muestra cromatografía en fase inversa C4 de suero parcialmente purificado u orina de animales que portan tumor. Se sometieron a ensayo todas las fracciones en células endoteliales capilares bovinas con bFGF en un ensayo de proliferación de 72 horas tal como se describió en el ejemplo 8. Se observó un pico de inhibición discreto en ambos casos eluyendo al 30-35% de acetonitrilo en la fracción 23. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de la fracción inhibidora del tercer ciclo de cromatografía en fase inversa C4 de suero de animales que portan tumor 65 mostró una única banda a aproximadamente 38.000 Daltons.

Ejemplo 14

Caracterización de angiostatina en circulación

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

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

15 Ejemplo 15

Purificación de fragmentos inhibidores a partir de plasminógeno humano

- 20 Se obtuvo el sitio I de unión a lisina del plasminógeno de Sigma Chemical Company. La preparación es plasminógeno humano purificado tras la digestión con elastasa. El sitio I de unión a lisina obtenido de esta manera es una población de proteínas que contiene, en estado agregado, al menos las tres primeras estructuras de triple bucle (números 1 a 3) en la cadena de plasmina A (Kringel 1+2+3). (Sottrup-Jensen, L., *et al.* in Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3, 191, Davidson, J. F., *et al.* eds. Rayen Press, Nueva York 1978 y Wiman, B., *et al.*, Biochemica et Biophysica Acta, 579, 142 (1979)). Se resuspendió el sitio I de unión a lisina del plasminógeno (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) en agua y se aplicó a una columna de fase inversa C4 que se había equilibrado con agua de calidad para HPLC/TFA al 0,1%. Se eluyó la columna con un gradiente de agua/TFA al 0,1% frente a acetonitrilo/TFA al 0,1% y se recogieron las fracciones en tubos de polipropileno. Se evaporó una alícuota de cada uno en un evaporador centrífugo (speed vac), se resuspendió con agua, y se aplicó a BCE en un ensayo de proliferación.
- 30 Se repitió este procedimiento dos veces para las fracciones inhibidoras usando un gradiente similar para la elución. La actividad inhibidora eluyó al 30-35% de acetonitrilo en la operación final de la columna C4. La SDS-PAGE de la fracción inhibidora reveló 3 bandas discretas de masa molecular reducida aparente de 40, 42,5 y 45 kd. La SDS-PAGE en condiciones no reductoras reveló tres bandas de masa molecular 30, 32,5 y 35 kd respectivamente.

35 Ejemplo 16

Extracción de actividad inhibidora a partir de SDS-PAGE

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

Ejemplo 17

50 *Estudios de tratamiento de fragmento de plasminógeno*

- Se implantaron a los ratones carcinomas pulmonares de Lewis y se sometieron a resecciones cuando los tumores eran de 1500-2000 mm³. El día de la operación, se dividieron aleatoriamente los ratones en 6 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales diarias con los tres fragmentos inhibidores purificados de plasminógeno humano, plasminógeno humano completo, orina de animales que portan tumor, orina de ratones normales, o solución salina. Se trató un grupo de animales que portaban tumor que sólo tenían un procedimiento simulado con inyecciones de solución salina. Inmediatamente después de la extirpación del tumor primario, los ratones reciben una inyección intraperitoneal de 24 µg (1,2 mg/kg/día/ratón) de los fragmentos de plasminógeno inhibidores como una dosis de carga. Entonces recibieron una inyección intraperitoneal diaria de 12 µg del fragmento inhibidor (0,6 mg/kg/día/ratón) durante la duración del experimento. Los ratones control reciben la misma dosis de molécula de plasminógeno completa tras la extirpación del tumor. Para los tratamientos de orina, la orina de ratones normales o que portaban tumor se filtró, se sometió a diálisis de manera extensiva, se liofilizó y después se resuspendió en agua estéril para obtener una concentración de 250 veces. Se administró a los ratones 0,8 ml del concentrado de orina dializado, o bien de ratones que portaban tumor o bien de ratones normales, en dos inyecciones intraperitoneales el día de la extirpación del tumor primario como una dosis de carga. Entonces recibieron inyecciones intraperitoneales diarias de 0,4 ml de la orina sometida a diálisis y concentrada durante el transcurso del experimento. Los tratamientos continuaron durante 13 días, momento en el que se sacrificaron todos los ratones y se les realizó la autopsia.

En las figuras 8 y 9 se muestran los resultados del experimento. La figura 8 muestra, metástasis pulmonares superficiales tras el tratamiento de 13 días. Las metástasis pulmonares superficiales se refieren al número de metástasis observado en los pulmones de los ratones en la autopsia. Se usó un esteromicroscopio para contar las metástasis. La figura 8 muestra el número medio de metástasis pulmonares superficiales que se contó y el error estándar de la media. Tal como se muestra, el grupo de ratones con el tumor primario presente no mostraron metástasis. Los ratones, en los que se reseccionó el tumor primario y se trataron con solución salina, mostraron metástasis extensa. Los ratones tratados con el fragmento de plasminógeno derivado de humano no mostraron metástasis. Los ratones tratados con plasminógeno completo mostraron metástasis extensa lo que indica que la molécula de plasminógeno completa no tiene actividad inhibidora endotelial. Aquellos ratones tratados con orina sometida a diálisis y concentrada de ratones que portaban tumor no mostraron metástasis. Los ratones tratados con orina concentrada de ratones normales mostraron metástasis extensa. Cuando se midió el peso del pulmón, se obtuvieron resultados similares (figura 9).

Ejemplo 18

15 *Secuencia de aminoácidos de angiostatina humana y murina*

Se determinó la secuencia de aminoácidos de angiostatina aislada de orina de ratón y angiostatina aislada de la preparación del fragmento del sitio I de unión a lisina humana en un secuenciador de proteínas de Applied Biosystem modelo 477A. Se identificaron las fracciones de aminoácido feniltiohidantoína con un HPLC ABI modelo 120A en línea. La secuencia de aminoácidos determinada a partir de la secuencia N-terminal y los digestos tripticos de la angiostatina humana y murina indican que la secuencia de la angiostatina es similar a la secuencia que empieza en el aminoácido número 98 del plasminógeno murino. Por tanto, la secuencia de aminoácidos de la angiostatina es una molécula que comprende una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kilodaltons y 45 kilodaltons tal como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la del fragmento de plasminógeno murino que empieza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacto. En la figura 1 se muestra la secuencia de aminoácidos inicial de la angiostatina murina (SEQ ID NO: 2). La longitud de la secuencia de aminoácidos puede ser ligeramente más larga o más corta que la mostrada en la figura 1.

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

Ejemplo 19

40 *Expresión de angiostatina humana en E. coli*

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

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

Se seleccionaron colonias de expresión de la siguiente manera. Los aislados de colonias (colony lifts) de *E. coli* transformados con el gen que codifica para angiostatina se hicieron crecer en filtros de nitrocelulosa impregnados con IPTG y se recubrieron en una placa de agar LB. Tras la inducción con IPTG de la expresión, se lisaron las colonias sobre filtros de nitrocelulosa. Se bloquearon, se aclararon y se trataron con sonda los aislados de nitrocelulosa con dos anticuerpos monoclonales separados (AcM Dcd y Vap; donación de S. G. Mc Cance y F. J. Castellino, Universidad de Notre Dame) que reconocen conformaciones específicas de angiostatina. Se seleccionaron colonias fuertemente de expresión por los AcM.

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

De éstos, se seleccionó el clon pTrcHisA/HAsH4. La inducción con IPTG fue durante 4 horas tras las cuales se recogió el sedimento celular y se resuspendió en Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, glicerol al 5% y lisozima 200 mg/ml y se agitó durante 30 min. a 4°C. Se centrifugó la suspensión a 14.000 rpm durante 25 min. y se resuspendió el sedimento en Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, glicerol al 5% y DOC al 0,1%. Se agitó esta suspensión durante 1 h. a 4°C, y entonces se centrifugó a 14.000 rpm durante 25 min. La fracción de sobrenadante en esta etapa contiene angiostatina expresada. Se encontró que la angiostatina humana expresada por *E. coli* posee la propiedad física de la angiostatina nativa, que es la capacidad para unirse a la lisina. Por tanto la angiostatina expresada por *E. coli* se purificó sobre una columna de lisina-sepharose (Pharmacia o Sigma) en una etapa única. La elución de angiostatina desde la columna fue con ácido epsilon-amino-n-caproico 0,2 M pH 7,5.

Posterior a estos experimentos, se realizó un aumento de escala a 10 l de lotes de fermentación del clon pTrcHisA/HAsH4. Las células obtenidas de esta inducción con aumento de escala se sedimentaron y se resuspendieron en Tris 50 mM pH 7,5, se rompieron a 10.000 psi enfriando tres veces a 10°C entre pases. Se clarificó el lisado obtenido mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C, y se aisló la angiostatina expresada sobre lisina-sepharose (figura 11).

Se sometió a diálisis de manera exhaustiva la angiostatina humana expresada por *E. coli* purificada frente a agua y se liofilizó. La angiostatina humana expresada se resuspendió en medio (DMEM, BCS al 5%, gentamicina/penicilina/estreptomicina al 1%) hasta una concentración estimada de 3 µg/ml, y se usó en ensayos celulares endoteliales capilares bovinos (BCE) *in vitro*, tal como se describe en el ejemplo 8, página 39. De manera similar, se trató el clon control que contenía sólo el vector de manera idéntica al clon pTrcHisA/HAsH4. Se indujo con IPTG de manera idéntica, y se usó el lisado bacteriano para unir a lisina, se eluyó con ácido aminocaproico 0,2 M, se sometió a diálisis de manera exhaustiva y se liofilizó. Esta preparación control también se resuspendió en medio a una concentración estimada de 3 µg/ml. Se obtuvieron las muestras de angiostatina recombinante y se obtuvieron controles a partir de lotes de inducción y fermentación diferentes así como de series de purificación separadas, y se codificaron todas en EntreMed, Maryland. Se realizaron ensayos de BCE con estas muestras codificadas de una manera ciega en el hospital infantil (Children's Hospital), Boston.

Los resultados de los ensayos de BCE de angiostatina humana recombinante mostraron que la angiostatina humana expresada en *E. coli* inhibía la proliferación de células BCE debido a bFGF (usado a 1 ng/ml) (figura 12). Se usó la angiostatina recombinante de reserva en medio (a aproximadamente 3 µg/ml) a una dilución de 1:5, 1:10 y 1:20. Se calculó al porcentaje de inhibición tal como sigue:

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

El porcentaje de inhibición de la proliferación de células BCE era comparable o superior al de la angiostatina derivada de plasminógeno a concentraciones similares. En la figura 13 se representan los resultados de una serie repetida del ensayo de BCE, en el que a una dilución 1:5 de la angiostatina recombinante de reserva dieron porcentajes de inhibición similares a los obtenidos con angiostatina derivada de plasminógeno. La figura 13 muestra el resultado sorprendente de que la proteína de angiostatina recombinante humana inhibe más del 60%, y tanto como más del 75% de la proliferación de BCE en cultivo.

Ejemplo 20

La angiostatina mantiene la inactividad de la micrometástasis aumentando la tasa de apoptosis

Tras la inoculación subcutánea de ratones C57 BL6/J con células de carcinoma pulmonar de Lewis (1 x 10⁶), se desarrollaron tumores primarios de aproximadamente 1,5 cm³. Se sometieron los animales o bien a la extirpación quirúrgica del tumor primario o bien a cirugía simulada. Los días 5, 10 y 15 tras la cirugía, se sacrificaron los ratones y se prepararon sus pulmones para un examen histológico. Los animales con tumores primarios reseccionados mostraron una proliferación masiva de micrometástasis comparados con los controles de operación simulada (figura 14). Se acompañaron estos cambios por un aumento significativo en el peso del pulmón.

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

Se obtuvo evidencia de apoyo tratando ratones con tumores primarios extirpados con un supresor exógeno de la angiogénesis. Esta sustancia, TNP-1470 (O-cloroacetilcarbamoilfumagilol, anteriormente llamada AGM-1470) es un análogo de fumagilina con actividad anti-angiogénica notificada. La inyección subcutánea de TNP-1470 (30 mg/kg

cada dos días) produjo resultados que fueron sorprendentemente similares a Los descritos anteriormente para animales que tenían tumores primarios intactos. Estos animales mostraron un peso de pulmón inferior, índice proliferativo equivalente y un aumento del índice apoptótico comparado con controles inyectados con solución salina (figura 16).

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

Ejemplo 21

Tratamiento de tumores primarios con angiostatina in vivo

Se purificó la angiostatina a partir de plasminógeno humano mediante digestión de elastasa limitada tal como se describió en el ejemplo 15 anterior. Se resuspendió la angiostatina en la solución salina tamponada con fosfato para la administración en ratones C57Bl6/J macho de seis semanas de edad. Se implantaron por vía subcutánea a los animales 1×10^6 células tumorales o bien de carcinoma pulmonar de Lewis o bien fibrosarcoma T241. El tratamiento con angiostatina se empezó tras cuatro días cuando los tumores tenían un tamaño de 80-160 mm³. Los ratones recibieron inyecciones de angiostatina o bien en una inyección única de 40 mg/kg o bien dos de inyecciones de 80 mg/kg por vía intraperitoneal (ip) o vía subcutánea (sc). Se sacrificaron los animales en diversos momentos tras extenderse el tratamiento hasta 19 días.

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

El tratamiento con angiostatina (dosis total de 80 mg/kg/día, administrado dos veces al día a 40 mg/kg ip o sc) también redujo significativamente la tasa de crecimiento de tumores primarios LLC-LM (figura 17). Este efecto inhibidor fue evidente a los 4 días y aumentó su magnitud en todos los momentos posteriores examinados. El último día del experimento (día 19), los ratones tratados con angiostatina tenían un volumen tumoral medio que era sólo el 20% de los controles inyectados con solución salina que era significativamente diferente ($p < 0,001$ prueba de la t de Student).

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

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

Ejemplo 22

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

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

Ejemplo 23

Terapia génica - Efecto de la transfección del gen de angiostatina sobre el volumen tumoral

5 Se generó usando PCR una secuencia de ADN de 1380 pares de bases para angiostatina derivada de ADNc de plasminógeno de ratón (obtenida de la colección americana de cultivos tipo (ATCC)), que codifica para los aminoácidos 1-460 de plasminógeno de ratón, y se insertó en un vector de expresión. Se transfectó el vector de expresión en células de fibrosarcoma T241 y se implantaron las células transfectadas en ratones. Los ratones control recibieron o bien células T241 no transfectadas, o bien células T241 transfectadas sólo con el vector (es decir células transfectadas que no expresan angiostatina). Se usaron tres clones de células transfectadas que expresan angiostatina en el experimento. Se determinó el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo. Los resultados muestran la reducción sorprendente y drástica en el volumen tumoral medio en ratones para los clones de células que expresan angiostatina comparado con las células control que no expresan y que no están transfectadas.

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

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

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

1. Se hacen crecer células T241 en placas de cultivo de tejido de 60 cm², siembra = 1-2 x 10⁵ células en 2 ml del medio de crecimiento apropiado complementado con suero.

30 2. Incubar las células a 37°C en un incubador de CO₂ hasta que las células sean confluentes en un 40-70%. Normalmente tardará de 18-24 h, pero el tiempo variará entre los tipos de células. La confluencia de las células tumorales T241 fue de aproximadamente del 70%.

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

35 Disolución A: Para cada transfección, diluir 5 µg de ADN en 100 µl de medio sérico reducido OPTI-MEM I libre de suero (disponible de Life Technologies) (también puede usarse agua desionizada de calidad para cultivo tisular).

40 Disolución B: Para cada transfección, diluir 30 µg de LIPOFECTIN en 100 µl de medio OPTI-MEM.

4. Combinar las dos disoluciones, mezclarlas suavemente e incubarlas a temperatura ambiente durante 10-15 min.

5. Lavar dos veces las células con medio libre de suero.

45 6. Para cada transfección, añadir 0,8 ml de medio libre de suero a cada tubo que contiene los complejos reactivo LIPOFECTIN™-ADN. Mezclar suavemente y recubrir el complejo sobre las células.

7. Incubar las células durante aproximadamente 12 h a 37°C en un incubador de CO₂.

50 8. Sustituir el medio que contiene ADN con de medio selección 1 mg/ml que contiene suero e incubar las células a 37°C en un incubador de CO₂ durante un total de 48-72 h.

9. Someter a ensayo los extractos celulares para determinar la actividad génica a las 48-72 h tras la transfección.

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

60 De manera interesante, el crecimiento celular *in vitro* de células T241 y células pulmonares de Lewis transfectadas con angiostatina no se inhibió o se vio afectado de manera adversa, tal como se muestra en las figuras 25 y 26.

65 La figura 27 representa los resultados del experimento de transfección. Los tres clones transfectados T241 que expresan angiostatina produjeron volúmenes tumorales medios en ratones que se redujeron sustancialmente con respecto al volumen tumoral en ratones control. El volumen tumoral medio de los ratones a los que se implantó el clon 37 era sólo el 13% del control, mientras que los volúmenes tumorales del clon 31 y clon 25 eran sólo el 21% y el 34% de los volúmenes tumorales control, respectivamente. Estos resultados demuestran que las secuencias de ADN que

codifican para angiostatina pueden transfectarse en células, que las secuencias de ADN transfectadas pueden expresar proteína de angiostatina mediante células implantadas, y que la angiostatina expresada funciona *in vivo* para reducir el crecimiento tumoral.

5 Ejemplo 24

Localización del sitio de expresión de angiostatina in vivo

Para localizar el sitio de expresión de la proteína de angiostatina *in vivo*, se analizó el ARN total de diversos tipos de células, células de carcinoma pulmonar de Lewis (ratón), fibrosarcoma T241 (ratón), y células de linfoma de Burkitt (ser humano), o bien de un tumor nuevo o bien de un cultivo celular tras varios pasos para determinar la presencia de transcritos de angiostatina. El análisis de tipo Northern de las muestras mostró una ausencia de cualquier hibridación de señal con la secuencia thn de todas las muestras excepto la del ARN de hígado de ratón que mostraba una señal única de aproximadamente 2,4 kb correspondiente a plasminógeno de ratón. El análisis de tipo Northern de muestras humanas muestra una ausencia de cualquier hibridación de señal con secuencia de angiostatina humana de todas las muestras excepto la del ARN de hígado humano normal que muestra una señal única de aproximadamente 2,4 kb correspondiente a plasminógeno humano.

El análisis de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) mostró una ausencia de cualquier producto de todas las muestras tratadas con sonda con secuencias de angiostatina de ratón excepto la del hígado de ratón normal. El análisis de RT-PCR mostró una ausencia de cualquier producto de todas las muestras humanas tratadas con sonda con secuencias de angiostatina humanas excepto la del hígado normal humano (tamaño esperado de 1050 pb para ratón y 1134 pb para el ser humano).

Por tanto, parece que los transcritos de angiostatina de ratón (suponiendo identidad con los aminoácidos 97 a 450 de plasminógeno de ratón) no se producen por todas las muestras de ratón anteriores y los transcritos de angiostatina humana (suponiendo identidad con los aminoácidos 93 a 470 de plasminógeno humano) no se producen por las muestras humanas anteriores. Las señales positivas obtenidas en el hígado de ratón/de ser humano normal provienen de la hibridación con el plasminógeno.

30 Ejemplo 25

Expresión de angiostatina en levadura

Se clonó el fragmento génico que codifica para los aminoácidos 93 a 470 de plasminógeno humano en el sitio XhoI/EcoRI de pHIL-SI (Invitrogen) que permite la expresión secretada de proteínas usando la señal de secreción PHO1 en la levadura *Pichia pastoris*. De manera similar, se clonó el fragmento génico que codifica para los aminoácidos 93 a 470 de plasminógeno humano en el sitio SnaBI/EcoRI de pPIC9 (Invitrogen) que permite la expresión secretada de proteínas usando la señal de secreción factor-a en la levadura *Pichia pastoris*. Las proteínas de angiostatina humanas expresadas en estos sistemas tendrán muchas ventajas sobre las expresadas en *E. coli* tal como procesamiento de proteína, plegamiento de proteína y modificación post-traducciona que incluye la glicosilación.

La expresión de gen en *P. pastoris*: se describe en Sreekrishna, K. *et al.* (1988) High level expression of heterologous proteins in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. J. Basic Microbiol. 29 (4): 265-278, y Clare, J. J. *et al.* (1991) Production of epidermal growth factor in yeast: High-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies, Gene 105:205-212, ambas incorporadas al presente documento como referencia.

50 Ejemplo 26

Expresión de proteínas de angiostatina en plantas y animales transgénicos

Se crean animales transgénicos tales como los de la familia bovina o porcina que expresan el transcrito génico de angiostatina El animal transgénico expresa la proteína de angiostatina por ejemplo en la leche de estos animales. Adicionalmente se construyen plantas transgénicas comestibles que expresan el transcrito génico de angiostatina.

La construcción de animales transgénicos que expresan ADN foráneo se describe en Smith H. Phytochrome transgenics: functional, ecological and biotechnical applications, Semin. Cell. Biol. 1994 5(5):315-325, que se incorpora al presente documento como referencia.

60 Ejemplo 27

Caracterización de fragmentos de angiostatina que inhiben la proliferación celular entotelial

El siguiente ejemplo caracteriza la actividad de fragmentos de angiostatina individuales y en combinación. Los datos sugieren que existe una diferencia funcional entre estructuras kringle individuales y puede obtenerse una potente actividad anti-endotelial y, por tanto anti-angiogénica, a partir de tales fragmentos proteicos de angiostatina.

ES 2 292 174 T3

Tal como se usa en el presente documento, “fragmento de angiostatina” significa un derivado proteico de angiostatina, o plasminógeno, que tiene una actividad de inhibición de la proliferación celular endotelial. Los fragmentos de angiostatina son útiles para tratar estados o enfermedades mediados por angiogénesis. Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de angiostatina para inhibir o suprimir el crecimiento tumoral. Las secuencias de aminoácidos de tal fragmento de angiostatina, por ejemplo, pueden seleccionarse de una parte del plasminógeno murino (SEQ ID NO: 1), angiostatina murina (SEQ ID NO: 2); angiostatina humana (SEQ ID NO: 3), angiostatina de mono Rhesus (SEQ ID NO: 4), angiostatina porcina (SEQ ID NO: 5) y angiostatina bovina (SEQ ID NO: 6), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa.

Tal como se usa en el presente documento, “kringle 1” significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 1, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a la de kringle 1 murino (SEQ ID NO: 7), kringle 1 humano (SEQ ID NO: 8), kringle 1 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 9), kringle 1 porcino (SEQ ID NO: 10), y kringle 1 bovino (SEQ ID NO: 11), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 1 murino (SEQ ID NO: 7) corresponde a las posiciones de aminoácidos 103 a 181 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1, y corresponde a las posiciones de aminoácidos 6 a 84 (inclusive) de la angiostatina murina de SEQ ID NO: 2. Kringle 1 humano (SEQ ID NO: 8), kringle 1 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 9), kringle 1 porcino (SEQ ID NO: 10) y kringle 1 bovino (SEQ ID NO: 11) corresponden a las posiciones de aminoácidos 6 a 84 (inclusive) de angiostatina de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, “kringle 2” significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 2, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a, la de kringle 2 murino (SEQ ID NO: 12), kringle 2 humano (SEQ ID NO: 13), kringle 2 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 14), kringle 2 porcino (SEQ ID NO: 15) y kringle 2 bovino (SEQ ID NO: 16), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 2 murino (SEQ ID NO: 12) corresponde a las posiciones de aminoácidos 185 a 262 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1, y corresponde a las posiciones de aminoácidos 88 a 165 (inclusive) de la angiostatina murina de SEQ ID NO: 2. Kringle 2 humano (SEQ ID NO: 13), kringle 2 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 14), kringle 2 porcino (SEQ ID NO: 15) y kringle 2 bovino (SEQ ID NO: 16) corresponden a las posiciones de aminoácidos 88 a 165 (inclusive) de angiostatina de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, “kringle 3” significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 3, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a, la de kringle 3 murino (SEQ ID NO: 17), kringle 3 humano (SEQ ID NO: 18), Kringle 3 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 19), kringle 3 porcino (SEQ ID NO: 20) y kringle 3 bovino (SEQ ID NO: 21). Kringle 3 murino (SEQ ID NO: 17) corresponde a las posiciones de aminoácidos 275 a 352 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1, y corresponde a las posiciones de aminoácidos 178 a 255 (inclusive) de la angiostatina murina de SEQ ID NO: 2. Kringle 3 humano (SEQ ID NO: 18), kringle 3 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 19), kringle 3 porcino (SEQ ID NO: 20) y kringle 3 bovino (SEQ ID NO: 21) corresponden a las posiciones de aminoácidos 178 a 255 (inclusive) de la angiostatina de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, “kringle 4” significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 4, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a, la de kringle 4 murino (SEQ ID NO: 22) y kringle 4 humano (SEQ ID NO: 23), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 4 murino (SEQ ID NO: 22) corresponde a las posiciones de aminoácidos 377 a 454 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1.

Tal como se usa en el presente documento, “kringle 2-3” significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 2-3, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a la de kringle 2-3 murino (SEQ ID NO: 24), kringle 2-3 humano (SEQ ID NO: 25), kringle 2-3 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 26), kringle 2-3 porcino (SEQ ID NO: 27) y kringle 2-3 bovino (SEQ ID NO: 28), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 2-3 murino (SEQ ID NO: 24) corresponde a las posiciones de aminoácidos 185 a 352 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1, y corresponde a las posiciones de aminoácidos 88 a 255 (inclusive) de la angiostatina murina de SEQ ID NO: 2. Kringle 2-3 humano (SEQ ID NO: 25), kringle 2-3 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 26), kringle 2-3 porcino (SEQ ID NO: 27) y kringle 2-3 bovino (SEQ ID NO: 28) corresponden a las posiciones de aminoácidos 88 a 255 (inclusive) de la angiostatina de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, “kringle 1-3” significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 1-3, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a, la de kringle 1-3 murino (SEQ ID NO: 29), kringle 1 humano (SEQ ID NO: 30), kringle 1-3 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 31), kringle 1-3 porcino (SEQ ID NO: 32) y kringle 1-3 bovino (SEQ ID NO: 33), a menos que se indique otra cosa por

el contexto en el que se usa. Kringle 1-3 murino (SEQ ID NO: 29) corresponde a las posiciones de aminoácidos 103 a 352 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1, y corresponde a las posiciones de aminoácidos 6 a 255 (inclusive) de la angiostatina murina de SEQ ID NO: 2. Kringle 1-3 humano (SEQ ID NO: 30), kringle 1-3 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 31), kringle 1-3 porcino (SEQ ID NO: 32) y kringle 1-3 bovino (SEQ ID NO: 33) corresponden a las posiciones de aminoácidos 6 a 255 (inclusive) de la angiostatina de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, "kringle 1-2" significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 1-2, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a, la de kringle 1-2 murino (SEQ ID NO: 34), kringle 1-2 humano (SEQ ID NO: 35), kringle 1-2 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 36), kringle 1-2 porcino (SEQ ID NO: 37) y kringle 1-2 bovino (SEQ ID NO: 38), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 1-2 murino (SEQ ID NO: 34) corresponde a las posiciones de aminoácidos 103 a 262 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1, y corresponde a las posiciones de aminoácidos 6 a 165 (inclusive) de la angiostatina murina de SEQ ID NO: 2. Kringle 1-2 humano (SEQ ID NO: 35), kringle 1-2 de mono Rhesus (SEQ ID NO: 36), kringle 1-2 porcino (SEQ ID NO: 37) y kringle 1-2 bovino (SEQ ID NO: 38) corresponden a las posiciones de aminoácidos 6 a 165 (inclusive) de la angiostatina de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, "kringle 1-4" significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene una actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 1-4, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a, la de kringle 1-4 murino (SEQ ID NO: 39) y kringle 1-4 humano (SEQ ID NO: 40), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 1-4 murino (SEQ ID NO: 39) corresponde a las posiciones de aminoácidos 103 a 454 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1.

Las secuencias de aminoácidos de kringle 1, kringle 2, kringle 3, kringle 4, kringle 2-3, kringle 1-3, kringle 1-2 y kringle 1-4, son homólogas, respectivamente, a las secuencias de kringle específicas identificadas anteriormente. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos tienen un grado de homología con las secuencias dadas a conocer de al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70% y más preferiblemente al menos el 80%. Debe entenderse que pueden realizarse una variedad de sustituciones, adiciones, delecciones u otras modificaciones de aminoácidos a los fragmentos enumerados anteriormente para mejorar o modificar la actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de la proliferación celular endotelial de los fragmentos de angiostatina. El término "homólogo funcional" significa que pueden usarse secuencias alteradas según la invención que incluye delecciones, adiciones o sustituciones de diferentes residuos, dando como resultado una secuencia que codifica para el mismo producto génico o uno funcionalmente equivalente. El propio producto génico puede contener delecciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos dentro de una secuencia de angiostatina, lo que da como resultado un cambio silencioso, produciendo así una proteína de angiostatina funcionalmente equivalente. Tales sustituciones de aminoácidos pueden realizarse partiendo de la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliencia y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina, histidina y arginina; los aminoácidos con grupos de cabezas polares no cargados que tienen valores de hidrofiliencia similares incluyen los siguientes: glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina; y los aminoácidos con grupos de cabezas no polares incluyen alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, metionina, triptófano. Tales modificaciones no pretenden exceder el alcance y el espíritu de las reivindicaciones. Por ejemplo, para evitar la homodimerización mediante la formación puentes disulfuro entre kringles, se mutaron los residuos de cisteína C4 en kringle 2 humano recombinante (SEQ ID NO: 13) y C42 en kringle 3 recombinante (SEQ ID NO: 18) a serinas. Además, se entiende que pueden realizarse una variedad de sustituciones, adiciones, delecciones u otras modificaciones de aminoácidos en los fragmentos de angiostatina identificados anteriormente, que no alteran significativamente la actividad inhibidora de la proliferación celular endotelial de los fragmentos, y que, por tanto, no pretenden exceder el alcance de las reivindicaciones. Mediante "no alteran significativamente" se quiere decir que el fragmento de angiostatina tiene al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70% y más preferiblemente al menos el 80% de la actividad inhibidora de la proliferación celular endotelial en comparación con la del fragmento de angiostatina homólogo más próximo dado a conocer en el presente documento.

55 *Expresión y construcción génica*

Se usó un método basado en PCR para generar los fragmentos de ADNc que codifican para kringle 1 (K1), kringle 2 (K2), kringle 3 (K3), kringle 4 (K4) y kringle 2-3 (K2-3) del plasminógeno humano (HPg). Kringle 1 (K1r), kringle 2 (K2r), kringle 3 (K3r), kringle 4 (K4r) y kringle 2-3 (K2-3r) recombinantes se expresaron en *E. coli*, tal como se describió anteriormente (Menhart, N., Shel, L. C., Kelly, R. F., y Castellino, F. J. (1991) Biochem. 30, 1948-1957; Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B., y Rickli, E. E. (1994) Eur. J. Biochem. 219, 455-462; Söndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M., y Rickli, E. E. (1996) Biochem. en prensa; Rejante, M. R., Byeon, L.-J. L., y Llinas, M. (1991) Biochem. 30, 11081-11092). Para evitar la homodimerización mediante la formación de puentes disulfuro entre kringle tal como se muestra en la figura 32B, se mutaron los residuos de cisteína C169 en K2r y C297 en K3r a serinas, tal como se observa en las SEQ ID NOS 13 y 18, en las posiciones 4 y 42, respectivamente. (Söndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M., y Rickli, E.E. (1996) Biochem. en prensa). Los K3r y K2-3r contenían una cola de hexa-histidinas en el extremo N-terminal que se utilizó para la purificación de la proteína (no mostrado).

Digestión proteolítica

Se prepararon los fragmentos de K1-3, K1-4 y K4 mediante digestión de Lys-HPg (Abbott Labs) con elastasa porcina (Sigma), tal como se describió anteriormente (Powell, J. R., y Castellino, F. J. (1983) *Biochem.* 22, 923-927). En resumen, se incubaron 1,5 mg de elastasa a temperatura ambiente con 200 mg de plasminógeno humano en Tris-HCl 50 mM pH 8,0 durante la noche con agitación. La reacción se terminó mediante la adición de fluorofosfato de diisopropilo (DFF) (Sigma) hasta una concentración final de 1 mM. Se sacudió la mezcla durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y se sometió a diálisis durante la noche frente a Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Purificación de proteínas

Se expresó K1 recombinante en células bacterianas de *E. coli* DH5 α usando un vector plasmídico pSTII. Esta proteína se purificó hasta la homogeneidad mediante cromatografía usando columnas de lisina-Sepharose 4B (Pharmacia) y Mono Q (BioRad). Las células bacterianas de *E. coli* (cepa HB101) que expresaban K2r y K3r se hicieron crecer a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8 a 3°C en medio 2 x YT que contenía ampicilina 100 mg/ml y kanamicina 25 mg/ml. Se añadió IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 1 mM y se hicieron crecer las células durante 4,5 horas adicionales a 37°C para inducir la producción de proteínas recombinantes. Se recogieron las células mediante centrifugación y se almacenaron los sedimentos a -80°C. Los lisados celulares descongelados se resuspendieron en el tampón de extracción (clorhidrato de guanidina 6 M en fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0). Se centrifugó la suspensión a 15.000 x g durante 30 minutos y se añadió b-mercaptoetanol al sobrenadante a una concentración final de 10 mM. Entonces se cargó el sobrenadante en una columna de agarosa Ni²⁺-MrA (1,5 cm x 5 cm) preequilibrada con el tampón de extracción. Se lavó sucesivamente la columna con tampón de extracción a pH 8,0 y pH 6,3, respectivamente. Se eluyeron K2 y K3 recombinantes con tampón de extracción a pH 50.

Los fragmentos de K1-3, K1-4 y K4 escindidos proteolíticamente se purificaron usando una columna de lisina-Sepharose 4B (2,5 cm x 15 cm) equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 hasta que se alcanzó una absorbancia a 180 nm de 0,005. Los fragmentos de kringle absorbidos se eluyeron con tampón Tris que contenía ácido ϵ -aminocaproico 200 mM, pH 8,0. Las muestras eluidas se sometieron a diálisis durante la noche frente a Tris-HCl 20 mM, pH 5,0, y se aplicaron a una columna Mono-S de BioRad equilibrada con el mismo tampón. Se eluyeron los fragmentos de K4, K1-3 y K1-4 con gradientes escalonados del 0-20%, 20-50% y 50-70% de fosfato 20 mM/KCl 1M, pH 5,0. La mayor parte de los fragmentos de K1-3 y K1-4 se eluyeron de la columna con KCl 0,5 M tal como se determina mediante SDS-PAGE. Todas las fracciones se sometieron a diálisis durante la noche frente a Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Tras la diálisis, se purificaron adicionalmente los fragmentos de K1-3 y K1-4 usando una columna de heparina-Sepharose (5 cm x 10 cm) (Sigma) preequilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se eluyó el fragmento de K1-3 con KCl 350 mM y se recuperó K1-4 de la fracción de flujo a través. Los fragmentos de kringle purificados se analizaron en geles de SDS seguido por tinción con plata, mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos policlonales anti-K4 y K1-3 humanos, y mediante análisis de secuenciación del extremo amino-terminal.

*Replegamiento *in vitro**

Se llevó a cabo el replegamiento de K2r, K3r y K2-3r según un protocolo convencional (Cleary, S., Mulkerrin, M. G., y Kelley, R. R. (1989) *Biochem.* 28, 1884-1891). Las proteínas purificadas se ajustaron a pH 8,0 y se añadió ditioneitol (DTT) hasta una concentración final de 5 mM. Tras una incubación durante la noche, se diluyó la disolución con 4 volúmenes de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenían glutatión reducido 1,25 mM. Tras 1 hora de incubación, se añadió glutatión oxidado hasta una concentración final de 1,25 mM y se incubó durante 6 horas a 4°C. La proteína naturalizada de nuevo se sometió a diálisis inicialmente frente a H₂O durante 2 días y durante dos días adicionales frente a solución salina tamponada con fosfato 50 mM, pH 8,0. Entonces se cargó la disolución en una columna de lisina-Bio-Gel (2 cm x 13 cm) equilibrada con la misma solución salina tamponada con fosfato. Se lavó la columna con solución salina tamponada con fosfato y se eluyó la proteína con un tampón fosfato que contenía 6-AHA 50 mM (ácido 6-aminohexanoico). Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Aquapore Butil (2,1 x 100 mm, de poro ancho (widedore) de 30 nm, 7 mm, Applied Biosystems) y se utilizó una cromatografía líquida de Hewlett Packard con gradientes de acetonitrilo.

Reducción y alquilación

Se llevaron a cabo la reducción y la alquilación de los fragmentos de kringle según un protocolo convencional (Cao, Y., y Pettersson, R. F., (1990) *Growth Factors* 3, 1013). Se incubaron aproximadamente 20-80 mg de las proteínas purificadas en 300-500 ml de medio DME en ausencia de suero a temperatura ambiente con 15 ml de DTT 0,5 M durante 15 minutos. Tras la incubación, se añadieron a la reacción 30 ml de yodoacetamida 0,5 M. La disolución de proteínas se sometió a diálisis a 4°C durante la noche inicialmente frente a 20 volúmenes de DMEM. La disolución se sometió a diálisis adicionalmente a 4°C durante 4 horas adicionales frente a 20 volúmenes de DMEM reciente. Tras la diálisis, se analizaron las muestras en un gel de SDS y se sometieron a ensayo para determinar sus actividades inhibitoras sobre la proliferación celular endotelial.

Ensayo de proliferación endotelial

Se aislaron células endoteliales capilares bovinas (BCE) tal como se describió anteriormente (Folkman, J., Hauschild, C. C., y Zetter, B. R. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5217-5221) y se mantuvieron en DMEM

complementado con suero de ternero bovino (BCS) al 10% inactivado por calor, antibióticos, y bFCF humano recombinante 3 ng/ml (Scios Nova, MountainLew, CA). Las monocapas de crecimiento de células BCE en placas de 6 pocillos se dispersaron en una disolución de tripsina al 0,05%. Se resuspendieron las células con DMEM que contenía BCS al 10%. Se añadieron aproximadamente 12.500 células en 0,5 ml a cada pocillo de las placas de cultivo tisular
 5 gelatinizadas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C (en CO₂ al 10%) durante 24 horas. Se sustituyó el medio por 500 ml de DMEM reciente que contenía BCS al 5% y se añadieron a cada pocillo muestras de fragmentos de kringle individuales o en combinación por triplicado. Tras 30 minutos de incubación, se añadió bFGF hasta una concentración final de 1 ng/ml. Tras 72 horas de incubación, se trataron las células con tripsina, se resuspendieron en Hematall (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) y se contaron con un contador Coulter.

10 Purificación y caracterización del fragmento de kringle del plasminógeno humano

Se amplificaron los fragmentos de ADNc que codifican para kringles individuales (K1, K2, K3, y K4) y kringles 2-3 (K2-3) del plasminógeno humano mediante un método basado en PCR (figura 28). Los fragmentos de ADNc
 15 amplificados por PCR se clonaron en un vector de expresión bacteriano. Se replegaron *in vitro* las proteínas recombinantes expresadas a partir de *Escherichia coli* y se purificaron hasta una homogeneidad > 98% usando cromatografía acoplada a HPLC (figura 29). En condiciones reductoras, K2, K3 y K4 recombinantes migraron con pesos moleculares de 12-13 kDa (figura 29A, carriles 2-4), correspondientes a los pesos moleculares previstos de cada fragmento de kringle. K1 recombinante que migra con un peso molecular superior de 17 kDa se identificó mediante electroforesis
 20 en gel de SDS. Se obtuvieron los fragmentos de K1-4 y K1-3 mediante la digestión proteolítica de Lys-plasminógeno humano (Lys-HPg) con elastasa, tal como se describió anteriormente (Powell, J. R., y Castellino, F. J. (1983) Biochem. 22, 923-927; Brockway, W. J., y Castellino, F. J. (1972) Arch. Biochem Biophys). Estos dos fragmentos (figura 29B, carriles 1 y 2) con pesos moleculares previstos de 43 kDa y 35 kDa, respectivamente, también se purificaron hasta homogeneidad. El análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de los fragmentos purificados dio
 25 una secuencia idéntica, -YLSE-, seguida por la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 40, para K1-3 y K1-4, respectivamente. La secuencia N-terminal para K4 produjo -VVQD- con aproximadamente un 20% de -VQD-, seguida por la SEQ ID NO: 23, cada de las cuales se prevé a partir de la secuencia esperada que comienza con Valina¹⁷⁶ y Valina¹⁷⁷ de la angiostatina humana (SEQ ID NO: 3).

30 Actividad anti-proliferativa en células endoteliales para kringles individuales

Se sometieron a ensayo fragmentos de kringles recombinantes individuales de la angiostatina para determinar las actividades inhibidoras en el crecimiento de células endoteliales capilares bovinas (BCE) mediante bFGF. Tal como se muestra en la figura 30A, K1r inhibió la proliferación de células BCE de una forma dependiente de la dosis. La
 35 concentración de K1r requerida para alcanzar un 50% de inhibición (DE₅₀) fue de aproximadamente 320 nM (tabla 4). Por el contrario, K4r mostró poco o ningún efecto inhibitor sobre la proliferación celular endotelial. K2 recombinante y K3r, dos fragmentos de kringles que no se unen a lisina, también produjeron una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación celular endotelial (figura 30B). Sin embargo, la potencia inhibidora de K2r fue sustancialmente inferior a la de K1r y K3r (DE₅₀ = 460) (figura 30 y tabla 4). No pudo detectarse ninguna citotoxicidad o morfología
 40 bien diferenciada con las células endoteliales apoptóticas tal como redondeo, desprendimiento y fragmentación de las células, ni siquiera tras la incubación con una alta concentración de estos fragmentos de kringle. Estos datos sugieren que la actividad anti-crecimiento endotelial de la angiostatina puede compartirse por los fragmentos de K1, K2 y K3, y en menor grado por K4.

50 TABLA 4

Actividad inhibidora sobre la proliferación de células endoteliales capilares

Fragmentos	DE ₅₀ (nM)
Kringle 1	320
Kringle 2	—
Kringle 3	460
Kringle 4	—
Kringle 2-3	—
Kringle 1-3	70
Kringle 1-4 (angiostatina)	135

Actividad anti-proliferativa en células endoteliales de los fragmentos de K1-3 y K1-4

Para evaluar el efecto anti-proliferativo en células endoteliales de fragmentos de kringle combinados, se sometieron a ensayo fragmentos proteolíticos purificados de K1-4, K1-3 y K2-3r humanos en células BCE. De acuerdo con los hallazgos anteriores (O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, J., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., y Folkman, J. (1994) *Cell* 79, 315-328), la proliferación de las células BCE, tal como se muestra en la figura 31, se inhibió significativamente mediante el fragmento de K1-4 similar a la angiostatina ($DE_{50} = 135$ nM) (tabla 4). Se obtuvo un aumento de la actividad anti-crecimiento endotelial con el fragmento de K1-3 ($DE_{50} = 70$ nM) (tabla 4). Se produjo la inhibición de la proliferación celular endotelial de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados indican que la eliminación de K4 de la angiostatina potencia la actividad anti-crecimiento endotelial.

Inhibición aditiva mediante K2r y K3r

El fragmento de K2-3r mostró sólo una débil actividad inhibidora que fue similar a la de K2r solo (figura 31). Sin embargo, tanto K2r como K3r inhibieron la proliferación celular endotelial (figura 30B). Este hallazgo sugiere que el efecto inhibidor de K3 estaba oculto en la estructura de K2-3. Estudios estructurales previos demostraron que estaba presente un puente disulfuro entre kringles entre K2 (cisteína¹⁶⁹) y K3 (cisteína²⁹⁷) del plasminógeno humano, correspondiente a la cisteína⁹¹ y la cisteína²¹⁹ de SEQ ID NO: 3 (Söndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M., y Rickli, E. E. (1996) *Biochem. en prensa*). Véase la figura 32B. Se probó el efecto inhibidor de K2r y K3r en combinación. De manera interesante se observó una inhibición aditiva cuando se añadieron los fragmentos de K2r y K3r individuales juntos a las células BCE. Véase la figura 32A. Estos resultados implican que es preferible abrir el puente disulfuro entre K2 y K3 con el fin de obtener el máximo efecto inhibidor de K2-3.

Se requiere el plegamiento apropiado de las estructuras kringle para la actividad anti-endotelial de la angiostatina

Para estudiar si se requiere el plegamiento de las estructuras kringle para la actividad anti-proliferación endotelial, se redujo la angiostatina natural con DTT y se sometió a ensayo sobre células endoteliales capilares bovinas. Tras la reducción, se alquiló adicionalmente la angiostatina con yodoacetamida y se analizó mediante electroforesis en gel de SDS. Tal como se muestra en la figura 34A, la proteína tratada con DTT migró a una posición superior con un peso molecular de aproximadamente 42 kDa (carril 2) en comparación con la angiostatina natural con un peso molecular de 33 kDa (carril 1), lo que sugiere que la angiostatina estaba completamente reducida. La actividad anti-proliferación de la angiostatina se suprimió en buena parte tras la reducción (figura 34B). A partir de estos resultados, se concluye que es preferible el plegamiento correcto de la angiostatina a través de los puentes disulfuro entre kringles para mantener su potente efecto sobre la inhibición de la proliferación celular endotelial.

La alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios kringle del plasminógeno humano muestra que K1, K2, K3 y K4 muestran una homología de secuencia notable y una arquitectura macroscópica idéntica (56-82% de identidad) tal como se observa en la figura 35. Entre estas estructuras, el kringle de unión a la lisina de alta afinidad, K1, es el segmento inhibidor más potente de la proliferación celular endotelial. Es de interés que el fragmento de unión a la lisina de afinidad intermedia, K4, carece de actividad inhibidora. Estos datos sugieren que el sitio de unión a la lisina de las estructuras kringle puede no estar implicado directamente en la actividad inhibidora. La conservación de aminoácidos y la divergencia funcional de estas estructuras kringle proporcionan un sistema ideal para estudiar el papel de las mutaciones producidas por la replicación del ADN durante la evolución. También se encuentran actividades divergentes similares con respecto a la regulación de la angiogénesis mostrada por un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente en las familias de hormonas de crecimiento - prolactina y quimiocina -C-X-C- (Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, A. J., Hunt, A. L., y Donner, S. I. (1990) *Science* 247, 77-79.; Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. J., y Strieter, R. M. (1992) *Science* 258, 1798-1801.; Cáo, Y., Chen, C., Weatherbee, J. A., Tsang, M., y Folkman, J. (1995) *J. Exp. Med.* 182, 2069-2077.; Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A., y Kunkel, S. L. (1995) *Shock* 4, 155-160.; Jackson, D., Volpert, O. V., Bouck, N., y Linzer, D. I. H. (1994) *Science* 266, 1581-1584).

El análisis adicional de la secuencia revela que K4 contiene dos residuos de lisina cargados positivamente adyacentes a las cisteínas 22 y 78 (figura 35). El análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H muestra que estas 4 lisinas, junto con la lisina 57, forman el núcleo de un dominio cargado positivamente en K4 (Llinas M, datos no publicados), mientras que otras estructuras kringle carecen de un dominio cargado positivamente de este tipo. Queda por estudiar si este dominio enriquecido en lisina contribuye a la pérdida de actividad inhibidora de kringle 4 del plasminógeno humano. Anteriormente se notificó que K4 estimula la proliferación de otros tipos de células y aumenta la liberación del calcio intracelular (Donate, L. E., Gherardi, E., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Aporicio, S. y Blundell, T. L. (1994) *Prot. Sci.* 3, 2378-2394). El hecho de que la eliminación de K4 de la angiostatina potencie su actividad inhibidora sobre las células endoteliales sugiere que esta estructura puede evita algo del efecto inhibidor de K1-3.

Sigue sin estar caracterizado el mecanismo subyacente a cómo la angiostatina y sus fragmentos de kringle relacionados inhiben específicamente el crecimiento de las células endoteliales. Todavía no está claro si la inhibición está mediada por un receptor que se expresa específicamente en las células endoteliales en proliferación, o si la angiostatina se internaliza por las células endoteliales y posteriormente inhibe la proliferación celular. Alternativamente, la angiostatina puede interactuar con un receptor de la adhesión celular endotelial, tal como la integrina $\alpha_3\beta_3$, que bloquea la angiogénesis mediada por integrina (Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld R. A., Hu, T. Klier, G., y Cheresch, D. A. (1994) *Cell* 79, 1157-1164). Es de interés que Friedlander *et. al.* (Friedlander, M., Brooks, P.

C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A. y Cheresch, D. A. (1995) 270, 1502) notificaran recientemente que la angiogénesis *in vivo* en modelos de membrana corioalantoidea o de córnea (inducida por bFGF mediante el factor de necrosis tumoral) era dependiente de integrina $\alpha_v\beta_3$. Sin embargo, la angiogénesis estimulada por VEGF, el factor de crecimiento transformante α , o ésteres de forbol era dependiente de $\alpha_v\beta_5$. Los anticuerpos frente a las integrinas individuales bloquearon específicamente una de estas rutas, y un antagonista proteico cíclico de ambas integrinas bloqueó la angiogénesis inducida por cada una de las citocinas (Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A. y Cheresch, D. A. (1995) 270, 1502). Dado que la angiogénesis inducida por bFGF y VEGF se inhiben mediante la angiostatina, puede bloquear una ruta común para esta angiogénesis mediada por integrina.

En las últimas décadas se ha identificado un número creciente de inhibidores endógenos de la angiogénesis (Folkman, J. (1995) N. Engl. J. Med. 333, 1757-1763). De los nueve supresores celulares endoteliales caracterizados, algunos inhibidores son fragmentos proteolíticos. Por ejemplo, el fragmento N-terminal de 16 kDa de la prolactina humana inhibe la proliferación celular endotelial y bloquea la angiogénesis *in vivo* (Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentierdelrue, F., y Weiner, R. I. (1993) Endocrinology 133, 1292-1299). En un artículo reciente, D'Angelo *et al.* informaron de que el fragmento anti-angiogénico de 16 kDa en el extremo N-terminal inhibía la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) mediante VEGF y bFGF en células endoteliales capilares (D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J., y Weiner, R. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 6374-6378). De manera similar a la angiostatina, la molécula parental intacta de prolactina no inhibe la proliferación celular endotelial ni es un inhibidor de la angiogénesis. El factor plaquetario 4 (PF-4) inhibe la angiogénesis a altas concentraciones (Maione, T. E., Grey, G. S., Petro, A. J., Hunt, A. L. y Donner, S. I. (1990) Science 247, 77-79; Cao, Y., Chen, C., Weatherbee, J. A., Tsang, M. y Folkman, J. (1995) J. Exp. Med. 182, 2069-2077). Sin embargo, el fragmento de PF-4 escindido proteolíticamente truncado en el extremo N-terminal muestra un aumento de 30 a 50 veces en su actividad anti-proliferativa con respecto a la molécula de PF-4 intacta (Gupta, S. K., Hassel, T. y Singh, J. P. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7799-7803). También se ha demostrado que fragmentos proteicos más pequeños de fibronectina, factor de crecimiento epidérmico murino y trombospondina inhiben específicamente el crecimiento celular endotelial (Homandberg, G. A., Williams, J. E., Grant, D., Schumacher, B., y Eisenstein, R. (1985) Am. J. Pathol. 120, 327-332; Nelson, J., Allen, W. E., Scott, W. N., Bailie, J. R., Walker, B., McFerran, N. V., y Wilson, D. J. (1995) Cancer Res. 55, 3772-3776; Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazer, W. A., Polverini, P. J., y Bouck, N. (1993) J. Cell Biol. 122,497-511). El procesamiento proteolítico de una proteína grande puede cambiar la estructura conformación de la molécula original o exponer nuevos epítomos que son anti-angiogénicos. Por tanto, la(s) proteasa(s) pueden desempeñar un papel crítico en la regulación de la angiogénesis. Hasta la fecha, se sabe poco acerca de la regulación de estas actividades proteasa *in vivo*.

Los datos también muestran que el plegamiento mediado por el puente disulfuro de las estructuras kringle en la angiostatina es preferible para mantener su actividad inhibidora sobre el crecimiento celular endotelial. También se encuentran estructuras kringle análogas a éstas del plasminógeno en una variedad de proteínas diferentes. Por ejemplo, la apolipoproteína (a) tiene hasta 37 repeticiones de kringle 4 de plasminógeno (McLean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W.-J., Eaton, D. L., Chen, E. Y., Fless, G. M., Scanu, A. M., y Lawn, R. M. (1987) Nature 330, 132-137). La parte amino terminal de la protrombina también contiene dos kringles que son homólogos a los del plasminógeno (Walz, D. A., Hewett-Emmett, D., y Seegers, W. H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 1969-1973). Se ha demostrado que la urocinasa posee una estructura kringle que comparte una amplia homología con el plasminógeno (Gunzler, W. A., J., S. G., Otting, F., Kim, S.-M. A., Frankus, E., y Flohe, L. (1982) Hoppe-Seyler's A. Physiol. Chem. 363, 1155-1165). Además, la proteína B tensioactiva y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también llevan estructuras kringle (Johansson, J., Curstedt, T., y Jörnvall, H. (1991) Biochem. 30, 6917-6921; Lukker, N. A., Presta, L. G., y Godowski, P. J. (1994) Prot. Engin. 7, 895-903).

Ejemplo 28

Supresión de metástasis y de proliferación celular endotelial mediante fragmentos de angiostatina

El siguiente ejemplo caracteriza la actividad de fragmentos de angiostatina adicionales. Los datos sugieren que puede obtenerse una potente actividad supresora de tumores y anti-endotelial a partir de tales fragmentos proteicos de la angiostatina.

Tal como se usa en el presente documento, "kringle 1-4BKLS" significa un derivado proteico de plasminógeno que tiene un actividad inhibidora de células endoteliales, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia homóloga a kringle 1-4BKLS, ejemplificada mediante, pero sin limitarse a la de kringle 1-4BKLS murino (SEQ ID NO: 41), y kringle 1-4BKLS humano (SEQ ID NO: 42), a menos que se indique otra cosa por el contexto en el que se usa. Kringle 1-4BKLS murino (SEQ ID NO: 41) corresponde a las posiciones de aminoácidos 93 a 470 (inclusive) del plasminógeno murino de SEQ ID NO: 1. Este ejemplo demuestra que un "fragmento de angiostatina" puede ser un fragmento de plasminógeno y que engloba una secuencia de aminoácidos mayor que la angiostatina presentada en la SEQ ID NO: 3, por ejemplo, y que todavía tiene actividad anti-angiogénica o actividad inhibidora de la proliferación celular endotelial terapéutica.

Una secuencia de aminoácidos de kringle 1-4BLKS es homóloga a las secuencias específicas de kringle 1-4BLKS identificadas anteriormente. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos tienen un grado de homología con las secuencias descritas de al menos el 60%, más preferiblemente al menos 70%, y más preferiblemente al menos el 80%. Debe entenderse que pueden realizarse una variedad de sustituciones, deleciones y otras modificaciones de aminoáci-

dos a los fragmentos enumerados anteriormente para mejorar o modificar la actividad inhibidora de células endoteliales de los fragmentos. Tales modificaciones no pretenden exceder el alcance y el espíritu de las reivindicaciones. Además, se entiende que pueden realizarse una variedad de sustituciones, adiciones, o deleciones silenciosas de aminoácidos en los fragmentos de kringle identificados anteriormente, que no alteran significativamente la actividad de inhibición celular endotelial de los fragmentos, y que, por tanto, no pretenden exceder el alcance de las reivindicaciones.

Clonación de la angiostatina en *Pichia pastoris*

Se amplificaron las secuencias que codifican para la angiostatina mediante PCR usando la Vent polimerasa (New England Biolabs) y los cebadores número 154 (5'-ATCGCTCGAGCGTTATTTGAAAAGAAAGTG-3') (SEQ ID NO: 43) y número 151 (5'-ATCGGAATTCAAGCAGGACAACAGGCGG-3') (SEQ ID NO: 44) que contienen los ligadores XhoI y Eco RI, respectivamente, y usando el plásmido pTrcHis/HAs como molde. Este plásmido contenía secuencias que codifican para los aminoácidos 93 a 470 del plasminógeno humano (SEQ ID NO: 42) para su Clonación en el sitio Xho I/Eco RI del vector de expresión pHIL-S1 usando la señal de secreción natural de *P. pastoris*, *PHO 1*. Esta misma secuencia se amplificó de la misma manera usando los cebadores número 156 (5'-ATCGTACG TATTATTTGAAAAGAAAGTG-3') (SEQ ID NO: 45) y número 151 que contenían los ligadores Sna BI y Eco RI, respectivamente, para su clonación en el sitio Sna BI/Eco RI del vector de expresión pPIC9 con la señal secretora del factor alfa. Se purificaron en gel los productos de las ampliaciones, los ligadores se digirieron con las enzimas apropiadas y se purificaron de nuevo usando Gene-Clean (Bio 101). Se ligaron estos fragmentos génicos en los vectores apropiados. Se seleccionaron los clones resultantes y se obtuvieron y se linealizaron preparaciones de plásmido de los clones para generar las cepas recombinantes His⁺ Mut^s e His⁺ Mut⁺ cuando se transformaron en la cepa huésped de *P. pastoris*, GS115. La integración se confirmó mediante PCR.

Ambos recombinantes His⁺ e His⁺ Mut⁺ se indujeron con metanol y se detectaron para alta expresión de angiostatina usando geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie e inmunotransferencias utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón frente a los kringles 1 a 3 (Castellino, Enzyme Research Laboratories, Inc., South Bend, IN). A partir de estos, se seleccionó un clon de *P. pastoris* GS115 transformado, pHIL-S1/HAs18, y se caracterizó fenotípicamente como His⁺ Mut^s.

Expresión de PHIL-S1/HAs18

La expresión de la angiostatina a partir de pHIL-S1/HAs18 fue típica para un clon His⁺ Mut^s. En la inducción en matraces con agitación con deflectores, se cultivó 1 l de células a DO₆₀₀ en 150 de medio complejo de metanol tamponado que contenía extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, base nitrogenada de levadura al 1,34% con sulfato de amonio, biotina al 0,00004% y metanol al 0,5% en un matraz de 1 l con deflectores. Las células se agitaron constantemente a 30°C, 250 rpm. El metanol se alimentó por lotes a intervalos de 24 horas mediante la adición de metanol absoluto hasta una concentración final del 0,5%. Tras 120 horas, las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 minutos, y los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta que se utilizaron.

Purificación de la angiostatina a partir de caldo de fermentación de *P. pastoris* mediante cromatografía en lisina-Sepharose

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. El caldo de fermentación bruto, normalmente 200 ml, que contiene angiostatina, se clarificó mediante centrifugación a 14.000 x g y se concentró mediante una membrana de punto de corte de peso molecular 30 kDa, Centriprep 30 (Amicon), hasta aproximadamente un cuarto del volumen original. Se añadió un volumen de tampón fosfato 50 mM, pH 7, 5, a la muestra concentrada que se concentró de nuevo mediante Centriprep hasta un cuarto del volumen de muestra original. La muestra se diluyó de nuevo en volumen: volumen con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7, 5. Se resuspendieron 60 g de lisina-Sepharose 4B (Pharmacia) en 500 ml de tampón fosfato 50 mM helado, pH 7,5 y se usaron para rellenar una columna de 48 x 100 mm (volumen de relleno -180 ml). La columna se lavó durante la noche con 7,5 volúmenes de columna (VC) de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. La muestra se bombeó en la columna a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min y la columna se lavó con 1,5 VC de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó entonces con 1,5 CV de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, a una velocidad de flujo de 3 ml/min: entonces se eluyó la angiostatina con ácido ϵ -amino-n-caproico 0,2 M, pH 7,4 a una velocidad de flujo de 3 ml/min. Se reunieron las fracciones que contenían absorbancia significativa y se sometieron a diálisis durante 24-48 horas frente a agua desionizada y se liofilizaron. Una recuperación típica a partir de una carga de proteína total de 100 mg es de 10 mg de angiostatina. Las columnas se regeneraron utilizando 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 50 mM/NaCl 1 M, pH 7, 5.

Ensayo de proliferación de células endoteliales capilares bovinas

Las células endoteliales capilares bovinas se obtuvieron tal como se describió anteriormente. Las células se mantuvieron en DMEM que contenía 3 mg/ml de bFGF humano recombinante (Scios Nova, Mountainview, CA), complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, penicilina 100 U/mi, estreptomycin 100 mg/mi y fungizona 0,25 mg/ml (BioWhittaker) en matraces de cultivo celular de 75 cm². El ensayo se llevó a cabo tal como se describió anteriormente.

Estudios con animales

Se inocularon ratones C57BI/6J macho de seis a ocho semanas de edad (Jackson Laboratories) por vía subcutánea con la línea de carcinoma pulmonar de Lewis poco metastásico (LLC-LM) murino (1×10^6 células/inyección). Aproximadamente 14 días tras la implantación, cuando el tumor primario alcanzó $1,5 \text{ cm}^3$, se anestesió a los animales con metoxiflurano y se extirparon quirúrgicamente los tumores primarios. El sitio de la incisión se cerró sutura interrumpida simple. La mitad de los animales en este grupo recibió una dosis de carga (3 mg/kg por vía subcutánea) de angiostatina derivada de plasminógeno o recombinante por vía subcutánea inmediatamente después de la cirugía, seguido por inoculaciones diarias de $1,5 \text{ mg/kg}$ durante 14 días. Un grupo control de ratones recibió un volumen igual de PBS cada día durante 14 días tras la cirugía. Todos los ratones se sacrificaron 14 días tras la extirpación del tumor primario (28 días tras la implantación del tumor), se extirparon los pulmones y se pesaron, y se contaron las metástasis de superficie con un estereomicroscopio.

Características de los fragmentos de angiostatina humana recombinante

Se expresó un fragmento génico que codifica para angiostatina humana que incluye los kringles 1 a 4 del plasminógeno humano que contiene un total de 26 cisteínas, en *Pichia pastoris*, la levadura metilotrófica. La angiostatina expresada en *P. pastoris* se une a lisina-Sepharose y puede eluirse específicamente mediante ácido ϵ -aminocaproico. Esto demuestra que el/los kring(s) que se unen al ácido épsilon-aminocaproico completamente funcionales, que son propiedades físicas de kring 1 y 4 de plasminógeno (Sottrup-Jensen, L. *et al.*, Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3 (1978) Ravens Press, N.Y. pág. 191), pueden expresarse y secretarse por *P. pastoris* y purificarse mediante técnicas que no requieren replegamiento (figura 36A y B). Un anticuerpo monoclonal dependiente de manera conformacional frente a Kring 1 a 3 reconoció a la angiostatina expresada a partir de *P. pastoris*, así como a la angiostatina purificada mediante escisión por elastasa del plasminógeno (Castellano, Enzyme Research Laboratories, Inc., SouthBend, IN) (figura 36B). Este anticuerpo no reconoce las formas reducidas de plasminógeno o angiostatina.

La angiostatina expresada por *P. pastoris* se observa como un doblete que migra a 49 kDa y 51,5 kDa sobre geles de SDS-PAGE no reducidos y desnaturalizados teñidos con Coomassie. Las proteínas expresadas por *P. pastoris* se modifican tras la traducción con la mayor parte de la N-glicosilación del tipo rico en manosa y la O-glicosilación insignificante. Para evaluar la posibilidad de glicosilación en la angiostatina expresada por *P. pastoris*, se digirió la angiostatina recombinante con endoglicosidasa H específica de las estructuras ricas en manosa, haciendo que la banda de 51,5 kDa migrara de manera idéntica con la banda a 49 kDa (figura 37A y B). La digestión con O-glicanasa con tratamiento previo con neuraminidasa para eliminar los residuos de ácido siálico, no cambió el patrón de migración del doblete (datos no mostrados). Estos resultados indican que *P. pastoris* expresó la angiostatina de dos formas: (1) con una cadena compleja unida a N probablemente de la estructura:

(Man)₂-150--Man

Man--GlcNAc---GlcNAc-Asn-

(Man)₁-2-Man

y (2) sin ninguna glicosilación.

Inhibición de células endoteliales capilares bovinas in vitro

Para determinar si la angiostatina expresada de forma recombinante tenía potencial de actividad anti-angiogénica, se cultivaron BCE en presencia de bFGF para determinar si la adición de angiostatina recombinante purificada inhibiría la proliferación de BCE. La angiostatina purificada expresada por *P. pastoris* inhibió la proliferación dirigida por bFGF de las células endoteliales bovinas *in vitro* (figura 38B) de una manera dependiente de la dosis (figura 38C). A 1 ug/ml de angiostatina recombinante, la inhibición fue del 80%. La inhibición del 50% fue equivalente a la obtenida con la angiostatina derivada de la escisión con elastasa del plasminógeno humano.

Supresión de metástasis in vivo

Se usó la línea LLC (LM) murina que se puede transplantar a partir de la cual se identificó la angiostatina por primera vez. Cuando se implantan de manera subcutánea en ratones C57BI/6J singénicos, estos tumores crecen rápidamente, produciendo tumores $> 1,5 \text{ cm}^3$ en el plazo de 14 días. Tras la resección del tumor primario, las micrometástasis en los pulmones crecen exponencialmente, hasta cubrir completamente la superficie del pulmón. Estas metástasis están sumamente vascularizadas hacia el día 14 tras la resección del tumor primario. Si se deja el tumor primario, las micrometástasis permanecen latentes y no son visibles macroscópicamente. Se administró sistémicamente angiostatina recombinante a los ratones tras la resección del tumor primario para someter a prueba la supresión del crecimiento de la metástasis. La angiostatina expresada por *P. pastoris* administrada sistémicamente a 30 ug/ratón/día inhibió el crecimiento de la metástasis tal como se cuantificó anotando las metástasis de superficie (figura 39A) y el peso pulmonar total (figura 39B). Los pesos de los pulmones de los ratones que tenían tumores primarios reseccionados y que habían

recibido dosis diarias de angiostatina recombinante o angiostatina obtenida de la escisión con elastasa del plasminógeno fueron comparables a los de los ratones normales (190 a 200 mg). Los pulmones de los ratones en los que se resecionaron los tumores primarios y que posteriormente se trataron con dosis diarias de angiostatina recombinante eran de color rosa con un número mínimo de micrometástasis no vascularizadas (figura 40). Por el contrario, los ratones tratados con solución salina tras la resección del tumor primario tenían los pulmones recubiertos con metástasis vascularizadas (figura 41). También fue de notable importancia una ausencia de toxicidad sistémica o local producida por la angiostatina expresada por *P. pastoris* en la dosis y el régimen usados en este estudio. No hubo evidencia de inflamación ni hemorragia en todos los ratones tratados.

La proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* posee dos características físicas importantes de la proteína natural: (1) se reconoce por un anticuerpo monoclonal dependiente de manera conformacional que surge frente a kringles 1 a 3 del plasminógeno humano (figura 36B) y (2) se une a la lisina (figura 36A y B). Estas propiedades indicaron que la proteína de angiostatina recombinante se expresaba con una conformación que imita a la de la molécula nativa. La proteína de angiostatina expresada por *P. pastoris* inhibe la proliferación de células endoteliales capilares bovinas estimulada por bFGF *in vitro* (figura 38), cuando se administra sistémicamente, la angiostatina recombinante mantuvo el carcinoma pulmonar de Lewis metastásico, por lo demás letal, en un estado inhibido (figura 39A y B y figura 40).

Los datos preliminares demuestran la ausencia de un transcrito detectable para la angiostatina en los tumores de pulmón de Lewis resecionados recientemente de ratones o en las células LLC tras 4 pases en un cultivo *in vitro*. El plasminógeno, producido por el hígado, se mantiene en circulación a una concentración plasmática estable de $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Es posible que los tumores LLC-LM produzcan una enzima que escinde el plasminógeno, unido o en circulación, para producir angiostatina. Alternativamente, las células inflamatorias atraídas hacia el sitio tumoral podrían producir tal enzima.

Resulta intrigante que tanto el plasminógeno humano natural como el de *P. pastoris* se produzcan de una forma glicosilada y no glicosilada. En el caso del plasminógeno humano, un único transcrito para un único gen puede producir ambas formas. Se desconocen el mecanismo molecular de las modificaciones diferenciales tras la traducción del plasminógeno humano, así como las observadas en TPA.

La angiostatina se expresa sumamente por *P. pastoris*. Los sobrenadantes contienen 100 mg/l de la proteína. Por tanto, las cantidades requeridas para los ensayos clínicos deben ser sencillas para producir y purificar usando tecnología convencional bien conocida por los expertos en la técnica. El desarrollo de este sistema de expresión y la demostración de la actividad *in vitro* e *in vivo* de la angiostatina recombinante purificada frente a la metástasis proporcionaron la base para la evaluación de la capacidad de estos fragmentos para inhibir el crecimiento tumoral y prolongar la vida en los pacientes con cáncer y otros que padecen de enfermedad mediada por angiogénesis.

Ejemplo 29

Producción y administración de agregado de angiostatina

Este ejemplo demuestra la producción y administración de agregado de angiostatina para inhibir la proliferación celular endotelial y el crecimiento tumoral. Normalmente, se supone que es necesario solubilizar y replegar las proteínas recombinantes producidas a partir de *E. coli* (renaturalizadas, reducidas y alquiladas) para lograr actividad *in vivo*. En el proceso, a menudo se pierde una cantidad significativa de la proteína. En este ejemplo, el agregado de angiostatina recombinante se produce tras la purificación y se usa directamente, sin renaturalización, reducción o alquilación adicional, para inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Por tanto, este ejemplo proporciona un medio sorprendentemente eficaz para producir y usar angiostatina. Este agregado de angiostatina y el método para su administración también proporciona un medio de liberación sostenida de la angiostatina, optimizando así su eficacia. Tal como se usa en el presente documento "agregado de angiostatina" significa angiostatina que se ha purificado sustancialmente, pero que no se ha replegado manualmente, tal como se describe en más detalle mas adelante.

Expresión de angiostatina

Se usó el sistema de expresión de *E. coli*, que tiene la ventaja de ser rápido, productivo y económico, para la expresión de angiostatina de ratón. Se diseñaron dos cebadores oligonucleotídicos, que flanquean una secuencia de ADNc de kringles 1-4 de plasminógeno (el ADNc de plasminógeno se adquirió de ATCC), para una estrategia basada en PCR para construir el sistema de expresión de angiostatina. (Véase, por ejemplo, Menhart, N., Shel, L. C., Kelly, R. F., y Castellino, F. J. (1991) *Biochem.* 30, 1948-1957; Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B., y Rickli, E. E. (1994) *Eur. J. Biochem.* 219, 455-462; Söndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M., y Rickli, E. E. (1996) *Biochem.* en impresión; Rejante, M. R., Byeon, I.-J. L. y Llinas, M. (1991) *Biochem.* 30, 11081-11092). El producto de la PCR se insertó en los sitios Nco I y Xho I del vector pET22 (Novagen), que contiene el promotor lac de T7 y una secuencia de oligohistidina. Entonces se transformó el ADNc en *E. coli* (cepa BL21(DE3)), que contiene una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control de lacUV5. Se indujo la expresión de la angiostatina recombinante mediante la adición de IPTG. La angiostatina expresada se acumuló como cuerpos de inclusión en las células huésped y consistió normalmente en más del 40% de la proteína celular total, tal como se calculó mediante tinción con azul de Coomassie.

La invención contempla que puede expresarse una angiostatina recombinante, o un fragmento de la misma, derivada de cualquier especie apropiada, en una variedad de sistemas de vectores y huéspedes, bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 *Purificación y agregación de la angiostatina*

Se purificó la fracción insoluble de las células huéspedes sonificadas que contenían los cuerpos de inclusión mediante centrifugación a 9.000 rpm durante 25 minutos, y se repitió el lavado. El producto resultante contenía aproximadamente un 80% de angiostatina, tal como se calculó mediante tinción con azul de Coomassie. El dominio de oligohistidina N-terminal de la proteína de fusión posibilitó la purificación conveniente y económica de la angiostatina recombinante con cromatografía de afinidad de quelación en una columna de Ni²⁺-NTA-agarosa (1,5 cm x 5 cm) en condiciones desnaturalizantes, disolviendo los cuerpos de inclusión en urea 6 M. Tal como se observa en la figura 41, carril 7, la angiostatina purificada muestra una única banda en SDS-PAGE mediante tinción con azul de Coomassie, con una tasa de migración entre aproximadamente 45 kD a 65 kD, y más preferiblemente de aproximadamente 55 kD. Esta cromatografía de una única etapa puede purificar la proteína hasta una homogeneidad sustancial, sin embargo, la invención contempla que puede emplearse una variedad de otras técnicas de purificación bien conocidas por los expertos en la técnica para lograr este producto.

La proteína, en su tampón de elución, se sometió a diálisis entonces (15.000 MWCO (punto de corte de peso molecular) frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 24 horas con 3 cambios del dializado a 4°C. Durante la diálisis se observó un precipitado blanco. Entonces se extrajo la muestra de las bolsas de diálisis y se eliminó el precipitado mediante centrifugación. El precipitado se resuspendió entonces usando un vórtex, en PBS para formar una suspensión fina para su uso en modelos con animales, o para almacenarse a -20°C. Este precipitado proporcionó el agregado de angiostatina. Alternativamente, puede usarse tris-HCl 20 mM, pH 7,9/NaCl 150 mM como un tampón de diálisis, por ejemplo, La invención contempla que puede utilizarse más o menos diálisis y una variedad de otros tampones de diálisis para dar una cantidad correspondiente de agregado de angiostatina, dentro de las limitaciones que se pueden determinar rutinariamente por un experto en la técnica, en vista de la descripción actual.

30 *Pruebas in vitro del agregado de angiostatina*

Se utilizaron células endoteliales capilares bovinas (BCE) en un ensayo tal como se explica en el ejemplo 8. Las células se expusieron a agregado de angiostatina humana recombinante preparado tal como se describe en este ejemplo. Se muestran los resultados en la figura 42, que revela una inhibición significativa de las células endoteliales expuestas al agregado de angiostatina.

35 *Pruebas in vivo del agregado de angiostatina*

Todos los trabajos con animales se llevaron a cabo en las instalaciones de animales del Hospital Infantil según las directrices institucionales.

A. El agregado de angiostatina de ratón recombinante, preparado tal como se describe en este ejemplo, se sometió a prueba con el ensayo de CAM (membrana corioalantoidea) de pollo. (O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shinc; y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. y Folkman, J., Cell (1994) 79:315-328). A una dosis de 25 ug, la inhibición de la formación capilar fue del 100% (las cinco CAM de pollo sometidas a prueba dieron zonas de inhibición 2-3+). A una dosis de 100 ug, la inhibición de la formación capilar duró 96 horas. Se sabe que el efecto de otros inhibidores de la angiogénesis y de la angiostatina derivada de plasminógeno dura aproximadamente 48 horas. Esto sugiere que el agregado de angiostatina proporciona una ventaja de liberación sostenida.

B. Se inoculó carcinoma pulmonar de Lewis de manera subcutánea en la parte media del lomo de ratones C57B16. A los ratones se les implantaron 1 x 10⁶ células en 0,1 ml de PBS preparado tal como se describió anteriormente y se encerraron en jaulas en grupos de 6 o menos. Se midieron los tumores con un calibrador con dial y se determinaron los volúmenes tumorales usando la fórmula anchura x anchura x longitud x 0,52, y se determinó la razón del volumen tumoral tratado con respecto al control (T/C) para el último punto de tiempo.

Una vez que el volumen tumoral fue de 100-200 milímetros cúbicos, lo que se produjo en el plazo de 3-5 días, los ratones se aleatorizaron para dos experimentos separados. En el primer experimento, los ratones recibieron 2-3 mg/kg del agregado de suspensión de angiostatina de ratón recombinante en PBS inyectados de manera subcutánea en un sitio alejado del tumor cada 24 horas (n = 3 ratones/grupo). El grupo control recibió inyecciones comparables de solución salina. En el segundo experimento separado (n = 6 ratones/grupo), los ratones de prueba recibieron 10 mg/kg del agregado de suspensión de angiostatina de ratón recombinante en PBS inyectado de manera subcutánea en un sitio alejado del tumor cada 24 horas. El grupo control recibió inyecciones comparables de solución salina.

No se observó toxicidad sobre la pérdida de peso en ninguno de los ratones tratados con el agregado de suspensión de angiostatina recombinante. En los ratones, el agregado de angiostatina se observó como una masa subcutánea tras la inyección que se resorbe durante un periodo de varias horas. Esto sugiere que se estaba solubilizando gradualmente, y demuestra que el agregado de angiostatina es un medio eficaz de liberación sostenida. A ambas dosis, hubo una

inhibición significativa del crecimiento de los tumores primarios del carcinoma pulmonar de Lewis en los ratones tratados. Véanse las figuras 43 y 44. El T/C obtenido mediante la administración de 10/mg/kg/día como una única inyección durante 19 días (cuando los animales control con solución salina comenzaron a morir y se sacrificaron) es de 0,06, lo que constituye una reducción del volumen tumoral nunca logrado anteriormente según el conocimiento de los inventores.

Los resultados *in vitro* e *in vivo* de este ejemplo proporcionan una base razonable para esperar el éxito en la utilización de los productos y los procedimientos descritos para la inhibición de la proliferación celular endotelial, la angiogénesis y el crecimiento tumoral en seres humanos. Aunque no se desea adherirse a ninguna teoría, el agregado de angiostatina recombinante producido mediante el presente método puede tener una conformación diferente y, por tanto, diferentes propiedades físicas, a partir de angiostatina generada por elastasa u otras proteínas purificadas que normalmente se renaturalizan. Se precipitó la angiostatina recombinante purificada para formar un agregado de suspensión sometiendo a diálisis la disolución proteínica frente a un volumen relativamente grande de tampón o agua. Se cree que esto se produce debido a que la proteína plegada inadecuadamente llega a hacerse insoluble y se agrega. Anteriormente, no se habría esperado que un agregado de proteína desnaturalizado fuera tan notablemente eficaz *in vivo*. También se cree que la potente actividad antitumoral demostrada se debe a una lenta aunque constante disolución y liberación del agregado de proteína de los sitios subcutáneos. La invención contempla además que puede usarse o bien la angiostatina que se produce naturalmente o bien la recombinante, así como fragmentos de angiostatina, en los métodos de purificación descritos para producir el agregado de angiostatina natural o recombinante, o el agregado de fragmentos de angiostatina, que pueden usarse para la inhibición satisfactoria de la proliferación celular endotelial y el crecimiento tumoral, sin necesidad de renaturalización.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un fragmento de angiostatina o una combinación de fragmentos de angiostatina que tiene actividad inhibidora de angiogénesis en un mamífero, en la que el fragmento de angiostatina se selecciona del grupo que consiste de una región kringle 1, una región kringle 2, una región kringle 3, una región kringle 1-2 y una región kringle 2-3.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento de angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos de una región kringle 2-3 o una región kringle 1-2.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el fragmento de angiostatina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38, o una combinación de las mismas.
- 20 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento de angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos de una región kringle 1.
- 25 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la región kringle 1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
- 30 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento de angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos de la región kringle 2.
- 35 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que la región kringle 2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.
- 40 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento de angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos de la región kringle 3.
- 45 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que la región kringle 3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.
- 50 10. Composición farmacéutica que comprende una secuencia de ADN aislada que codifica para un fragmento de angiostatina o una combinación de fragmentos de angiostatina que tiene actividad inhibidora de angiogénesis en un mamífero, en la que el fragmento de angiostatina se selecciona del grupo que consiste en una región kringle 1, una región kringle 2, una región kringle 3, una región kringle 1-2 y una región kringle 2-3.
- 55 11. Composición según la reivindicación 10, en la que el fragmento de angiostatina o la combinación de fragmentos de angiostatina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38.
- 60 12. Composición farmacéutica que comprende un vector, en la que el vector contiene una secuencia de ADN que codifica para un fragmento de angiostatina o una combinación de fragmentos de angiostatina que tiene una actividad inhibidora de proliferación celular endotelial, pudiendo dicho vector expresar dicho fragmento de angiostatina cuando está presente en una célula, y en la que dicho fragmento de angiostatina se selecciona del grupo que consiste en una proteína de kringle 1, una proteína de kringle 2, una proteína de kringle 3, una proteína de kringle 1-2 y proteína de kringle 2-3.
- 65 13. Composición según la reivindicación 12, en la que dicha secuencia de ADN codifica para un fragmento de angiostatina o una combinación de fragmentos de angiostatina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38.
14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para inhibir la proliferación celular endotelial o para tratar una enfermedad mediada por angiogénesis, seleccionada del grupo que consiste en cáncer, artritis, degeneración macular y retinopatía diabética.

ES 2 292 174 T3

15. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación celular endotelial o para tratar una enfermedad mediada por angiogénesis seleccionada del grupo que consiste en cáncer, artritis, degeneración macular y retinopatía diabética.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

SECUENCIA DE PLASMINÓGENO DE RATÓN:

Met Asp His Lys Glu Val Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Lys Pro
 Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Ile Ser Thr Gln Gly Ala Ser
 Leu Phe Ser Leu Thr Lys Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Val Ser Asp
 Cys Leu Ala Lys Cys Glu Gly Glu Thr Asp Phe Val Cys Arg Ser Phe
 Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
 Lys Thr Ser Ser Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
 Arg Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg
 Gly Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly
 Ala Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
 Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe
 Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
 Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
 His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
 Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
 Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu
 Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe
 Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
 Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu
 Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
 Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
 Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
 Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
 Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
 Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe
 Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His
 Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
 Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val
 Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys
 Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu
 Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr
 Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
 Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr
 Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala

FIGURA 2

RATÓN
SER HUMANO
MONO RHESUS
PORCINO
BOVINO

```

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 292 174 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

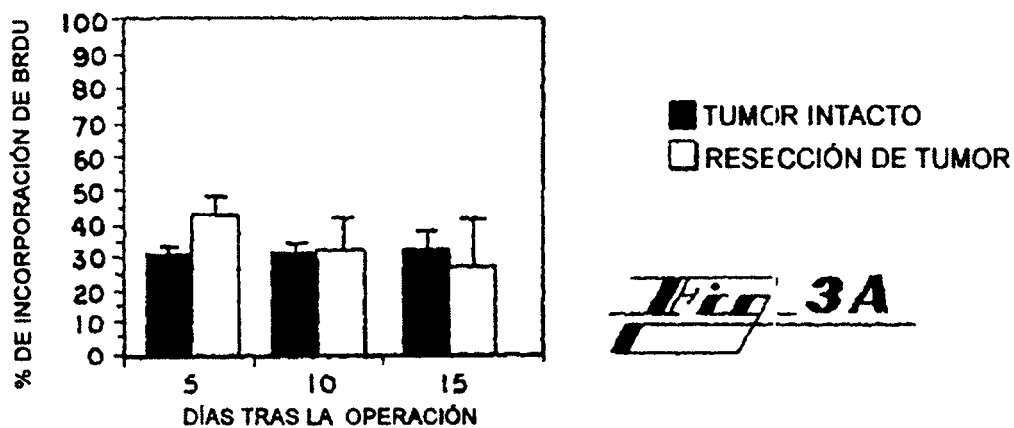


Fig. 3A

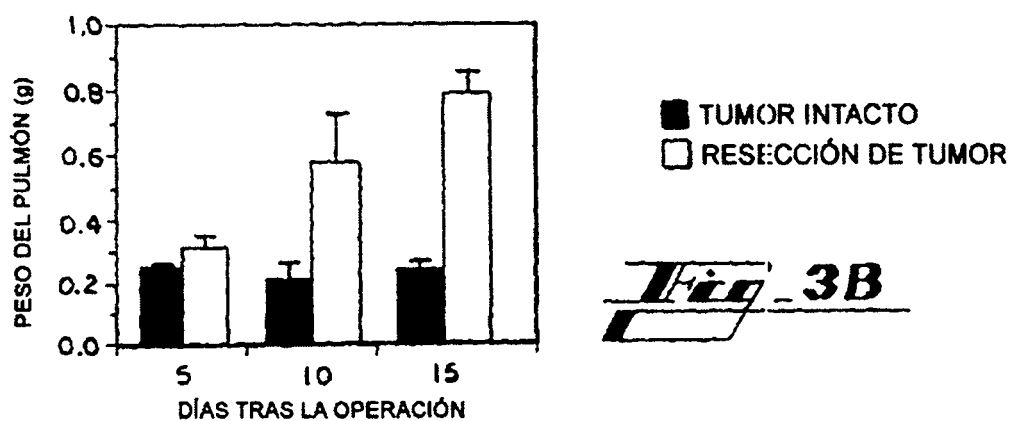


Fig. 3B

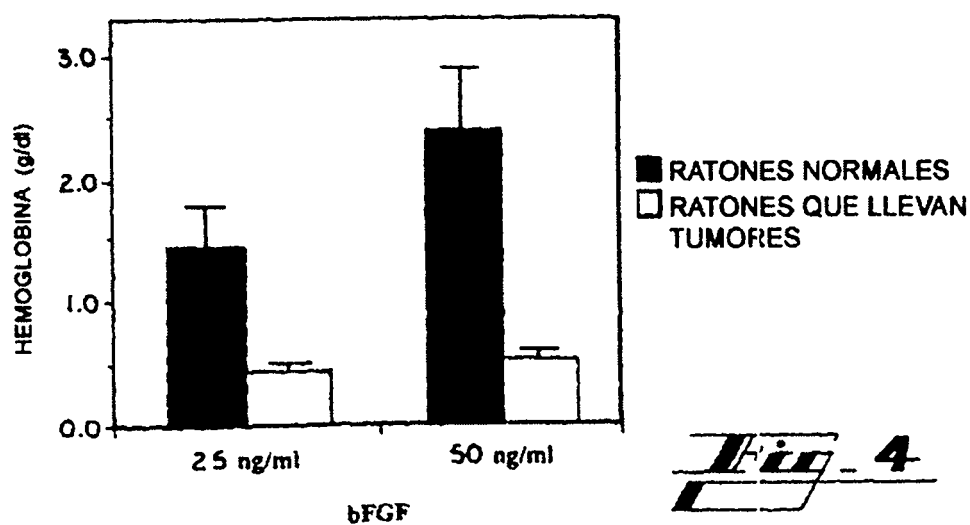


Fig. 4

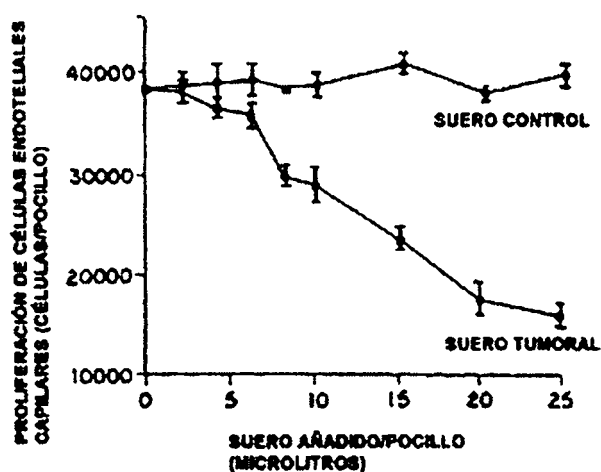
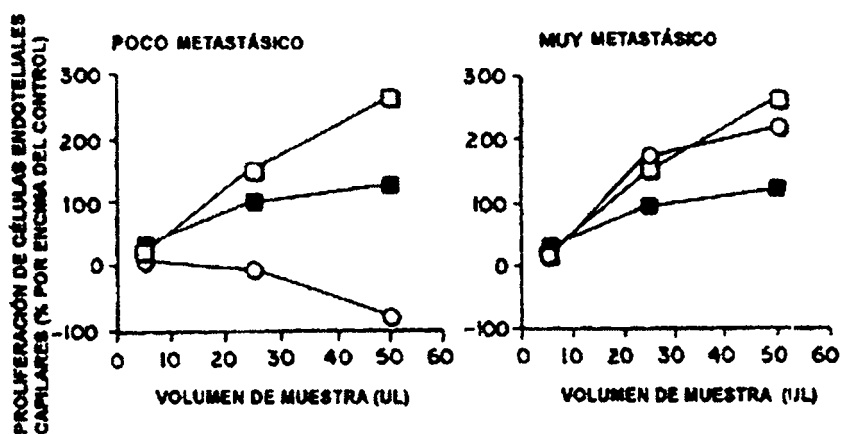


Fig. 5

- ASCITIS
- SUERO DE RATONES CON ASCITIS
- SUERO DE RATONES NORMALES

Fig. 6



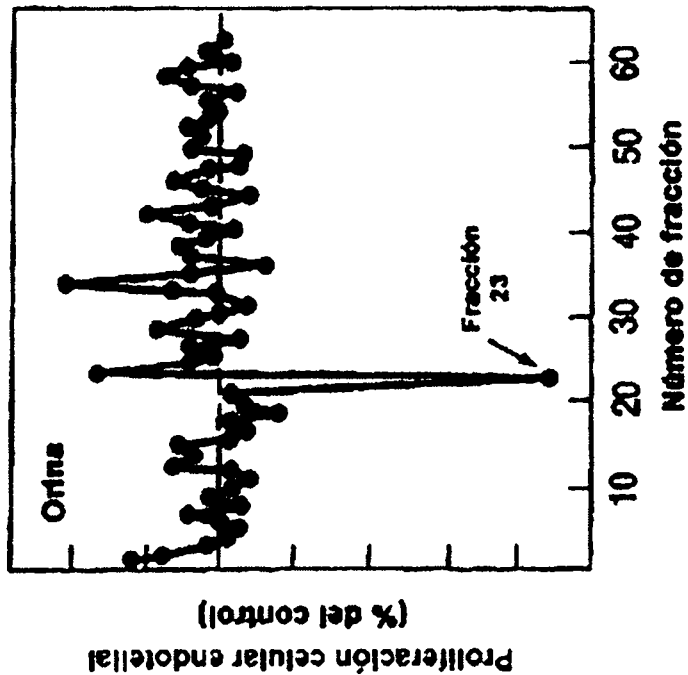


FIGURA 7B

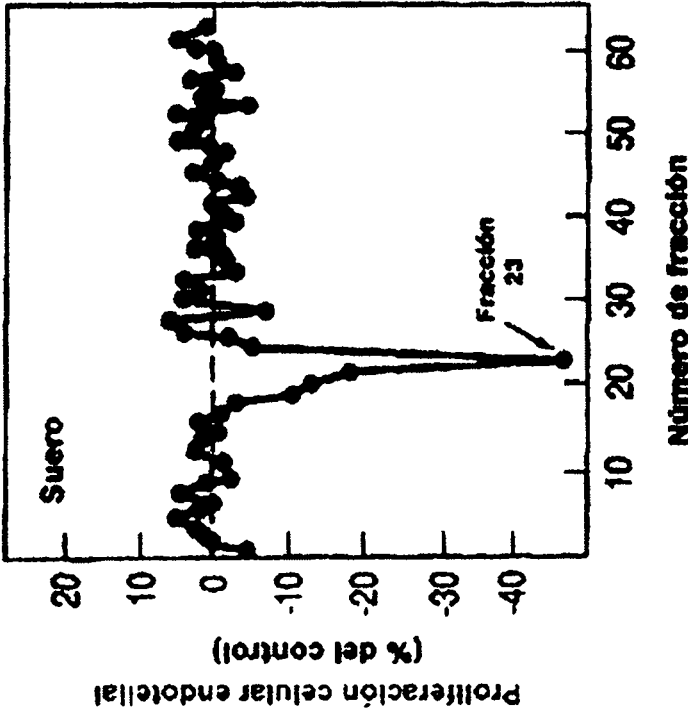


FIGURA 7A

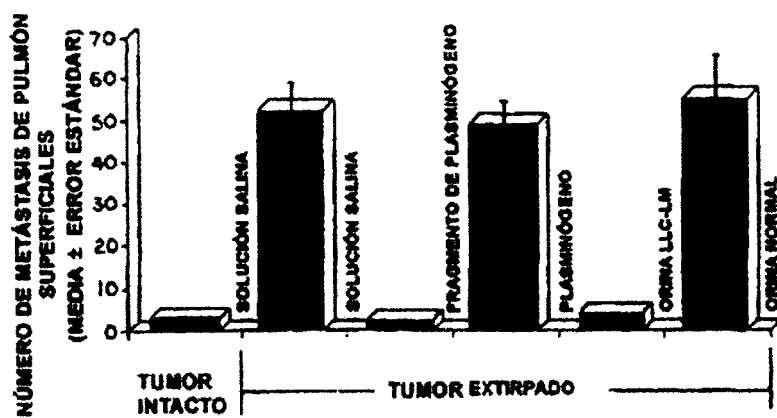


Fig. 8

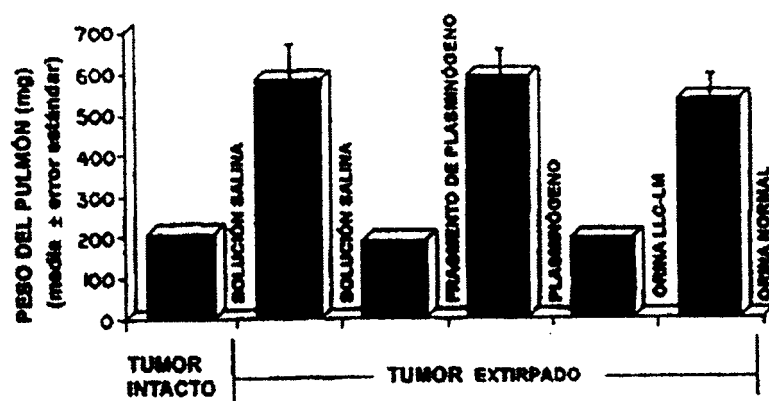


Fig. 9

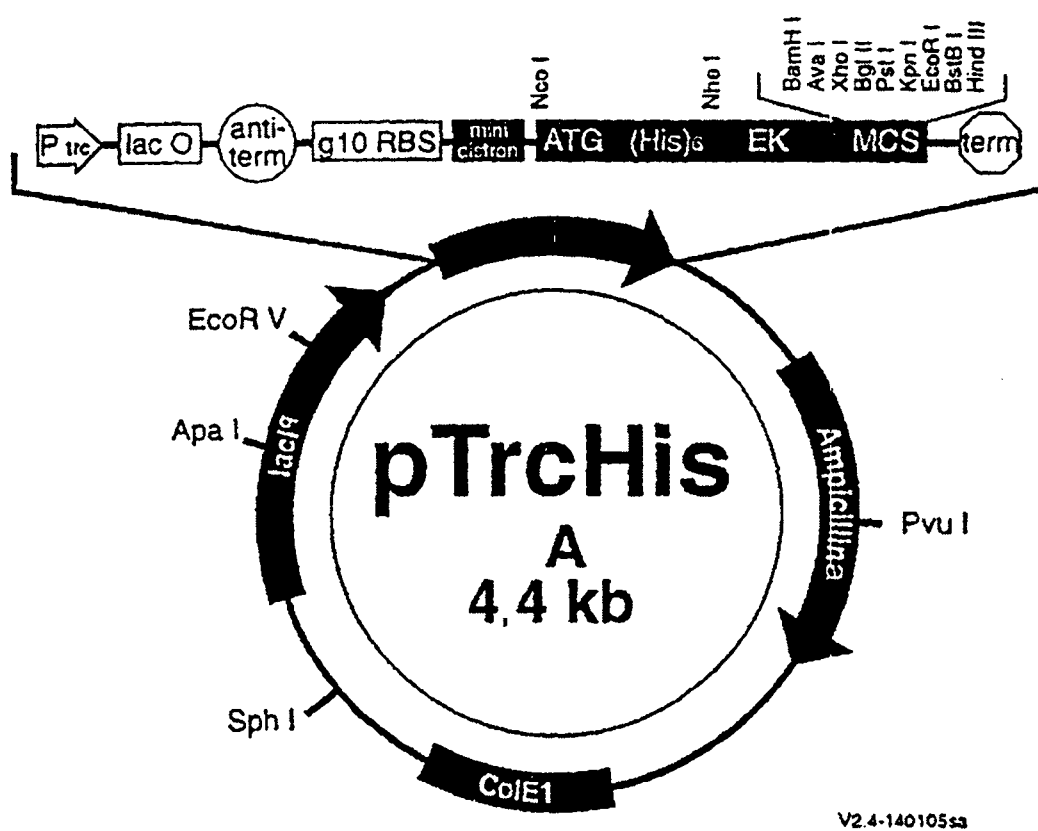


FIGURA 10

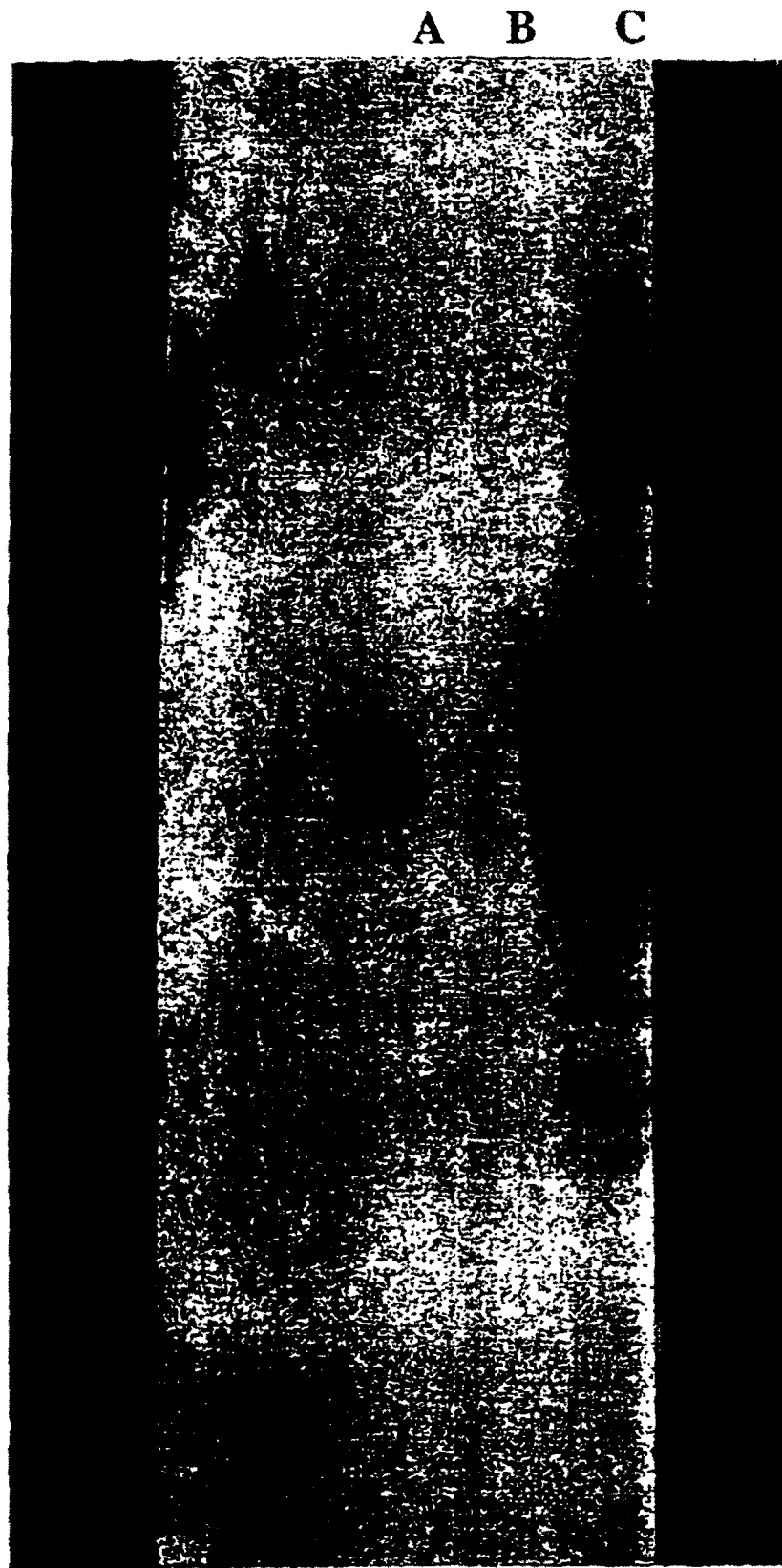
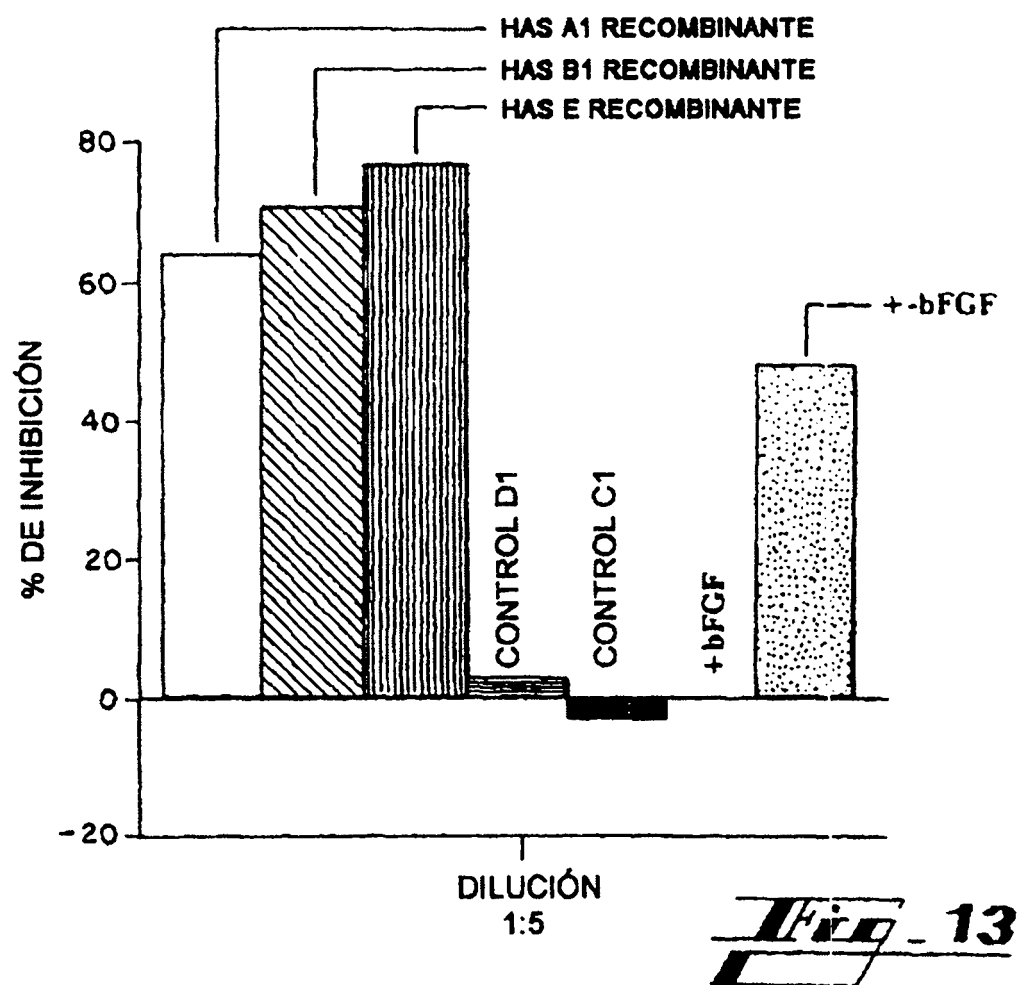


FIGURA 11



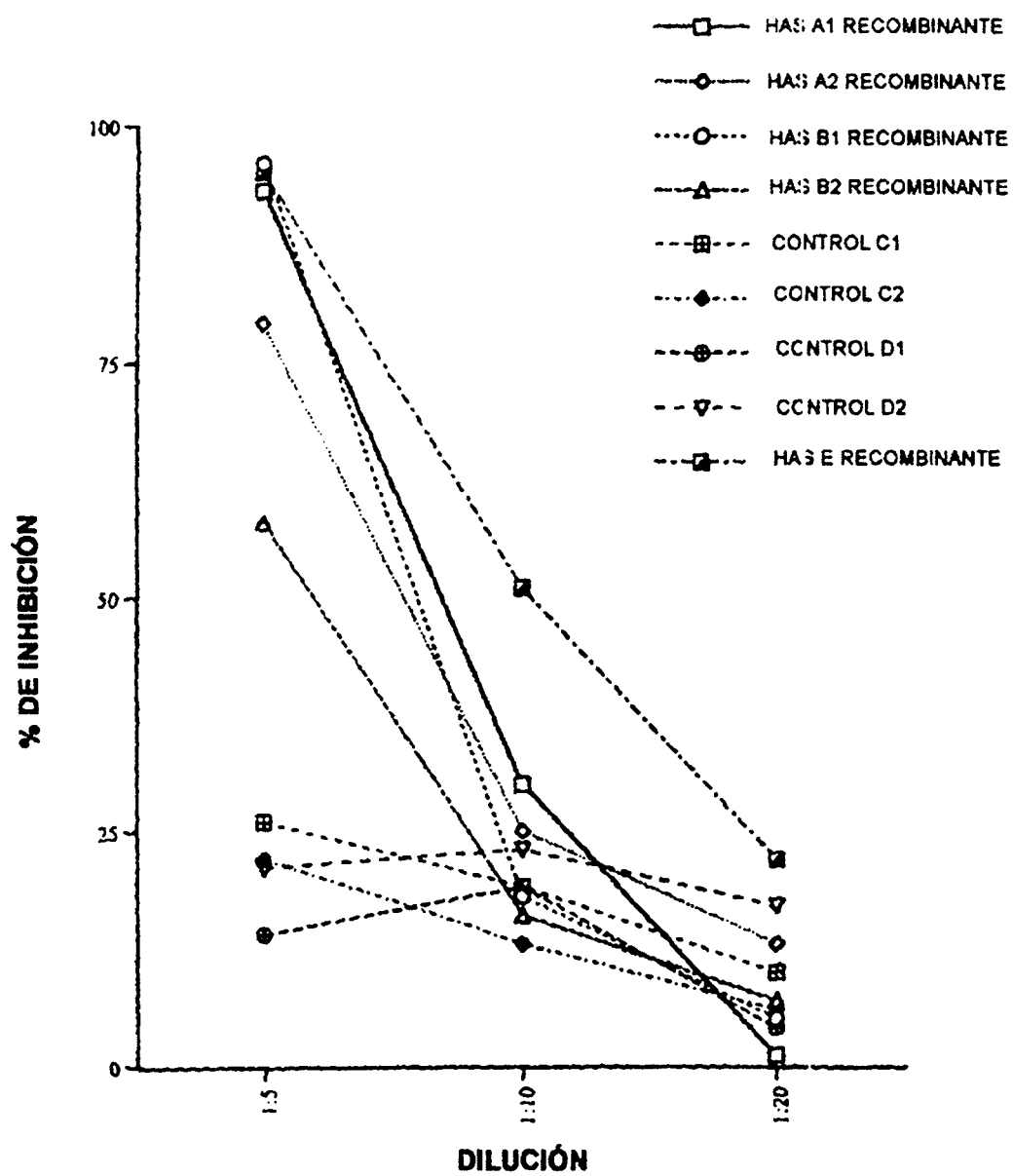


FIGURA 12

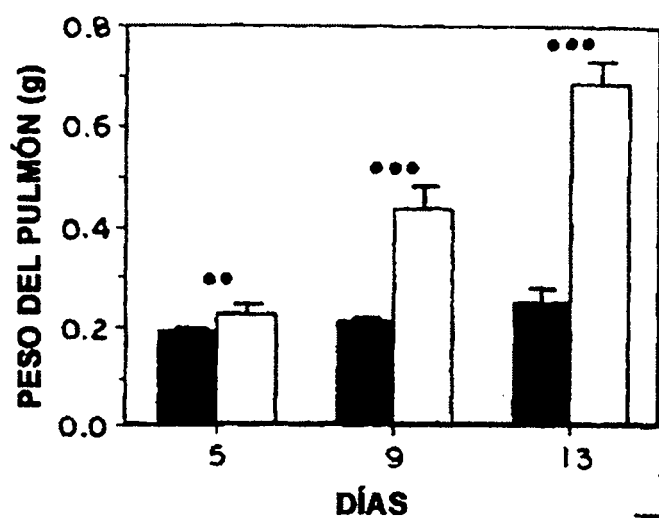


Fig. 15A

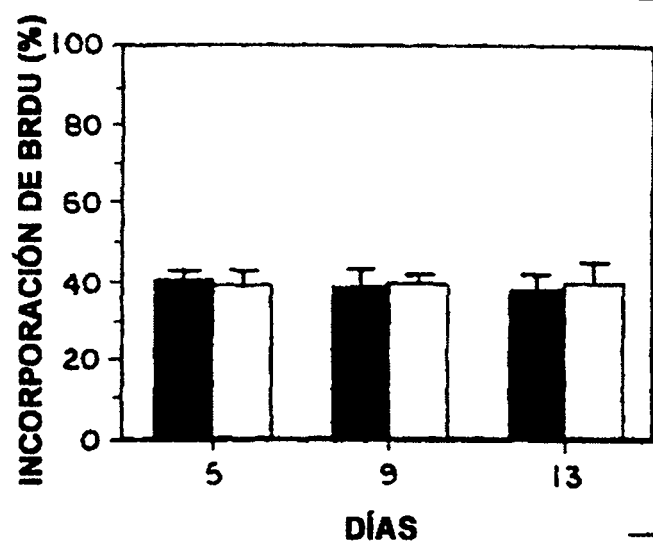


Fig. 15B

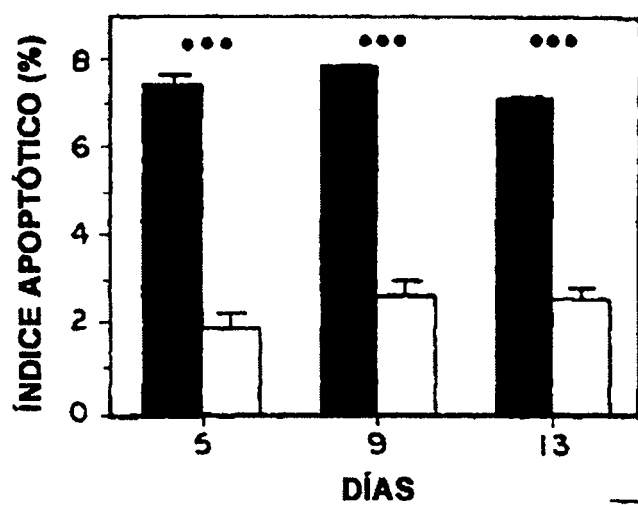


Fig. 15C

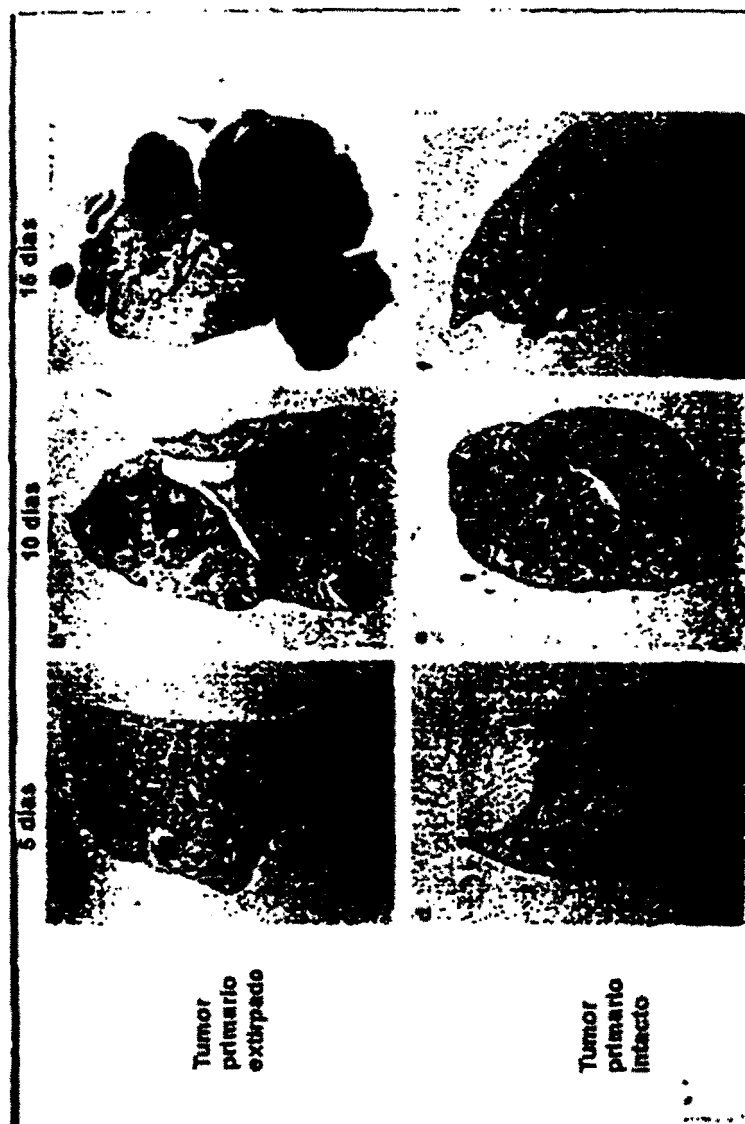


FIGURA 14

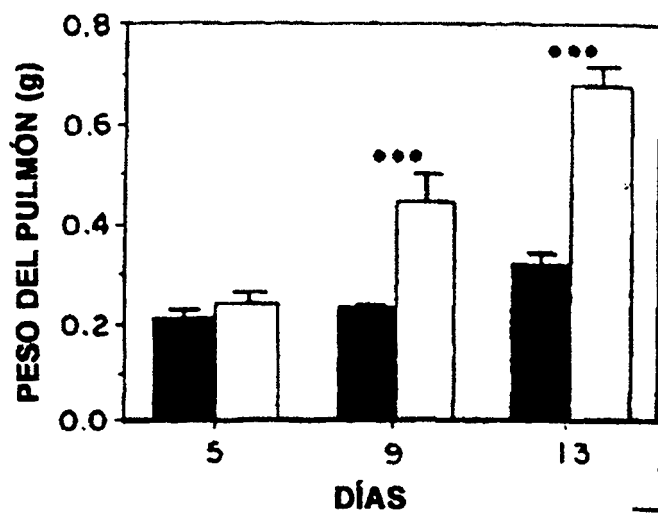


***Fig.* 16A**

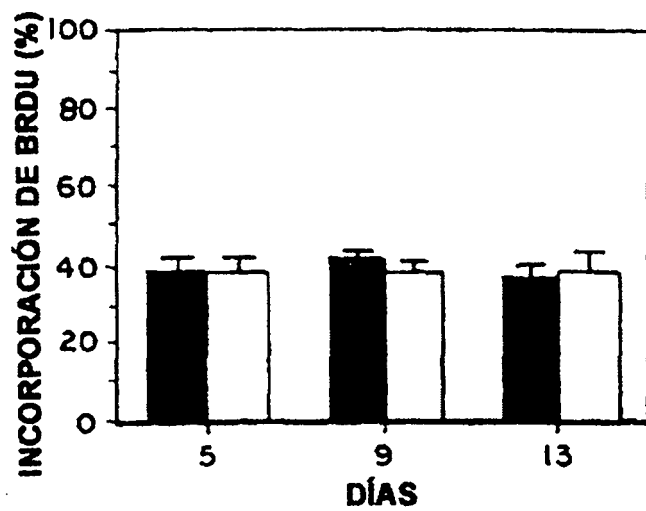


***Fig.* 16B**

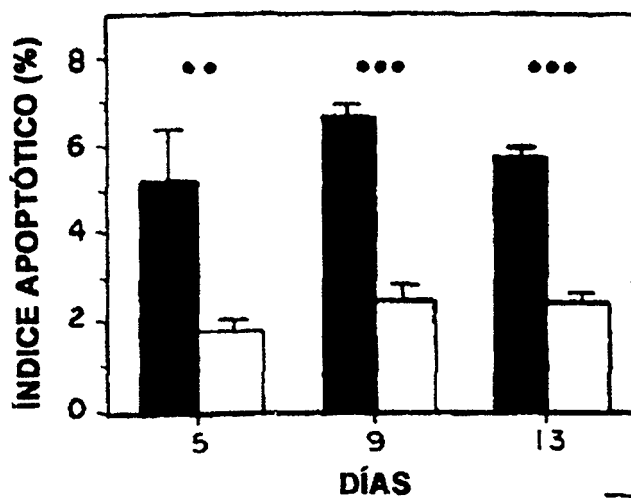


***Fig.* 16C**

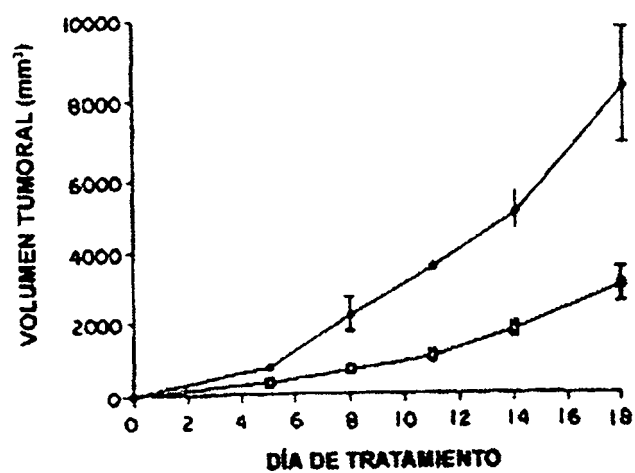


Fig. 17

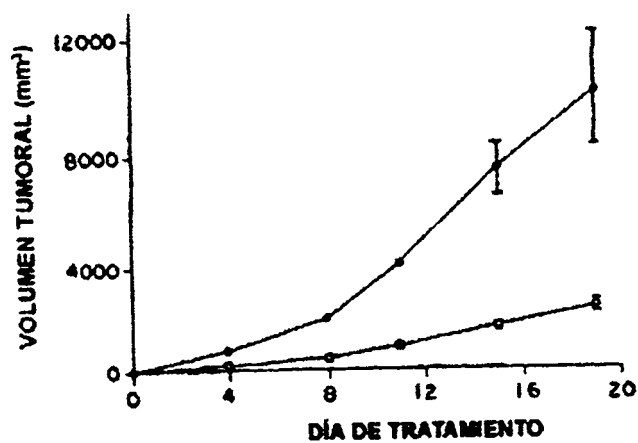


Fig. 18

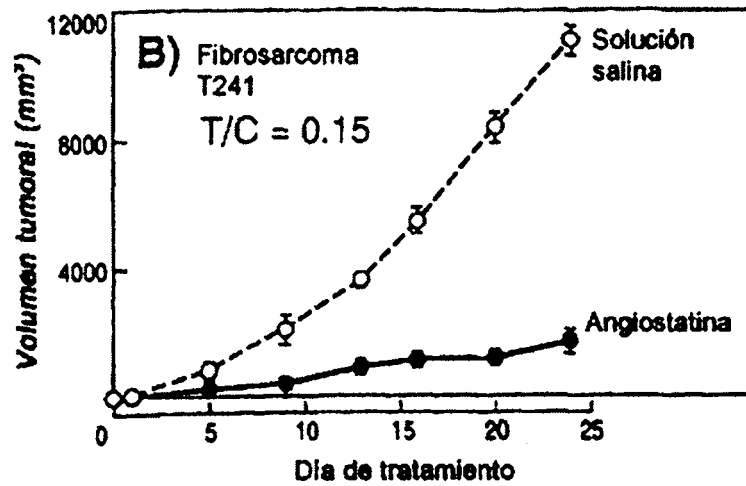


FIGURA 19

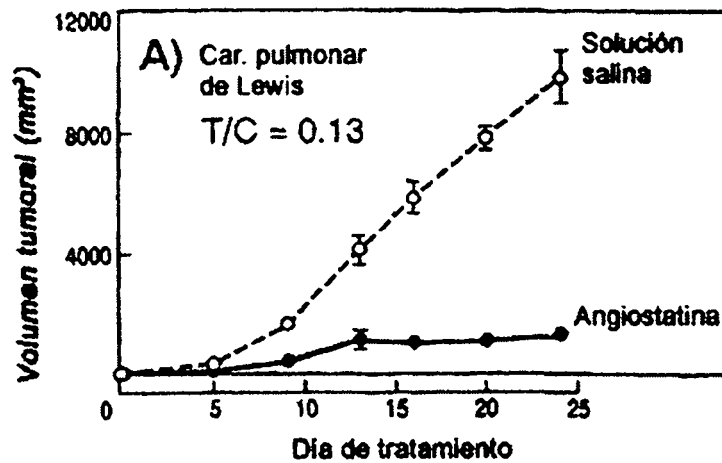


FIGURA 20

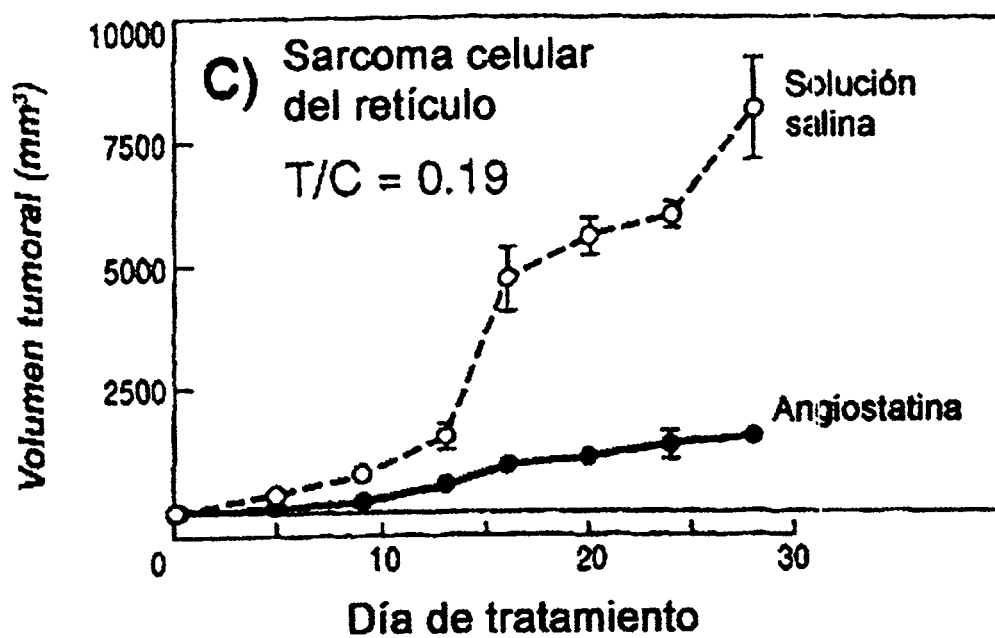
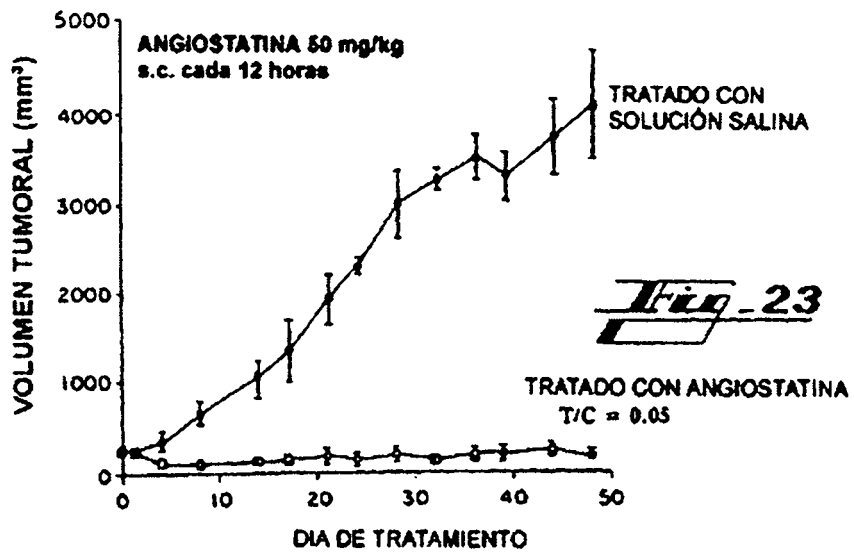
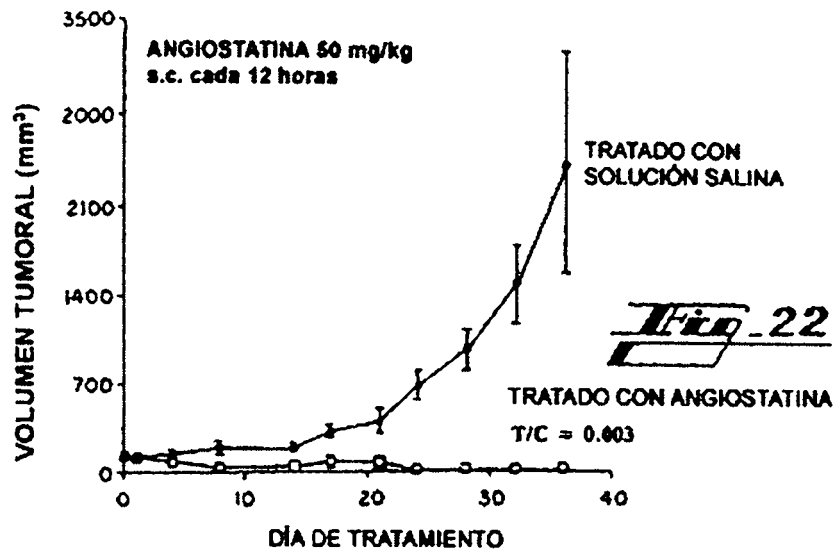


FIGURA 21



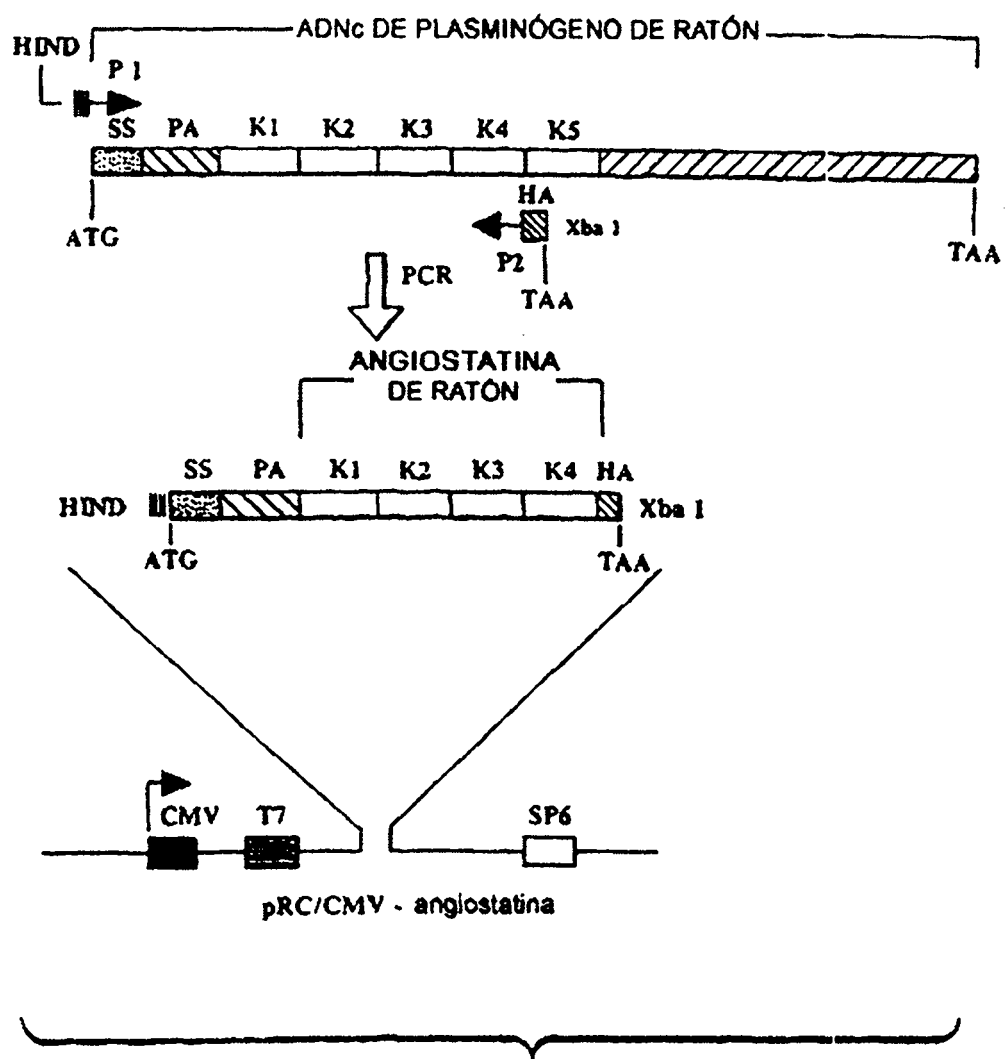


Fig. 24

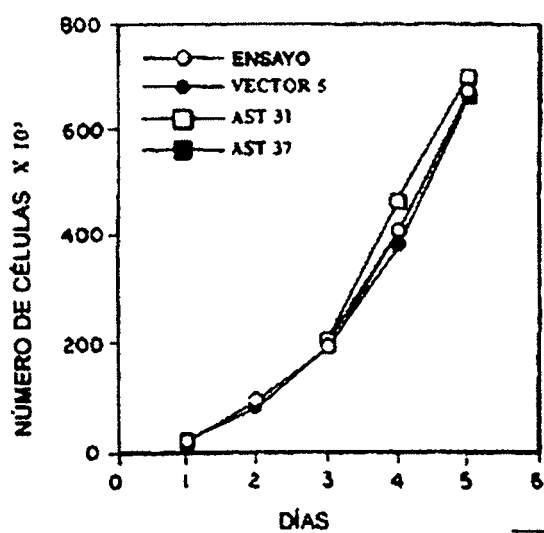


Fig. 25A

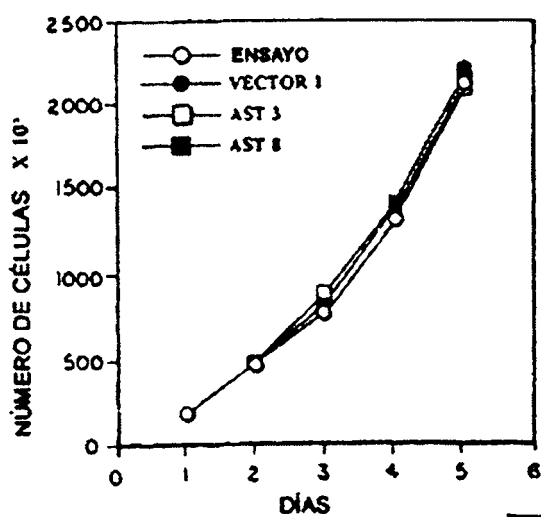


Fig. 25B

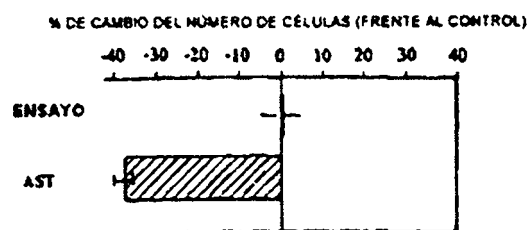


Fig. 26A

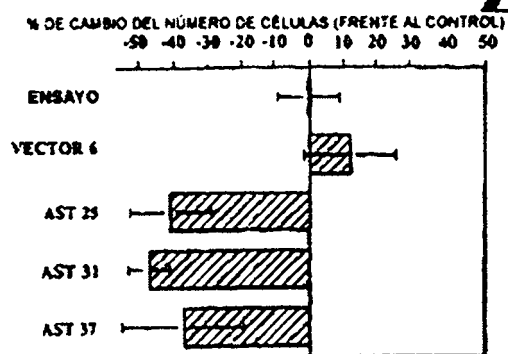


Fig. 26B

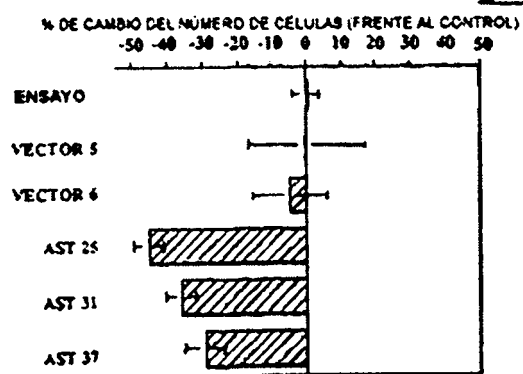


Fig. 26C

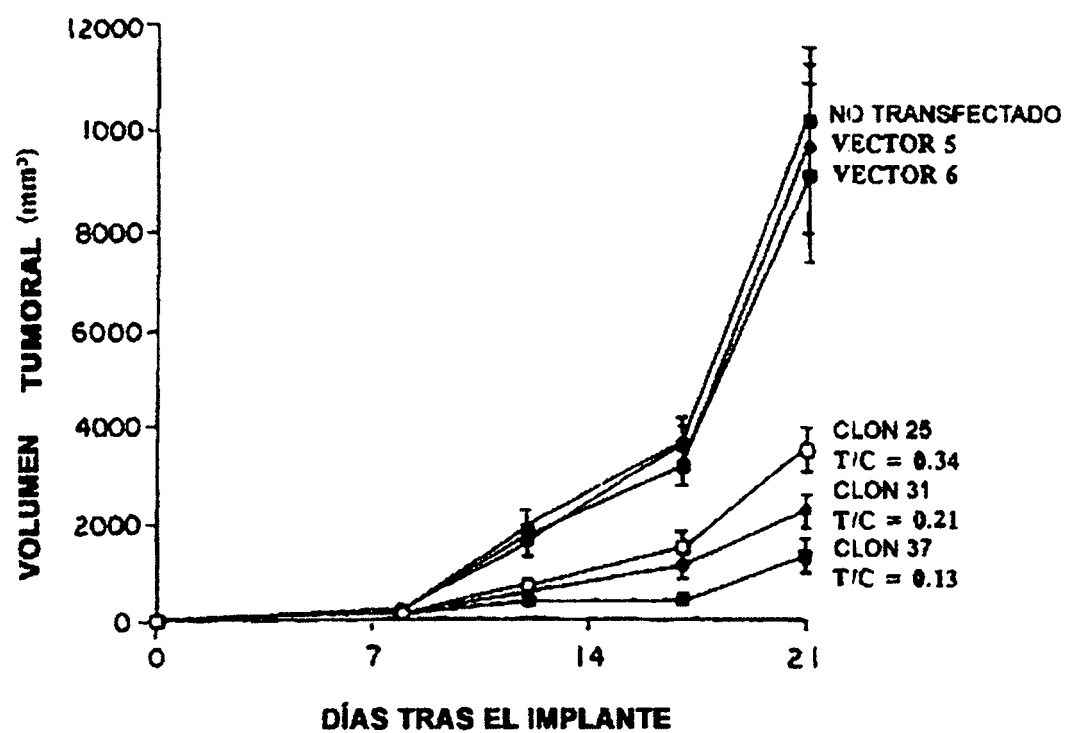


Fig. 27

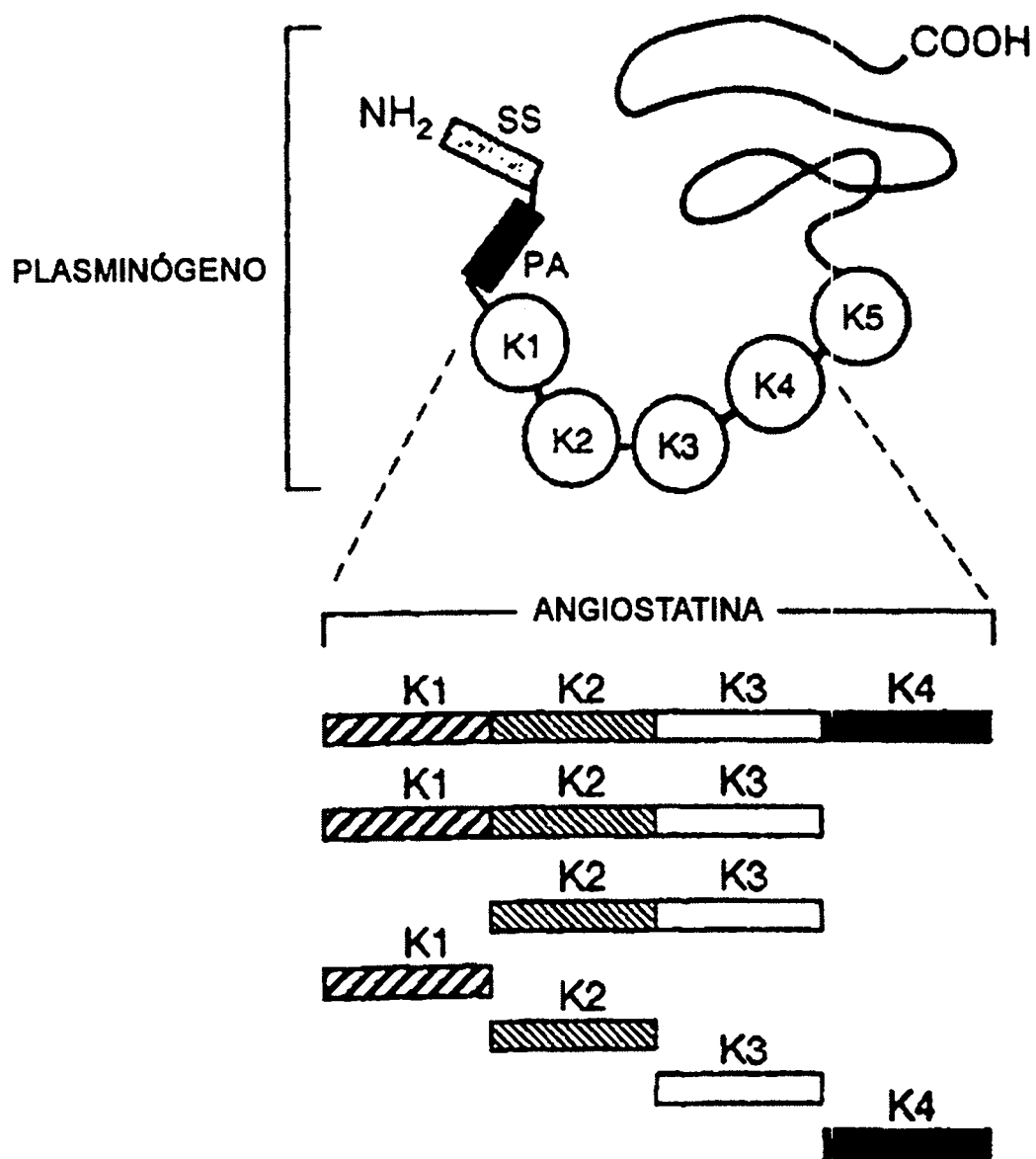


FIGURA 28

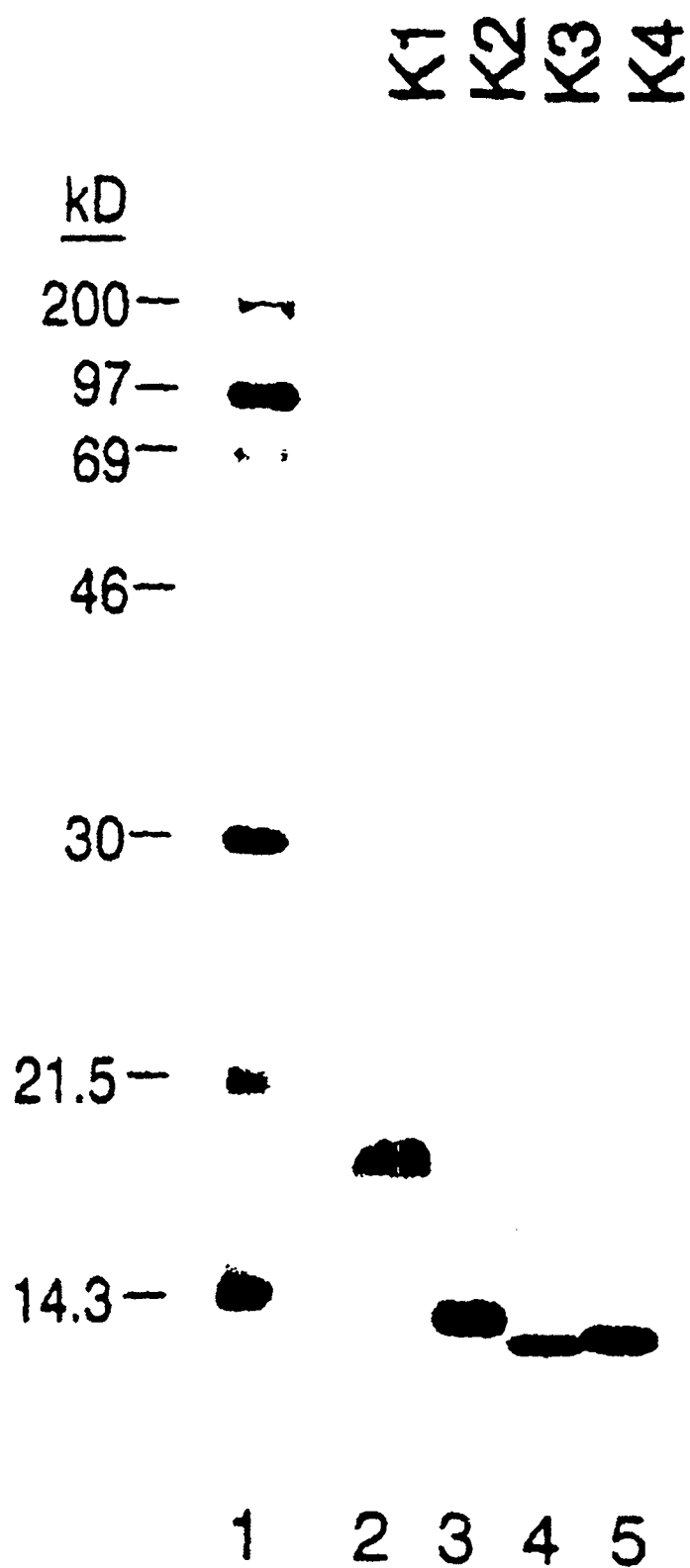


FIGURA 29A

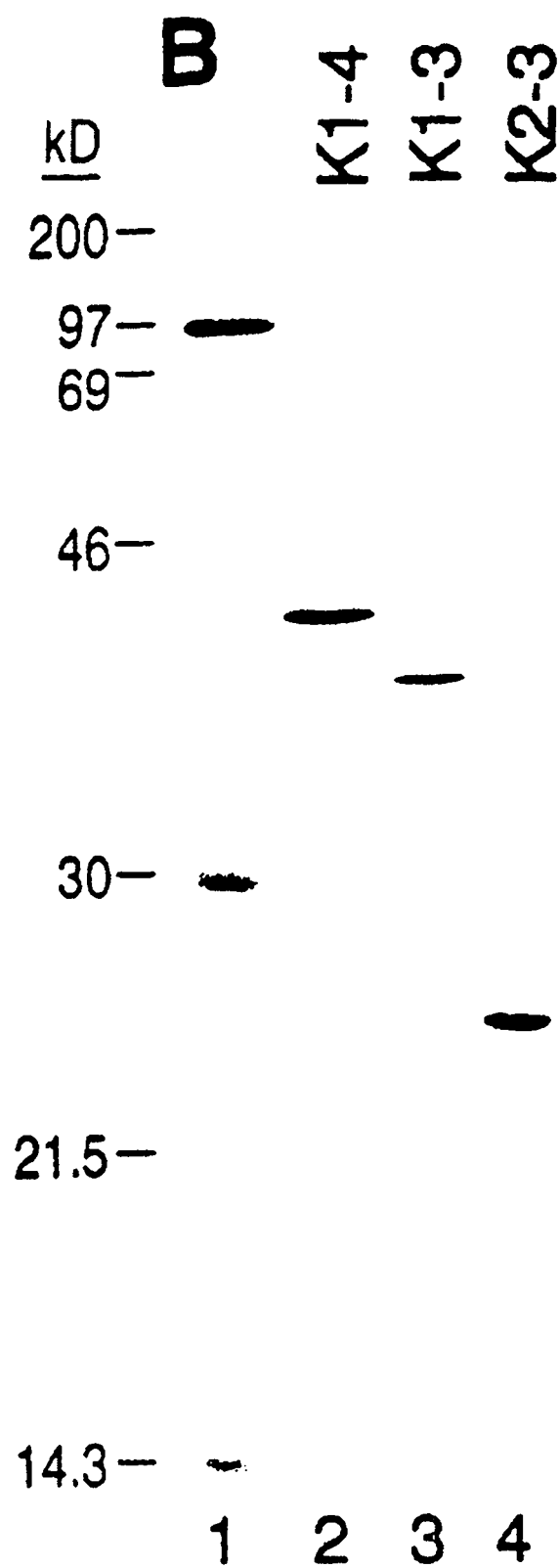


FIGURA 29B

FIGURA 30B

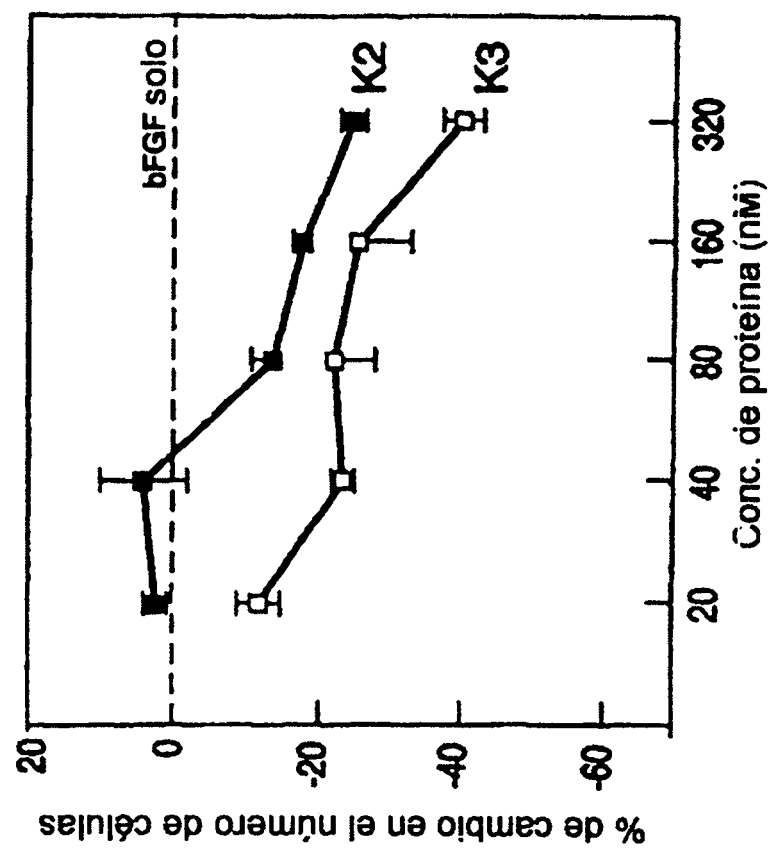
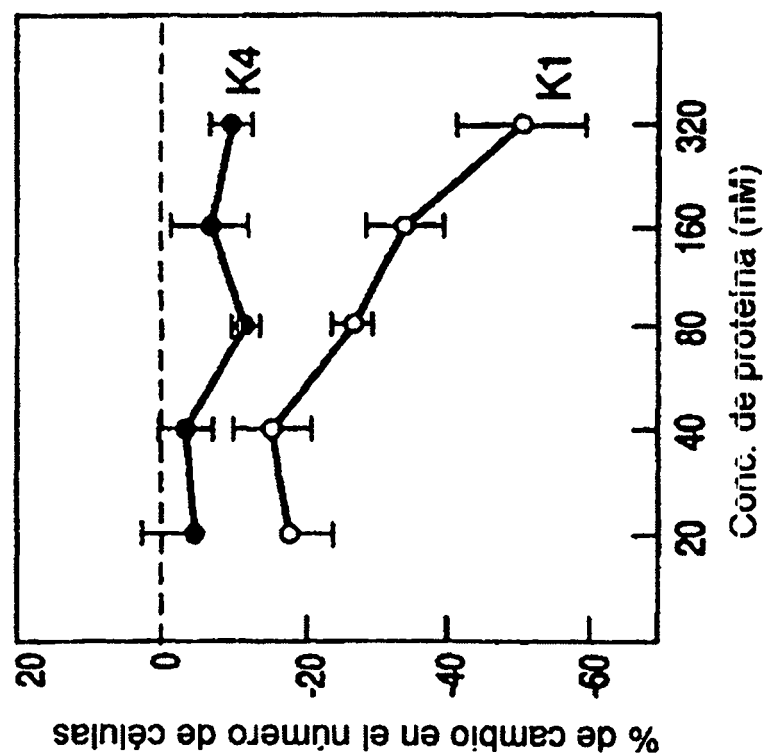


FIGURA 30A



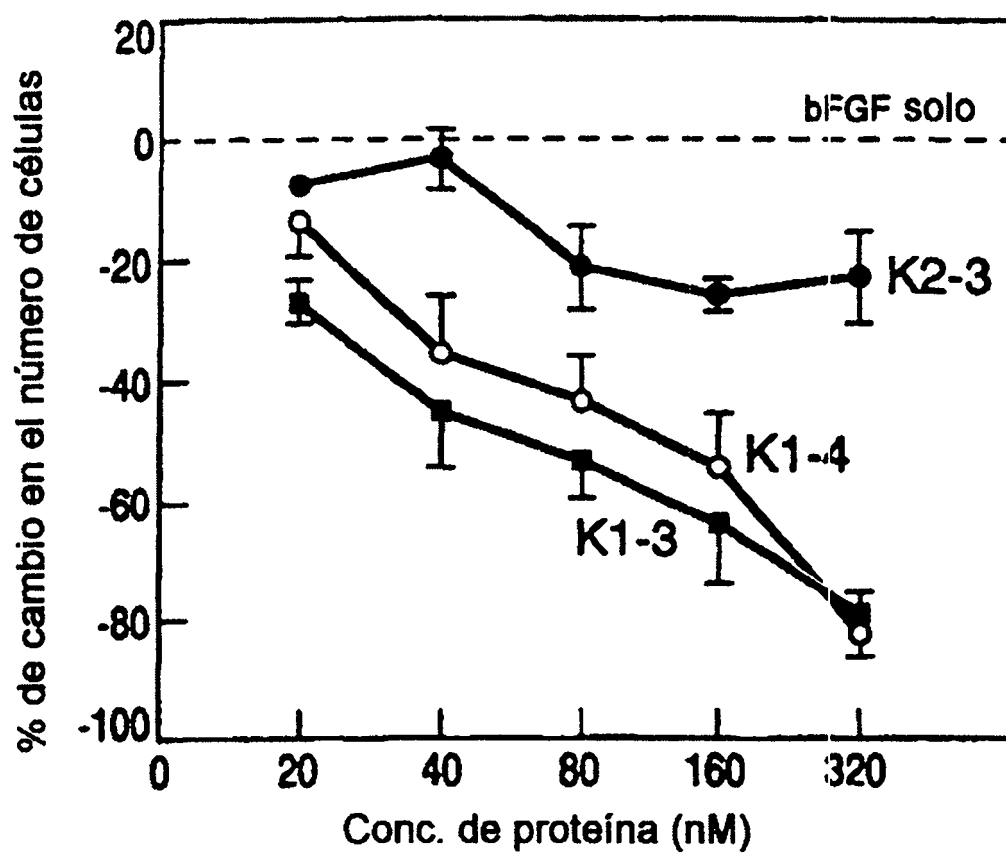


FIGURA 31

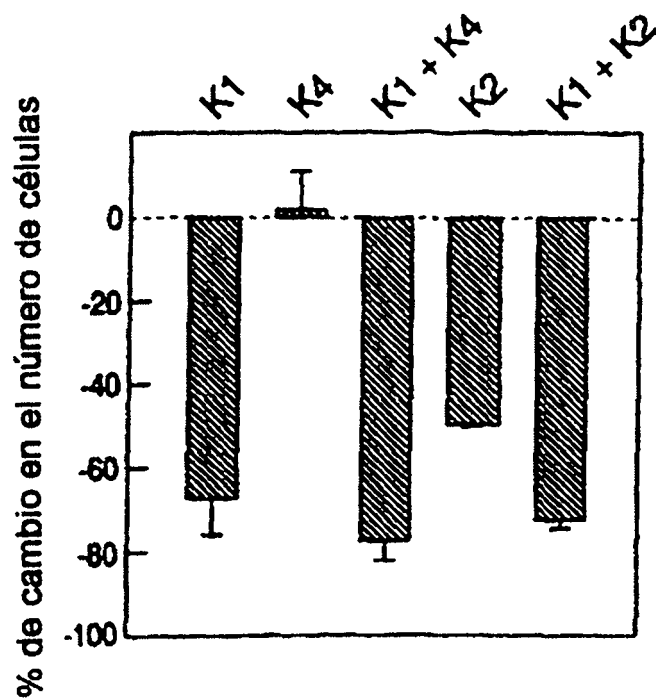


FIGURA 33A

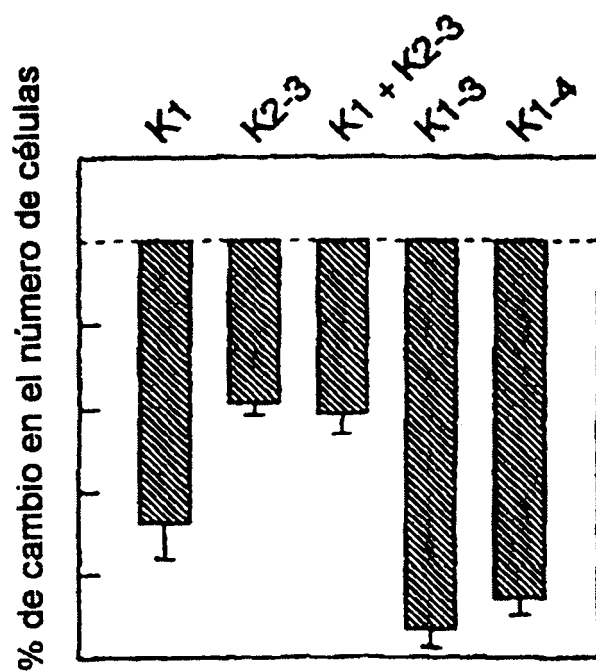


FIGURA 33B

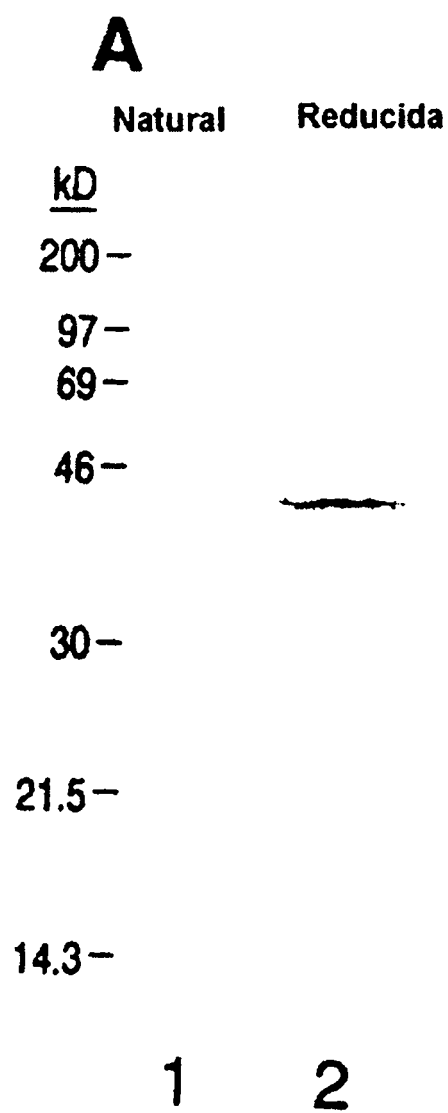


FIGURA 34A

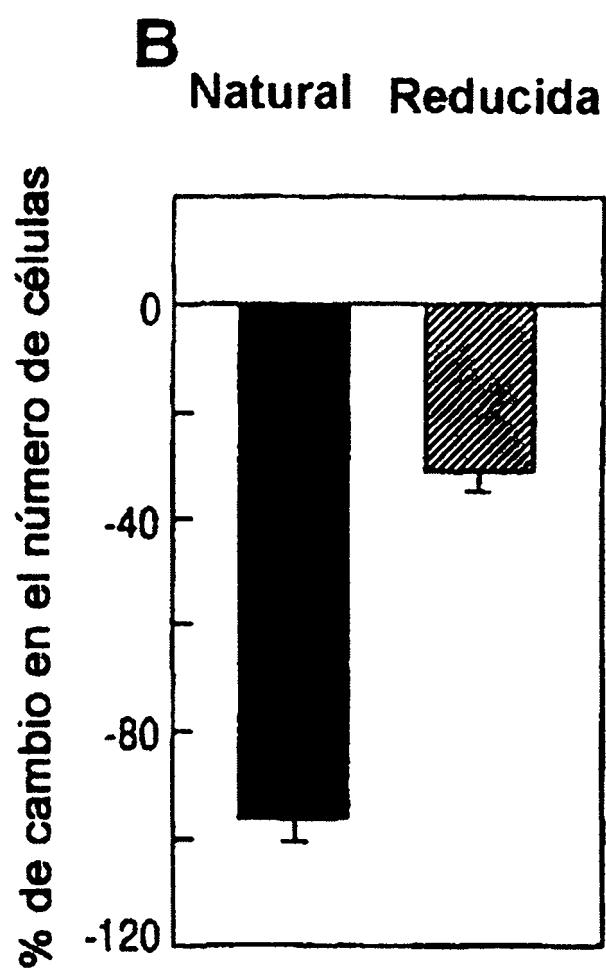


FIGURA 34B

		1	20	40
		*	*	
Kringle1		CKTGNGKNYRGTMSTKNGITCQKWSSSTSPHRP-RFSPAT		
Kringle2		CMHCSGENYDGKISKTMGLECQAWDSQSPHAG-YIPSK		
Kringle3		CLKGTTGENYRGNAVTVSGHTCQHWSAQTPHTHNR-TPEN		
Kringle4		CYHGDGQSYRGTSSTTTGKKKCQSWSSMTPHRHQK-TPEN		
		41	60	80
		*	*	*
Kringle1		HPSEGLEENYCRNPDNDPQGPWCYTTPDPEKRYDYCDILEC		
Kringle2		FPNKNLKKNYCRNPDREL-RPWCFTTDPNKRWELCDIPRC		
Kringle3		FPCKNLDENYCRNPDGKR-APWCHTTNSQVRWEYCKIPSC		
Kringle4		YPNAGLTMNYCRNPDADK-GPWCFTTDPNKRWELCDILEC		

FIGURA 35

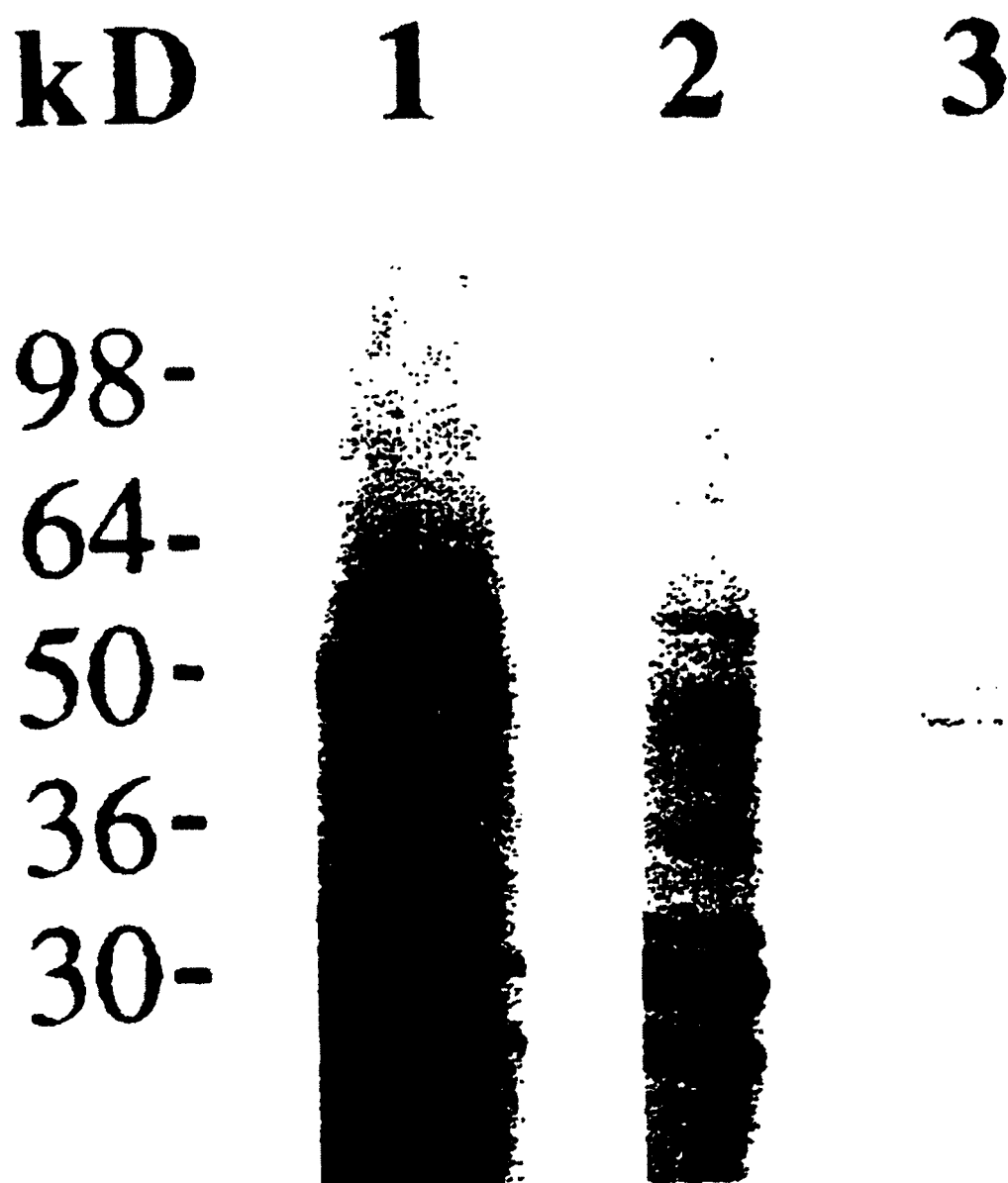


FIGURA 36A

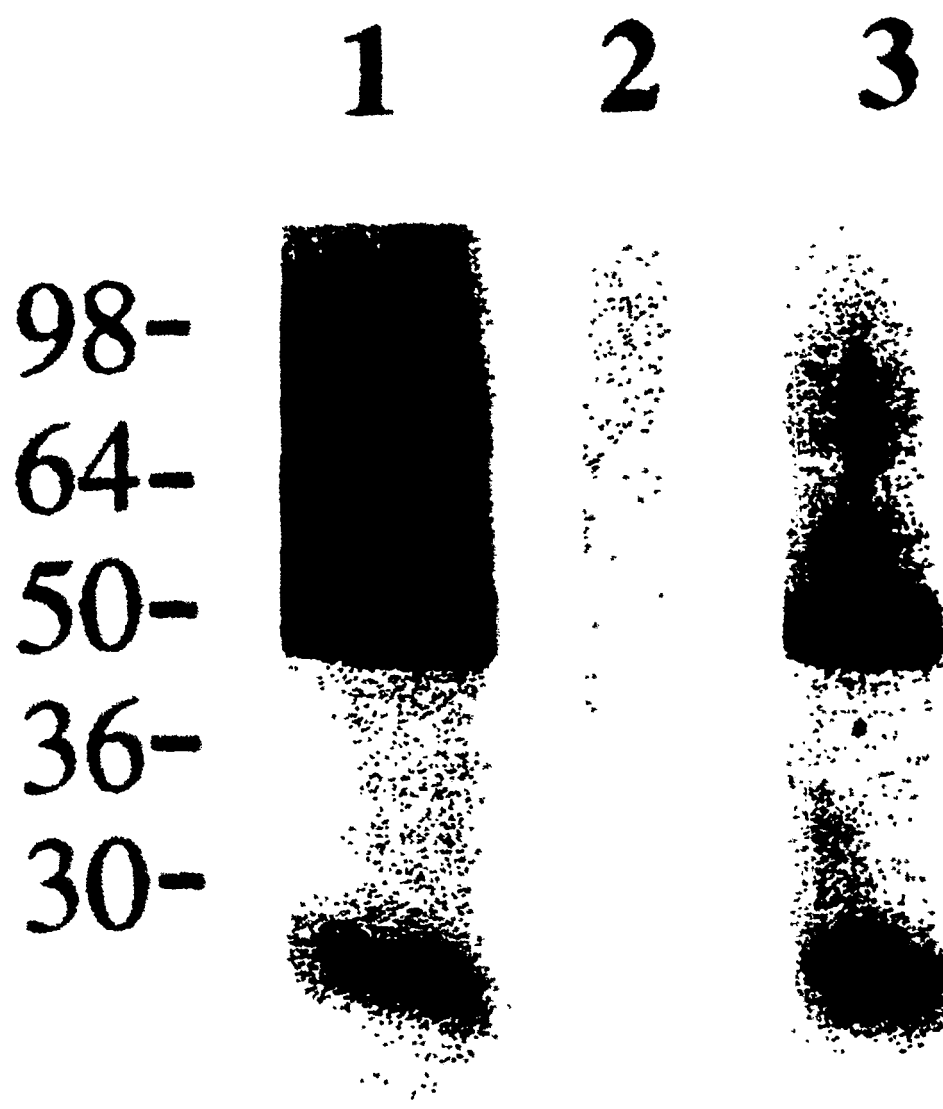


FIGURA 36B

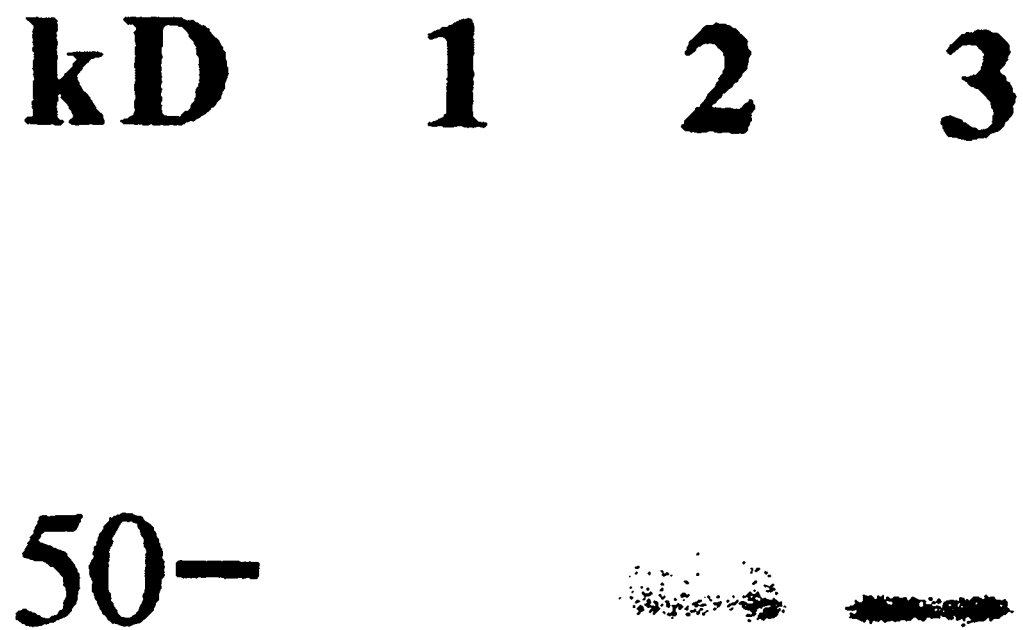


FIGURA 37A

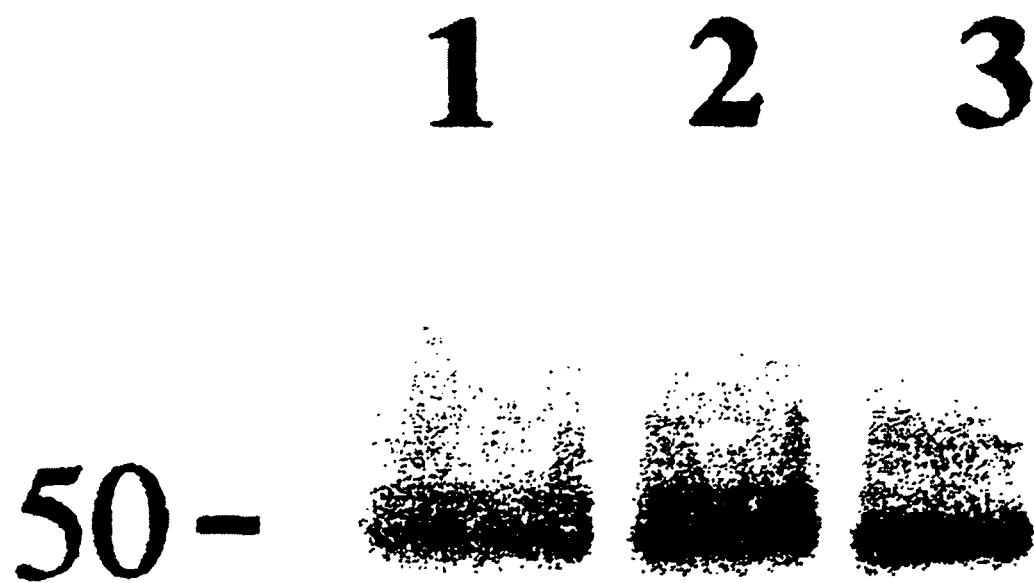


FIGURA 37B

ES 2 292 174 T3



FIGURA 38A

Fig. 38C

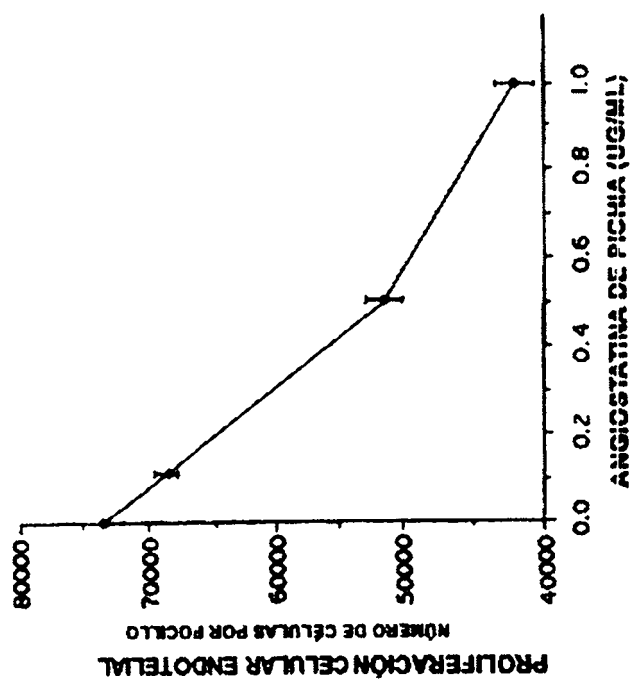
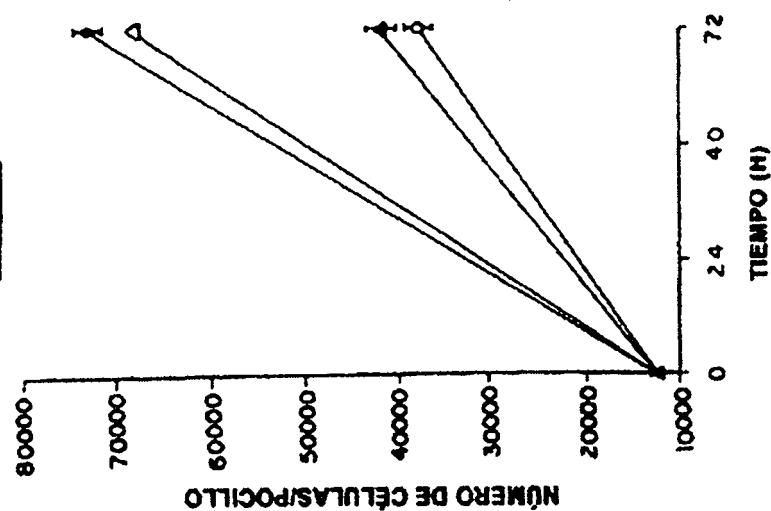


Fig. 38B



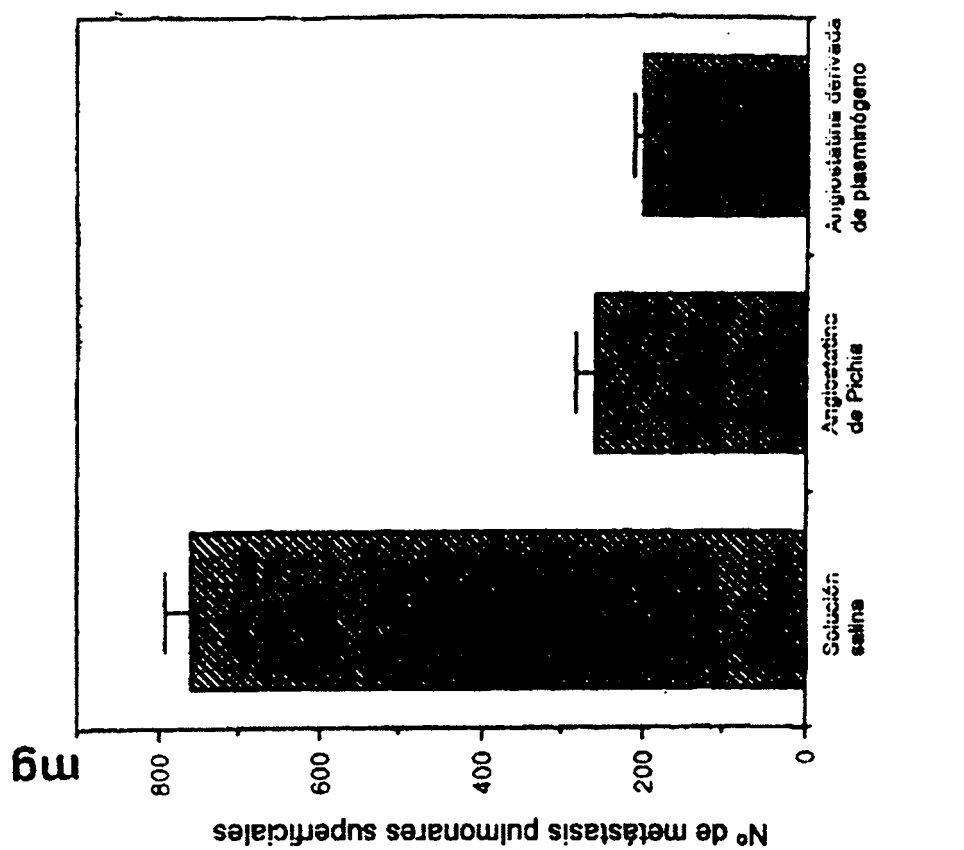


FIGURA 39B

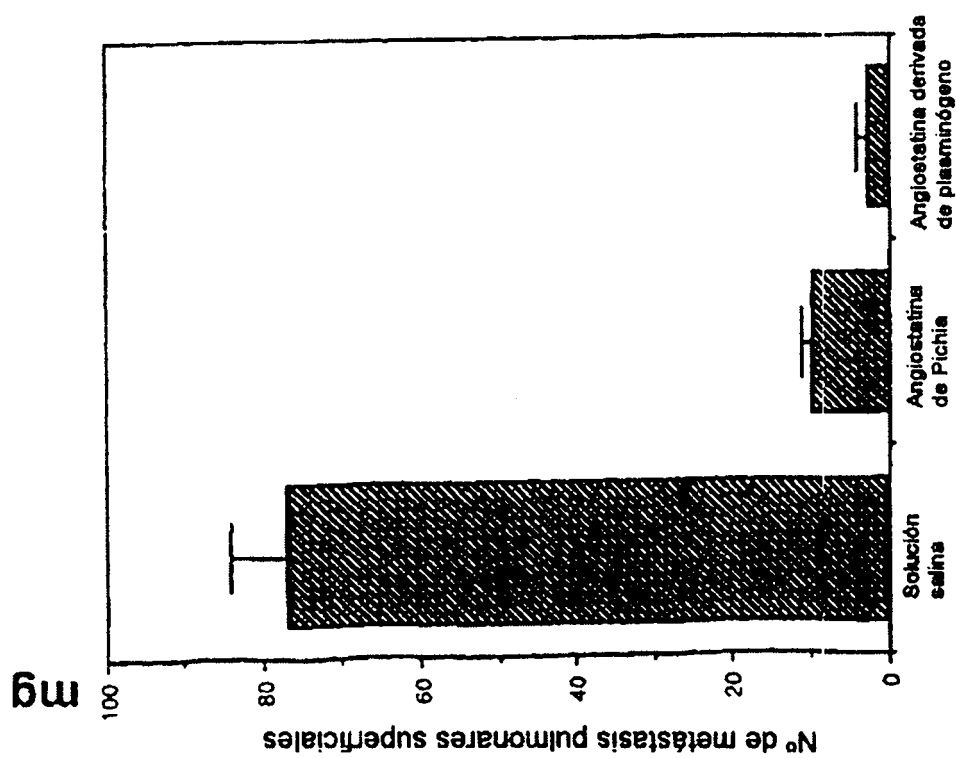


FIGURA 39A



FIGURA 40

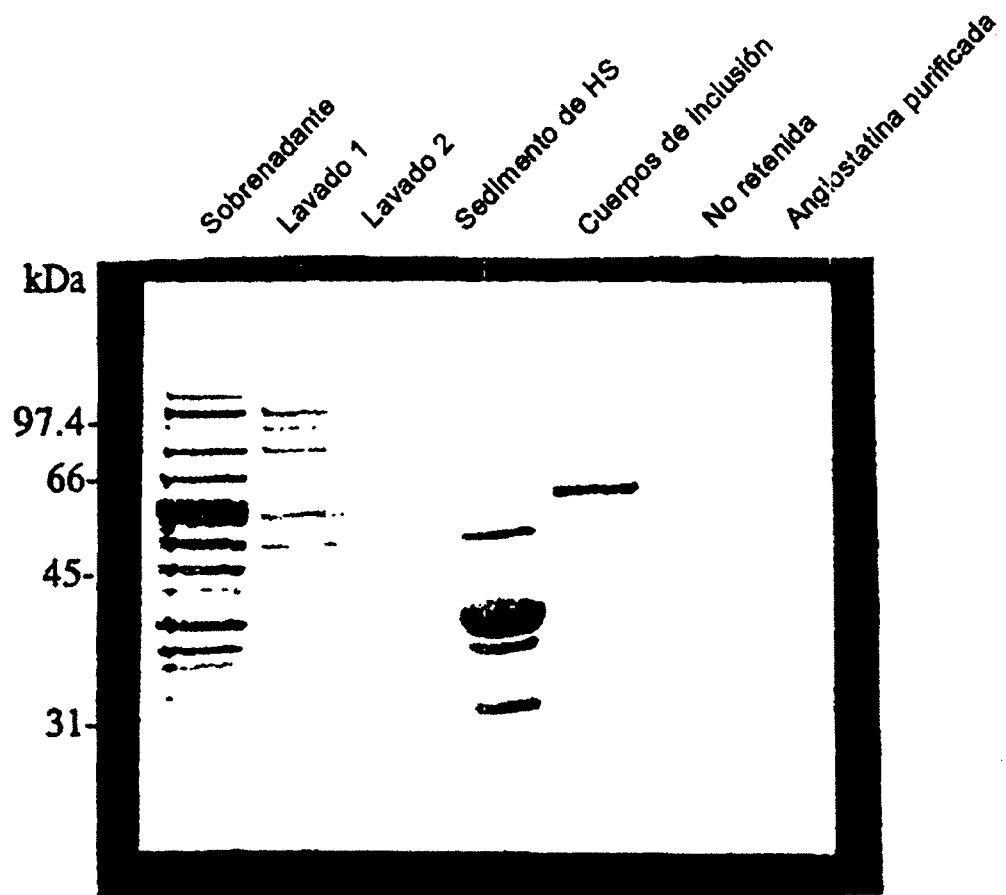


FIGURA 41

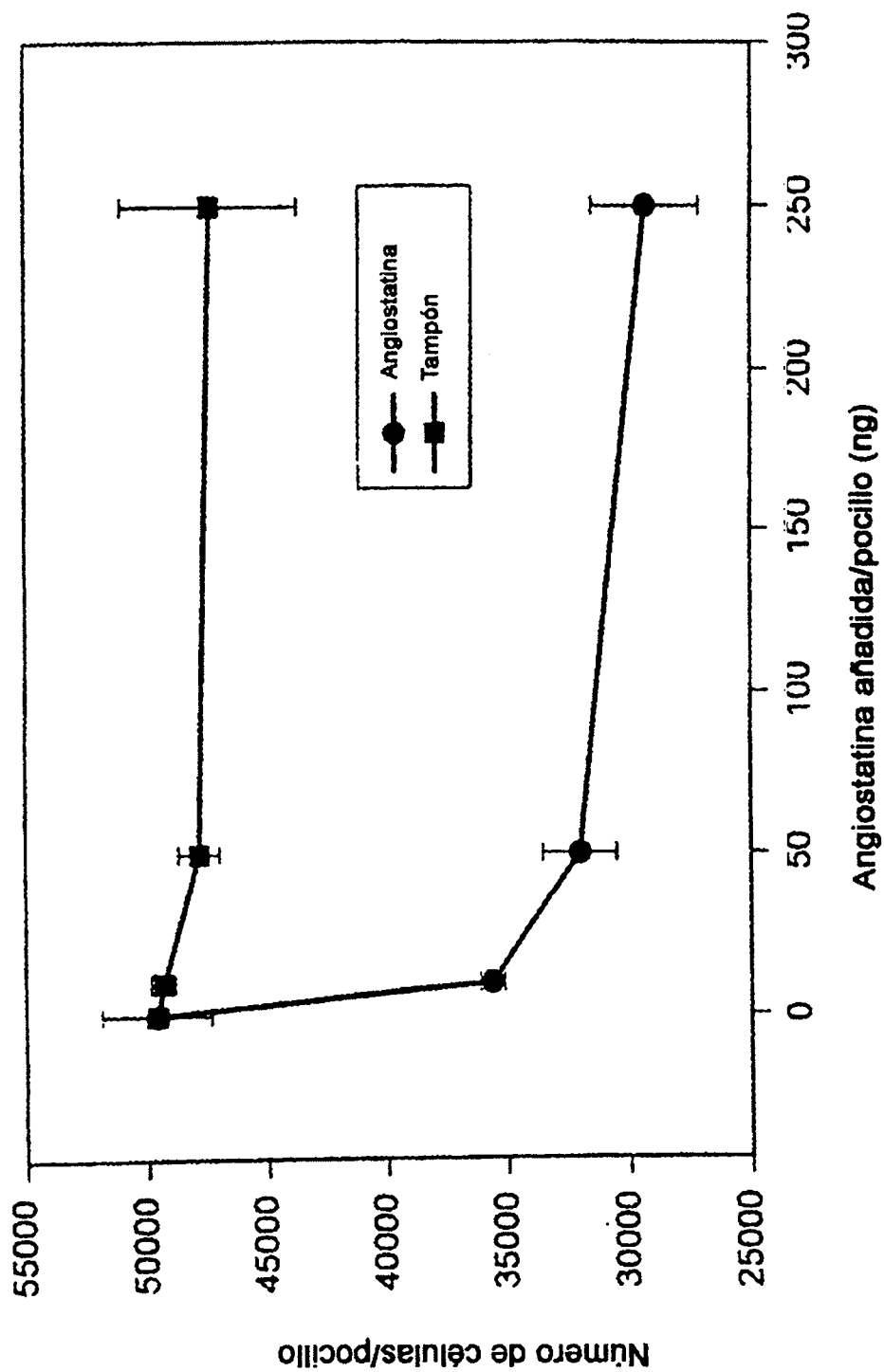


FIGURA 42

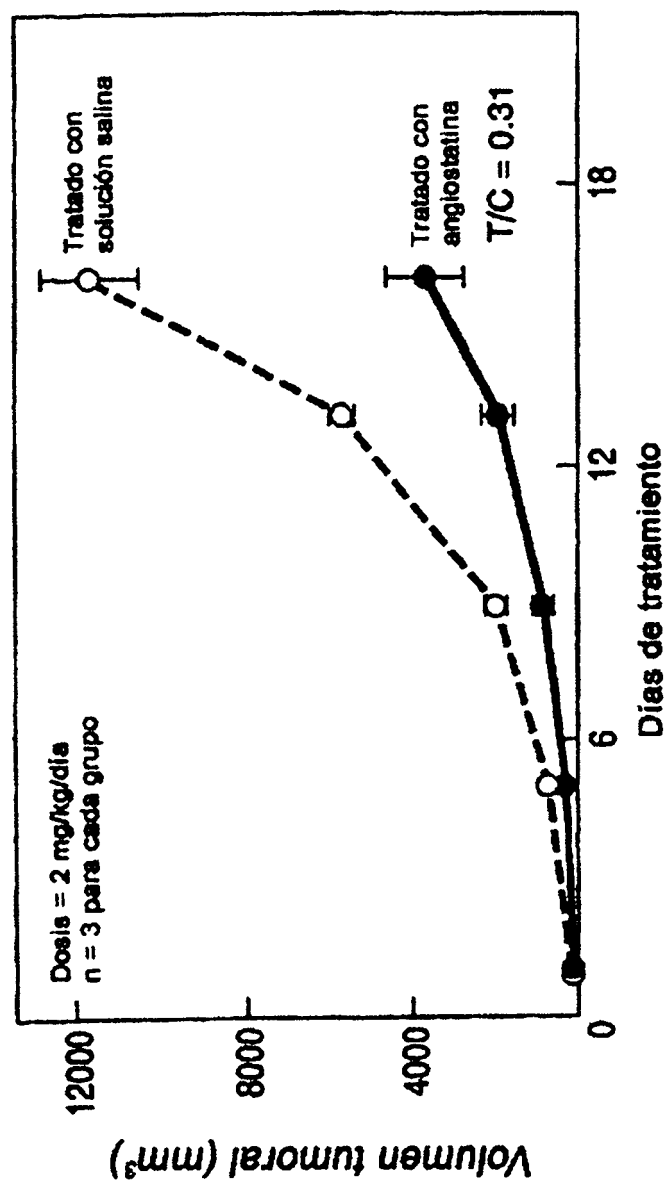


FIGURA 43

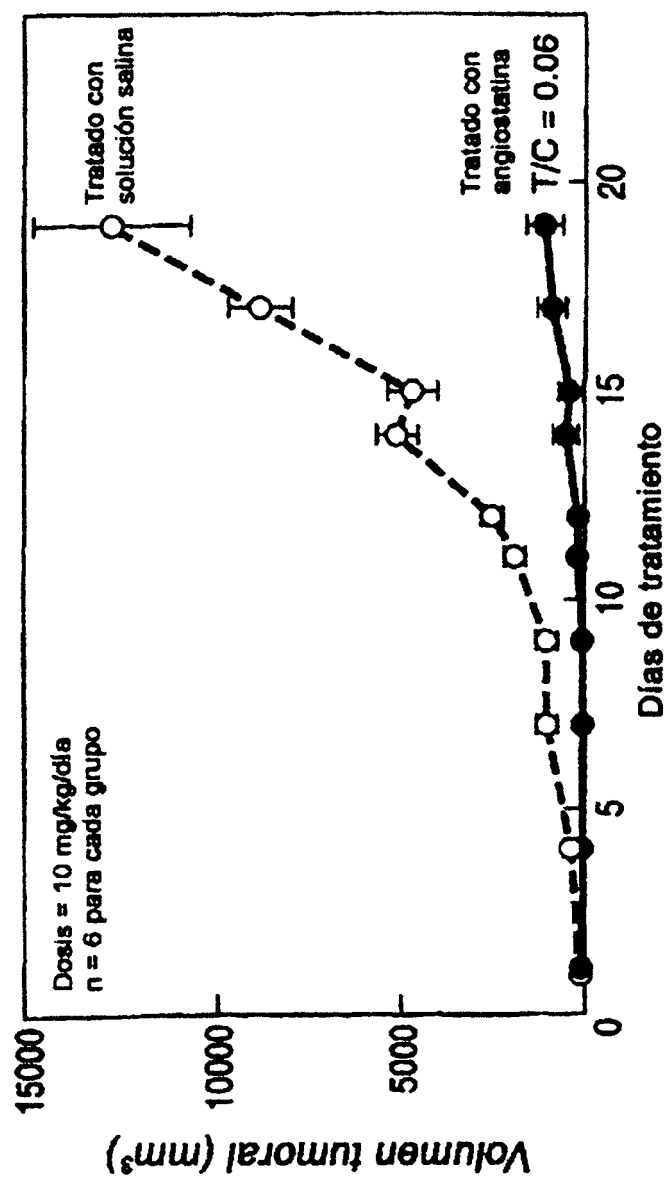


FIGURA 44

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Folkman, M. Judah
O'Reilly, Micheal
Yihai Cao
Sim, B. Kim Lee
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Fragmentos de angiostatina y método de uso
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 45
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: Jones & Askew
(B) CALLE: 191 Peachtree Street, planta 37º
(C) CIUDAD: Atlanta
20 (D) ESTADO: Georgia
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) CÓDIGO POSTAL: 30303-1769
- 25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: Patent In Release nº 1.0, Versión nº 1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
35 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: Warren, William L.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.714
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 05213-0126
- 45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 404-818-3700
(B) TELEFAX: 404-818-3799

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 812 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- 65 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:

ES 2 292 174 T3

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: Plasminógeno

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

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

ES 2 292 174 T3

	Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Asp	Cys	Gln	Ala	
			195					200					205				
5	Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ala	Lys	Phe	
		210					215					220					
10	Pro	Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Met	Asn	Tyr	Cys	His	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	
		225				230					235					240	
15	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				
20	Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	
			275					280					285				
25	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	
30	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	
				325						330					335		
35	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	
40			355					360					365				
	Glu	Gln	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Glu	Cys	Tyr	Gln	Ser	Asp	Gly	Gln	Ser	
		370					375					380					
45	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Cys	Gln	Ser	
		385				390					395					400	
50	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			
55	Lys	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	
			435					440					445				
60	Cys	Asn	Leu	Lys	Arg	Cys	Ser	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Val	Val	Glu	Leu	
		450					455					460					
65	Pro	Thr	Val	Ser	Gln	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Asp	
		465				470					475					480	

ES 2 292 174 T3

	Cys	Met	Tyr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asp	Tyr	Arg	Gly	Lys	Thr	Ala	Val	Thr	
					485					490					495		
5	Ala	Ala	Gly	Thr	Pro	Cys	Gln	Gly	Trp	Ala	Ala	Gln	Glu	Pro	His	Arg	
				500					505					510			
10	His	Ser	Ile	Phe	Thr	Pro	Gln	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Asp	Leu	Glu	Lys	
			515					520					525				
15	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	
		530					535					540					
20	Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Pro	Leu	Cys	
	545					550					555					560	
25	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Phe	Glu	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Val	Glu	Pro	Lys	
					565					570						575	
30	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Asn	Pro	His	Ser	
				580					585						590		
35	Trp	Pro	Trp	Gln	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Thr	Gly	Gln	His	Phe	
			595					600					605				
40	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	
		610					615					620					
45	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Ser	Arg	Pro	Glu	Phe	Tyr	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	
	625					630					635					640	
50	Ala	His	Glu	Glu	Tyr	Ile	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Ile	Ser	Val	
					645					650					655		
55	Ala	Lys	Leu	Ile	Leu	Glu	Pro	Asn	Asn	Arg	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	
				660					665					670			
60	Leu	Ser	Arg	Pro	Ala	Thr	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Leu	
			675					680					685				
65	Pro	Ser	Pro	Asn	Tyr	Met	Val	Ala	Asp	Arg	Thr	Ile	Cys	Tyr	Ile	Thr	
		690					695					700					
70	Gly	Trp	Gly	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	
	705					710					715					720	
75	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Val	Glu	Tyr	
					725					730					735		
80	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Lys	Ser	Thr	Glu	Leu	Cys	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	
				740					745					750			

ES 2 292 174 T3

	Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys	755	760	765
5	Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu	770	775	780
10	Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg	785	790	795
	Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn	805	810	
15				

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

- | | |
|----|---|
| 20 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: |
| | (A) LONGITUD: 339 aminoácidos |
| | (B) TIPO: aminoácido |
| 25 | (C) TIPO DE CADENA: |
| | (D) TOPOLOGÍA: lineal |
| | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína |
| 30 | (iii) HIPOTÉTICA: NO |
| | (iv) ANTISENTIDO: NO |
| | (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal |
| 35 | (vi) FUENTE ORIGINAL: |
| | (A) ORGANISMO: Murino |
| | (vii) FUENTE INMEDIATA: |
| 40 | (B) CLON: Fragmento de angiostatina |
| | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2: |

45	Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly	1	5	10	15
50	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	
55	Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln Gly	50	55	60	
60	Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn	65	70	75	80

65

ES 2 292 174 T3

Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr
 85 90 95
 5 Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp
 100 105 110
 10 Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro
 115 120 125
 Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro
 130 135 140
 15 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys
 145 150 155 160
 20 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser 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
 25 Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
 195 200 205
 30 Arg 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
 35 Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu
 245 250 255
 40 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
 45 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 50 Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
 305 310 315 320
 55 Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys
 325 330 335
 Gly Pro Trp

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 339 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido

ES 2 292 174 T3

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: Fragmento de angiotatina

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 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	

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 339 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
- 55 (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 60 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: mono Rhesus
- 65 (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: Fragmento de angiostatina

ES 2 292 174 T3

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

5	Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly	1	5	10	15
10	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	
15	Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly	50	55	60	
20	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	
25	Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp	100	105	110	
30	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	
35	Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys	145	150	155	160
40	Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr	165	170	175	
45	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	
50	Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu	210	215	220	

ES 2 292 174 T3

	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Lys	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr
	225					230					235					240
5	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
10				260					265					270		
	Leu	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Glu	Cys	Tyr	His	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Tyr
			275					280					285			
15	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	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
20		305				310					315					320
	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys
					325					330					335	
25																
	Gly	Pro	Trp													

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 339 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Porcino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: Fragmento de angiostatina

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 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		

ES 2 292 174 T3

	Ser	Ser	Pro	His	Ile	Pro	Lys	Tyr	Ser	Pro	Glu	Lys	Phe	Pro	Leu	Ala	
			35					40					45				
5	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	Lys	Gly	
		50					55					60					
10	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Thr	Arg	Phe	Asp	Tyr	Cys	Asp	
	65					70					75					80	
15	Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	Asp	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	His	Tyr	
					85					90					95		
20	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Ile	Glu	Cys	Gln	Ser	Trp	
				100					105					110			
25	Gly	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Leu	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	
			115					120					125				
30	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	
		130					135					140					
35	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Phe	Cys	
	145					150					155					160	
40	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	
					165					170					175		
45	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	
				180					185					190			
50	Thr	Ala	Ser	Gly	His	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Ser	Ala	Gln	Ser	Pro	His	
			195					200					205				
55	Lys	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Glu	Glu	
		210					215					220					
60	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	
	225					230					235					240	
65	Thr	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Trp	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys	Gly	
					245					250					255		
70	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	His	Leu	Asp	Ala	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	
					260				265					270			
75	Gln	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	
			275					280					285				
80	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Gly	Arg	Lys	Cys	Gln	Ser	Trp	
		290					295					300					
85	Val	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Gly	Asn	Phe	Pro	
	305					310					315					320	

ES 2 292 174 T3

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

5 Ser Pro Trp

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 339 aminoácidos

15 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

25 (A) ORGANISMO: Bovino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: Fragmento de angiostatina

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

35 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

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

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

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

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

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

65

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 79 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 60 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 65 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

ES 2 292 174 T3

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

```

Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly Thr Met Ser Arg Thr
1          5          10          15

Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala Thr Phe Pro His Val
20          25          30

Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35          40          45

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

Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn Ile Pro Glu Cys
65          70          75

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 79 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 79 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TIPO DE CADENA:
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: mono Rhesus
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
 - (B) CLON: K1
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

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

ES 2 292 174 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 79 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Porcino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

```

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Thr Ser Lys Thr
 1           5           10           15

Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val Ser Ser Pro His Ile
          20           25           30

Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
          35           40           45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
          50           55           60

Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys
65           70           75

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 79 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Bovino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

[illegible]

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: '78 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

35 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: K2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:

ES 2 292 174 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

Cys Met His Ser Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20 25 30

His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: mono Rhesus

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K2

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

35 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

40 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Porcino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

45 (B) CLON: K2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

```

50 Cys Met His Cys Ser Gly Glu His Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr
    1             5             10             15

Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp Gly Ser Gln Ser Pro His Ala
    20             25             30

55 His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn
    40             45

60 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
    55             60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 65             70             75

```

ES 2 292 174 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 73 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Bovino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Glu Gly Lys Ile Ala Lys Thr
1 5 10 15

Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20 25 30

His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

Asp Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K3

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 78 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

35 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

40 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

45 (B) CLON: K3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 19:

ES 2 292 174 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: mono Rhesus

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val Thr
1 5 10 15

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

His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
50 55 60

Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Porcino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K3

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Bovino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

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

ES 2 292 174 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K4

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

```

Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
 1          5          10          15

Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg
      20          25          30

His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn
      35          40          45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
      50          55          60

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Arg Cys
65          70          75

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

ES 2 292 174 T3

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K4

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

5

10

15

20

25

```
Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
1           5           10           15

Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg
20           25           30

His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn
35           40           45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50           55           60

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys
65           70           75
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 24:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 168 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

40

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

45

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

50

(B) CLON: K2-3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

55

60

65

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 25:

- | | |
|----|--------------------------------------|
| 45 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: |
| | (A) LONGITUD: 168 aminoácidos |
| | (B) TIPO: aminoácido |
| 50 | (C) TIPO DE CADENA: |
| | (D) TOPOLOGÍA: lineal |
| | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína |
| 55 | (iii) HIPOTÉTICA: NO |
| | (iv) ANTISENTIDO: NO |
| | (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal |
| 60 | (vi) FUENTE ORIGINAL: |
| | (A) ORGANISMO: <i>Homo sapiens</i> |
| | (vii) FUENTE INMEDIATA: |
| 65 | (B) CLON: K2-3 |

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LAS EQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 168 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: mono Rhesus

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: K2-3

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 27:

- | | |
|-----|--------------------------------------|
| 45 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: |
| 50 | (A) LONGITUD: 168 aminoácidos |
| 55 | (B) TIPO: aminoácido |
| 60 | (C) TIPO DE CADENA: |
| 65 | (D) TOPOLOGÍA: lineal |
| 70 | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína |
| 75 | (iii) HIPOTÉTICA: NO |
| 80 | (iv) ANTISENTIDO: NO |
| 85 | (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal |
| 90 | (vi) FUENTE ORIGINAL: |
| 95 | (A) ORGANISMO: Porcino |
| 100 | (vii) FUENTE INMEDIATA: |
| 105 | (B) CLON: K2-3 |

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- | | |
|----|-------------------------------|
| 50 | (A) LONGITUD: 168 aminoácidos |
| | (B) TIPO: aminoácido |
| | (C) TIPO DE CADENA: |
| 55 | (D) TOPOLOGÍA: lineal |

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

60 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

65 (A) ORGANISMO: Bovino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

ES 2 292 174 T3

(B) CLON: K2-3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 250 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

60 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

65 (A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

ES 2 292 174 T3

(B) CLON: K1-3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

5

Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly Thr Met Ser Arg Thr
1 5 10 15

10

Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala Thr Phe Pro His Val
20 25 30

15

Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45

20

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

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

25

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

30

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

His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro Ser Lys Asn Leu Lys
115 120 125

35

Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
130 135 140

40

Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys
145 150 155 160

45

Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
165 170 175

Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys
180 185 190

50

Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr
195 200 205

55

Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
210 215 220

60

Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu
225 230 235 240

Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
245 250

65

ES 2 292 174 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 250 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15

Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 250 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

ES 2 292 174 T3

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: mono Rhesus

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

```

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1          5          10          15

Arg Thr Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20          25          30

Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35          40          45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50          55          60

Thr Asp Pro Glu Glu Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
65          70          75          80

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

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

His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
115         120         125

Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
130         135         140

Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
145         150         155         160

Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
165         170         175

Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val Thr Val Ser Gly His
180         185         190

Thr Cys His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr
195         200         205

Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
210         215         220

Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Val
225         230         235         240

Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
245         250

```

ES 2 292 174 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 250 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Porcino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

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

ES 2 292 174 T3

Lys Thr Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp Gly Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 5 His Ala His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 10 Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 15 Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 20 Thr Thr Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 25 Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Ala Ser Gly His
 180 185 190
 Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro His Lys His Asn Arg Thr
 195 200 205
 30 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Glu Val
 225 230 235 240
 35 Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 245 250

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 33:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 250 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TIPO DE CADENA:
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Bovino
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
 - (B) CLON: K1-3
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 160 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 292 174 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 160 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

ES 2 292 174 T3

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 160 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

ES 2 292 174 T3

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: mono Rhesus

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

```

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1           5           10           15

Arg Thr Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20           25           30

Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35           40           45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50           55           60

Thr Asp Pro Glu Glu Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
65           70           75           80

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

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

His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
115          120          125

Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
130          135          140

Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
145          150          155          160

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 160 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Porcino

ES 2 292 174 T3

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-2

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 160 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Bovino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-2

ES 2 292 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 38:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 39:

- | | |
|----|--|
| 45 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: |
| | (A) LONGITUD: 352 aminoácidos |
| | (B) TIPO: aminoácido |
| 50 | (C) TIPO DE CADENA: |
| | (D) TOPOLOGÍA: lineal |
| | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína |
| 55 | (iii) HIPOTÉTICA: NO |
| | (iv) ANTISENTIDO: NO |
| | (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal |
| 60 | (vi) FUENTE ORIGINAL: |
| | (A) ORGANISMO: Murino |
| | (vii) FUENTE INMEDIATA: |
| 65 | (B) CLON: K1-4 |
| | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 39: |

ES 2 292 174 T3

	Cys	Lys	Thr	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Met	Ser	Arg	Thr	
	1				5					10					15		
5	Lys	Ser	Gly	Val	Ala	Cys	Gln	Lys	Trp	Gly	Ala	Thr	Phe	Pro	His	Val	
				20					25					30			
	Pro	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Thr	His	Pro	Asn	Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	
10				35				40					45				
	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	Gln	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	
		50					55					60					
15	Thr	Asp	Pro	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asn	Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	
	65					70					75					80	
	Glu	Glu	Cys	Met	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Lys	Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	
20					85					90					95		
	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Asp	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	
				100					105					110			
25	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ala	Lys	Phe	Pro	Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	
			115					120					125				
	Met	Asn	Tyr	Cys	His	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	
30		130					135					140					
	Thr	Thr	Asp	Pro	Thr	Lys	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	
35		145				150					155					160	
	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Thr	Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	
					165					170					175		
40	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Gly	Lys	
				180					185					190			
	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Ser	Glu	Gln	Thr	Pro	His	Arg	His	Asn	Arg	Thr	
45			195					200					205				
	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	
		210					215					220					
50	Pro	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Ser	Gln	Leu	
	225					230					235					240	
	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Glu	Ile	Pro	Ser	Cys	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	
55					245					250					255		
	Asp	Gln	Ser	Asp	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Thr	Pro	Val	Val	
60				260					265					270			
	Gln	Glu	Cys	Tyr	Gln	Ser	Asp	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	
			275					280					285				
65	Thr	Thr	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Cys	Gln	Ser	Trp	Ala	Ala	Met	Phe	Pro	
		290					295					300					

ES 2 292 174 T3

His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu
305 310 315 320

Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp Cys Tyr
325 330 335

Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Arg Cys
340 345 350

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 352 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-4

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 40:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15

Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30

Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60

Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu
65 70 75 80

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

ES 2 292 174 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 378 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

ES 2 292 174 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Murino

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-4BKLS

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 41:

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

ES 2 292 174 T3

	Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys	145	150	155	160
5	Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro	165	170	175	
10	Pro Ser Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg	180	185	190	
	Gly Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser	195	200	205	
15	Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys	210	215	220	
20	Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala	225	230	235	240
	Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu	245	250	255	
25	Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser	260	265	270	
30	Val Pro Pro Glu Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser	275	280	285	
	Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys	290	295	300	
35	Lys Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr	305	310	315	320
40	Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn	325	330	335	
	Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val	340	345	350	
45	Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser	355	360	365	
50	Val Val Glu Leu Pro Thr Val Ser Gln Glu	370	375		

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 378 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

ES 2 292 174 T3

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: K1-4BKLS

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 42:

```

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

Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys
20           25           30

Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala
35           40           45

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

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

Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys
85           90           95

Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu
100          105          110

Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile
115          120          125

Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn
130          135          140

Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys
145          150          155          160

Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser
165          170          175

Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg
180          185          190

```

ES 2 292 174 T3

	Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser	195	200	205
5	Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys	210	215	220
10	Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala	225	230	235
	Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys	245	250	255
15	Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro	260	265	270
20	Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly	275	280	285
	Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys	290	295	300
25	Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr	305	310	315
30	Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn	325	330	335
	Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val	340	345	350
35	Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser	355	360	365
40	Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu	370	375	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

60 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 65 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

ES 2 292 174 T3

(B) CLON: Cebador 154

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 43:

5

ATCGCTCGAG CGTTATTGA AAGGAAAGTG

30

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 44:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

25

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

30

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

35

(B) CLON: Cebador 151

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 44:

40

ATCGGAATTC AAGCAGGACA ACAGGCGG

28

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 45:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

55

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

60

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

65

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

ES 2 292 174 T3

(B) CLON: Cebador 156

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 45:

5 ATCGTACGTA TTATTGAAA AGAAAGTG 28

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65