(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 405 T2** 2007.11.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 758 390 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 405.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/05107**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 918 854.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/029242**
(86) PCT-Anmeldetag: **26.04.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.02.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.02.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/57*** (2006.01)
C12N 9/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

248629	**26.04.1994**	**US**
326785	**20.10.1994**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Children's Medical Center Corp., Boston, Mass., US

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(72) Erfinder:
O'REILLY, Michael S., Winchester, MA 01890, US; FOLKMAN, M. Judah, Brookline, MA 02115, US; SIM, Kim Lee, Gaitherburg, MD 20878, US; CAO, Yihai, S-116 32 Stockholm, SE

(54) Bezeichnung: **ANGIOSTATIN UND VERFAHREN ZU SEINER NUTZUNG ZUR VERMEIDUNG DER ANGIOGENESE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Erfindungsgebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Endothelinhibitoren, die reversibel die Proliferation von Endothelzellen inhibieren, welche als Angiostatine bezeichnet werden. Genauer gesagt, betrifft die vorliegende Erfindung Angiostatin-Proteine, die aus Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin isoliert werden können, oder die durch rekombinante, enzymatische oder chemische Verfahren synthetisiert werden können. Das Angiostatin ist in der Lage, Angiogenese-verwandte Erkrankungen zu inhibieren und angiogene Prozesse zu modulieren. Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung diagnostische Tests und Kits für die Angiostatin-Messung, histochemische Kits zur Lokalisierung von Angiostatin, DNA-Sequenzen, die Angiostatin kodoeren und molekulare Proben, um die Angiostatin-Biosynthese zu überwachen, Antikörper, die für das Angiostatin spezifisch sind, die Entwicklung von Peptidagonisten und -antagonisten gegen den Angiostatin-Rezeptor, Antiangiostatin-Rezeptor-spezifische Antikörperagonisten und -antagonisten und zytotoxische Mittel, die an Angiostatin-Peptide gebunden sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] So wie er hier verwendet wird, bedeutet der Begriff „Angiogenese" die Generierung neuer Blutgefäße in einem Gewebe oder Organ. Unter normalen physiologischen Bedingungen erfahren Menschen oder Tiere nur in sehr spezifischen beschränkten Situationen eine Angiogenese. Beispielsweise wird die Angiogenese normalerweise bei der Wundheilung, bei der fötalen und embryonalen Entwicklung und der Bildung des Corpus luteum, Endometrium und der Placenta beobachtet. Der Begriff „Endothelium" meint eine dünne Schicht flacher Epithelzellen, die seröse Höhlen, Lymphgefäße und Blutgefäße auskleiden.

[0003] Sowohl die kontrollierte als auch die unkontrollierte Angiogenese laufen vermutlich in gleicher Weise ab. Endothelzellen sind Pericyten, die von einer Basalmembran umgeben sind und bilden kapilläre Blutgefäße. Angiogenese beginnt durch den Abbau der Basalmembran durch Enzyme, die von Endothelzellen und Leukocyten freigesetzt werden. Die Endothelzellen, die das Lumen der Blutgefäße auskleiden, durchdringen dann die Basalmembran. Angiogene Stimulationsfaktoren induzieren die Endothelzellen dazu, durch die aufgebrochene Basalmembran zu migrieren. Die migrierenden Zellen bilden einen „Spross" des Parentalblutgefäßes, wobei die Endothelzellen Mitose durchlaufen und proliferieren. Die Endothel-Sprossen verschmelzen miteinander, um kapilläre Schlaufen zu bilden, welche das neue Blutgefäß erzeugen.

[0004] Eine permanente, nicht regulierte Angiogenese tritt bei einer Vielzahl von Krankheitsstadien, Tumormetastasen und bei dem abnormen Wachstum von Endothelzellen auf, und unterstützt die pathologischen Schädigungen, die bei diesen Zuständen gesehen werden. Die verschiedenen pathologischen Erkrankungsstadien, in denen eine nicht regulierte Angiogenese vorliegt, sind als Angiogenese-abhängige oder Angiogenese-assoziierte Erkrankungen gruppiert worden.

[0005] Die Hypothese, dass Tumorwachstum Angiogenese-abhängig ist, wurde zuerst 1971 vorgeschlagen (Folkman J., Tumor angiogenesis: Therapeutic implications., N. Engl. Jour. Med. 285: 1182–1186, 1971). In einfacher Form gesagt, bedeutet dies: „Sobald ein Tumor-„Beginn" aufgetreten ist, muss jeder Anstieg der Tumorzellpopulation ein Anstieg an neuen Kapillaren, die in dem Tumor konvergieren, vorangehen." Tumor-„Beginn" wird derzeit so verstanden, dass es eine prävasculäre Änderung des Tumorwachstums anzeigt, bei dem eine Population an Tumorzellen, die einige wenige Kubikmillimeter Volumen einnehmen und nicht einige wenige Millionen Zellen überschreiten, mit vorhandenen Wirtsmikrogefäßen überleben können. Die Expansion des Tumorvolumens über dieses Stadium hinaus benötigt die Induzierung neuer kapillärer Blutgefäße. Beispielsweise wären pulmonäre Micrometastasen in dem frühen prävasculären Stadium in Mäusen nicht nachweisbar, außer durch Hochleistungsmikroskopie anhand histologischer Schnitte.

[0006] Beispiele für indirekte Beweise, die dieses Konzept unterstützen, schließen ein:
(1) Die Wachstumsrate von Tumoren, die in subkutane transparente Kammern in Mäusen implantiert sind, ist langsam und linear, bevor die Neovascularisierung beginnt, und schnell und nahezu exponentiell nach der Neovascularisierung (Algire G.H. 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) Tumoren, die in isolierten perfundierten Organen gezüchtet werden, in denen Blutgefäße nicht proliferieren, sind auf 1–2 mm^3 beschränkt, aber sie expandieren schnell um das ungefähr 1.000-Fache dieses Volumens, wenn sie in Mäuse transplantiert werden, und neovascularisiert werden. (Folkman J. et al., Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intesti-

nal segments. Annals of Surgery 164: 491–502, 1966)
(3) Tumorwachstum in der avasculären Cornea schreitet langsam und in einer linearen Form voran, aber es ändert sich in exponentielles Wachstum nach der Neovascularisierung. (Grimbrone, 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) Tumoren, die in wässriger Flüssigkeit der hinteren Kammer des Kaninchenauges suspendiert sind, bleiben überlebensfähig, nicht vascularisiert und in der Größe auf unter 1 mm^3 begrenzt. Sobald sie in das Gefäßbett der Iris implantiert werden, werden sie neovascularisiert und wachsen schnell und erreichen innerhalb von 2 Wochen 16.000 Mal ihr Originalvolumen. (Grimbone M.A. Jr. et al., Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J. Exp. Med. 136: 261–276)
(5) Wenn Tumoren in die Chorioallantoinmembran des Hühnerembryos implantiert werden, wachsen sie während einer avasculären Phase von über 72 Stunden langsam, aber sie überschreiten einen mittleren Durchmesser von 0,93 + 0,29 mm nicht. Eine schnelle Tumorexpansion tritt innerhalb von 24 Stunden nach dem Beginn der Neovascularisierung auf, und am Tag 7 erreichen diese vascularisierten Tumore einen mittleren Durchmesser von 8,0 + 2,5 mm. (Knighton D., Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. British J. Cancer, 35: 347–356, 1977)
(6) Vasculäre Gruppierungen von Metastasen in der Kaninchenleber weisen eine Heterogenität in der Größe der Metastasen auf, aber sie zeigen einen relativ gleichförmigen Ausgangspunkt der Größe, bei dem die Vascularisierung vorhanden ist. Tumoren sind im Allgemeinen bis zu 1 mm im Durchmesser avasculär, aber sie werden über diesen Durchmesser hinausgehend neovascularisiert. (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) In transgenen Mäusen, die Carcinome in den Betazellen der Pancreasinseln entwickeln, sind die prävasculären hyperplastischen Inseln auf eine Größe von unter 1 mm begrenzt. Im Alter von 6–7 Wochen sind 4–10 % der Inseln neovascularisiert, und aus diesen Inseln entstehen größere vascularisierte Tumoren von mehr als dem 1.000-Fachen des Volumens der prävasculären Inseln. (Folkman J. et al., Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339: 58–61, 1989)
(8) Ein spezifischer Antikörper gegen VEGF (vasculärer Endothelwachstumsfaktor) reduziert die Dichte der Mikrogefäße und verursacht die „signifikante oder dramatische" Inhibierung des Wachstums dreier menschlicher Tumoren, die von VEGF als ihrem einzigen Mediator der Angiogenese (in Nacktmäusen) abhängen. Der Antikörper inhibiert nicht das Wachstum der Tumorzellen 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) Ein monoklonaler anti-bFGF Antikörper verursacht 70 % Inhibierung des Wachstums eines Maustumors, welcher von der Sekretion von bFGF als seinem einzigen Mediator der Angiogenese abhängt. Der Antikörper inhibiert das Wachstum der Tumorzellen in vitro nicht. (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) Intraperitoneale Injektion von bFGF verstärkt das Wachstum eines Primärtumors und dessen Metastasen durch die Stimulierung des Wachstums der kapillären Endothelzellen im Tumor. Die Tumorzellen selbst haben keine Rezeptoren für bFGF, und bFGF ist kein Mitogen für die Tumorzellen in vitro. (Gross J.L. et al., Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF. Proc. Amer. Assoc. Canc. Res. 31: 79, 1990)
(11) Ein spezifischer Angiogeneseinhibitor (AGM-1470) inhibiert das Tumorwachstum und die Metastasen in vivo, ist aber bei der Inhibierung der Tumorzellenproliferation in vitro viel weniger wirksam. Er inhibiert die vasculäre Endothelzellproliferation halb-maximal bei einer 4 log niedrigeren Konzentration als er die Tumorzellproliferation inhibiert. (Ingber D. et al., Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature, 48: 555–557, 1990). Es gibt auch indirekte klinische Hinweise, dass das Tumorwachstum Angiogenese-abhängig ist.
(12) Menschliche Retinoblastome, die in den Glaskörper metastasieren, entwickeln avasculäre Sphäroide, die auf weniger als 1 mm^3 beschränkt sind, trotz der Tatsache, dass sie lebensfähig sind und 3H-Thymidin einschließen (wenn sie aus dem entkernten Auge entfernt werden und in vitro analysiert werden).
(13) Karzinome des Eierstocks metastasieren in die Peritonealmembran als winzige avasculäre weiße Körner (1–3 mm^3). Diese Implantate wachsen selten stärker, bis einer oder mehrere davon neovascularisiert werden.
(14) Die Intensität der Neovascularisierung beim Brustkrebs (Weidner N. et al., Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. 324: 1–8, 1991, und 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) und beim Prostatakrebs (Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W., Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive protate carcinoma. American Journal of Pathology, 143 (2): 401–409, 1993) korreliert stark mit dem Risiko der weiteren Metastasierung.
(15) Metastasen des menschlichen Hautmelanoms sind vor der Neovascularisierung selten. Der Beginn der Neovascularisierung führt zu einer erhöhten Dicke der Läsion und einem erhöhten Risiko der Metastasierung.

(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) Beim Blasenkrebs ist das Niveau des angiogenen Peptids bFGF im Urin ein sensitiverer Indikator des Status und des Ausmaßes der Erkrankung als die Zytologie. (Nguyen M. et al., Elevated levels of an angiogeneic peptide, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 85: 241–242, 1993)

[0007] Daher ist es klar, dass Angiogenese eine Hauptrolle bei der Metastasierung von Krebs spielt. Wenn diese angiogene Aktivität unterdrückt oder eliminiert werden könnte, dann würde der Tumor, obwohl er vorhanden ist, nicht wachsen. Im Krankheitsstadium könnte die Prävention der Angiogenese die Schädigung abkehren, die durch die Invasion des neuen mikrovaskulären Systems verursacht worden ist. Therapien, die auf eine Kontrolle des Angiogeneseprozesses ausgerichtet sind, könnten zu einer Außerkraftsetzung oder Abschwächung dieser Erkrankung führen.

[0008] Was daher notwendig ist, ist eine Zusammensetzung und ein Verfahren, die das unerwünschte Wachstum von Blutgefäßen inhibieren, insbesondere in Tumoren. Ebenfalls benötigt wird ein Verfahren zum Nachweisen, Messen und Lokalisieren der Zusammensetzung. Die Zusammensetzung sollte in der Lage sein, die Aktivität endogener Wachstumsfaktoren in prämetastasierenden Tumoren zu überwinden, und die Bildung von Kapillaren in den Tumoren verhindern, wodurch das Wachstum der Tumoren inhibiert wird. Die Zusammensetzung, Fragmente der Zusammensetzung und Antikörper, die für die Zusammensetzung spezifisch sind, sollten auch in der Lage sein, die Bildung von Kapillaren in Angiogeneseprozessen zu modulieren, wie beispielsweise bei der Wundheilung und der Reproduktion. Die Zusammensetzung und das Verfahren zur Inhibierung der Angiogenese sollten vorzugsweise nicht toxisch sein und wenige Nebenwirkungen hervorrufen. Ebenfalls benötigt wird ein Verfahren zum Nachweisen, Messen und Lokalisieren der Bindungsstellen der Zusammensetzung, wie auch der Stellen der Biosynthese der Zusammensetzung. Die Zusammensetzung und die Fragmente der Zusammensetzung sollten in der Lage sein, an andere Moleküle, sowohl für radioaktive und auch nicht-radioaktive Markierungszwecke, konjugiert zu werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Erfindungsgemäß werden Zusammensetzungen und Verfahren bereitgestellt, die bei der Modulierung der Angiogenese wirksam sind, und die nicht erwünschte Angiogenese inhibieren, insbesondere die Angiogenese, die mit Tumorwachstum zusammenhängt. Die vorliegende Erfindung schließt ein Protein ein, welches als „Angiostatin" bezeichnet worden ist, welches durch seine Fähigkeit definiert wird, die Angiogeneseaktivität endogener Wachstumsfaktoren, wie bFGF in vitro zu überwinden, und durch seine Aminosäuresequenzhomologie und strukturelle Ähnlichkeit mit einem inneren Teil des Plasminogens, welches ungefähr bei der Plasminogen-Aminosäure 98 beginnt. Angiostatin umfasst ein Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen ungefähr 38 Kilodalton und 45 Kilodalton, wie durch reduzierende Polyacrylamidgelelectrophorese bestimmt wird, und mit einer Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen ähnlich der eines Fragments des murinen Plasminogens ist, welches bei der Aminosäure Nr. 98 eines intakten murinen Plasminogenmoleküls (SEQ ID Nr. 2) beginnt.

[0010] Die Aminosäuresequenz von Angiostatin variiert leicht zwischen den Spezies. Beispielsweise ist beim menschlichen Angiostatin die Aminosäuresequenz im Wesentlichen ähnlich der Sequenz des oben beschriebenen murinen Plasminogenfragments, obwohl eine aktive menschliche Angiostatin-Sequenz entweder bei der Aminosäure Nr. 97 oder 99 der intakten menschlichen Plasminogenaminosäuresequenz beginnen kann. Des Weiteren haben Fragmente vom menschlichen Plasminogen ähnliche antigene Wirkung, wie in einem Maus-Tumor-Modell gezeigt worden ist. Es ist verständlich, dass die Anzahl an Aminosäuren in dem aktiven Angiostatin-Molekül variieren kann, und dass alle Aminosäuresequenzen, die eine Endothel-inhibierende Wirkung haben, als in die vorliegende Erfindung eingeschlossen angesehen werden.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Zusammensetzungen zur Behandlung von Erkrankungen und von Prozessen, die durch unerwünschte und nicht kontrollierte Angiogenese vermittelt werden, indem an einen Menschen oder ein Tier eine Zusammensetzung verabreicht wird, die ein im Wesentlichen gereinigtes Angiostatin oder Angiostatin-Derivat in einer Dosierung umfasst, die ausreicht, um die Angiogenese zu inhibieren. Die vorliegende Erfindung ist besonders nützlich zur Behandlung oder zur Unterdrückung des Wachstums von Tumoren. Die Verabreichung von Angiostatin an einen Menschen oder ein Tier mit prävaskularisierten, metastasierenden Tumoren wird das Wachstum oder die Expansion dieser Tumore verhindern.

[0012] Die vorliegende Erfindung umfasst auch DNA-Sequenzen, die Angiostatin kodieren, Expressionsvek-

toren, die DNA-Sequenzen enthalten, welche Angiostatin kodieren, und Zellen, welche einen oder mehrere Expressionsvektoren enthalten, die DNA-Sequenzen enthalten, die Angiostatin kodieren. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner gentherapeutische Verfahren, in denen DNA-Sequenzen, die Angiostatin kodieren, in einen Patienten eingeschleust werden, um in vivo die Angiostatin-Niveaus zu modifizieren.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft auch diagnostische Verfahren und Kits zum Nachweis und der Messung von Angiostatin in biologischen Flüssigkeiten und Geweben zur Lokalisierung von Angiostatin in Geweben und Zellen. Das diagnostische Verfahren und der Kit können in jeder dem normalen Fachmann auf dem Gebiet bekannten Form vorliegen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Antikörper, die für das Angiostatin-Molekül spezifisch sind und Teile davon sowie Antikörper, die die Bindung von Antikörpern inhibieren, welche für Angiostatin spezifisch sind. Diese Antikörper können polyklonale Antikörper oder monoklonale Antikörper sein. Die Antikörper, die für Angiostatin spezifisch sind, können in diagnostischen Kits verwendet werden, um das Vorhandensein und die Menge an Angiostatin nachzuweisen, welches diagnostisch oder prognostisch für das Auftreten oder das Wiederauftreten von Krebs oder anderen Erkrankungen ist, welche durch Angiogenese vermittelt werden. Antikörper, die für Angiostatin spezifisch sind, können auch an einen Menschen oder ein Tier verabreicht werden, um den Menschen oder das Tier gegen Angiostation passiv zu immunisieren, wodurch die angiogene Inhibierung reduziert wird.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft auch diagnostische Verfahren und Kits zum Nachweisen des Vorhandenseins und der Menge von Antikörpern, die ein Angiostatin in Körperflüssigkeiten binden. Das diagnostische Verfahren und der Kit können in jeder Form vorliegen, die gewöhnlichen Fachleuten in dem Gebiet gut bekannt sind.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Antiangiostatin-Rezeptor-spezifische Antikörper, die an den Angiostatin-Rezeptor binden, und das entsprechende Signal an die Zelle übermitteln, und als Agonisten oder Antagonisten wirken.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Angiostatin-Peptidfragmente und Analoga, die isotopisch oder mit anderen Molekülen oder Proteinen zur Verwendung im Nachweis und der Visualisierung von Angiostatin-Bindungsstellen durch Techniken, die einschließen, aber nicht beschränkt sind auf, Positronenemissionstomographie, Autoradiographie, Durchflusscytometrie, Radiorezeptorbindungstests und Immunhistochemie verwendet werden können.

[0017] Diese Angiostatin-Peptide und Analoga dienen auch als Agonisten und Antagonisten des Angiostatin-Rezeptors, wodurch sie die biologische Wirkung von Angiostatin verstärken oder blockieren. Solche Peptide werden bei der Isolierung des Angiostatin-Rezeptors verwendet.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Angiostatin, Angiostatin-Fragmente, Angiostatin-Antiseren, oder Angiostatin-Rezeptoragonisten und Angiostation-Rezeptorantagonisten, die an cytotoxische Mittel für therapeutische und Forschungsanwendungen gebunden sind. Weiter werden Angiostatin, Angiostatin-Fragmente, Angiostatin-Antiseren, Angiostatin-Rezeptoragonisten und Angiostatin-Rezeptorantagonisten mit pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten und gegebenenfalls mit Verbindungen zur verzögerten Freisetzung oder Zusammensetzungen, die biologisch abbaubaren Polymeren und therapeutische Zusammensetzungen zu bilden, zusammengegeben.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft molekulare Sonden der Ribonucleinsäure oder Desoxiribonucleinsäure, die bei der Transkription und Translation von Angiostatin beteiligt sind. Diese molekularen Sonden stellen Mittel zum Nachweis und der Messung der Angiostatin-Biosynthese in Geweben und Zellen bereit.

[0020] Demgemäß ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Zusammensetzung bereitzustellen, die ein Angiostatin umfasst.

[0021] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen und Prozessen bereitzustellen, die durch Angiogenese vermittelt werden.

[0022] Es ist noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein diagnostisches oder prognostisches Verfahren und ein Kit zum Nachweis des Vorhandenseins und der Menge von Angiostatin in einer Körperflüssigkeit oder einem Gewebe nachzuweisen.

[0023] Es ist noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren und eine Zusammensetzung

zur Behandlung von Erkrankungen und Prozessen bereitzustellen, die durch Angiogenese vermittelt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Hämangiome, feste Tumoren, solide Tumoren, das Blut übertragende Tumoren, Leukämien, Metastasierung, Telangiectasia, Psoriasis, Scleroderma, pyogene Granulome, Myocardangiogenese, Morbus Crohn, Plaqueneovascularisierung, coronare Kollaterale, cerebrale Kollaterale, arteriovenose Fehlbildungen, Ischämische Angiogenese in Gliedern, corneale Erkrankungen, Rubeose, neovasculäre Glaucome, diabetische Retinopathie, retrolentale Fibroplasie, Arthritis, diabetische Neovascularisierung, maculare Degeneration, Wundheilung, Magengeschwür, Heliobacter verwandte Erkrankungen, Frakturen, Keloide, Vasculogenese, Hämatopoiese, Ovulation, Menstruation, Placentabildung und Cat Scratch Fever.

[0024] Es ist noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Zusammensetzung zur Behandlung und Unterdrückung des Wachstums eines Krebses bereitzustellen.

[0025] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Verbindungen bereitzustellen, die die Produktion oder Aktivität von Enzymen modulieren oder nachahmen, die Angiostatin in vivo oder in vitro hervorruft.

[0026] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, Angiostatin oder Antiangiostatin-Antikörper durch direkte Injektion von Angiostation-DNA in einen Menschen oder ein Tier, welches solche Angiostatin- oder Antiangiostatin-Antikörper benötigt, bereitzustellen.

[0027] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Nachweisen und Quantifizieren des Vorhandenseins eines Antikörpers bereitzustellen, der für ein Angiostatin in einer Körperflüssigkeit spezifisch ist.

[0028] Noch ein weiteres erfindungsgemäßes Ziel ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung, die aus Antikörpern gegen Angiostatin besteht, welche für spezifische Regionen des Angiostatin-Moleküls selektiv sind, und welche nicht Plasminogen erkennen.

[0029] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Nachweis durch Prognose von Krebs bereitzustellen.

[0030] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Zusammensetzung zur Verwendung in der Visualisierung und Quantifizierung von Stellen der Angiostationbindung in vivo und in vitro bereitzustellen.

[0031] Es ist noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Zusammensetzung zur Verwendung in dem Nachweis und der Quantifizierung der Angiostatin-Biosynthese bereitzustellen.

[0032] Es ist noch ein weiters Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Therapie bei Krebs bereitzustellen, die minimale Nebenwirkungen hat.

[0033] Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung liegt darin, eine Zusammensetzung, welche ein cytotoxisches Mittel zur Behandlung oder Unterdrückung des Wachstums eines Krebses ist, bereitzustellen, die Angiostatin oder ein Angiostatin-Peptid, umfasst.

[0034] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung liegt darin, ein Verfahren zur gezielten Verabreichung von Angiostatin-verwandten Zusammensetzungen an spezifische Stellen bereitzustellen.

[0035] Noch ein weiteres Ziel der Erfindung ist das Bereitstellen von Zusammensetzungen und Methoden, die für die Gentherapie zur Modulierung angiogener Prozesse nützlich sind.

[0036] Diese und andere Ziele, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden nach Beurteilung der folgenden detaillierten Berschreibung der offenbarten Ausführungsformen und der angehängten Ansprüche deutlich.

Kurze Beschreibung der Figuren.

[0037] Fig. 1 zeigt SEQ ID Nr. 1, die Aminosäuresequenz des vollständigen murinen Plasminogens.

[0038] Fig. 2 zeigt die Anfangssequenz des Angiostatins der Maus (SEQ ID Nr. 2) und vergleicht die murine Sequenz mit den entsprechenden menschlichen (SEQ ID Nr. 3), Rhesusaffen-(SEQ ID Nr. 4), Schweine-(SEQ ID Nr. 5) und Rinder-(SEQ ID Nr. 6) Plasminogenpeptidfragmenten. Die Maus-Sequenz wird zuerst aufgelistet,

gefolgt vom Menschen, Rhesusaffen, Schwein und Rind.

[0039] **Fig.** 3 zeigt den BrdU-Markierungsindex von Tumorzellen in der Lunge in Gegenwart oder Abwesenheit eines Primärtumors.

[0040] Fig. 4 zeigt eine Matrigel-Analyse des Einflusses eines primären Lewis Lungentumors der bFGF-gesteuerten Angiogenese in vivo.

[0041] Fig. 5 zeigt eine Dosis-Reaktionskurve des Serums, das aus Mäusen stammt, die ein Lewis-Lungencarcinom (LLC-Low) tragen, gegenüber Serum normaler Mäuse. Rinderkapillar-Endothelzellen wurden in einem bFGF-vermittelten 72-Stunden Proliferationstest untersucht.

[0042] **Fig.** 6 zeigt, dass sowohl gering und stark metastasierende Tumoren endothel-mitogene Wirkung in ihren Aszites enthalten, aber nur die wenig metastasierende Tumorlinie endothel-inhibierende Wirkung im Serum aufweist.

[0043] **Fig.** 7 zeigt ein C4-Umkehrphasen-Chromatographie-Profil teilweise gereinigten Serums oder Urins aus Tumor-tragenden Tieren.

[0044] Fig. 8 zeigt Oberflächen-Lungenmetastasen nach einer 13-tägigen Behandlung von Mäusen mit intaktem Plasminogenmolekül, der aktiven Fraktion der Lysinbindungsstelle I Präparation menschlichen Plasminogens, konzen triertem Urin aus Tumor-tragenden Mäusen und konzentriertem Urin normaler Mäuse.

[0045] Fig. 9 zeigt das Lungengewicht nach einer 13-tägigen Behandlung von Mäusen mit intaktem Plasminogenmolekül des menschlichen Plasminogen, der aktiven Fraktion des Lysin-Bindestelle-I-Präparats, konzentriertem Urin von Tumor-tragenden Mäusen und konzentriertem Urin normaler Mäuse.

[0046] Fig. 10 ist eine schematische Darstellung des pTrcHis-Vektors.

[0047] Fig. 11 stellt einen Immunoblot von durch E. coli exprimiertem menschlichem Angiostatin aus einer 10 l hochskalierten Fermentierung, welche mit einem monoklonalen Antikörper gegen die menschliche Plasminogen-Kringle-Region 1–3 untersucht wurde. Der Pfeil zeigt, das rekombinante menschliche Angiostatin. A) zeigt rekombinantes Angiostatin, das mit 0,2 M Aminocaprylsäure eluierte; B) zeigt die letzte Waschung mit 1 × PBS der Lysinsäule und C) zeigt das gereinigte Lysat der aufgebrochenen Zellen.

[0048] Fig. 12 ist ein Graph, der die prozentuale Inhibierung der wachsenden Rinderkapillarendothelzellen als Funktion der Verdünnung der Ausgangslösung zeigt; A1, A2, B1, B2 und E sind rekombinante Klone, die menschliche Angiostatin-Antiangiogenese aufweisen; C1-, C2-, D1- und D2-Kontrollen sind Negativkontrollklone, die nur den Vektor ohne die menschliche DNA-Sequenz enthalten, welche Angiostatin kodiert.

[0049] Fig. 13 zeigt die inhibitorische Wirkung auf die Proliferation bei Rinderkapillarendothelzellen in vitro durch rekombinantes menschliches Angiostatin.

[0050] Fig. 14 zeigt den Wachstumsproliferationsindex und den Apoptoseindex nach Entfernung des Primärtumors und der Behandlung mit Salzlösung oder einem Fumagillinanalogon mit anti-angiogener Wirkung.

[0051] **Fig.** 15 zeigt die Inhibierung des Wachstums eines T241 Primärtumors in Mäusen durch Behandlung mit menschlichem Angiostatin in vivo durch eine einzelne Injektion von 40 mg/kg/Tag.

[0052] **Fig.** 16 zeigt die Inhibierung des Wachstums eines LLC-LM Primärtumors in Mäusen durch Behandlung mit menschlichem Angiostatin in vivo zu zwei Dosen von 40 mg/kg pro Dosis (80 mg/kg/Tag).

[0053] Fig. 17 zeigt die Wirkung der Entfernung eines primären Lewis-Lungencarcinom-Tumors auf das Wachstum von dessen Lungenmetastasen.

[0054] Fig. 18 zeigt die Wachstumsproliferation und den Apoptoseindex nach Tumorresektion.

[0055] Fig. 19 zeigt die Wirkung der Verabreichung des Angiostatin-Proteins an Mäuse mit implantierten T241 Fibrosarcomzellen auf das Gesamt-Tumorvolumen als Funktion der Zeit.

[0056] Fig. 20 zeigt die Wirkung der Verabreichung des Angiostatin-Proteins an Mäuse mit implantierten Lewis-Lungencarcinom (LM)-Zellen auf das gesamte Tumorvolumen als Funktion der Zeit.

[0057] Fig. 21 zeigt die Wirkung der Verabreichung des Angiostatin-Proteins an Mäuse mit implantierten Reticulum-Zellsarcomzellen auf das Gesamt-Tumorvolumen als Funktion der Zeit.

[0058] Fig. 22 zeigt die Wirkung der Verabreichung des Angiostatin-Proteins an immundefiziente SCID-Mäuse mit implantierten menschlichen Prostatacarcinom PC-3-Zellen auf das gesamte Tumorvolumen als Funktion der Zeit über einen 24-Tage Zeitraum.

[0059] Fig. 23 zeigt die Wirkung der Verabreichung des Angiostatin-Proteins an immundefiziente SCID-Mäuse mit implantierten menschlichen Brustcarcinom MDA-MB-Zellen auf das Gesamttumorvolumen als Funktion der Zeit über einen 24-Tage Zeitraum.

[0060] Fig. 24 ist eine schematische Darstellung der Klonierung der Maus-DNA-Sequenz, die für das Maus-Angiostatin-Protein kodiert, welches aus Maus-Plasminogen cDNA stammt. Das Maus-Angiostatin umfasst die Mausplasminogen-Kringle-Region 1–4. PCR bedeutet Polymerase-Kettenreaktion; P1 ist der 5'-End-Oligonucleotidprimer für die PCR; P2 ist der 3'-End-Oligonucleotidprimer für PCR; SS kennzeichnet die Signalsequenz; ATG ist der Translations-Initiationscodon; TAA ist der Translations-Stopcodon; HA stellt einen Hämagglutininepitop-Anhang dar (YPYDVPDYASL); K1, K2, K3 und K4 stellen Mausplasminogen-Kringle-Regionen 1, 2, 3 bzw. 4 dar. CMV ist der Cytomegalievirus-Promotor; T7 ist der Bakteriophagen-Promotor; PA stellt Präaktivierungspeptide dar und SP6 ist der Sp-6-Promotor.

[0061] **Fig.** 25 stellt die Anzahl an Zellen als Funktion der Tage nicht-transfizierter Zellen (mock) dar; Zellen transfiziert mit dem Vektor alleine ohne die DNA-Sequenz, die für Angiostatin kodiert (Vektor 5), und zwei Angiostatin-exprimierende Klone (AST 31 und AST 37). Reihe (a) stellt die Ergebnisse der Transfektion von T241-Zellen dar, Reihe (b) stellt die Ergebnisse der LL2-Zellen dar.

[0062] **Fig.** 26 zeigt die Ergebnisse mit Kulturmedium, das aus E. coli-Zellen stammt, die den Angiostatin-Klon enthalten, auf die Zellanzahl. Nicht transfizierte Zellen (mock) sind Kontrollzellen, die mit dem Vektor alleine transfiziert wurden, ohne die DNA-Sequenz, die für Angiostatin kodiert (Vektor 5), und drei Angiostatin-exprimierende Klone (AST 25, AST 31 und AST 37). Reihe (a) stellt die Ergebnisse der Inkubation von Kulturmedium aus der Kontrolle (mock) und einen Angiostatin-Klon (exprimierend und nicht exprimierend) auf die Zellzahl dar. Reihe (b) stellt die Ergebnisse der Inkubation von Kulturmedium der Kontrolle (mock), Vektor allein (Vektor 6) und Angiostatin-Klonen, die Maus-Angiostatin exprimieren, bezogen auf die Zellzahl dar. Reihe (c) stellt die Ergebnisse der Inkubation von gereinigtem Kulturmedium der Kontrolle (mock) und der Angiostatin-Klone, die Maus-Angiostatin exprimieren, auf die Zellzahl dar, wobei das Kulturmedium über eine Lysin-Sepharose-Säule gereinigt wurde, um Lysin-bindende Bestandteile zu erhalten.

[0063] Fig. 27 zeigt die Wirkung des Gesamt-Tumorvolumens als Funktion der Dauer der Implantierung von T241-Fibrosarcomzellen in Mäusen dar, wenn die Fibrosarcomzellen mit einem Vektor transfiziert worden sind, der eine DNA-Sequenz enthält, welcher für das Angiostatin-Protein kodiert, und der Vektor in der Lage ist, das Angiostatin-Protein zu exprimieren. „Nicht transfiziert" stellt nicht veränderte T241 Fibrosarcomzellen dar, die in Mäuse implantiert wurden. „Vektor 6" stellt T241-Fibrosarcomzellen dar, die allein mit dem Vektor transfiziert wurden, der keine DNA-Sequenz enthält, welche für das Angiostatin-Protein kodiert, welches in Mäuse implantiert wurde. „Klon 25, Klon 31 und Klon 37" stellen drei Angiostatin-herstellende Klone der T241-Fibrosarcomzellen, welche in Mäuse implantiert wurden, dar, die mit einem Vektor transfiziert wurden, der die DNA-Sequenz enthält, die für das Angiostatin-Protein kodiert.

Detaillierte Beschreibung

[0064] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verfahren zum Nachweis und die Behandlung von Erkrankungen und Prozessen, die durch Angiogenese vermittelt werden oder damit zusammenhängen. Die Zusammensetzung umfasst Angiostatin, welches aus Körperflüssigkeiten isoliert werden kann, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Serum, Urin und Aszitesflüssigkeit, oder durch chemische oder biologische Verfahren synthetisiert wird (z. B. Zellkultur, rekombinante Genexpression, Peptidsynthese und in vitro enzymatische Katalyse von Plasminogen oder Plasmin, um das aktive Angiostatin hervorzubringen). Rekombinante Techniken schließen Genamplifikationen aus DNA-Quellen ein, indem die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet wird, und die Genamplifikation aus RNA-Quellen unter Verwendung von Reverse Transkriptase/PCR. Angiostatin inhibiert das Wachstum von Blutgefäßen in Geweben, wie in unvascularisierte

oder vascularisierte Tumore.

[0065] Die vorliegende Erfindung umfasst auch eine Zusammensetzung, die einen Vektor umfasst, der eine DNA-Sequenz enthält, welche für Angiostatin kodiert, wobei der Vektor in der Lage ist, Angiostatin zu exprimieren, wenn er in einer Zelle vorhanden ist, eine Zusammensetzung, die eine Zelle umfasst, die einen Vektor enthält, wobei der Vektor eine DNA-Sequenz enthält, die Angiostatin oder Fragmente oder Analoga davon kodiert, wobei der Vektor in der Lage ist, Angiostatin zu exprimieren, wenn er in der Zelle vorhanden ist, und Verfahren umfassend das Implantieren einer Zelle, die einen Vektor enthält, in einen Menschen oder ein nicht-menschliches Tier, wobei der Vektor eine DNA-Sequenz enthält, die Angiostatin kodiert, und wobei der Vektor in der Lage ist, Angiostatin zu exprimieren, wenn er in der Zelle vorhanden ist.

[0066] Des Weiteren umfasst die vorliegende Erfindung Angiostatin, welches mit pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten und gegebenenfalls mit Bestandteilen für die verzögerte Freisetzung oder Zusammensetzungen, wie biologisch abbaubare Polymere, zusammen gegeben ist, um therapeutische Zusammensetzungen zu bilden.

[0067] Genauer gesagt, schließt die vorliegende Erfindung ein Protein ein, das als Angiostatin bezeichnet wird, und das ein Molekulargewicht von ungefähr 38 bis 45 Kilodalton (kD) hat, welches in der Lage ist, die angiogene Wirkung von endogenen Wachstumsfaktoren wie bFGF in vitro zu überwinden. Angiostatin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen ungefähr 38 Kilodalton und 45 Kilodalton, wie durch reduzierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt wurde, und hat eine Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen die des Maus-Plasminogenfragments ist, das an der Aminosäure Nr. 98 des vollständigen Maus-Plasminogenmoleküls beginnt. Der Begriff „im Wesentlichen ähnlich", wenn er in Bezug auf die Angiostatin-Aminosäuresequenzen verwendet wird, bedeutet eine Aminosäuresequenz mit anti-angiogener Wirkung und mit einem Molekulargewicht von ungefähr 38 kD bis 45 kD, welche ebenfalls einen hohen Grad an Sequenzhomologie zum Peptidfragment des Maus-Plasminogens hat, das bei ungefähr der Aminosäure Nr. 98 des Maus-Plasminogens beginnt, und 38 kD bis 45 kD wiegt. Ein hoher Homologiegrad bedeutet, dass mindestens ungefähr 60 % Aminosäure-Homologie, vorzugsweise mindestens ungefähr 70 % Aminosäure-Homologie und mehr bevorzugt mindestens ungefähr 80 % Aminosäurehomologie vorliegen. Der Begriff „Endothel-inhibierende Wirkung", so wie er hier verwendet wird, bedeutet die Fähigkeit eines Moleküls, Angiogenese im Allgemeinen zu inhibieren und beispielsweise das Wachstum von Rinderkapillar-Endothelzellen in Kulturen in Gegenwart von Fibroblasten-Wachstumsfaktor zu inhibieren.

[0068] Die Aminosäuresequenz des vollständigen murinen Plasminogen-Moleküls ist in **Fig. 1** und in SEQ ID Nr. 1 gezeigt. Die Sequenz für Angiostatin beginnt ungefähr an der Aminosäure 98. Wirksames menschliches Angiostatin kann entweder an der Aminosäure 97 oder 99 des intakten menschlichen Plasminogen-Moleküls beginnen. Die Aminosäuresequenz der ersten 339 Aminosäuren von Angiostatin der Maus ist in **Fig. 2** gezeigt (SEQ ID Nr. 2), und wird mit den Sequenzen der entsprechenden Plasminogen-Peptidfragmente des Menschen (SEQ ID Nr. 3), Rhesusaffen (SEQ ID Nr. 4), Schweins (SEQ ID Nr. 5) und Rinds (SEQ ID Nr. 6) für Plasminogen verglichen. Angesichts der Tatsache, dass diese Sequenzen zu über 50 % ihrer Aminosäuren identisch sind, ist klar, dass die Aminosäuresequenzen des Angiostatins zwischen den Spezies im Wesentlichen ähnlich sind. Die gesamte Zahl der Aminosäuren von Angiostatin ist nicht genau bekannt, aber sie wird durch das Molekulargewicht des aktiven Moleküls definiert. Die Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Angiostatins kann in Abhängigkeit von der Art variieren, von der das Plasminogen-Molekül stammt. Daher hat das erfindungsgemäße Angiostatin, obwohl es vom menschlichen Plasminogen stammt, eine leicht verschiedene Sequenz vom Angiostatin haben, das aus der Maus stammt, und dennoch anti-angiogene Wirkung wie in einem Maustumor-Modell gezeigt wird.

[0069] Für Angiostatin ist gezeigt worden, dass es in der Lage ist, das Wachstum von Endothelzellen in vitro zu inhibieren. Angiostatin inhibiert das Wachstum von Zelllinien, die aus anderen Zellarten stammen, nicht. Genauer gesagt hat Angiostatin keine Wirkung auf Lewis-Lungencarcinom-Zelllinien, Mink-Lungenepithelium, 3T3 Fibroblasten, Rinderaorta glatte Muskelzellen, retinales Pigmentepithel des Rinds, MDCk-Zellen (Hunde-Nieren-Epithel), WI38-Zellen (fötale menschliche Lungenfibroblasten), EFN-Zellen (fötale Fibroblasten der Maus) und LM-Zellen (Bindegewebszellen der Maus). Endogenes Angiostatin in einer Tumor-tragenden Maus ist wirksam zur Inhibierung von Metastasen bei einer systemischen Konzentration von ungefähr 10 mg Angiostatin/kg Körpergewicht.

[0070] Angiostatin hat eine spezifische dreidimensionale Konformation, die durch die Kringle-Region des Plasminogenmoleküls definiert ist (Robbins, K. C., „The plasminogen-plasmin enzyme system" Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Practice, 2. Ausgabe, hrsg. von Colman, R. W. et al., J. B. Lippincott

Company, Seiten 340–357, 1987). Es gibt fünf derartige Kringle-Regionen, die konformationell verwandte Motive sind und in dem NH_2-terminalen Teil des Plasminogenmoleküls wesentliche Sequenzhomologie haben. Die dreidimensionale Konformation von Angiostatin umfasst vermutlich die Plasminogen-Kringle-Region 1 bis 3 und einen Teil der Kringle-Region 4. Jede Kringle-Region des Plasminogen-Moleküls enthält ungefähr 80 Aminosäuren und enthält 3 Disulfidbrücken. Dieses Cysteinmotiv ist dafür bekannt, in anderen biologisch wirksamen Proteinen vorhanden zu sein. Diese Proteine schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Prothrombin, Hepatocyten-Wachstumfaktor, Scatter-Factor und Macrophagen-stimulierendes Protein (Yoshimura, T. et al., „Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (SP, 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, Nr. 21, Seiten 15461–15468, 1993). Es wird in Erwägung gezogen, dass jedes isolierte Protein oder Peptid mit einer dreidimensionalen Kringle-artigen Konformation oder einem Cysteinmotiv, das anti-angiogene Aktivität in vivo besitzt, Teil der Erfindung ist.

[0071] Die vorliegende Erfindung schließt auch den Nachweis von Angiostatin in Körperflüssigkeiten und Geweben zum Zwecke der Diagnose oder Prognose von Erkrankungen wie Krebs ein. Die vorliegende Erfindung schließt auch den Nachweis von Angiostatin-Bindungsstellen und Rezeptoren in Zellen und Geweben ein. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Behandlung oder Prävention angiogener Erkrankungen und Prozesse, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Arthritis und Tumore, indem die Produktion von Angiostatin stimuliert wird, und/oder durch Verabreichung von im Wesentlichen gereinigten Angiostatin, oder von Angiostatin-Agonisten oder Antagonisten und/oder Angiostatin-Antiseren oder Antiseren, die gegen Angiostatin-Antiseren gerichtet sind, an einen Patienten. Zusätzliche Behandlungsverfahren schließen die Verabreichung von Angiostatin, Angiostatin-Fragmenten, Angiostatin-Analoga, Angiostatin-Antiseren, Angiostatin-Rezeptoragonisten und -antagonisten ein, die an zytotoxische Mittel gebunden sind. Es ist verständlich, dass Angiostatin von tierischem oder menschlichen Ursprung sein kann. Angiostatin kann auch synthetisch durch eine chemische Reaktion oder mit Hilfe rekombinanter Techniken in Verbindung mit Expressionssystemen hergestellt werden. Angiostatin kann auch durch die enzymatische Abspaltung von isoliertem Plasminogen oder Plasmin hergestellt werden, um Peptide zu erzeugen, die anti-angiogene Wirkung haben. Angiostatin kann auch durch Verbindungen hergestellt werden, die die Wirkung der endogenen Enzyme nachahmen, die Plasminogen in Angiostatin spalten. Angiostatin-Produktion kann ebenfalls durch Verbindungen moduliert werden, die die Aktivität von Plasminogen-spaltenden Enzymen beeinflussen.

[0072] Die passive Antikörpertherapie unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch an Angiostatin binden, kann verwendet werden, um die Angiogenese abhängigen Prozesse wie Reproduktion, Entwicklung und Wundheilung und Gewebereparatur zu modulieren. Zusätzlich können Antiseren, die gegen Fab-Regionen von Angiostatin-Antikörpern gerichtet sind, verabreicht werden, um an Angiostatin zu binden und mit der Fähigkeit, endogene Angiostatin-Antiseren zu blockieren.

[0073] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Gentherapie, wodurch das Gen, das Angiostatin kodiert, in einem Patienten reguliert wird. Zahlreiche Verfahren zum Transferieren oder zur Verabreichung von DNA in Zellen zur Expression eines Genprodukt-Proteins, das sonst als Gentherapie bezeichnet wird, sind offenbart in: Gene Transfer into Mammalian Somatic Cells in vivo, N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12 (4): 335–356 (1992). Die Gentherapie umfasst den Einschluss von DNA-Sequenzen in somatische oder Keimbahn-Zellen entweder zur Verwendung ex vivo oder in der in vivo Therapie. Die Gentherapie arbeitet so, dass Gene ersetzt werden, normale oder abnormale Genfunktionen gesteigert werden und Infektionserkrankungen und andere Erkrankungen bekämpft werden.

[0074] Strategien zur Behandlung dieser medizinischen Probleme mit Hilfe der Gentherapie schließen therapeutische Strategien ein, beispielsweise die Identifizierung eines defekten Gens und dann die Zugabe eines funktionalen Gens, um die Funktion des defekten Gens entweder zu ersetzen oder ein kaum funktionales Gen zu verbessern; oder prophylaktische Strategien, wie beispielsweise die Zuführung eines Gens für das Proteinprodukt, das den Zustand behandeln wird, oder das das Gewebe oder Organ empfindlicher gegenüber eines Behandlungsregime macht. Als ein Beispiel einer prophylaktischen Strategie kann ein Gen wie Angiostatin in einen Patienten gebracht werden und so das Auftreten einer Angiogenese verhindern; oder ein Gen, das Tumorzellen empfindlicher gegenüber der Bestrahlung macht, könnte inseriert werden, und dann würde die Bestrahlung des Tumors die verstärkte Abtötung der Tumorzellen verursachen.

[0075] Viele Protokolle für den Transfer der Angiostatin-DNA oder der Angiostatin-regulatorischen Sequenzen werden in dieser Erfindung in Betracht gezogen. Die Transfektion von Promotorsequenzen, die nicht normalerweise spezifisch mit Angiostatin assoziiert gefunden werden, oder andere Sequenzen, die die Produktion von Angiostatin-Protein erhöhen würden, werden ebenfalls als Verfahren der Gentherapie in Betracht gezo-

gen. Ein Beispiel dieser Technologie kann gefunden werden in Transkaryotic Therapies, Inc., in Cambridge, Massachusetts, unter Verwendung der homologen Rekombination, um einen „genetischen Schalter" zu inserieren, der ein Erythropoietingen in Zellen anschaltet. Siehe Genetic Engineering News, 15. April 1995. Solche „genetischen Schalter" können verwendet werden, um Angiostatin (oder den Angiostatin-Rezeptor) in Zellen zu aktivieren, die normalerweise nicht Angiostatin exprimieren (oder den Angiostatin-Rezeptor).

[0076] Gentransfer-Verfahren für die Gentherapie fallen in drei breite Kategorien – physisch (z. B. Elektroporation, direkter Gentransfer und Partikelbombardierung), chemisch (Lipid-basierte Träger, oder andere nicht-virale Vektoren) und biologisch (Virus-Vektoren, die von Viren abstammen und Rezeptoraufnahmen). Beispielsweise können nicht-virale Vektoren verwendet werden, welche Liposomen einschließen, die mit DNA beschichtet sind. Solche Liposom/DNA-Komplexe können direkt intravenös in den Patienten injiziert werden. Es wird vermutet, dass die Liposomen/DNA-Komplexe in der Leber konzentriert werden, wo sie die DNA in Macrophagen und Kupferzellen einschleusen. Diese Zellen sind langlebig und stellen dadurch eine Langzeitexpression der verabreichten DNA bereit. Zusätzlich können Vektoren oder die „nackte" DNA des Gens direkt in das gewünschte Organ oder in das Gewebe oder den Tumor für eine gezielte Verabreichung der therapeutischen DNA injiziert werden.

[0077] Gentherapeutische Methoden können ebenfalls durch den Verabreichungsort beschrieben werden. Grundsätzliche Wege, um Gene zu verabreichen, schließen den ex vivo Gentransfer, den in vivo Gentransfer und den in vitro Gentransfer ein. Beim ex vivo Gentransfer werden Zellen aus den Patienten entnommen und in Kultur gezüchtet. Die DNA wird in die Zellen transfiziert und die transfizierten Zellen werden in ihrer Zahl expandiert und dann in den Patienten reimplantiert. Im in vitro Gentransfer sind die transformierten Zellen Zellen, die in Kultur gezüchtet werden, wie beispielsweise Gewebekulturzellen und sind nicht besondere Zellen aus einem besonderen Patienten. Diese „Laborzellen" werden transfiziert, die transfizierten Zellen werden ausgewählt und expandiert, um sie entweder in einen Patienten zu implantieren oder für andere Zwecke zu verwenden.

[0078] Der in vivo Gentransfer schließt die Einschleusung von DNA in die Zellen des Patienten ein, wenn die Zellen in dem Patienten vorhanden sind. Methoden schließen die Verwendung des viral vermittelten Gentransfers unter Verwendung nicht-infektiöser Viren ein, um das Gen in den Patienten zu bringen, oder die Injizierung nackter DNA an eine Stelle des Patienten, und die DNA wird von einem Prozentsatz an Zellen aufgenommen, in denen das Genprodukt-Protein exprimiert wird. Zusätzlich können die anderen Methoden, die hier beschrieben sind, wie beispielsweise die Verwendung eines „Gen-Gewehrs", für die in vitro Insertion von Angiostatin-DNA oder Angiostatin-regulatorischen Sequenzen verwendet werden.

[0079] Chemische Verfahren der Gentherapie können eine auf Lipid basierende Verbindung, die nicht notwendigerweise ein Liposom ist, einschließen, um die DNA über die Zellmembran zu verschiffen. Lipofectine oder Cytofectine, Lipid-basierende positive Ionen, die an negativ geladene DNA binden, bilden einen Komplex, der die Zellmembran überwinden kann und liefern die DNA in das Innere der Zelle ab. Andere chemische Verfahren verwenden die Rezeptorvermittelte Endozytose, was die Bindung eines spezifischen Liganden an einen Zelloberflächenrezeptor einschließt und die Umhüllung und den Transport desselben über die Zellmembran. Der Ligand bindet an die DNA und der gesamte Komplex wird in die Zelle transportiert. Der Liganden-Genkomplex wird in den Blutfluss injiziert und dann werden die Zielzellen, die den Rezeptor tragen, spezifisch den Liganden binden und den Liganden-DNA-Komplex in die Zelle transportieren.

[0080] Viele der Gentherapiemethoden benutzen virale Vektoren, um Gene in Zellen zu inserieren. Beispiele sind veränderte Retrovirusvektoren, die in ex vivo Verfahren verwendet werden, um Gene in periphere und Tumorinfiltrierende Lymphozyten, Hepatozyten, Epidermiszellen, Myozyten und andere somatische Zellen einzuschleusen. Diese veränderten Zellen werden dann in den Patienten eingeschleust, um das Genprodukt der inserierten DNA bereitzustellen.

[0081] Virale Vektoren sind ebenfalls verwendet worden, um Gene in Zellen einzuschleusen, indem in vivo Protokolle verwendet wurden. Um eine Gewebespezifische Expression fremder Gene zu steuern, können cis-wirkende regulatorische Elemente oder Promotoren, die dafür bekannt sind, dass sie Gewebespezifisch sind, verwendet werden. Alternativ dazu kann dies unter Verwendung der in situ-Verabreichung von DNA oder viralen Vektoren an spezifische anatomische Stellen in vivo erreicht werden. Beispielsweise wurde der Gentransfer in Blutgefäße in vivo durch Implantierung in vitro transduzierter Endothelzellen in ausgewählten Stellen der Arterienwände erreicht. Das Virus infizierte umgebende Zellen, welche auch das Genprodukt exprimieren. Ein viraler Vektor kann direkt an die Stelle in vivo, beispielsweise durch einen Katheter, verabreicht werden, was dadurch ermöglicht, dass nur bestimmte Bereiche durch das Virus infiziert werden, und so eine lang an-

dauernde ortsspezifische Genexpression bereitstellen. Der in vivo Gentransfer unter Verwendung von Retrovirusvektoren ist ebenfalls in Brustgewebe und Lebergewebe durch die Injektion eines geänderten Virus in die Blutgefäße nachgewiesen worden, die zu diesen Organen führen.

[0082] Virale Vektoren, die für gentherapeutische Protokolle verwendet worden sind, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Retroviren, andere RNA-Viren, wie Poliovirus oder Sindbisvirus, Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus, Herpesviren, SV 40, Vaccinia und andere DNA-Viren. Replikationsdefekte Maus-Retrovirus-Vektoren sind die am verbreitetsten verwendeten Gentransfer-Vektoren. Maus-Leukämie-Retroviren bestehen aus einer einzelsträngigen DNA, die mit einem nuklearen Kernprotein und Polymerase (pol)-Enzymen komplexiert ist, welche durch einen Proteinkern (gag) verkapselt sind und durch eine Glycoproteinhülle (env) umgeben sind, die den Wirtsbereich festlegt. Die genomische Struktur von Retroviren schließt die gag-, pol- und env-Gene ein, welche am 5'- und 3'-Ende durch die langen terminalen Wiederholungen (LTR) eingeschlossen sind. Retrovirale Vektorensysteme nutzen die Tatsache aus, dass ein minimaler Vektor, der die 5'- und 3'-LTRs und das Verpackungssignal enthält, ausreichend ist, um eine Verpackung des Vektors sowie die Infektion und Integration in Zielzellen zu ermöglichen, vorausgesetzt, dass die viralen Strukturproteine in der Verpackungszelllinie zur Verfügung gestellt werden. Fundamentale Vorteile der Retrovirus-Vektoren für den Gentransfer schließen eine effiziente Infektion und Genexpression in den meisten Zelltypen ein, präzise Einzelkopie-Vektor-Integration in die chromosomale DNA der Zielzelle und die Leichtigkeit der Manipulierung des retroviralen Genoms.

[0083] Das Adenovirus besteht aus linearer doppelsträngiger DNA, die mit Kernproteinen komplexiert ist und von Capsidproteinen umgeben ist. Der Fortschritt der molekularen Virologie hat zu der Fähigkeit geführt, die Biologie dieser Organismen auszunutzen, um Vektoren herzustellen, die in der Lage sind, neue genetische Sequenzen in vivo in Zielzellen zu transduzieren. Auf Adenoviren basierende Vektoren exprimieren Genprodukt-Peptide in großer Menge. Adenovirus-Vektoren besitzen eine hohe Effizienz in der Infektiosität, selbst wenn niedrige Titer des Virus verwendet werden. Zusätzlich ist das Virus als zellfreies Virion vollständig infektiös, so dass die Injektion von produzierenden Zelllinien nicht notwendig ist. Ein weiterer potentieller Vorteil der adenoviralen Vektoren ist die Fähigkeit, eine Langzeitexpression heterologer Gene in vivo zu erzielen.

[0084] Mechanische Verfahren der DNA-Verabreichung schließen fusogene Lipidvesikel, wie Liposomen oder andere Vesikel für die Membranfusion, Lipidpartikel der DNA, welche kationische Lipide wie Lipofectin einschließen, Polylysin-vermittelten Transfer von DNA, direkte Injektion von DNA, wie beispielsweise Mikroinjektion von DNA in Keimbahn- oder somatische Zellen, pneumatisch verabreichte DNA-beschichtete Partikel, wie beispielsweise Goldpartikel unter Verwendung des „Gen-Gewehrs", und anorganische chemische Ansätze, wie die Calciumphosphat-Transfektion ein. Ein weiteres Verfahren ist die Liganden-vermittelte Gentherapie, welche die Komplexierung der DNA mit spezifischen Liganden einschließt, um Liganden-DNA-Konjugate zu bilden, um diese DNA zu einer spezifischen Zelle oder einem Gewebe zu dirigieren.

[0085] Es ist gefunden worden, dass die Injektion von Plasmid-DNA in Muskelzellen einen hohen Prozentsatz an Zellen hervorbringt, die transfiziert sind, und eine fortgesetzte Expression von Markergenen besitzen. Die DNA des Plasmids kann sich in das Genom der Zellen integrieren oder nicht. Nicht-Integration der transfizierten DNA würde die Transfektion und Expression von Genprodukt-Proteinen in terminal differenzierten, nicht-proliferativen Geweben über einen verlängerten Zeitraum ermöglichen, ohne Angst zu haben, dass Mutations-bedingte Insertionen, Deletion oder Veränderungen im zellulären oder mitochondrialen Genom auftreten. Langzeit, aber nicht notwendigerweise permanenter Transfer therapeutischer Gene in spezifischen Zellen kann Behandlungsformen für genetische Erkrankungen bereitstellen, oder für die prophylaktische Verwendung. Die DNA könnte periodisch re-injiziert werden, um das Niveau des Genprodukts ohne Mutationen, die in Genomen der Empfängerzellen auftreten, zu bewahren. Die Nicht-Integration der endogenen DNA kann die Anwesenheit mehrerer verschiedener exogener DNA-Konstrukte innerhalb einer Zelle ermöglichen, wobei alle der Konstrukte verschiedene Genprodukte exprimieren.

[0086] Partikel-vermittelte Gentransfer-Methoden wurden zuerst bei der Transformation von Pflanzengewebe verwendet. Mit einer Vorrichtung zur Partikelbombardierung oder „Gen-Gewehr", wird eine Bewegungskraft erzeugt, um die DNA-beschichteten hochdichten Partikel (wie beispielsweise Gold oder Tungsten) auf eine hohe Geschwindigkeit zu bringen, was das Eindringen in die Zielorgane, Gewebe oder Zellen ermöglicht. Partikelbombardierungen können in in vitro-Systemen verwendet werden, oder durch ex vivo- oder in vivo-Techniken, um DNA in Zellen, Gewebe oder Organe einzuschleusen.

[0087] Die Electroporation für den Gentransfer verwendet einen elektrischen Strom, um Zellen oder Gewebe für den Electroporations-vermittelten Gentransfer empfindlich zu machen. Ein kurzer elektrischer Impuls mit

einer festgelegten Feldstärke wird verwendet, um die Permeabilität einer Membran in solcher Weise zu erhöhen, dass DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Diese Technik kann in in vitro-Systemen verwendet werden, oder in ex vivo- oder in in vivo-Techniken, um die DNA in Zellen, Gewebe oder Organe einzuschleusen.

[0088] Der Träger-vermittelte Gentransfer in vivo kann verwendet werden, um fremde DNA in Zellen zu transfizieren. Der Träger-DNA-Komplex kann einfach in Körperflüssigkeiten oder den Blutfluss eingeschleust werden und dann ortsspezifisch in das Zielorgan oder Gewebe des Körpers dirigiert werden. Sowohl Liposomen und Polycationen, wie beispielsweise Polylysin, Lipofectine oder Cytofectine können verwendet werden. Liposomen, die zellspezifisch oder organspezifisch sind, können entwickelt werden und dadurch wird die fremde DNA, die durch das Liposom transportiert wird, durch die Zielzellen aufgenommen. Die Injektion von Immunoliposomen, die auf einen spezifischen Rezeptor oder bestimmte Zellen abzielen kann, kann als günstiges Verfahren zur Inserierung von DNA in Zellen verwendet werden, die diesen Rezeptor tragen. Ein weiteres Trägersystem, das verwendet worden ist, ist das Asialoglycoprotein/Polylysin-Konjugatsystem zur Einschleusung von DNA in Hepatocyten beim in vivo-Gentransfer.

[0089] Die transfizierte DNA kann ebenfalls mit anderen Arten von Trägern komplexiert werden, so dass die DNA in die Empfängerzelle getragen wird, und dann in dem Cytoplasma oder dem Nucleoplasma bleibt. Die DNA kann an nukleare Träger-Proteine in spezifisch konstruierten Vesikelkomplexen gebunden sein und direkt in den Nucleus getragen werden.

[0090] Die Genregulation von Angiostatin kann durch die Verabreichung von Verbindungen erreicht werden, die an das Angiostatin-Gen binden, oder an Kontrollregionen, die mit dem Angiostatin-Gen assoziiert sind, oder an dessen entsprechendes RNA-Transkript, um die Rate der Transkription oder Translation zu modifizieren. Zusätzlich können Zellen, die mit einer DNA-Sequenz transfiziert sind, die Angiostatin kodiert, an einen Patienten verabreicht werden, um eine in vivo-Quelle für Angiostatin bereitzustellen. Beispielsweise können Zellen mit einem Vektor transfiziert werden, der eine Nucleinsäuresequenz enthält, die Angiostatin kodiert.

[0091] Der Begriff „Vektor", so wie er hier verwendet wird, bedeutet einen Träger, der spezifische Nucleinsäuresequenzen enthalten oder sich damit verbinden kann, und welcher so wirkt, dass er die spezifischen Nucleinsäuresequenzen in eine Zelle transportiert. Beispiele solcher Vektoren schließen Plasmide und infektiöse Mikroorganismen wie Viren, oder nicht-virale Vektoren wie Liganden-DNA-Konjugate, Liposomen, Lipid-DNA-Komplexe ein. Es kann gewünscht sein, dass ein rekombinantes DNA-Molekül, was eine Angiostatin-DNA-Sequenz umfasst, operativ an eine Expressions-Kontrollsequenz gebunden wird, um einen Expressionsvektor zu bilden, der in der Lage ist, Angiostatin zu exprimieren. Die transfizierten Zellen können Zellen sein, die aus dem normalen Gewebe des Patienten stammen, das erkrankte Gewebe des Patienten oder Zellen, die nicht vom Patienten stammen.

[0092] Beispielsweise können Tumorzellen, die aus einem Patienten entfernt wurden, mit einem Vektor transfiziert werden, der in der Lage ist, das Angiostatin-Protein der vorliegenden Erfindung zu exprimieren, und dann in den Patienten wieder eingeschleust werden. Die transfizierten Tumorzellen produzieren Angiostatin-Niveaus in Patienten, die das Wachstum des Tumors inhibieren. Patienten können Menschen sein oder nicht-menschliche Tiere. Zellen können ebenfalls durch einen Nicht-Vektor transfiziert werden, oder durch physische oder chemische Verfahren, welche in dem Fachgebiet bekannt sind, wie beispielsweise Electroporation, Ionoporation oder über ein „Gen-Gewehr". Zusätzlich kann Angiostatin-DNA ohne die Hilfe eines Trägers in einen Patienten direkt injiziert werden. Insbesondere kann Angiostatin-DNA in Haut, Muskel oder Gewebe oder Blut injiziert werden.

[0093] Das Gentherapie-Protokoll für die Transfektion von Angiostatin in einen Patienten kann entweder durch die Integration von Angiostatin-DNA in das Genom von Zellen, in Minichromosomen, oder als separate replizierende oder nicht-replizierende DNA-Konstrukte im Zytoplasma oder Nucleoplasma der Zelle verlaufen. Die Angiostatin-Expression kann über einen langen Zeitraum anhalten, oder sie kann periodisch reinjiziert werden, um ein gewünschtes Niveau des Angiostatin-Proteins in der Zelle, dem Gewebe oder dem Organ oder ein vorher bestimmtes Blutniveau zu halten.

[0094] Angiostatin kann mit einer HPLC C4-Säule (siehe Tabelle 3) isoliert werden. Das Angiostatin-Protein wird bei 30 bis 35 % in einem Acetonitrilgradienten eluiert. Auf einem Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel-Electrophorese (PAGE)-Gel unter reduzierenden Bedingungen eluierte die Proteinbande mit der Aktivität als einzelner Peak bei ungefähr 38 kD.

[0095] Die Erfinder haben gezeigt, dass ein wachsender Primärtumor mit der Freisetzung von spezifischen Inhibitoren der Endothelzell-Proliferation assoziiert ist, einschließlich von Angiostatin, welcher die Angiogenese der Metastase unterdrückt, und dadurch das Wachstum der Metastasen selbst inhibiert. Die Quelle des Angiostatins, das mit dem Primärtumor assoziiert ist, ist nicht bekannt. Die Verbindung kann durch Abbau von Plasminogen durch eine spezifische Protease hergestellt werden, oder Angiostatin könnte durch Expression eines spezifischen Gens, das für Angiostatin kodiert, produziert werden.

[0096] Der angiogene Phänotyp von Primärtumoren hängt von der Produktion angiogener Peptide im Überschuss gegenüber Endothelzell-Inhibitoren ab, welche von normalen Zellen hergestellt werden, aber bei denen vermutet wird, dass sie während der Transformierung in eine Neoplasie herunter reguliert werden. Während die Produktion von Angiostatin in einer individuellen Tumorzelle bezogen auf die Produktion durch seinen parentalen Zelltyp herunter reguliert sein kann, kann die gesamte Menge an Inhibitor, die durch den gesamten-Tumor hergestellt wird, ausreichend sein, um in den Kreislauf einzudringen und das Endothelwachstum an entfernten Stellen der Mikrometastasen zu unterdrücken. Angiostatin bleibt im Kreislauf für signifikant längere Zeit als die angiogenen Peptide, die von einem Primärtumor freigesetzt werden. So scheinen angiogene Peptide lokal zu wirken, während Angiostatin global wirkt und im Blut mit einer relativ langen Halbwertszeit zirkuliert. Die Halbwertszeit von Angiostatin beträgt ungefähr 12 Stunden bis 5 Tage.

[0097] Obwohl nicht gewünscht ist, an die folgenden Hypothesen gebunden zu sein, wird vermutet, dass, wenn ein Tumor angiogen wird, dieser ein oder mehrere angiogene Peptide freisetzt (z. B. aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GM-CSF), welche lokal wirken, dass Endothel in der Nachbarschaft des Primärtumors von der extravasculären Richtung avisieren und nicht zirkulieren (oder nur mit kurzer Halbwertszeit zirkulieren). Diese angiogenen Peptide müssen in einer ausreichenden Menge hergestellt werden, um die Wirkung des Endothelzell-Inhibitors (Inhibitoren der Angiogenese) zu überwinden, damit ein Primärtumor kontinuierlich seine Population expandiert. Sobald ein derartiger Primärtumor gut wächst, setzt er kontinuierlich Endothelzell-Inhibitoren in den Kreislauf frei. Nach dieser Hypothese wirken diese Inhibitoren in einer entfernten Distanz vom Primärtumor, und zielen auf das Kapillarendothel einer Metastase in intravasculärer Richtung ab und zirkulieren fortgesetzt. Dadurch, und gerade, wenn eine entfernte Metastase beginnen könnte, die Angiogenese zu iniziieren, kann das Kapillarendothel in seiner Nachbarschaft durch das zufließende Angiostatin inhibiert werden.

[0098] Sobald ein Primärtumor eine ausreichende Größe erreicht hat, um Angiostatin zu veranlassen, kontinuierlich in die Zirkulation freigesetzt zu werden, ist es für ein zweites Tumorimplantat (oder eine Micrometastase) schwierig, seine eigene Angiogenese zu iniziieren oder zu steigern. Wenn ein zweites Tumorimplantat (z. B. im subkutanen Raum oder in die Cornea oder intravenös in die Lunge) auftritt, kurz nachdem der Primärtumor implantiert worden ist, wird der Primärtumor nicht in der Lage sein, den Sekundärtumor zu unterdrücken (da die Angiogenese in dem Sekundärtumor bereits im Gange ist). Wenn zwei Tumoren gleichzeitig implantiert werden (z. B. in gegenüberliegende Seiten), können die Inhibitoren einen äquivalenten inhibitorischen Infekt aufeinander auswirken.

[0099] Das Angiostatin der vorliegenden Erfindung kann sein:

(i) Verabreichung an Tumor-tragende Menschen oder Tiere als anti- angiogener Therapie;

(ii) Überwachung im menschlichen oder Tierserum, Urin oder Geweben als prognostische Marker; und

(iii) verwendet werden als die Grundlage, um im Serum und Urin von Krebspatienten auf ähnliche angiostatische Moleküle zu untersuchen.

[0100] Es wird als Teil der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen, dass Angiostatin aus einer Körperflüssigkeit wie Blut oder dem Urin von Patienten isoliert werden kann, oder das Angiostatin durch rekombinante DNA-Verfahren oder synthetische Peptidchemie-Verfahren produziert wird, die gewöhnlichen Fachleuten im Gebiet gut bekannt sind. Protein-Reinigungsverfahren sind in dem Fachgebiet gut bekannt und ein spezifisches Beispiel für ein Verfahren zur Reinigung von Angiostatin oder die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung wird in den unten beschriebenen Beispielen bereitgestellt. Die Isolierung von endogenem humanem Angiostatin wird unter Verwendung ähnlicher Techniken erreicht.

[0101] Ein Beispiel eines Verfahrens zum Herstellen von Angiostatin unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken bedingt die folgenden Schritte (1) Identifizierung und Reinigung von Angiostatin, wie oben diskutiert, und wie unten genauer beschrieben werden wird, (2) Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Inhibitors, (3) synthetische Erzeugung von 5'- und 3'-DNA-Oligonucleotidprimern der Angiostatin-Sequenz, (4) Amplifizierung der Angiostatin-Gensequenz unter Verwendung von Polymerase, (5) Inserieren der amplifzierten Sequenz in einen geeigneten Vektor, wie beispielsweise einen Expressionsvektor, (6) Inserieren des Gens, das der Vektor enthält, in einem Mikroorganismus oder ein anderes Expressionssys-

tem, das in der Lage ist, das inhibitorische Gen zu exprimieren, und (7) Isolieren des rekombinant hergestellten Inhibitors. Geeignete Vektoren schließen virale, bakterielle und eukaryontische (wie beispielsweise Hefe) Expressionsvektoren ein. Die oben erwähnten Techniken werden vollständiger beschrieben in Laborhandbüchern, wie beispielsweise „Molecular Cloning: A 1aboratory Manual", 2. Ausgabe von Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 1989. Die DNA-Sequenz des menschlichen Plasminogens ist publiziert worden (Browne, M. J. et al., „Expression of recombinant human plasminogen and aglycoplasminogen in HeLa cells", Fibrinolysis Vol. 5 (4), 257–260, 1991). Ein Beispiel eines solchen rekombinanten Expressionssystems ist Escherichia coli-Stamm XL-1B p TrcA/HasH4, welcher mit Erlaubnis von der American Type Culture Collection 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 unter der ATCC-Bezeichnung Nr. 98231 verfügbar ist, und welcher am 23. Oktober 1996 hinterlegt wurde.

[0102] Das Angiostatin-Gen kann ebenfalls aus Zellen oder Gewebe (wie beispielsweise Tumorzellen) isoliert werden, die hohe Konzentrationen an Angiostatin exprimieren, in dem (1) Messenger-RNA aus dem Gewebe isoliert wird, (2) die Reverse Transcriptase verwendet wird, um die entsprechende DNA-Sequenz zu erzeugen, und dann (3) die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den entsprechenden Primern verwendet wird, um die DNA-Sequenz zu amplifizieren, die für die aktive Angiostatin-Aminosäuresequenz kodiert.

[0103] Noch ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Angiostatin oder biologisch wirksamen Fragmenten davon ist durch Peptidsynthese. Sobald ein biologisch aktives Fragment von Angiostatin unter Verwendung des Testsystems, das unten genauer beschrieben werden wird, gefunden wird, kann es sequenziert werden, beispielsweise durch automatisierte Peptidsequenzierverfahren. Alternativ dazu kann die DNA-Sequenz unter Verwendung der manuellen oder automatisierten Sequenzverfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, bestimmt werden, sobald das Gen oder die DNA, die für Angiostatin kodiert, isoliert worden ist, beispielsweise durch die oben erwähnten Methoden. Die Nucleinsäuresequenz wiederum stellt Informationen bezüglich der Aminosäuresequenz bereit. Diese kann aus der entsprechenden DNA-Sequenz bestimmt werden, wenn das biologisch wirksame Fragment durch die spezifischen Methoden, wie beispielsweise Trypsinverdau erzeugt wird, oder wenn das Fragment N-terminal sequenziert worden ist.

[0104] Sobald die Aminosäuresequenz des Peptids bekannt ist, kann das Fragment durch Techniken, die im Fachgebiet gut bekannt sind, synthetisiert werden, wie beispielsweise angegeben in „Solid Phase Peptide Synthesis: A practical Approach" E. Atherton und R. C. Sheppard, IRL Press, Oxford, England. Gleichermaßen können mehrere Fragmente synthetisiert werden, die anschließend miteinander verbunden werden, um größere Fragmente zu bilden. Diese synthetischen Peptidfragmente können ebenfalls mit Aminosäuresubstitutionen an spezifischen Stellen hergestellt werden, um die agonistische und antagonistische Wirkung in vitro und in vivo zu testen. Peptidfragmente, die eine hoch-affine Bindung an Gewebe besitzen, können verwendet werden, um den Angiostatin-Rezeptor mit Affinitätssäulen zu isolieren. Die Isolierung und die Reinigung des Angiostatin-Rezeptors ist ein fundamentaler Schritt in Richtung der Aufklärung des Mechanismus der Wirkung von Angiostatin. Die Isolierung eines Angiostatin-Rezeptors und die Identifizierung von Angiostatin-Agonisten und -Antagonisten wird die Entwicklung von Medikamenten erleichtern, um die Aktivität des Angiostatin-Rezeptors zu modulieren, dem endgültigen Weg zur biologischen Aktivität. Die Isolierung des Rezeptors ermöglicht die Konstruktion von Nucleotidsonden, um die Stelle und die Synthese des Rezeptors unter Verwendung von in situ und Lösungs-Hybridisierungstechniken zu überwachen. Des Weiteren kann das Gen des Angiostatin-Rezeptors isoliert werden, in einen Expressionsvektor eingeschlossen werden und in Zellen transfiziert werden, beispielsweise in die Tumorzellen eines Patienten, um die Fähigkeit des Zelltyps zu erhöhen, des Gewebes oder des Tumors, Angiostatin zu binden und die lokale Angiogenese zu inhibieren.

[0105] Angiostatin ist wirksam in der Behandlung von Erkrankungen oder Prozessen, die durch Angiogenese vermittelt werden oder diese einschließen. Die vorliegende Erfindung betrifft das Verfahren zur Behandlung von Angiogenese-vermittelten Erkrankungen, mit einer wirksamen Menge von Angiostatin, oder eines biologisch wirksamen Fragmentes davon, oder Kombinationen aus Angiostatin-Fragmenten, die gemeinsam die angiogene Wirkung besitzen, oder Angiostatin-Agonisten und -Antagonisten. Die Angiogenese-vermittelten Erkrankungen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, solide Tumoren, im Blut vorhandene Tumoren, wie beispielsweise Leukämien, Tumormetastasen, benigne Tumoren, beispielsweise Hämangiome, akustische Neurome, Neurofibrome, Trachome und pyogene Granulome; rheumatoide Arthritis, Psoriasis, oculare angiogene Erkrankungen, beispielsweise diabetische Retinopathie, Retinopathie der Prematurity, maculare Degeneration, Abstoßung bei der Hornhauttransplantation, neovasculäre Glaucome, retrolentale Fibroplasie, Rubeose, Osler-Webber-Syndrom, Myocardangiogenese, Plaque-Neovascularisierung, Telangiectasia, hämophile Gelenke, Angiofibrome und Wundgranulierung. Angiostatin ist nützlich bei der Behandlung von Erkrankungen einer überschüssigen oder nicht normalen Stimulierung von Endothelzellen. Diese Erkrankungen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, intestinale Adhäsion, Morbus Crohn, Atherosclerose, Scleroder-

ma und hypertrophische Narben, d. h. Keloide. Angiostatin kann als Mittel zur Geburtenkontrolle durch die Verhinderung der Vascularisierung verwendet werden, die für die Einnistung des Embryo benötigt wird. Angiostatin ist nützlich bei der Behandlung von Erkrankungen, die Angiogenese als pathologische Konsequenz aufweisen, wie beispielsweise Cat-Scratch-Disease (Rochele minalia quintosa) und Geschwüre (Helicobacter pylori).

[0106] Die synthetischen Peptidfragmente von Angiostatin haben eine Vielzahl von Verwendungen. Das Peptid, das an den Angiostatin-Rezeptor mit hoher Spezifität und Avidität bindet, wird radioaktiv markiert und für die Visualisierung und Quantifizierung von Bindungsstellen unter Verwendung von autoradiographischen und Membranbindungstechniken verwendet. Diese Anwendung stellt wichtige diagnostische und Recherchemittel bereit. Das Wissen der Bindungseigenschaften des Angiostatin-Rezeptors erleichtert die Untersuchung der Transduktionsmechanismen, die mit dem Rezeptor verbunden sind.

[0107] Zusätzlich ermöglicht die Markierung von Angiostatin Peptiden mit kurzlebigen Isotopen die Visualisierung von Rezeptorbindungsstellen in vivo unter Verwendung von Positronenemissions-Tomographie oder anderen modernen radiographischen Techniken, um Tumoren mit Angiostatin-Bindungsstellen zu lokalisieren.

[0108] Die systematische Substituierung von Aminosäuren durch diese synthetisierten Peptide bringt hoch-affine Peptidagonisten und -antagonisten hervor, die an den Angiostatin-Rezeptor binden, welche die Angiostatin-Bindung an ihren Rezeptor verstärken oder reduzieren. Solche Agonisten werden verwendet, um das Wachstum von Mikrometastasen zu unterdrücken, wodurch die Ausbreitung des Krebs beschränkt wird. Antagonisten gegen Angiostatin werden in Situationen verwendet, bei denen eine nicht-adäquate Vascularisierung stattfindet, um die inhibitorischen Wirkungen von Angiostatin zu blockieren und die Angiogenese zu fördern. Beispielsweise könnte diese Behandlung therapeutische Wirkungen bei der Wundheilung bei Diabetikern haben.

[0109] Angiostatin-Peptide werden verwendet, um Affinitätsäulen für die Isolierung des Angiostatin-Rezeptors aus kultivierten Tumorzellen zu entwickeln. Die Isolierung und Reinigung des Angiostatin-Rezeptors wird von der Aminosäuresequenzierung gefolgt. Unter Verwendung dieser Information kann das Gen oder die Gene, die für den Angiostatin-Rezeptor kodieren, identifiziert und isoliert werden. Als nächstes werden klonierte Nucleinsäuresequenzen für die Insertion in Vektoren entwickelt, die in der Lage sind, den Rezeptor zu exprimieren. Diese Techniken sind Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Die Transfektion der Nucleinsäuresequenz (-sequenzen), die den Angiostatin-Rezeptor kodieren, in Tumorzellen und die Expression des Rezeptors durch die transfizierten Tumorzellen steigert die Anfälligkeit dieser Zellen für das endogene oder exogene Angiostatin und senkt dadurch die Rate des metastatischen Wachstums.

[0110] Cytotoxische Mittel, wie beispielsweise Ricin, werden an Angiostatin und hoch affine Angiostatin-Peptidfragmente gebunden, wodurch sie ein Mittel für die Zerstörung von Zellen bereitstellen, die Angiostatin binden. Diese Zellen können an vielen Stellen gefunden werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Mikrometastasen und Primärtumore. Peptide werden an cytotoxische Mittel gebunden, und in einer Weise infundiert, die so ausgerichtet ist, dass sie die Verabreichung an den gewünschten Ort maximiert. Beispielsweise werden Ricin-gebundene hochaffine Angiostatin-Fragmente durch eine Kanüle in Gefäße, die die Zielstelle versorgen, oder direkt in das Ziel eingeschleust. Solche Mittel können ebenfalls in einer kontrollierten Weise durch osmotische Pumpen verabreicht werden, die an Infusionskanülen gebunden sind. Eine Kombination von Angiostatin-Antagonisten kann gemeinsam mit Stimulatoren der Angiogenese verabreicht werden, um die Vascularisierung von Gewebe zu verstärken. Dieses Therapieregime stellt ein wirksames Mittel zur Zerstörung von metastasierendem Krebs dar.

[0111] Angiostatin kann in Kombination mit anderen Zusammensetzungen und Pro zeduren zur Behandlung von Erkrankungen verwendet werden. Beispielsweise kann ein Tumor konventionell mit Hilfe der Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie behandelt werden, und mit Angiostatin kombiniert werden, und dann kann Angiostatin anschließend an den Patienten verabreicht werden, um die Ruhe der Micrometastasen zu verlängern und das Wachstum jedes restlichen Primärtumors zu stabilisieren und zu inhibieren. Zusätzlich werden Angiostatin, Angiostatin-Fragmente, Angiostatin-Antiseren, Angiostatin-Rezeptor-Agonisten, Angiostatin-Rezeptor-Antagonisten oder Kombinationen daraus mit pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten zusammengegeben und gegebenenfalls mit einer Matrix für die verzögerte Freisetzung, wie beispielsweise biologisch abbaubare Polymere, um therapeutische Zusammensetzungen zu bilden.

[0112] Eine Matrix für die verzögerte Freisetzung, die hier verwendet wird, ist eine Matrix, die aus Materialien besteht, für gewöhnlich Polymeren, die durch enzymatische oder Säure-/Basehydrolyse oder durch Auflösung abbaubar sind. Sobald sie in den Körper inseriert sind, wird auf die Matrix durch Enzyme und Körperflüssigkei-

ten eingewirkt. Die Matrix für die verzögerte Freisetzung wird vorzugsweise aus biologisch kompatiblen Materialien ausgewählt, wie beispielsweise Liposomen, Polylactin (Polymilchsäure), Polyglycolid (Polymer der Glycolsäure), Polylactid-co-glycolid (Co-Polymer aus Milchsäure und Glycolsäure), Polyanhydriden, Poly(ortho)ester, Polypeptiden, Hyaluronsäure, Collagen, Chondroitinsulfat, Carbonsäuren, Fettsäuren, Phospholipiden, Polysacchariden, Nucleinsäuren, Polyaminosäuren, Aminosäuren, wie beispielsweise Phenylalanin, Tyrosin, Isoleucin, Polynucleotiden, Polyvinylpropylen, Polyvinylpyrrolidon und Silicon. Eine bevorzugt biologisch abbaubare Matrix ist eine Matrix aus entweder Polylactid, Polyglycolid oder Polylactid-co-glycolid (Co-Polymere aus Milchsäure und Glycolsäure).

[0113] Die Angiogenese-modulierende therapeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann ein Feststoff, eine Flüssigkeit oder ein Aerosol sein und kann durch irgendeinen bekannten Verabreichungsweg verabreicht werden. Beispiele für feste therapeutische Zusammensetzungen schließen Pillen, Cremes und implantierbare Dosierungseinheiten ein. Pillen können oral verabreicht werden, die therapeutischen Cremes können topisch verabreicht werden. Die implantierbare Dosierungseinheit kann lokal verabreicht werden, beispielsweise an einer Tumorstelle, oder sie kann für die systemische Freisetzung der therapeutischen Angiogenese modulierenden Zusammensetzung implantiert werden, beispielsweise subkutan. Beispiele für eine Flüssigzusammensetzung schließen Formulierungen ein, die für die subkutane, intravenöse, intraarterielle Injektion angepasst sind, und Formulierungen für die topische und intraokulare Verabreichung. Beispiele für Aerosolformulierungen schließen Inhalationsformulierungen für die Verabreichung in die Lungen ein. Das erfindungsgemäße Angiostatin kann ebenfalls verwendet werden, um Antikörper zu erzeugen, die spezifisch für den Inhibitor sind und für dessen Rezeptor. Die Antikörper können entweder polyklonale Antikörper oder monoklonale Antikörper sein. Diese Antikörper, die spezifisch an Angiostatin oder Angiostatin-Rezeptoren binden, können in diagnostischen Verfahren und Kits verwendet werden, die gewöhnlichen Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, um Angiostatin oder Angiostatin-Rezeptoren in einer Körperflüssigkeit oder in Gewebe nachzuweisen oder zu quantifizieren. Ergebnisse aus diesen Tests können verwendet werden, um das Auftreten oder das Wiederauftreten von Krebs oder anderen Angiogen-vermittelten Erkrankungen vorherzusagen oder zu diagnostizieren.

[0114] Das Angiostatin kann ebenfalls in einem diagnostischen Verfahren und einem Kit verwendet werden, um Antikörper nachzuweisen und zu quantifizieren, die in der Lage sind, Angiostatin zu binden. Diese Kits werden den Nachweis von zirkulierenden Angiostatin-Antikörpern erlauben, was die Ausbreitung von Mikrometastasen in Gegenwart von Angiostatin anzeigt, welche von Primärtumoren in situ freigesetzt werden. Patienten, die solche zirkulierenden Anti-Angiostatin-Antikörper haben, können möglicherweise leichter mehrere Tumore und Krebse entwickeln, und können möglicherweise eher ein Wiederauftreten von Krebs nach Behandlungen oder Remissionsperioden aufweisen. Die Fab-Fragmente dieser Anti-Angiostatin-Antikörper können als Antigene verwendet werden, um Anti-Angiostatin-Fab-Fragment-Antiseren herzustellen, die verwendet werden können, um Anti-Angiostatin-Antikörper zu neutralisieren. Ein derartiges Verfahren würde das Entfernen von zirkulierendem Angiostatin durch Anti-Angiostatin-Antikörper reduzieren, wodurch die Angiostatin-Niveaus, die zirkulieren, effizient erhöht werden.

[0115] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Blockierung der Wirkung von überschüssigem endogenem Angiostatin. Dies kann durch passive Immunisierung eines Menschen oder eines Tiers mit Antikörpern gemacht werden, die für das nicht gewünschte Angiostatin in dem System spezifisch sind. Diese Behandlung kann wichtig sein bei der Behandlung von abnormaler Ovulation, Menstruation und Plazentabildung sowie der Vasculogenese. Dies stellt ein nützliches Mittel zur Untersuchung der Wirkung der Angiostatin-Entfernung auf metastatische Prozesse bereit. Das Fab-Fragment der Angiostatin-Antikörper enthält die Bindungsstelle für Angiostatin. Dieses Fragment wird aus Angiostatin-Antikörpern unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Techniken isoliert. Die Fab-Fragmente von Angiostatin-Antiseren werden als Antigene verwendet, um die Herstellung von Fab-Fragment-Antiserum zu erzeugen. Die Infusion dieses Antiserums gegen die Fab-Fragmente von Angiostatin hindert Angiostatin daran, an Angiostatin-Antikörper zu binden. Der therapeutische Nutzen wird durch die Neutralisierung der endogenen Anti-Angiostatin-Antikörper erreicht, indem die Bindung von Angiostatin an die Fab-Fragmente von Anti-Angiostatin blockiert wird. Die Nettowirkung dieser Behandlung ist die Erleichterung der Fähigkeit des endogenen zirkulierenden Angiostatins, die Zielzellen zu erreichen, wodurch die Ausbreitung von Metastasen vermindert wird.

[0116] Es ist klar, dass die vorliegende Erfindung beabsichtigt, jegliches Derivat von Angiostatin einzuschließen, das Endothel-inhibierende Wirkung aufweist. Die vorliegende Erfindung schließt das gesamte Angiostatin-Protein, Derivate des Angiostatin-Proteins und biologisch wirksame Fragmente des Angiostatin-Proteins ein. Diese schließen Proteine mit Angiostatin-Aktivität ein, die Aminosäuresubstitution haben, oder die Zucker oder andere Moleküle an die funktionalen Gruppen der Aminosäure angehängt haben. Die vorliegende Erfin-

dung schließt auch Gene ein, die für Angiostatin und Angiostatin-Rezeptor kodieren, und Proteine, die durch solche Gene exprimiert werden.

[0117] Die Proteine und Proteinfragmente mit Angiostatin-Aktivität, die oben beschrieben wurde, können als isolierte und im Wesentlichen gereinigte Proteine und Proteinfragmente in pharmazeutisch annehmbaren Formulierungen unter Verwendung von Formulierungsverfahren bereitgestellt werden, die für gewöhnlich den Fachleuten bekannt sind. Diese Formulierungen können durch Standardrouten verabreicht werden. Im Allgemeinen können die Kombinationen durch topische, transdermale, intraperitoneale, intracraniale, intracerebroventriculäre, intracerebrale, intravaginale, intraunterine, orale, rectale oder parenterale (z. B. intravenöse, intraspinale, subkutane oder intramuskuläre) Wege verabreicht werden. Zusätzlich kann das Angiostatin in biologisch abbaubare Polymere eingeschlossen werden, was die verzögerte Freisetzung der Verbindung ermöglicht, wobei die Polymere in der Nähe implantiert werden, wo die Medikamentenverabreichtung gewünscht wird, beispielsweise an der Stelle eines Tumors, oder sie so implantiert werden, dass das Angiostatin langsam systemisch freigesetzt wird. Osmotische Minipumpen können ebenfalls verwendet werden, um eine kontrollierte Freisetzung von hohen Konzentrationen von Angiostatin durch Kanülen an dem Ort von Interesse bereitzustellen, wie beispielsweise direkt in das metastatische Wachstum oder in die vasculäre Zufuhr des Tumors. Die biologisch abbaubaren Polymere und ihre Verwendung sind beispielsweise im Detail beschrieben in Brem et al., J.Neurosurg. 74: 441–446 (1991).

[0118] Die Dosierung des erfindungsgemäßen Angiostatins hängt von dem Krankheitsstadium oder dem Zustand der zu behandeln ist und anderen klinischen Faktoren, wie beispielsweise dem Gewicht und dem Zustand des Menschen oder des Tiers und der Verabreichungsroute der Verbindung ab. Zur Behandlung von Menschen oder Tieren können ungefähr 0,5 mg/kg bis 500 mg/kg des Angiostatins verabreicht werden. Abhängig von der Halbwertszeit des Angiostatins in dem besonderen Tier oder Menschen kann das Angiostatin zwischen mehreren Malen pro Tag bis einmal pro Woche verabreicht werden. Es ist klar, dass die vorliegende Erfindung Anwendung sowohl für die Verwendung beim Menschen als auch in der Veterinärmedizin hat. Die erfindungsgemäßen Methoden ziehen einzelne wie auch mehrfache Verabreichungen in Erwägung, welche entweder gleichzeitig oder über verlängerte Zeiträume verabreicht werden.

[0119] Die Angiostatin-Formulierungen schließen solche ein, die für orale, rektale, ophthalmische (einschließlich intravitreale oder intracamerale), nasale, topische (einschließlich buccal und sublingual), intrauterine, vaginale oder parenterale (einschließlich subkutane, intraperitoneale, intramuskuläre, intravenöse, intradermale, intracranielle, intratracheale und epidurale) Verabreichungen verwendet werden. Die Angiostatin-Formulierungen können in günstiger weise in Einheitsdosierungsformen vorliegen und können durch konventionelle pharmazeutische Techniken hergestellt werden. Solche Techniken schließen den Schritt des In-Verbindung-Bringens des wirksamen Inhaltsstoffs und der pharmazeutischen Träger oder Exzipienten ein. Im Allgemeinen werden die Formulierungen durch gleichmäßiges und eng ineinander und In-Kontakt-Bringen des wirksamen Inhaltsstoffs mit Flüssigträgern oder fein verteilten festen Trägern oder beiden und dann, falls notwendig, das Formen des Produkts hergestellt.

[0120] Die Formulierungen, die für die parenterale Verabreichung geeignet sind, schließen wässrige und nicht wässrige sterile Injektionslösungen ein, welche Anti-Oxidationsmittel, Puffer, Bacteriostatica und Lösstoffe enthalten, die die Formulierung isotonisch mit Blut des beabsichtigten Empfängers machen; und wässrige und nicht-wässrige sterile Suspensionen, die Suspensionsmittel und Verdickungsmittel einschließen. Die Formulierungen können in Einheitsdosierungs- und Mehrfachdosierungsbehältern vorliegen, beispielsweise in versiegelten Ampullen und Phiolen, und sie können in einem gefriergetrockneten (lyophilisierten) Zustand gelagert werden, der nur die Zugabe des sterilen Flüssigträgers notwendig macht, beispielsweise Wasser für Injektionen, direkt vor der Verwendung. Nicht vorbereitete Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Körnern und Tabletten der zuvor beschriebenen Art hergestellt werden.

[0121] Bevorzugte Einheitsdosierungsformulierungen sind solche, die eine tägliche Dosierung oder Einheit, eine tägliche Subdosierung oder einen geeigneten Anteil davon des zu verabreichenden Inhaltsstoffs enthalten. Es sollte klar sein, dass zusätzlich zu den Inhaltsstoffen, insbesondere den oben erwähnten, die erfindungsgemäßen Formulierungen andere Mittel einschließen können, die konventionellerweise im Fachgebiet verwendet werden, wobei die Art der jeweiligen Formulierung in Betracht gezogen wird. Gegebenenfalls können cytotoxische Mittel enthalten sein, oder in anderer Form mit Angiostatin-Proteinen kombiniert werden, oder biologisch funktionale Peptidfragmente davon, um eine Doppeltherapie für den Patienten bereitzustellen.

[0122] Angiogenese inhibierende Peptide der vorliegenden Erfindung können in standardisierten mikrochemischen Anlagen synthetisiert werden und mittels HPLC und Massenspectrophotometrie auf die Reinheit ge-

testet werden. Die Verfahren für die Peptidsynthese, HPLC-Reinigung und Massenspectrophotometrie sind Fachleuten auf dem Gebiet allgemein geläufig. Angiostatin-Peptide und Angiostatin-Rezeptorenpeptide werden ebenfalls in rekombinanten Coli- oder Hefeexpressionssystemen hergestellt und mittels Säulenchromatographie gereinigt.

[0123] Verschiedene Peptidfragmente des intakten Angiostatin-Moleküls können zur Verwendung in verschiedenen Anwendungen synthetisiert werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die folgenden; als Antigene für die Entwicklung spezifischer Antiseren, als Agonisten und Antagonisten, die an Angiostatin-Bindungsstellen wirksam sind, als Peptide, die gebunden werden an oder für das gezielte Abtöten von Zellen, die Angiostatin binden, mit cytotoxischen Mitteln in Kombination verwendet werden. Die Aminosäuresequenzen, die diese Peptide umfassen, werden auf der Grundlage ihrer Position aus den äußeren Bereichen des Moleküls ausgewählt, und sind für die Bindung von Antiseren zugänglich. Die Amino- und Carboxytermini von Angiostatin sowie der Mittelbereich des Moleküls werden getrennt in den Fragmenten, die synthetisiert werden, dargestellt.

[0124] Diese Peptidsequenzen werden mit bekannten Sequenzen unter Verwendung von Proteinsequenzdatenbanken, wie GenBank, Brookhaven Protein, SWISS-PROT und PIR verglichen, um potentielle Sequenzhomologien zu bestimmen. Diese Information erleichtert die Eliminierung von Sequenzen, die einen hohen Grad an Sequenzhomologie zu anderen Molekülen aufweisen, wodurch das Potential für eine hohe Spezifität bei der Entwicklung von Antiseren, Agonisten und Antagonisten für Angiostatin verbessert wird.

[0125] Angiostatin und von Angiostatin abstammende Peptide können an andere Moleküle unter Verwendung von Standardverfahren gebunden werden. Die Amino- und Carboxytermini von Angiostatin enthalten beide Tyrosin- und Lysinreste und sind isotopisch und nicht-isotopisch durch zahlreiche Techniken markierbar, z. B. durch radioaktive Markierung unter Verwendung von konventionellen Techniken (Tyrinreste-Chloramin T, Iodogen, Lactoperoxidase; Lysinrest-Bolton-Hunter-Reagent). Diese Bindungstechniken sind Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Alternativ dazu wird Tyrosin oder Lysin an Fragmente, die nicht diese Reste aufweisen, angehängt, um die Markierung der reaktiven Amino- und Hydroxylgruppen an dem Peptid zu erleichtern. Die Bindungstechnik wird auf der Grundlage der funktionalen Gruppen ausgewählt, die auf den Aminosäuren verfügbar sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Amino, Sulfhydral, Carboxyl, Amid, Phenol und Imidazol. Zahlreiche Reagenzien, die verwendet werden, um diese Bindungen durchzuführen, schließen unter anderem Glutaraldehyd, diazotisiertes Benzidin, Carbodiimid und p-Benzochinon ein.

[0126] Angiostatin-Peptide werden chemisch an Isotope, Enzyme, Trägerproteine, cytotoxische Mittel, Fluoreszenzmoleküle, Chemiluminescenz-, Bioluminescenz- und andere Verbindungen für eine Vielzahl an Anwendungen gebunden. Die Effizienz der Bindungsreaktion wird unter Verwendung verschiedener Techniken bestimmt, die für eine spezifische Reaktion geeignet sind. Beispielsweise wird die radioaktive Markierung eines Angiostatin-Peptids mit ^{125}Iod unter Verwendung von Chloramin T und $Na^{125}I$ mit hoher spezifischer Aktivität erreicht. Die Reaktion wird durch Natriummetabisulfid beendet, und das Gemisch wird auf Einwegsäulen entsalzt. Das markierte Peptid wird von der Säule eluiert und Fraktionen werden eingesammelt. Aliquote werden aus jeder Fraktion entfernt und die Radioaktivität wird in einem Gamma-Zählgerät gemessen. Auf diese Weise wird das nicht umgesetzte $Na^{125}I$ von dem markierten Angiostatin-Peptid abgetrennt. Die Peptidfraktionen mit der höchsten spezifischen Radioaktivität werden für die anschließende Verwendung, beispielsweise die Analyse der Fähigkeit an Angiostatin-Antiseren zu binden, gelagert.

[0127] Andere Anwendungen der Peptidkonjugierung sind die Produktion von polyklonalen Antiseren. Beispielsweise werden Angiostatin-Peptide, die Lysinreste enthalten, an gereinigtes Rinderserumalbumin unter Verwendung von Glutaraldehyd gebunden. Die Effizienz der Reaktion wird durch Messung der Inkorporation des radioaktiv markierten Peptids bestimmt. Nicht umgesetztes Glutaraldehyd und Peptid werden durch Dialyse getrennt. Das Konjugat wird für die anschließende Verwendung gelagert.

[0128] Antiserum gegen Angiostatin, Angiostatin-Analoga, Peptidfragmente von Angiostatin und des Angiostatin-Rezeptors können hergestellt werden. Nach der Peptidsynthese und der Reinigung werden sowohl monoklonale und polyklonale Antiseren unter Verwendung etablierter Techniken, die Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt sind, erzeugt. Beispielsweise können polyklonale Antiseren in Kaninchen, Schafen, Ziegen oder anderen Tieren erzeugt werden. Angiostatin-Peptide, die an ein Trägermolekül gebunden werden, wie beispielsweise Rinderserumalbumin oder Angiostatin selbst, wird mit einem Adjuvanzgemisch kombiniert, emulgiert und subkutan an verschiedenen Stellen auf dem Rücken, dem Nacken, den Seiten und manchmal in die Fußsohlen injiziert. Boost-Injektionen werden in regulären Intervallen, wie beispielsweise alle 2 bis 4 Wochen durchgeführt. Blutproben werden durch Venenpunktion beispielsweise unter Verwendung der kleinen Ohrve-

nen nach Dilatation ungefähr 7 bis 10 Tage nach jeder Injektion gewonnen. Die Blutproben werden über Nacht bei 4°C verklumpen gelassen und werden bei ungefähr 2.400 × g bei 4°C für ungefähr 30 Minuten zentrifugiert. Das Serum wird entfernt, aliquotiert und bei 4°C für die sofortige Verwendung oder bei –20 bis –90°C für die anschließende Analyse verwendet.

[0129] Alle Serumproben für die Erzeugung polyklonaler Antiseren oder Medienproben aus der Produktion der monoklonalen Antiseren werden zur Bestimmung des Antikörpertiters analysiert. Der Titer wird auf verschiedene Weisen etabliert, beispielsweise unter Verwendung von Dot-Blots und Dichteanalysen, und ebenfalls durch die Präzipitierung radioaktiv markierter Peptid-Antikörperkomplexe unter Verwendung von Protein A, sekundären Antiseren, kaltem Ethanol oder Aktivkohle-Dextran, gefolgt von der Aktivitätsmessung mit einem Gamma-Zählgerät. Das Antiserum mit dem höchsten Titer wird ebenfalls auf Affinitätssäulen gereinigt, welche kommerziell erhältlich sind. Angiostatin-Peptide werden an das Gel in der Affinitätssäule gebunden. Antiserumproben werden durch die Säule durchgeleitet und Anti-Angiostatin-Antikörper bleiben an die Säule gebunden. Diese Antikörper werden anschließend eluiert, eingesammelt und für die Bestimmung des Titers und die Spezifität untersucht.

[0130] Das Angiostatin-Antiserum mit dem höchsten Titer wird getestet, um das Folgende festzustellen: a) optimale Antiserumverdünnung für die höchste spezifische Bindung des Antigens und niedrigste nicht-spezifische Bindung, b) die Fähigkeit, zunehmende Mengen an Angiostatin-Peptid in einer Standardverdrängungskurve zu binden, c) potentielle Kreuzreaktivität mit verwandten Peptiden und Proteinen, einschließlich Plasminogen und ebenfalls Angiostatin verwandter Spezies feststellen, d) Fähigkeit, Angiostatin-Peptide in Extrakten aus Plasma, Urin, Geweben und Zellkulturmedien nachzuweisen.

[0131] Kits zur Messung von Angiostatin und des Angiostatin-Rezeptors können ebenfalls gewonnen werden. Antiseren, die den höchsten Titer und Spezifität besitzen und Angiostatin-Peptide in Extrakten aus Plasma, Urin, Geweben und in Zellkulturmedien nachweisen können, werden weiter untersucht, um leicht zu verwendende Kits für die schnelle, zuverlässige, empfindliche und spezifische Messung und Lokalisierung von Angiostatin zu etablieren. Diese Testkits schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, die folgenden Techniken: kompetitive und nicht kompetitive Tests, Radioimmunoassay, Bioluminescenz- und Chemoluminescenztests, fluorometrische Tests, Sandwich-Tests, immunradiometrische Tests, Dot-Blots, enzymgebundene Tests einschließlich ELISA, Mikrotiterplatten, Antikörper-beschichtete Streifen oder Tauchstreifen für die schnelle Überwachung bei Urin oder Blut und Immuncytochemie. Für jeden Kit werden der Bereich, die Sensitivität, die Präzision, die Zuverlässigkeit, die Spezifität und die Reproduzierbarkeit des Tests ermittelt. Eine Variation innerhalb des Tests und Zwischentests wird an den Punkten 20 %, 50 % und 80 % der Standardverdrängungskurve oder Aktivität etabliert.

[0132] Ein Beispiel eines Assay-Kits, der für gewöhnlich in der Recherche und in der Klinik verwendet wird, ist ein Radioimmunassay (RIA)-Kit. Ein Angiostatin-RIA wird unten dargestellt. Nach erfolgreicher Radioiodierung und Reinigung von Angiostatin oder eines Angiostatin-Peptids wird das Antiserum, das den höchsten Titer besitzt, in mehreren Verdünnungen in Röhrchen gegeben, die einen relativ konstanten Gehalt an Radioaktivität besitzen, wie beispielsweise 10.000 cpm in einem geeigneten Puffersystem. Andere Röhrchen enthalten Puffer oder präimmunes Serum, um die nicht-spezifische Bindung festzustellen. Nach der Inkubation bei 4°C für 24 Stunden wird Protein A hinzugegeben und die Röhrchen werden gevortexed, bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert und bei ungefähr 2.000–2.500 × g bei 4°C zentrifugiert, um die Komplexe des Antikörpers, der an markiertes Antigen gebunden hat, zu präzipitieren. Der Überstand wird durch Absaugen entfernt und die Radioaktivität in den Pellets wird im Gamma-Zählgerät gemessen. Die Antiserumverdünnung, die ungefähr 10 bis 40 % des markierten Peptids nach Abzug der nicht-spezifischen Bindung bindet, wird weiter charakterisiert.

[0133] Als nächstes wird ein Verdünnungsbereich (ungefähr 0,1 pg bis 10 ng) des Angiostatin-Peptids, das für die Entwicklung des Antiserum verwendet worden ist, durch Zugabe bekannter Mengen des Peptids zu den Röhrchen, die radioaktiv markiertes Peptid und Antiserum enthalten, ermittelt. Nach einer zusätzlichen Inkubationsdauer, beispielsweise 24 bis 48 Stunden, wird Protein A hinzugegeben und die Röhrchen werden zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Radioaktivität im Pellet gemessen. Die Verdrängung der Bindung des radioaktiv markierten Angiostatin-Peptids durch das nichtmarkierte Angiostatin-Peptid (Standard) stellt eine Standardkurve bereit. Mehrere Konzentrationen anderer Angiostatin-Peptidfragmente, von Plasminogen, von Angiostatin verschiedener Spezies, und homologer Peptide werden zu dem Teströhrchen hinzugegeben, um die Spezifität des Angiostatin-Antiserums zu kennzeichnen.

[0134] Extrakte verschiedener Gewebe, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, primäre und sekundäre Tu-

more, Lewis-Lungentumor, Kulturen Angiostatinproduzierender Zellen, Placenta, Uterus und anderer Gewebe, wie beispielsweise Hirn, Leber und Darm werden unter Verwendung von Extraktionstechniken, die erfolgreich verwendet worden sind, hergestellt, um Angiostatin zu extrahieren. Nach der Lyophilisierung oder einer Speed-Vac der Gewebeextrakte wird Testpuffer hinzugegeben und verschiedene Aliquots werden in die RIA-Röhrchen gegeben. Die Extrakte bekannter Angiostatin-produzierender Zellen ergeben Verdrändungskurven, die parallel zur Standardkurve sind, wobei Extrakte aus Geweben, die kein Angiostatin herstellen, radioaktiv markiertes Angiostatin von dem Angiostatin-Antiserum nicht verdrängen. Zusätzlich werden Extrakte aus Urin, Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit von Tieren mit Lewis-Lungencarzinom zu den Teströhrchen in zunehmenden Mengen hinzugegeben. Parallele Verdrängungskurven zeigen die Brauchbarkeit des Angiostatin-Tests an, um Angiostatin in Geweben und Körperflüssigkeiten zu messen.

[0135] Gewebeextrakte, die Angiostatin enthalten, werden zusätzlich dadurch gekennzeichnet, dass Aliquots einer HPLC-Umkehrphase unterzogen werden. Eluatfraktionen werden eingesammelt, in einer Speed-Vac getrocknet, in RIA-Puffer rekonstituiert und in dem Angiostatin-RIA analysiert. Die maximale Menge der Angiostatin-Immunreaktivität findet sich in den Fraktionen, die der Elutionsposition von Angiostatin entspricht.

[0136] Der Test-Kit stellt Instruktionen, Antiserum, Angiostatin oder Angiostatin-Peptid und möglicherweise auch radioaktiv markiertes Angiostatin und/oder Reagenzien für die Präzipitierung gebundener Angiostatin-Angiostatin-Antikörperkomplexe bereit. Der Kit ist nützlich für die Messung von Angiostatin in biologischen Flüssigkeiten und Gewebeextrakten von Tieren und Menschen mit und ohne Tumoren.

[0137] Ein weiterer Kit wird für die Lokalisierung von Angiostatin in Geweben und Zellen verwendet. Dieser Angiostatin-Immunhistochemie-Kit stellt Instruktionen, Angiostatin-Antiserum und möglicherweise Blockierungsserum und ein sekundäres Antiserum bereit, das an ein Fluoreszenzmolekül, wie beispielsweise Fluoreszinisothiocyanat gebunden ist, oder irgendein anderes Reagens, das zur Visualisierung des Primärantiserums verwendet wird. Immunhistochemietechniken sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Dieser Angiostatin-Immunhistochemie-Kit erlaubt die Lokalisierung von Angiostatin in Gewebeschnitten und kultivierten Zellen sowohl mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie. Er wird sowohl für die Recherche und für klinische Zwecke verwendet. Beispielsweise werden Tumore biopsiert oder eingesammelt und Gewebeschnitte mit einem Microtom geschnitten, um die Stellen der Angiostatin-Produktion zu untersuchen. Solche Informationen sind für diagnostische und möglicherweise therapeutische Zwecke bei dem Nachweis und der Behandlung von Krebs nützlich. Ein anderes Verfahren zur Visualisierung von Stellen der Angiostatin-Biosynthese schließen die radioaktive Markierung von Nucleinsäuren zur Verwendung in der in situ-Hybridisierung ein, um Angiostatin-Messenger-RNA zu sondieren. Gleichermaßen kann der Angiostatin-Rezeptor lokalisiert werden, visualisiert werden und mit Hilfe von immunhistochemischen Techniken quantifiziert werden.

[0138] Diese Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele dargestellt, welche nicht so ausgelegt werden sollten, dass sie Beschränkungen des Schutzbereichs der Ansprüche darstellen. Im Gegenteil ist es klar, dass es für zahlreiche andere Ausführungsformen, Modifizierungen und Äquivalente davon Auswege geben kann, die nach dem Lesen der beiliegenden Beschreibung für Fachleute auf dem Gebiet selbstverständlich sind, ohne vom Schutzbereich der angehängten Ansprüche abzuweichen.

Beispiel 1

Auswahl des Tier-Tumorsystems, bei dem das Wachstum der Metastasen durch den Primärtumor inhiziert wird und nach Entfernung des Primärtumors beschleunigt wird.

[0139] Nach dem Durchmustern einer Vielzahl an Maustumoren, die in der Lage sind, ihre eigenen Metastasen zu inhibieren, wurde ein Lewis-Lungencarzinom ausgewählt, bei dem der Primärtumor am wirksamsten die Lungenmetastasierung inhibierte. Syngene sechs Wochen alte männliche C57BI6/J-Mäuse wurden mit 1×10^6 Tumorzellen (subkutan Dorsum) injiziert. Sichtbare Tumore traten zuerst nach 3–4 Tagen auf. Sobald die Tumore ungefähr 1.500 mm^3 groß waren, wurden die Mäuse zufallsgemäß in zwei Gruppen aufgeteilt. Der Primärtumor wurde in der ersten Gruppe vollständig ausgeschnitten und in der zweiten Gruppe nach einer Scheinoperation intakt gelassen. Obwohl Tumoren von 500 mm^3 bis 3.000 mm^3 das Wachstum von Metastasen inhibierten, war 1.500 mm^3 der größte Primärtumor, der mit einer hohen Überlebensrate und keinem lokalen Wiederauftreten sicher ausgeschnitten werden konnte.

[0140] Nach 21 Tagen wurden alle Mäuse geopfert und einer Autopsie unterworfen. In Mäusen mit einem intakten Primärtumor gab es vier +2 sichtbare Metastasen, verglichen mit fünfzig + 5 Metastasen in den Mäusen, in denen der Tumor entfernt worden ist ($p < 0{,}0001$). Diese Daten wurden durch das Lungengewicht bestätigt,

welches eng mit der Tumorlast korreliert, wie zuvor gezeigt worden ist. Es gab einen 400 % Anstieg im Lungen-Nassgewicht in den Mäusen, denen die Tumore entfernt worden sind, verglichen mit Mäusen, in denen die Tumore intakt gelassen worden sind ($p < 0{,}0001$).

[0141] Dieses experimentelle Modell ergab reproduzierbare Daten und das beschriebene Experiment ist reproduzierbar. Dieser Tumor wird als „Lewis-Lungencarzinom – wenig metastasierend" (LLC-Low) bezeichnet. Der Tumor unterdrückte auch Metastasen in nahezu identischer Weise in SCID-Mäusen, denen sowohl die B- und T-Lymphozyten fehlen.

Beispiel 2

Isolierung einer Variante des Lewis-Lungencarzinoma-Tumors, der stark metastasiert, unabhängig davon, ob der Primärtumor entfernt ist.

[0142] Eine stark metastasierende Variante des Lewis-Lungencarzinoma entstand spontan aus der LLC-Low-Zelllinie des Beispiels 1 in einer Gruppe der Mäuse und ist gemäß den in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren isoliert worden und wiederholt transplantiert worden. Dieser Tumor (LLC-High) bildet mehr als 30 sichtbare Lungenmetastasen, unabhängig davon, ob der Primärtumor vorhanden ist oder nicht.

Beispiel 3

Größe der Metastasen und die Proliferationsrate von Tumorzellen darin. Wirkung des Primärtumors, der Metastasen inhibiert (LLC-Low).

[0143] C57Bl16/J-Mäuse wurden in allen Experimenten verwendet. Den Mäusen wurden subkutan LLC-Low-Zellen inokuliert und 14 Tage später wurde der Primärtumor in der Hälfte der Mäuse entfernt. Nach 5, 10 und 15 Tagen, nachdem der Tumor entfernt worden ist, wurden die Mäuse geopfert. Histologische Schnitte der Lungenmetastasen wurden gewonnen. Mäuse mit einem intakten Primärtumor hatten Mikrometastasen in der Lunge, die nicht neovascularisiert wurden. Diese Metastasen waren auf einen Durchmesser von 12–15 Zellschichten beschränkt und zeigten keinen signifikanten Größenanstieg, selbst 15 Tage nach der Tumorentfernung. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, denen der Primärtumor entfernt worden war, bereits nach 5 Tagen nach der Operation große vascularisierte Metastasen. Diese Metastasen durchliefen einen weiteren 4-fachen Anstieg im Volumen bis zum 15. Tag, nachdem der Tumor entfernt worden war (wie durch das Lungengewicht und die Histologie wiedergespiegelt wurde). Ungefähr 50 % der Tiere, die den Primärtumor entfernt hatten, starben an den Lungenmetastasen vor dem Ende des Experiments. Alle Tiere mit einem intakten Primärtumor überlebten das Ende des Experiments.

[0144] Die Replikationsrate der Tumorzellen innerhalb der Metastasen wurde durch das Zählen der Kernfärbungen mit BrdU bestimmt, welches zuvor in die Mäuse injiziert worden war. Der hohe Prozentsatz an Tumorzellen, die BrdU in kleinen avasculären Metastasen der Tiere mit einem intakten Primärtumor inkorporieren, war äquivalent zu der BrdU-Inkorporation von Tumorzellen in den großen vascularisierten Metastasen der Mäuse, denen der Primärtumor entfernt worden war (**Fig.** 3). Dieser Befung lässt vermuten, dass das Vorhandensein eines Primärtumors keinen direkten Effekt auf die Replikationsrate von Tumorzellen bei der Metastase hat.

[0145] In **Fig.** 3 zeigt die linke Spur den BrdU-Markierungsindex von Tumorzellen in der Lunge in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Primärtumors. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte mit 0,2 M HCl für 10 Minuten permeabilisiert und mit 1 µg/ml Proteinase K verdaut (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) in 0,2 M Tris-HC1, 2 mM $CaCl_2$ bei 37°C für 15 Minuten. Der Markierungsindex wurde durch das Zählen des Prozentsatzes positiver Nuclei bei 250-facher Vergrößerung abgeschätzt. Die rechte Spur der **Fig.** 3 stellt die Analyse des gesamten Lungengewichts der Tumore mit Primärtumoren in intakter oder entfernter Form an den Tagen 5, 10 und 15 nach der Operation dar. Die Tiere wurden 6 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von BrdU geopfert (0,75 mg/Maus).

Beispiel 4

Inhibierung der Angiogenese in Lungenmetastasen in Gegenwart eines intakten Primärtumors.

[0146] Um den Grad der Vascularisierung in Lungenmetastasen zu messen, wurden Gewebe mit Antikörpern gegen von-Willebrand-Faktor gefärbt (einem Endothelspezifischen Marker, erhältlich von Dako Inc., Carpente-

ria, CA). Die Metastasen von Tieren mit intakten Tumoren bildeten einen dünnen Ring (8–12 Tumorzellschichten), um die vorhandenen pulmonaren Gefäße. Außer den Endothelzellen der Gefäßauskleidung waren keine oder wenige Zellen positiv für von-Willebrand-Faktor. Im Gegensatz dazu waren die Lungenmetastasen der Tiere 5 Tage nach Entfernung des Primärtumors nicht nur größer, sondern auch durch kapilläre Sprossungen infiltriert, die Endothelzellen enthielten, welche stark von-Willebrand-Faktor positiv waren.

[0147] In immunhistochemischen Analysen auf das Vorhandensein von Endothelzellen in Lungenmetastasen hatte eine Lungenmetastase mit einem intakten Primärtumor 19 Tage nach der Inokulation einen Ring aus Tumorzellen um das bereits vorhandene Mikrogefäß in der Lunge. Die Metastase war auf 8 bis 12 Zellschichten begrenzt. Es gab keinen Hinweis auf eine Neovascularisierung um das Mikrogefäß, und dieses enthielt keine neuen Mikrogefäße. Dies war typisch für die maximale Größe einer avasculären präangiogenen Metastase.

[0148] In einer immunhistochemischen Analyse von Gewebe, welches 5 Tage, nachdem der Primärtumor herausgeschnitten worden war, eingesammelt wurde (19 Tage nach der Inokulation des Primärtumors), umgab die Metastase ein bereits vorhandenes Gefäß in der Lunge. Im Gegensatz dazu war der Tumor nicht in der Probe neovascularisiert, wo der Primärtumor nicht herausgeschnitten worden war. Das bedeutet, dass ein intakter Primärtumor die Bildung neuer kapillärer Blutgefäße in Metastasen inhibiert, aber die Proliferation von Tumorzellen innerhalb der Metastase wird durch den Primärtumor nicht beeinflusst.

Beispiel 5

Ein Primärtumor inhibiert die Angiogenese eines zweiten Tumors, der in die Maushornhaut implantiert wird. Das Wachstum dieses zweiten Tumors wird inhibiert.

[0149] Ein 0,25 bis 0,5 mm^2 großer Lewis-Lungentumor (LLC-Low) wurde am Tag 0 in die Maushornhaut implantiert (Muthukkaruppan Vr. et al., Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205: 1416–1418, 1979). Ein Primärtumor wurde durch Inokulieren von 1×10^6 LLC-Low-Zellen subkutan in den Rücken gebildet, entweder 4 oder 7 Tage vor dem Implantat in die Hornhaut; oder am Tag des Implantats in die Hornhaut; oder 4 oder 7 Tage nach dem Implantat in der Hornhaut. Die Kontrollmäuse erhielten das Hornhautimplantat, aber keinen subkutanen Tumor. Andere Kontrollmäuse erhielten das Hornhautimplantat und 4 Tage vor dem Hornhautimplantat eine Inokulation von LLC-High-Tumorzellen in den Rücken. Die Hornhäute wurden täglich durch eine Schlitzlampen-Stereomikroskopie auf das Wachstum des Hornhauttumors untersucht (gemessen durch ein okulares Mikrometer), und auf das Wachstum neuer Kapillargefäße vom Rand des Hornhautkörpers.

[0150] Bei Kontrollmäusen, die keinen primären subkutanen Tumor tragen, entwickelte die Mehrzahl der Hornhäute (6/8) eine Neovascularisierung, die am Tag 6 bis 7 nach dem Implantat in die Hornhaut begann und bis zum Tag 10 anhielt. Am Tag 10 hatten die vascularisierten Hornhauttumore ungefähr ein Viertel des Volumens des gesamten Auges. In Gegenwart des primären subkutanen LLC-Low-Tumors wurden die Hornhautimplantate nicht vascularisiert, wenn der Primärtumor mindestens 4 Tage oder mehr vor dem Hornhautimplantat vorhanden war (Tabelle 1). In Abwesenheit der Neovascularisierung wuchsen die Hornhauttumore langsam als dünne, weiße, avasculäre Scheiben innerhalb der Hornhaut.

[0151] Wenn jedoch der Primärtumor nicht bis 4 Tage nach dem Implantat in die Hornhaut implantiert wurde, wurden die Hornhäute vascularisiert und 3/3 Hornhauttumoren wuchsen in ähnlichen Raten wie die nicht Tumor-tragenden Kontrollen. In Gegenwart des primären subkutanen LLC-High-Tumors entwickelte die Mehrheit der Hornhäute (2/3) eine Neovascularisierung, welche am Tag 7 nach dem Implantat in die Hornhaut begann und bis zum Tag 10 anhielt. Am Tag 10 hatten die vascularisierten Hornhauttumore wiederum ungefähr ein Viertel des Volumens des gesamten Auges erreicht.

Tabelle 1

Inhibierung der Tumorangiogenese in der Hornhaut durch einen primären subkutanen Tumor (Alle Primärtumoren sind LLC-Low, außer (*), welcher LLC-High ist).

Tag des Augenimplantats	0	0	0	0	0	0	0
Tag des Primärtumor-Implantats	-7	-4	-4*	0	keine	+4	+7
Anzahl an Mäusen mit neuen Hornhautgefäßen am Tag 10	2/10	0/9	2/3	2/3	6/8	3/3	2/3

[0152] Es würde erwartet werden, dass 0/10 Hornhäuten eine Neovascularisierung zeigen, wenn der primäre subkutane LLC-Low Tumor 7 Tage vor dem Augentumorimplantat (d. h. –7) implantiert wird. Jedoch wurden 2 der Tumore (2/10) nekrotisch, da sie zu groß waren (>3 cm^3).

Beispiel 6

Primärer intakter Tumor inhibiert die Angiogenese, die durch ein sekundäres subkutanes Implantat mit basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) induziert wird.

[0153] Obwohl die Experimente, die in den Beispielen 4 und 5 beschrieben sind, zeigen, dass ein Primärtumor die Angiogenese in einer sekundären Metastase inhibiert, zeigten diese Studien nicht, ob der Primärtumor: (i) die endotheliale Proliferation direkt inhibiert (oder die Angiogenese), oder (ii) indirekt durch die Herunterregulierung der angiogenen Wirkung der metastasierenden Tumorzellen. Um zwischen diesen zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde ein Fokus der subkutanen Angiogenese durch ein Implantat von Matrigel, welcher basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) enthält, induziert (Passaniti A. et al., A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anit-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. Lab. Invest. 67: 519, 1992).

[0154] Matrigel (ein Extrakt aus Basalmembran-Proteinen), welcher 25 bzw. 50 ng/ml bFGF in Gegenwart von Heparin enthält, wurde subkutan auf der ventralen Oberfläche normaler und Tumor-tragender Mäuse (LLC-Low) injiziert. Die Mäuse wurden 4 Tage später geopfert und die Hämoglobinkonzentration im Gel wurde gemessen, um die Blutgefäßbildung zu quantifizieren. Es ist zuvor gezeigt worden, dass die Anzahl an neuen Gefäßen, die in Matrigel eindringen, mit der Hämoglobinkonzentration korreliert (Folkman J., Angiogenesis and ist inhibitors in „Important Advances in Oncology 1985", VT DeVita, S. Hellman und S. Rosenberg, Hrsg., J. B. Lippincott, Philadelphia 1985). Einige Gele wurden auch für die histologische Untersuchung präpariert. Bei normalen Mäusen waren Matrigel-Pellets, die 50 ng/ml bFGF enthielten, vollständig rot. Sie wurden durch neue Kapillargefäße stark invadiert und enthielten 2,4 g/dl Hämoglobin. Matrigel, dem bFGF fehlte, war durchsichtig und grau und enthielt nur 0,4 g/dl Hämoglobin (ein 6-facher Unterschied). Im Gegensatz dazu enthielt Matrigel von Mäusen mit einem Primärtumor nur 0,5 g/dl (**Fig. 4**).

[0155] Die nahezu vollständige Inhibierung der Angiogenese in diesem Experiment lässt vermuten, dass das Vorhandensein eines Lewis-Lungenprimärtumors die bFGF induzierte Angiogenese direkt inhibiert.

Beispiel 7

Transfer von Serum aus einem Tumor-tragenden Tier in ein Tier, dem der Primärtumor entfernt worden ist, unterdrückt Metastasen.

[0156] In Mäuse wurde ein Lewis-Lungencarzinom, wie oben beschrieben, implantiert. 15 Tage später, wenn die Tumore ungefähr 1.500 mm^3 groß waren, wurden die Mäuse zufallsgemäß in vier Gruppen aufgeteilt. In drei Gruppen wurde eine vollständige chirurische Resektion des Primärtumors durchgeführt; in einer Gruppe wurde er an Ort und Stelle gelassen (nach einer chirurgischen Scheinprozedur). Die Mäuse in den drei Resektionsgruppen erhielten dann tägliche intraperitoneale Injektionen an Salzlösung, Serum normaler nicht Tumor-tragender Mäuse oder Serum aus Mäusen mit 1.500 mm^3 Lewis-Lungencarzinom. Die Gruppe an Mäusen mit den Tumoren, die intakt gelassen worden waren, enthielten intraperitoneale Salzinjektionen. Alle Mäuse wurden 21 Tage behandelt, worauf die Tiere euthanisiert wurden und die Lungenmetastasen gezählt wurden

(Tabelle 2).

Tabelle 2

	Primärtumor entfernt			Primärtumor intakt
Behandlung (intraperitoneale Injektionen)	Salzlösung	Serum normaler Mäuse	Serum Tumor-tragender Mäuse	Salz-Injektionen
Anzahl der Lungenmetastasen	55±5	50±4	7±2	3±1

[0157] Diese Ergebnisse wurden durch das Lungengewicht bestätigt. p = < 0,0001 für den Unterschied zwischen den zwei Gruppen [(55 & 50) vs. (7 & 3)). Ähnliche Ergebnisse sind gewonnen worden, indem Angiostatin aus dem Urin Tumor-tragender Tiere verwendet wurde.

Beispiel 8

Rinderkapillar-Endothel (BCE)-Zelltest

[0158] BCE-Zellen wurden nur zwischen den Passagen 9 und 14 verwendet. Am Tag 0 wurden BCE-Zellen auf gelatinisierte (1,5 % Gelatine in PBS bei 37°C, 10 % CO_2 für 24 Stunden und dann mit 0,5 ml PBS gespült) 24-Well-Platten in einer Konzentration von 12.500 Zellen/Well ausplattiert. Die Zellzählung wurde mit Hilfe eines Hämozytometers durchgeführt. Die Zellen wurden in 500 µl DMEM mit 10 % Hitze-inaktiviertem (56°C für 20 Minuten) Rinderkälberserum und 1 % Glutamin-Pen-Strep (GPS) ausplattiert.

[0159] BCE-Zellen werden wie folgt gefordert: Das Medium wird entfernt und durch 250 µl DMEM/5 % BCS/1 % GPS ersetzt. Die zu testende Probe wird dann zu den Wells hinzugegeben (die Menge variiert in Abhängigkeit von der zu testenden Probe). Platten werden für ungefähr 10 Minuten in 37°C/10 % CO_2 gestellt. 250 µl DMEM/5 % BCS/1 % GPS mit 2 ng/ml bFGF wird zu jedem Well hinzugegeben. Das endgültige Medium ist 500 µl DMEM/5 % BCS/1 % GPS mit 1 ng/ml bFGF. Die Platte wird für 72 Stunden in den 37°C/10 % CO_2-Inkubator zurückgegeben.

[0160] Am Tag 4 werden die Zellen durch Entfernen des Mediums gezählt und dann werden alle Wells trypsinisiert (0,5 ml Trypsin/EDTA) für 2 bis 3 Minuten. Die suspendierten Zellen werden dann in Scintillationsgefäße mit 9,5 ml Hämmetall überführt und unter Verwendung eines Coulter-Counters gezählt. Eine Einheit der Aktivität ist die Menge an Serum, die Angiostatin enthält, welches in der Lage ist, eine halb-maximale Inhibierung der kapillären Endothelproliferation zu erreichen, wenn die Endothelzellen in bFGF 1 ng/ml für 72 Stunden inkubiert werden.

Beispiel 9

Serum von Mäusen, die den gering metastasierenden Lewis-Lungentumor (LLC-Low) tragen, inhibiert die Kapillarendothelzell-Proliferation in vitro.

[0161] Rinderkapillar-Endothelzellen wurden mit basischem Fibroblasten-wachstumsfaktor (bFGF 1 ng/ml) in einem 72-stündigen Proliferationstest stimuliert. Das Serum der Tumor-tragenden Mäuse, das zu diesen Kulturen hinzugegeben worden war, inhibierte die Endothelzellproliferation in einer Dosisabhängigen und reversiblen Weise. Normales Serum wirkte nicht inhibitorisch (**Fig. 5**). Die Endothelzellproliferation wurde in ähnlicher Weise (bezogen auf die Kontrollen) durch Serum inhibiert, welches aus Tumor-tragenden nu/nu-Mäusen und SCID-Mäusen gewonnen wurde. Nachdem der Primärtumor entfernt worden war, verschwand die Angiostatin-Aktivität aus dem Serum innerhalb von 3–5 Tagen.

[0162] Tumor-tragendes Serum inhibierte auch Rinderaorta-Endothelzellen und Endothelzellen, die aus einem spontanen Maus-Hämangioendotheliom stammten (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), S. 259–269, 1990), aber es inhibierte nicht Lewis-Lungentumorzellen, 3T3-Fibroblasten, glatte

Aortamuskelzellen, Mink-Lungen-Epithel oder W138-Lungenfibroblasten aus einem menschlichen Fötus.

Beispiel 10

Serum von Mäusen, die einen Lewis-Lungentumor tragen (LLC-High), welcher Metastasen nicht inhibiert, inhibiert die kapillare Endothelzellproliferation in vitro nicht.

[0163] Das Serum von Mäusen, die einen Primärtumor aus LLC-High tragen, inhibierte nicht in signifikanter Weise die Proliferation von bFGF-stimulierten Rinderkapillar-Endothelzellen bezogen auf die Kontrollen. Auch wenn dieses Serum den ersten zwei Reinigungsschritten unterworfen wurde (auf Heparin-Sepharose-Chromatographie und Gelfiltration) wurde die Angiostatin-Aktivität in keiner der Fraktionen gefunden.

Beispiel 11

Aszites von Lewis-Lungencarzinom (wenig metastasierend) erzeugt auch Angiostatin-Serum.

[0164] Mäuse erhielten intraperitoneale Injektionen entweder von LLC-Low oder LLC-High Tumorzellen (10^6) und eine Woche später wurde aus jeder der 10–20 Mäuse 1–2 ml blutige Aszites gewonnen. Eine mesenterale Tumorausbreitung wurde beobachtet. Die Mäuse wurden dann euthanisiert. Das Serum wurde durch Herzpunktion gewonnen. Das Serum wurde ebenfalls aus normalen, nicht Tumortragenden Mäusen als Kontrolle gewonnen. Serum und Aszites wurden zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und der Überstand wurde an Rinderkapillar-Endothelzellen getestet, die durch bFGF (1 ng/ml) stimuliert worden waren (siehe Beispiel 8). Aszites, das von beiden Tumortypen stammte, stimulierte nach 72 Stunden signifikant die Proliferation der kapillaren Endothelzellen (z. B. 100 % Proliferation) gegenüber den Kontrollen (**Fig.** 6). Im Gegensatz dazu inhibierte Serum der wenig metastasierenden Mäuse die Endothelzellproliferation (Inhibierung von 79 % der Kontrollen). Das Serum der stark metastasierenden Linie war zu 200 % stimulatorisch.

[0165] Diese Daten zeigen, dass sie Aszitesflüssigkeit der wenig metastasierenden Linie einen Vorzug für den Endothel-Wachstumsstimulator gegenüber Angiostatin enthält. Dieser Zustand ist analog einem soliden Primärtumor. Des Weiteren scheint die Angiostatin-Aktivität im Serum, als wäre sie durch die stimulatorische Aktivität nicht beeinflusst. Dieses Muster ist ähnlich dem des soliden Primärtumors (LLC-Low). Die Aszitesflüssigkeit des stark metastasierenden Tumors (LLC-High) scheint ebenfalls bevorzugt einen Endothelzell-Stimulator zu haben, aber Angiostatin kann in dem Serum nicht identifiziert werden.

Beispiel 12

Fraktionierung von Angiostatin aus Serum mittels Säulenchromatographie und Analyse der Wachstums-inhibitorischen Fraktion mittels SDS-PAGE.

[0166] Um die Angiostatine zu reinigen, wurde Serum aus Tumor-tragenden Mäusen gepoolt. Die inhibitorische Wirkung, welche durch den oben beschriebenen in vitro-inhibitorischen Aktivitätstest untersucht wurde, wurde sequenziell unter Verwendung einer Heparinsepharose Biogel A 0,5 mm Agarose und mehreren Zyklen über C4-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) chromatographisch aufgetrennt. SDS-PAGE der HPLC-Fraktion, welche eine Endothel-inhibitorische Aktivität enthielt, zeigte eine diskrete Bande von anscheinend reduziertem Molekulargewicht von M_r 38.000 Dalton, welches ungefähr 1-Million-fach aufgereinigt wurde (siehe Tabelle 3) auf eine spezifische Aktivität von ungefähr 2×10^7. In verschiedenen Stadien der Reinigung wurden die gepoolten Fraktionen mit spezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein bekannter Endothel-Inhibitoren getestet. Plättchenfaktor-4, Thrombospondin oder Transformations-Wachstumsfaktor beta wurden in den teilweise gereinigten oder gereinigten Fraktionen nicht gefunden.

Tabelle 3

	Spezifische Aktivität (Units*/mg)	x-fache Reinigung
Serum	1,69	1
Heparin-Sepharose	14,92	8,8
Bio-gel A 0,5 m	69,96	41,4
HPCL/C4	2×10^7	$1,2 \times 10^6$

* Eine Aktivitätseinheit ist die Menge an Serum, die Angiostatin enthält, welche in der Lage ist, eine halb-maximale Inhibierung von kapillären Endothelproliferation zu erzeugen, wenn Endothelzellen für 72 Stunden in 1 ng/ml bFGF inkubiert werden.

Beispiel 13

Fraktionierung von Angiostatin aus dem Urin mittels Säulenchromatographie und Analyse der Wachstums-inhibitorischen Fraktion mittels SDS-PAGE.

[0167] Die Reinigung der Endothelzell-Inhibitoren aus dem Serum wird durch das geringe Volumen an Serum behindert, welches aus jeder Maus gewonnen werden kann, und durch die große Menge an Proteinen im Serum.

[0168] Der Urin von Tumor-tragenden Mäusen wurde analysiert und es wurde gefunden, dass er einen Inhibitor für die Endothelzell-Proliferation enthält, welcher im Urin der nicht Tumor-tragenden Mäuse und bei Mäusen mit LLC-high Tumoren auch nicht vorhanden ist. Die Reinigung der inhibitorischen Aktivität der Endothelzellen wurde mit der gleichen Strategie durchgeführt, die auch für die Reinigung des Serums durchgeführt wurde (oben beschrieben) (**Fig.** 7).

[0169] **Fig.** 7 zeigt eine C4-Umkehrphasenchromatographie teilweise gereinigten Serums oder Urins aus Tumor-tragenden Tieren. Alle Fraktionen wurden an Rinderkapillar-Endothelzellen mit bFGF in einem 72-stündigen Proliferationstest, wie in Beispiel 8 beschrieben, untersucht. Ein einzelner Peak der Inhibierung wurde in beiden Fällen gesehen, die bei 30–35 % Azetonitril in Fraktion 23 eluieren. SDS-Polyacrylamidgel-Electrophorese der inhibitorischen Fraktion aus dem dritten Zyklus der C4-Umkehrphasen-Chromatographie aus Serum Tumor-tragender Tiere zeigte eine Einzelbande bei ungefähr 38.000 Dalton.

Beispiel 14

Charakterisierung des zirkulierenden Angiostatins.

[0170] Die Endothel-Inhibierung wurde gemäß dem in Beispiel 9 beschriebenen Verfahren untersucht. Angiostatin wurde mit einer Synchropak HPLC C4-Säule (Synchrom, Inc. Lafayette, IN) isoliert. Der Inhibitor wurde bei 30 bis 35 % Acetonitrilgradient eluiert. Auf einem Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)-Gel unter reduzierenden Bedingungen (β-Mercaptoethanol (5 % v/v), eluierte die Proteinbande mit Aktivität bei 38 Kilodalton. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen eluierte das Protein mit Aktivität bei 28 Kilodalton. Die Aktivität wird an ähnlichen Punkten gefunden, ob die ursprüngliche Probe aus dem Urin oder aus dem Serum isoliert wurde. Die Aktivität wurde in anderen Banden nicht nachgewiesen.

[0171] Die Aktivität, die mit den Banden assoziiert ist, ging verloren, wenn sie erwärmt wurde (100°C für 10 Minuten) oder mit Trypsin behandelt wurde. Wenn die Bande mit Aktivität mit einem Wasser/Chloroform-Gemisch (1:1) extrahiert wurde, wurde die Aktivität nur in der wässrigen Phase gefunden.

Beispiel 15

Aufreinigung der inhibitorischen Fragmente aus menschlichem Plasminogen:

[0172] Die Plasminogen-Lysin-Bindungsstelle 1 wurde von Sigma Chemical Company erhalten. Das Präparat ist gereinigtes menschliches Plasminogen nach einem Verdau mit Elastase. Die Lysin-Bindungsstelle 1, die in

dieser Weise gewonnen wird, ist eine Population an Peptiden, die in einem Aggregat mindestens die ersten drei Dreifach-Schlaufenstrukturen (Nummern 1 bis 3) in der Plasminogen-Kette (Kringle 1 + 2 + 3) enthalten (Sotrrup-Jensen, L. et al., in Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis. vol. 3, 191, Davidson, J. F. et al., Hrsg. Raven Press, New York 1978 und Wiman, B. et al. Biochemica et Biophysica Acta, 579, 142 (1979)). Plasminogen-Lysin-Bindungsstelle 1 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) wurde in Wasser resuspendiert und auf eine C4-Umkehrphasensäule aufgetragen, die mit HPLC-geeignetem Wasser/0,1 % TFA äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit einem Gradienten aus Wasser/0,1 % TFA zu Acetonitril/0,1 % TFA eluiert und Fraktionen wurden in Polypropylenröhrchen aufgefangen. Ein Aliquot von jeder wurde in einer Speed-Vac verdampft, mit Wasser resuspendiert und auf BCEs in einem Proliferationstest aufgetragen. Dieses Verfahren wurde zweimal mit den inhibitorischen Fraktionen unter Verwendung eines ähnlichen Gradienten für die Eluierung wiederholt. Die inhibitorische Aktivität eluierte im letzten Durchlauf über die C4-Säule bei 30–35 % Acetonitril. SDS-PAGE der inhibitorischen Fraktion zeigte 3 diskrete Banden von einem offensichtlichen reduzierten Molekulargewicht von 40, 42,5 und 45 kd. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte 3 Banden mit einem Molekulargewicht von 30, 32,5 beziehungsweise 35 kd.

Beispiel 16

Extraktion der inhibitorischen Aktivität aus SDS-PAGE

[0173] Gereinigte inhibitorische Fraktionen aus auf menschlichem Plasminogen basierenden Reinigungen wurden mittels SDS-PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgelöst. Bereiche des Gels, die den Banden entsprechen, die in benachbarten Spuren gefunden werden, welche mit den gleichen Proben beladen wurden, in dem eine Silberfärbung durchgeführt wurde, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 1 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung bei 4°C für 12 Stunden in Polypropylenröhrchen inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und zweimal für 6 Stunden gegen Salzlösung (MWCO = 6–8.000) und zweimal gegen destilliertes Wasser für 6 Stunden dialysiert. Das Dialysat wurde durch Vakuumzentrifugierung verdampft. Das Produkt wurde in Salzlösung resuspendiert und auf Rinderkapillar-Endothelzellen appliziert, welche durch 1 ng/ml basischen Fibroblastenwachstumsfaktor in einem 72 Stunden Test stimuliert worden waren. Das Protein, das aus jeder der drei Banden extrahiert wurde, inhibierte die Kapillar-Endothelzellen.

Beispiel 17

Plasminogen-Fragment-Behandlungsstudien

[0174] Mäusen wurden Lewis-Lungencarzinome implantiert und einer Resektion unterzogen, sobald die Tumore 1.500–2.000 mm^3 groß waren. Am Tag der Operation wurden die Mäuse zufallsgemäß in 6 Gruppen von jeweils 6 Mäusen aufgeteilt. Die Mäuse erhielten täglich intraperitoneale Injektionen mit den drei gereinigten inhibitorischen Fragmenten des menschlichen Plasminogens, mit gesamtem menschlichen Plasminogen, mit Urin von Tumor-tragenden Mäusen, Urin normaler Mäuse oder Salzlösung. Eine Gruppe der Tumor-tragenden Tiere, die nur ein Scheinverfahren durchlief, wurde mit Salzinjektionen behandelt. Direkt nach der Entfernung des Primärtumors erhalten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 24 µg (1,2 mg/kg/Tag/Maus) der inhibitorischen Plasminogenfragmente als Beladungsdosis. Dann erhalten sie für die Dauer des Experiments tägliche intraperitoneale Injektionen von 12 µg des inhibitorischen Fragments (0,6 mg/kg/Tag/Maus). Kontrollmäuse erhielten die gleiche Dosis des Gesamtplasminogen-Moleküls nach der Tumorentfernung. Bei den Urinbehandlungen wird der Urin der normalen oder Tumor-tragenden Mäuse filtriert, intensiv dialysiert, lyophilisiert und dann in sterilem Wasser resuspendiert, um eine 250-fache Konzentration zu erhalten. Den Mäusen wurden entweder aus Tumor-tragenden Mäusen oder aus normalen Mäusen in zwei intraperitonealen Injektionen am Tag der Entfernung des Primärtumors als Beladungsdosis 0,8 ml des dialysierten Urinkonzentrats gegeben. Sie erhielten dann für den Ablauf des Experiments tägliche intraperitoneale Injektionen von 0,4 ml des dialysierten und konzentrierten Urins. Die Behandlungen wurden für 13 Tage fortgesetzt, welches der Zeitpunkt war, an dem alle Mäuse geopfert wurden und autopsiert wurden.

[0175] Die Ergebnisse der Experimente werden in den Fig. 8 und Fig. 9 gezeigt. Fig. 8 zeigt die oberflächlichen Lungenmetastasen nach der 13-tägigen Behandlung. Die Oberflächen-Lungenmetastasen beziehen sich auf die Anzahl an Metastasen, die in den Lungen der Mäuse bei der Autopsie gesehen werden. Ein Stereomikroskop wurde verwendet, um die Metastasen zu zählen. Fig. 8 zeigt die durchschnittliche Anzahl an Oberflächen-Lungenmetastasen, die gezählt wurden sowie die Standardabweichung. Wie gezeigt ist, wies die Mausgruppe mit dem Primärtumor keine Metastasen auf. Die Mäuse, bei denen der Primärtumor resektioniert wurde und die mit Salzlösung behandelt wurden, zeigten ausgedehnte Metastasen. Die Mäuse, die mit dem vom Menschen stammenden Plasminogenfragment behandelt wurden, zeigten keine Metastasen. Die Mäuse, die

mit dem gesamten Plasminogen behandelt wurden, zeigten ausgedehnte Metastasen, was andeutet, dass das gesamte Plasminogenmolekül keine Endothel-inhibitorische Wirkung besitzt. Mäuse, die mit dialysiertem und konzentriertem Urin von Tumor-tragenden Mäusen behandelt wurden, zeigten keine Metastasen. Mäuse, die mit dem konzentrierten Urin normaler Mäuse behandelt wurden, zeigten auffällige Metastasen. Wenn das Lungengewicht gemessen wurde, wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Fig. 9).

Beispiel 18

Aminosäuresequenz des Angiostatins der Maus und des Menschen

[0176] Die Aminosäuresequenz von Angiostatin, welches aus dem Mausurin isoliert wurde und Angiostatin, das aus dem menschlichen Lysin-Bindungsstellen 1-Fragment-Präparat isoliert wurde, wurden auf einem Applied Biosystem Model 477A Protein-Sequenziergerät bestimmt. Phenylthiohydantoinaminosäurefraktionen wurden mit einem online-ABI-Modell 120A HPCL identifiziert. Die Aminosäuresequenz, welche von der N-terminalen Sequenz und den Trypsin-Verdaus des Maus- und Menschen-Angiostatins bestimmt wurde, zeigt an, dass die Sequenz des Angiostatins ähnlich der Sequenz ist, die an der Aminosäure Nr. 98 des Maus-Plasminogens beginnt. Das bedeutet, dass die Aminosäuresequenz des Angiostatins ein Molekül ist, das ein Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen ungefähr 38 Kilodalton und 45 Kilodalton umfasst, wie durch reduzierende Polyacrylamidgel-Electrophorese bestimmt wurde und einer Aminosäuresequenz besitzt, die im Wesentlichen ähnlich der des Maus-Plasminogenfragments ist, das an der Aminosäure Nr. 98 des intakten Maus-Plasminogenmoleküls beginnt. Die Anfangs-Aminosäuresequenz des Maus-Angiostatin (SEQ ID Nr. 2) ist in Fig. 1 gezeigt. Die Länge der Aminosäuresequenz kann etwas länger oder kürzer sein als die, die in Fig. 1 gezeigt ist.

[0177] Die N-terminale Aminosäureanalyse und die Trypsinverdaus der aktiven Fraktion der menschlichen Lysin-Bindungsstelle 1 (siehe Beispiel 15) zeigt, dass die Sequenz der Fraktion ungefähr an der Aminosäure 97 oder 99 des menschlichen Plasminogens beginnt, und dass das menschliche Angiostatin homolog zum Maus-Angiostatin ist. Die Anfangs-Aminosäuresequenz des menschlichen Angiostatins (beginnend an Aminosäure 98) ist in Fig. 2 gezeigt (SEQ ID Nr. 3). Die Aminosäuresequenz des Angiostatins der Maus und des Menschen ist in Fig. 2 mit entsprechenden internen Aminosäuresequenzen des Plasminogens anderer Spezies, einschließlich des Schweins-, des Rinds- und des Resusaffen-Plasminogens verglichen, was das Vorhandensein von Angiostatin in diesen Spezies anzeigt.

Beispiel 19

Expression von menschlichem Angiostatin in E. coli.

[0178] Der pTrcHisA-Vektor (Invitrogen) (Fig. 10) wurde verwendet, um eine regulierte Transkription auf hohem Niveau, ausgehend vom trc-Promotor für die verstärkte Translationseffizienz, eukaryontischer Gene in E. coli zu erzielen. Angiostatin wird exprimiert und an einen N-terminalen Nickelbindenden Histidinschwanz für die Reinigung in einem Schritt unter Verwendung von Metall-Affinitätsharzen fusioniert. Die Enterokinase-Spaltungs-Erkennungsstelle in dem Fusionspeptid erlaubt die anschließende Entfernung des N-terminalen Histidin-Fudionspeptids vom gereinigten rekombinanten Protein. Das rekombinante menschliche Angiostatin-Protein band an Lysin; es ist kreuzreaktiv mit monoklonalen Antikörpern, die für die Kringle-Region 1, 2 und 3 spezifisch sind, und inhibiert die bFGF-gesteuerte Endothelzellproliferation in vitro.

[0179] Um das zu inserierende Stück zu konstruieren, wird das Genfragment, welches menschliches Angiostatin kodiert, aus einer menschlichen Leber-mRNA gewonnen, die umgekehrt transkribiert wird und unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und spezifischer Primer amplifiziert wird. Das Produkt von 1.131 Basenpaaren kodiert Aminosäuren 93 bis 470 des menschlichen Plasminogens. Das amplifizierte Fragment wurde in die XhoI/KpnI-Schnittstelle des pTrcHisA kloniert und das erhaltene Konstrukt in XL-1B (erhältlich von Stratagene) E. coli Wirtszellen transformiert. Ein Kontrollklon, der den Plasmidvektor pTrcHisA alleine enthält, wurde ebenfalls in XL-1B E. coli Wirtszellen transformiert. Dieser Klon wird als Vektor-Kontrollklon bezeichnet. Beide Klone wurden wie unten beschrieben identisch auf gereinigt.

[0180] Exprimierende Kolonien wurden in folgender Weise ausgewählt. Kolonienabdrücke von E. coli, die mit dem Gen transformiert sind, welches Angiostatin kodiert, wurden auf IPTG-imprägnierte Nitrozellulosefiltern gezüchtet und auf eine LB-Agarplatte gelegt. Nach der IPTG-Induktion der Expression wurden Kolonien auf Nitrozellulosefiltern lysiert. Die Nitrozelluloseabzüge wurden blockiert, gespült und mit zwei getrennten monoklonalen Antikörpern (mAbs Dcd und Vap; Geschenk von S. G. McCance und F. J. Castellino, University of Not-

re Dame) getestet, welche spezifische Konformationen von Angiostatin erkennen. Stark exprimierende Kolonien, die durch diese mAbs erkannt wurden, wurden ausgewählt.

[0181] Um die optimale Dauer der maximalen Expression zu erkennen, wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der IPTG-Induktion eingesammelt und wiederholten Einfrier-Auftauzyklen ausgesetzt, gefolgt von einer Analyse mittels SDS-PAGE, Immun-Blotting und dem Untersuchen mit den mAbs Dcd und Vap.

[0182] Hiervon wurde der Klon pTrcHisA/HAsH4 ausgewählt. Die Induktion mit IPTG betrug 4 Stunden, worauf das Zellpellet eingesammelt wurde und in 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 5 % Glycerol und 200 mg/ml Lysozym resuspendiert wurde und für 30 min. bei 4°C gerührt wurde. Die Aufschlemmung wurde zentrifugiert bei 14.000 Upm für 25 min. und das Pellet wurde in 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 5 % Glycerol und 0,1 % DOC resuspendiert. Diese Suspension wurde für 1 h bei 4°C gerührt und dann bei 14.000 Upm für 25 min. zentrifugiert. Die Überstandsfraktion aus diesem Schritt enthält exprimiertes Angiostatin. Das durch E. coli exprimierte menschliche Angiostatin besitzt die physiologische Eigenschaft nativen Angiostatins, d. h. die Fähigkeit, Lysin zu binden. Das durch E. coli exprimierte Angiostatin wurde daher in einem Einzelschritt über eine Lysin-Sepharose (Pharmacia oder Sigma)-Säule gereinigt. Die Eluierung von Angiostatin von der Säule wurde mit 0,2 M Epsilon-Amino-n-caprylsäure pH 7,5 durchgeführt.

[0183] Nach diesen Experimenten wurde eine Aufstockung in 10 l Fermentierungsbachtes des Klons pTrcHisA/HAsH4 durchgeführt. Die Zellen, die aus dieser aufgestockten Induktion erhalten wurden, wurden pellettiert und in 50 mM Tris pH 7,5 resuspendiert, bei 10.000 psi unter Kühlung bei 10°C zwischen den Durchläufen aufgebrochen. Das erhaltene Lysat wurde durch Zentrifugieren bei 10.000 Upm für 30 min. bei 4°C geklärt und das exprimierte Angiostatin wurde über eine Lysin-Sepharose (Fig. 11) isoliert.

[0184] Gereinigtes von E. coli exprimiertes menschliches Angiostatin wurde ausgiebig gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das exprimierte menschliche Angiostatin wurde in Medium (DMEM, 5 % BCS, 1 % Gentamycin/Pennicillin/Streptomycin) bis auf eine abgeschätzte Konzentration von 3 µg/ml resuspendiert, und in dem Rinderkapillar-Endothel (BCE)-Zelltest in vitro verwendet, der in Beispiel 8, Seite 39, beschrieben ist. Gleichermaßen wurde der Kontrollklon, der den Vektor alleine enthält, in gleicher Weise wie der Klon pTrcHisA/HAsH4 behandelt. Dieser wurde mit IPTG in identischer Weise induziert und das bakterielle Lysat wurde verwendet, um Lysin zu binden, mit 0,2 M Aminocaprylsäure eluiert, ausgiebig dialysiert und lyophilisiert. Dieses Kontrollpräparat wurde ebenfalls in Medium auf eine geschätzte Konzentration von 3 µg/ml resuspendiert. Die Proben des rekombinanten Angiostatins und der Kontrollen wurden aus verschiedenen Induktionsund Fermentierungsbatches wie auch getrennten Reinigungsläufen gewonnen, und sie wurden alle bei EntreMed, Maryland, kodiert. BCE-Tests wurden mit diesen kodierten Proben in geblindeter Weise beim Children's Hospital, Boston, durchgeführt.

[0185] Die Ergebnisse des BCE-Tests mit rekombinantem menschlichem Angiostatin zeigten, dass menschliches Angiostatin, das in E. coli exprimiert wurde, die Proliferation von BCE-Zellen durch bFGF (verwendet zu 1 ng/ml) (Fig. 12) inhibierte. Der rekombinante Angiostatin-Bestand in Medium (bei ungefähr 3 µg/ml) wurde zu 1:5, 1:10 und 1:20 Verdünnungen verwendet. Die prozentuale Inhibierung wurde wie folgt berechnet:

$$1 - \frac{\text{Anzahl der Zellen mit Angiostatin - Nummer der Zellen am Tag 0}}{\text{Anzahl der Zellen mit bFGF alleine - Anzahl der Zellen am Tag 0}}$$

[0186] Die prozentuale Inhibierung der BCE-Zellproliferation war vergleichbar oder höher als die von Plasminogen, welches von Angiostatin, das von Plasminogen stammt, bei ähnlichen Konzentrationen. Die Ergebnisse eines wiederholten Laufes des BCE-Tests sind in Fig. 13 wiedergegeben, wobei eine 1:5 Verdünnung des Bestands des rekombinanten Angiostatins ähnliche prozentuale Inhibierungen wie die ergab, die mit Angiostatin, das aus Plasminogen stammt, gewonnen wurde. Fig. 13 zeigt das überraschende Ergebnis, dass menschliches rekombinantes Angiostatin-Protein über 60 % inhibiert und bis zu 75 % der BCE-Proliferation in Kultur.

Beispiel 20

Angiostatin bewahrt den Ruhezustand von Mikrometastasen durch Erhöhung der Apoptoserate.

[0187] Nach der subkutanen Inokulation von Lewis-Lungencarzinomzellen (1×10^6) in C57 BL6/J-Mäuse, ent-

wickelten sich Primärtumore von ungefähr 1,5 cm^3. Die Tiere wurden entweder einer chirurgischen Entfernung des Primärtumors unterzogen oder eine Scheinoperation. Nach den Tagen 5, 10 und 15 nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Tiere geopfert und ihre Lungen wurden für eine histologische Untersuchung präpariert. Die Tiere mit herausoperierten Primärtumoren zeigten eine massive Proliferation der Mikrometastasen verglichen mit scheinoperierten Kontrollen (Fig. 14). Diese Änderungen waren durch einen signifikanten Anstieg des Lungengewichts begleitet.

[0188] Analysen der Tumorzellproliferation, wie durch die Aufnahme der Bromdeoxyuridin (BrdU) gemessen wurde, zeigten keine Unterschiede zwischen den Tieren mit intakten Primärtumoren oder resektionierten Tumoren an den Tagen 5, 9 und 13, was darauf hinweist, dass der Anstieg der Tumormasse nicht durch eine erhöhte Proliferation erklärt werden kann (**Fig.** 15). Demgemäß wurde Zelltod in diesen Tieren untersucht. Apoptose, ein Prozess des Zelltods, der unabhängig von Änderungen der Genexpression ist und für die Eliminierung von Zellen während der Entwicklung und in schnell proliferierenden Geweben verantwortlich ist, wie beispielsweise dem Dünndarm, wurde durch immunhistochemisch markierte fragmentierte DNA mit Hilfe der terminalen Deoxinucleotidyltransferase (TdT)-Technik untersucht. Der Apoptoseindex wurde zu jedem Zeitpunkt des Opfers bestimmt. Die Entfernung der Primärtumore verursachte einen statistisch signifikanten Anstieg (ungefähr 3- bis 4-fach) des Apoptoseindexes zu allen untersuchten Zeiten (**Fig.** 15).

[0189] Unterstützende Hinweise wurden mit einem exogenen Suppressor der Angiogenesedurch Behandlung von Mäusen gewonnen, denen die Primärtumore entfernt worden waren. Diese Substanz, TNP-1470 (O-Chloracetylcarboamoylfumagillol, zuvor bezeichnet als AGM-1470) ist ein Analogon von Fumagillin mit beschriebener anti-angiogener Wirkung. Die subkutane Injektion von TNP-1470 (30 mg/kg alle zwei Tage) rief Ergebnisse hervor, die auffallend ähnlich denen waren, die oben bei Tieren beschrieben wurden, die intakte Primärtumoren hatten. Diese Tiere wiesen, verglichen mit Kontrollen, in die Salzlösung injiziert wurde, ein niedrigeres Lungengewicht auf, einen äquivalenten Proliferationsindex und einen erhöhten Apoptoseindex (**Fig.** 16).

[0190] Diese Daten zeigen an, dass Metastasen im Ruhezustand bleiben, wenn die Tumorzellproliferation durch eine äquivalente Rate an Zelltod ausgeglichen wird. Die Entfernung des Primärtumors verursacht einen schnellen Anstieg des Wachstums der Metastasen, wahrscheinlich aufgrund der Entfernung von Angiogenese-Inhibitoren (Angiostatin), welche das metastatische Wachstum durch Erhöhung der Apoptose in Tumorzellen kontrollieren. Diese Wirkungen sind ähnlich denen, die nach der Entfernung der Primärtumore und der Verabreichung eines exogenen Inhibitors der Angiogenese gesehen werden. Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, dass der Primärtumor Angiostatin freisetzt, welcher den Ruhezustand der Mikrometastasen aufrecht erhält.

Beispiel 21

Behandlung von Primärtumoren mit Angiostatin in vivo.

[0191] Angiostatin wurde aus menschlichem Plasminogen mit einem beschränkten Elastaseverdau, wie in Beispiel 15 oben beschrieben, gereinigt. Angiostatin wurde für die Verabreichung an 6 Wochen alte männliche C57Bl6/J-Mäuse in Phosphat-gepufferte Salzlösung resuspendiert. Den Tieren wurden subkutan 1×10^6 Tumorzellen entweder des Lewis-Lungencarzinoms oder des T241-Fibrosarcoms implantiert. Die Behandlung mit Angiostatin wurde nach 4 Tagen begonnen, sobald die Tumore 80–160 mm^3 Größe hatten. Die Mäuse erhielten entweder als Einzelinjektion zu 40 mg/kg oder zwei 80 mg/kg Injektionen über intraperitoneale (ip) oder subkutane (sc) Wege Angiostatin-Injektionen. Die Tiere wurden zu zahlreichen Zeitpunkten bis zu 19 Tage nach der Behandlung geopfert.

[0192] Angiostatin, das in einer täglichen Dosis von 40 mg/kg ip verabreicht wurde, rief eine hoch signifikante Inhibierung des Wachstums von T241 Primärtumoren hervor (Fig. 17). Diese inhibitorische Wirkung auf das Wachstum war offensichtlich innerhalb von 2 Tagen sichtbar und stieg in der Größe über den zeitlichen Verlauf der Studie an. Am Tag 18 hatten die Angiostatin-behandelten Mäuse Tumore, die ungefähr 38 % des Volumens der Salzinjizierten Kontrollen betrugen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0{,}001$, Studentscher t-Test).

[0193] Angiostatin-Behandlung (Gesamtdosis 80 mg/kg/Tag, verabreicht zweimal täglich zu 40 mg/kg ip oder sc) reduzierte ebenfalls signifikant die Wachstumsrate der LLC-LM Primärtumore (Fig. 17). Diese inhibitorische Wirkung war nach 4 Tagen offenkundig und stieg in der Größenordnung an allen anschließenden Zeitpunkten der Untersuchung an. Am letzten Tag des Experiments (Tag 19) haben die Angiostatin-behandelten

Mäuse ein mittleres Tumorvolumen, das nur 20 % der Salz-injizierten Kontrollen hatte, was signifikant verschieden war ($p < 0{,}001$, Studentscher t-Test).

[0194] In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde Angiostatin (50 mg/kg q12h) an Mäuse verabreicht, in die T241-Fibrosarcom, Lewis-Lungencarzinom (LM) oder Reticulum-Sarcomzellen transplantiert wurden. Bei jedem Tumorzelltyp hatten die Mäuse, die Angiostatin erhielten, eine wesentlich geringere Tumorgröße. Fig. 19 zeigt, dass beim T241-Fibrosarcom die Angiostatin-behandelten Mäuse ein mittleres Tumorvolumen hatten, das nur 15 % der unbehandelten Mäuse am Tag 24 entsprach. Fig. 20 zeigt, dass beim Lewis-Lungencarzinom (LM) die Angiostatin-behandelten Mäuse ein mittleres Tumorvulumen hatten, das nur 13 % der unbehandelten Mäuse am Tag 24 entsprach. Fig. 21 zeigt, dass beim Reticulumsarcom die Angiostatin-behandelten Mäuse ein mittleres Tumorvolumen hatten, das nur 19 % der unbehandelten Mäuse am Tag 24 entsprach. Die Daten stellen den Durchschnittswert von 4 Mäusen zu jedem Zeitpunkt dar.

[0195] Die Ergebnisse zeigen, dass Angiostatin ein extrem wirksamer Inhibitor des Wachstums von 3 verschiedenen Primärtumoren in vivo ist.

Beispiel 22

Behandlung von aus menschlichen Zellen stammenden Primärtumoren in Mäusen mit Angiostatin in vivo.

[0196] Die Wirkung von Angiostatin auf zwei menschliche Tumorzelllinien, das menschliche Prostatacarzinom PC-3 und das menschliche Brustcarzinom MDA-MB wurden untersucht. Immun-defizienten SCID-Mäusen wurden menschliche Tumorzellen implantiert und die Mäuse wurden mit 50 mg/kg Angiostatin über alle 12 Stunden im Wesentlichen wie in Beispiel 21 beschrieben behandelt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Angiostatin-Protein der vorliegenden Erfindung ein wirksamer Inhibitor des Zellwachstums menschlicher Tumoren ist. Fig. 22 zeigt, dass die Angiostatin-behandelten Mäuse beim menschlichen Prostatacarzinom PC-3 nur 2 % des mittleren Tumorvolumens verglichen mit den unbehandelten Kontrollmäusen am Tag 24 hatten. Fig. 23 zeigt, dass die Angiostatin-behandelten Mäuse nur 8 % des mittleren Tumorvolumens verglichen mit den nicht behandelten Kontrollmäusen am Tag 24 beim menschlichen Brustcarzinom MDA-MB hatten.

Beispiel 23

Gentherapie-Effekt der Transfektion des Angiostatin-Gens auf das Tumorvolumen.

[0197] Eine 1380 DNA-Sequenz für Angiostatin, das aus Maus-Plasminogen-cDNA stammt (erhalten von der American Type Culture Collection (ATCC)), welches für die Maus-Plasminogen-Aminosäuren 1-460 kodiert, wurde mit Hilfe der PCR generiert und in einen Expressionsvektor inseriert. Der Expressionsvektor wurde in T241-Fibrosarcomzellen transfiziert und die transfizierten Zellen wurden in Mäuse implantiert. Die Kontrollmäuse erhielten entweder nicht-transfizierte T241-Zellen oder T241-Zellen, in die nur der Vektor transfiziert wurde (d. h. nicht Angiostatin-exprimierende transfizierte Zellen). Drei Angiostatin-exprimierende transfizierte Zellklone wurden in dem Experiment verwendet. Das mittlere Tumorvolumen über die Zeit wurde ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die überraschenden und dramatischen Reduzierungen des mittleren Tumorvolumens in Mäusen bei Angiostatin-exprimierenden Zellklonen, verglichen mit den nicht-transfizierten und nicht-exprimierenden Kontrollzellen.

[0198] Die Maus-DNA-Sequenz, die für Maus-Angiostatin-Protein kodiert, stammt aus der Maus-Plasminogen-cDNA. Das Maus-Angiostatin umfasst Maus-Plasminogen-Kringle-Region 1–4. Das Schema für die Herstellung dieses Klons ist in Fig. 24 gezeigt.

[0199] Die Maus-Angiostatin-Protein-Klone wurde in T241-Fibrosarcomzellen unter Verwendung von LIPOFECTINTM-Transfektionssystem (erhältlich von Life Technologies, Gaithersburg, MD) transfiziert. Das LIPOFECTIN™-Reagens ist eine 1:1 (w/w) Liposomenformulierung des cationischen Lipids N-[-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und Diolecoylphosphotidylethanolamin (DOPE) in Membran-gefiltertem Wasser.

[0200] Das Verfahren für die transiente Transfektion von Zellen ist wie folgt:

1. T241-Zellen werden in 60 cm^2 Gewebekulturschalen, ausgesät zu ungefähr 1-2 × 10^5 Zellen in 2 ml des geeigneten Wachstumsmediums supplementiert mit Serum, gezüchtet.
2. Inkubation der Zellen bei 37°C in einem CO_2-Inkubator, bis die Zellen 40–70 % konfluent sind. Das dauert ungefähr 18–24 h, aber die Zeit variiert abhängig vom Zelltyp. Die T241-Tumorzellenkonfluenz betrug un-

gefähr 70 %.
3. Vorbereitung der folgenden Lösungen in 12 × 75 mm sterilen Röhrchen:
Lösung A: für jede Transfektion 5 µg DNA in 100 µl Serum-freiem OPTI-MEM 2 reduziertem Serum Medium (erhältlich von Life Technologies) (dionisiertes Wasser mit Gewebekulturgrad kann ebenfalls verwendet werden) verdünnen.
Lösung B: für jede Transfektion 30 µg Lipofectamin in 100 µl OPTI-MEM Medium verdünnen.
4. Zusammengeben der zwei Lösungen, vorsichtig mischen und inkubieren bei Raumtemperatur für 10–15 min.
5. Zellen zweimal mit Serum-freiem Medium waschen.
6. Für jede Transfektion 0,8 ml Serum-freies Medium zu jedem Röhrchen enthaltend die LIPOFECTINTM-Reagens-DNA-Komplexe zugeben. Vorsichtig mischen und den Komplex auf die Zellen schichten.
7. Inkubieren der Zellen für ungefähr 12 h bei 37°C in einem CO_2-Inkubator.
8. Ersetzen des DNA-haltigen Mediums durch 1 mg/ml Selektionsmedium enthaltend Serum und inkubieren der Zellen bei 37°C in einem CO_2-Inkubator für insgesamt 48–72 h.
9. Untersuchung von Zellextrakten auf die Genaktivität bei 48–72 h nach der Transfektion.

[0201] Transfizierte Zellen können auf die Expression des Angiostatin-Proteins unter Verwendung von Angiostatin-spezifischen Antikörpern untersucht werden. Alternativ dazu traten ungefähr 10–14 Tage danach G418-resistente Kolonien in dem CMV-Angiostatin-transfizierten T241-Zellen auf. Es wurde auch eine Anzahl an Klonen in den mit dem Vektor allein transfizierten Klonen gesehen, aber nicht in den nicht-transfizierten Klonen. Die G418-resistenten Klone wurden selektiert bezüglich der Expression von Agiostatin, indem ein Immunfluoreszenz-Verfahren verwendet wurde.

[0202] Interessanterweise wurde das in vitro-Zellwachstum von T241-Zellen und Lewis-Lungenzellen, die mit Angiostatin transfiziert wurden, nicht inhibiert oder sonst nachteilig beeinflusst, wie in den **Fig.** 25 und 26 gezeigt wird.

[0203] Fig. 27 stellt die Ergebnisse des Transfektionsexperiments dar. Alle drei der Angiostatin-exprimierenden T241-transfizierten Klone produzierten mittlere Tumorvolumina in Mäusen, die im Wesentlichen relativ zum Tumorvolumen in Kontrollmäusen reduziert waren. Das mittlere Tumorvolumen der Mäuse, in die der Klon 37 implantiert wurde, betrug nur 13 % der Kontrolle, während der Klon 31 und der Klon 25 Tumorvolumina von nur 21 % und 34 % der Kontrolltumorvolumina ergab. Diese Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Sequenzen, die für Angiostatin kodieren, in Zellen transfiziert werden können, dass die transfizierten DNA-Sequenzen in der Lage sind, Angiostatin-Protein in den implantierten Zellen zu exprimieren, und dass das exprimierte Angiostatin in vivo so funktioniert, dass das Tumorwachstum reduziert ist.

Beispiel 24

Lokalisierung der Angiostatin-Expression in vivo.

[0204] Um die Expressionsstelle des Angiostatin-Proteins in vivo zu lokalisieren, wurde gesamte RNA aus verschiedenen Zelltypen, Lewis-Lungencarzinomzellen (Maus), T241-Fibrosarcom (Maus), und Burkitt Lymphomzellen (Mensch) sowohl aus frischen Tumoren oder Zellkulturen nach mehreren Passagen analysiert, um das Vorhandensein von Angiostatin-Transkripten zu bestimmen. Eine Northern-Analyse der Proben zeigte die Abwesenheit jeglichen Signals, was mit der Sequenz aus allen Proben hybridisierte, außer in der normalen Mausleber-RNA, welche ein einzelnes Signal von ungefähr 2,4 kb ergab, welches Maus-Plasminogen entspricht. Die Northern-Analyse der menschlichen Proben zeigte die Abwesenheit jedes Signals, das mit der menschlichen Angiostatin-Sequenz hybridisierte, bei allen Proben, außer der normalen menschlichen Leber-RNA, welche ein einzelnes Signal bei ungefähr 2,4 kb zeigte, was dem menschlichen Plasminogen entspricht.

[0205] Eine Reverse Transkriptionspolymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Analyse zeigte die Abwesenheit jedes Produkts in allen Proben, die mit Maus-Angiostatin-Sequenzen untersucht wurden, außer in der normalen Mausleber. Eine RT-PCR-Analyse zeigte die Abwesenheit jedes Produkts in menschlichen Proben, die mit menschlichen Angiostatin-Sequenzen untersucht wurden, außer in der normalen menschlichen Leber (erwartete Größe von 1.050 bp bei der Maus und 1.134 bp beim Menschen).

[0206] Daher scheint es, dass Maus-Angiostatin-Transkripte (unter der Annahme der Identität mit den Aminosäuren 97 bis 450 des Maus-Plasminogens) durch alle oben erwähnten Mausproben nicht hergestellt werden, und dass menschliche Angiostatin-Transkripte (unter der Vermutung einer Identität mit den Aminosäuren

93 bis 470 des menschlichen Plasminogens) nicht in den oben erwähnten menschlichen Proben produziert werden. Die positiven Signale, die in normaler Maus-/Menschenleber gewonnen wurden, stammen aus der Hybridisierung mit Plasminogen.

Beispiel 25

Expression von Angiostatin in Hefe.

[0207] Das Genfragment, das die Aminosäuren 93 bis 470 des menschlichen Plasminogens kodiert, wurde in die XhoI/EcoRI-Stelle des pHIL-SI (Invitrogen) kloniert, welcher die sezernierte Expression von Proteinen unter Verwendung des PHO1-Sekretionssignal in der Hefe Pichia pastoris erlaubt. Gleichermaßen wurde das Genfragment, das die Aminosäuren 93 bis 470 des menschlichen Plasminogens kodiert, in die SnaBI/EcoRI-Schnittstelle von pPIC9 (Invitrogen) kloniert, was die sezernierte Expression von Proteinen unter Verwendung des α-Faktor Sekretionssignals in der Hefe Pichia pastoris erlaubt. Die exprimierten menschlichen Angiostatin-Proteine in diesen Systemen haben viele Vorteile gegenüber solchen, die in E. coli exprimiert werden, wie beispielsweise die Proteinprozessierung, die Proteinfaltung und die posttranslationale Modifizierung, einschließlich der Glycosylierung.

[0208] Die Expression des Gens in P. pastoris, ist beschrieben in (Sreekrishna, K. et al. (1988) High level expression of heterologous proteins in methylotropic xeast Pichia pastoris. J. Basic Microbiol. 29 (4): 265–278, und 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.

Beispiel 26

Expression von Angiostatin-Proteinen in transgenen Tieren und Pflanzen.

[0209] Transgene Tiere, wie die Familie der Rinder oder Schweine, werden hergestellt, die das Angiostatin-Gentranskript exprimieren. Das transgene Tier exprimiert Angiostatin-Protein beispielsweise in der Milch dieser Tiere. Zusätzlich werden essbare transgene Pflanzen, die das Angiostatin-Gentranskript exprimieren, hergestellt.

[0210] Die Konstruktion transgener Tiere, die fremde DNA exprimieren, ist beschrieben in Smith H. Phytochrome transgenics: functional, ecological and biotechnical applications, Semin. Cell. Biol. 1994 5 (5): 315–325.

[0211] Es ist klar, dass das Vorangegangene nur bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betrifft und dass zahlreiche Modifizierungen oder Änderungen hierzu vorgenommen werden können, ohne vom Schutzbereich der Erfindung abzuweichen, die in den angehängten Ansprüchen ausgeführt ist, abzuweichen.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: The Children's Medical Center Corporation

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Angiostatin und Verwendungsverfahren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSE: Jones & Askew

(B) STRASSE: 191 Peachtree Street, 37th Floor

(C) STADT: Atlanta

(D) STAAT: Georgia

(C) LAND: U.S.A.

(D) ZIP: 30303-1769

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe #1.0, Version #1.30

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDUNG NR.: US

(B) ANMELDEDATUM:

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) DATEN DER PRIORITÄTSANMELDUNG:

(A) ANMELDUNG NR.: US 08/248,629

(B) ANMELDETAG: 26. April 1994

(vii) DATEN DER PRIORITÄTSANMELDUNG:

(A) ANMELDUNG NR.: US 08/326,785

(B) ANMELDETAG: 20. Oktober 1994

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: Johnson, James D.

(B) REGISTRIERUNGS-NR.: 31,771

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN-NR.: 05213-0122

(ix) TELEFONKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 404-818-3700

(B) TELEFAX: 404-818-3799

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 1

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 812 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1

```
Met Asp His Lys Glu Val Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Lys Pro
1               5                  10                  15

Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Ile Ser Thr Gln Gly Ala Ser
            20                  25                  30

Leu Phe Ser Leu Thr Lys Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Val Ser Asp
        35                  40                  45

Cys Leu Ala Lys Cys Glu Gly Glu Thr Asp Phe Val Cys Arg Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
65                  70                  75                  80

Lys Thr Ser Ser Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
                85                  90                  95

Arg Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg
            100                 105                 110

Gly Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly
        115                 120                 125

Ala Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn
    130                 135                 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln
145                 150                 155                 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
                165                 170                 175
```

```
Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
            180                 185                 190

Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala
        195                 200                 205

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe
    210                 215                 220

Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu
225                 230                 235                 240

Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr
                245                 250                 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
        275                 280                 285

Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
    290                 295                 300

His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
305                 310                 315                 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
                325                 330                 335

Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
            340                 345                 350

Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu
        355                 360                 365

Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser
    370                 375                 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
385                 390                 395                 400

Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe
                405                 410                 415

Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
            420                 425                 430

Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
        435                 440                 445

Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu
    450                 455                 460
```

```
Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
465                 470                 475                 480

Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
                485                 490                 495

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

His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys
        515                 520                 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
    530                 535                 540

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
545                 550                 555                 560

Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
                565                 570                 575

Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
            580                 585                 590

Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe
        595                 600                 605

Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His
    610                 615                 620

Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
625                 630                 635                 640

Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val
                645                 650                 655

Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys
            660                 665                 670

Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu
        675                 680                 685

Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr
    690                 695                 700

Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
705                 710                 715                 720

Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr
                725                 730                 735

Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala
            740                 745                 750
```

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

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

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

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 339 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 2

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro
    130                 135                 140

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

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr
                165                 170                 175

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

Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
        195                 200                 205

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

Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu
                245                 250                 255

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

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

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

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

Gly Pro Trp
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 3

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 339 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mensch

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3

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

Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
            20                  25                  30

Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu
    130                 135                 140

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

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
                165                 170                 175

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val
            180                 185                 190

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

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

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr
225                 230                 235                 240

Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp
                245                 250                 255

Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu
            260                 265                 270

Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
        275                 280                 285
```

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

Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
305                 310                 315                 320

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

Gly Pro Trp
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 4

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 339 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Rhesusaffe

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4

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

Thr Ser Pro His Arg Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

```
Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
    130                 135                 140

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

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
                165                 170                 175

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val
            180                 185                 190

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

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

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
225                 230                 235                 240

Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Glu
                245                 250                 255

Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Pro Leu Asp Pro Thr Ala Pro Pro Glu
            260                 265                 270

Leu Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
        275                 280                 285

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

Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Glu Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
305                 310                 315                 320

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

Gly Pro Trp
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 5

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 339 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Schwein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 5

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

Thr Thr Ser Lys Thr Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val
            20                  25                  30

Ser Ser Pro His Ile Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
    130                 135                 140

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

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Thr Tyr
                165                 170                 175

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

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

Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
    210                 215                 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
225                 230                 235                 240

Thr Asp Ser Glu Val Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Gly
                245                 250                 255

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Glu His Leu Asp Ala Pro Val Pro Pro Glu
            260                 265                 270
```

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

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

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

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

Ser Pro Trp
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 6

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 339 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Rind

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 6

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
    130                 135                 140

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

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Lys Tyr
                165                 170                 175

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

Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
    210                 215                 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu 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

Ser Ser Pro Leu Ser Thr Glu Arg Met Asp Val Pro Val Pro Pro Glu
            260                 265                 270

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

Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Leu Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
305                 310                 315                 320

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

Ser Pro Trp
```

Patentansprüche

1. Isoliertes als Angiostatin bezeichnetes Protein, umfassend ein Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen ungefähr 38 kD und 45 kD, bestimmt durch reduzierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, und mit einer Aminosäuresequenz, die ungefähr mit dem Aminosäurerest 98 des Plasminogenmoleküls beginnt, oder mit einer Aminosäuresequenz der Plasminogen-Kringel-Regionen 1 bis 3 und einem Teil der Kringel-Region 4, und mit anti-angiogener Wirkung.

2. Angiostatin-Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein ein Plasminogen-Fragment des Plasminogens des Menschen, des Plasminogens der Maus, des Plasminogens des Rinds, Rhesus-Plasminogens oder des Plasminogens des Schweins ist.

3. Angiostatin-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 2, mit den ersten 339 Aminosäuren seiner Aminosäuresequenz, die aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6 ausgewählt sind.

4. Angiostatin-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Plasminogenfragment eine inhibitorische Wirkung auf die Endothelzellproliferation in vitro in einem Rinder-Endothelzellen-Test hat.

5. Angiostatin-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Protein in der Lage ist, das Krebswachstum zu inhibieren.

6. Angiostatin-Protein nach Anspruch 5, wobei der Krebs aus der Gruppe, bestehend aus Prostatakrebs, Brustkrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs, ausgewählt ist.

7. Zusammensetzung, umfassend ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Sequenz, die für ein Angiostatin-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, die außerdem einen Vektor umfaßt, der die Nukleotidsequenz umfaßt, die das Angiostatin-Protein codiert, wobei der Vektor in der Lage ist, das Angiostatin-Protein zu exprimieren, wenn er in einer Zelle vorhanden ist.

9. Verfahren zum Exprimieren eines Angiostatin-Proteins in vitro, umfassend das Transfizieren eines Vektor in eine Zelle, wobei der Vektor ein RNA- oder DNA-Molekül umfaßt, wie in Anspruch 7 definiert, wobei der Vektor in der Lage ist, das Angiostatin-Protein zu exprimieren, wenn er in der Zelle vorhanden ist.

10. In vitro-Verfahren zum Nachweisen von Angiostatin in biologischen Flüssigkeiten, Geweben oder Gewebeextrakten, umfassend:
a) Zusammengeben einer Probe einer biologischen Flüssigkeit, eines Gewebes oder Gewebeextrakts mit einem Angiostatin-Antiserum, enthaltend einen Angiostatin-Antikörper;
b) Nachweisen der Bindung zwischen dem Angiostatin-Protein und dem Antikörper, dadurch Nachweisen von Angiostatin-Protein in der Probe.

11. Verfahren nach Anspruch 10 zum Nachweisen von Angiostatin gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6.

12. Verfahren nach Ansprüchen 10 oder 11, worin die Probe eine Körperflüssigkeit eines Menschen oder eines Tiers ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Mensch oder das Tier eine Angiogenese-vermittelte Erkrankung oder einen Zustand hat.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Mensch oder das Tier einen Krebs hat.

Es folgen 27 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1

Maus-Plasminogen-Sequenz:

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

FIGUR 2

Maus

Mensch

Rhesusaffe

Schwein

Rind

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

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

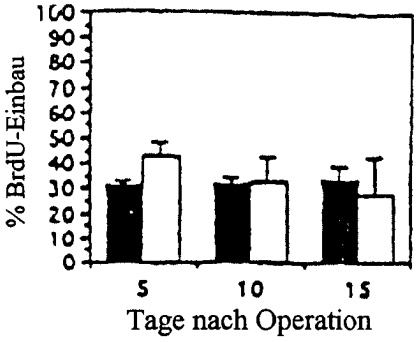
gln thr pro val val gln glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr
leu thr pro val val gln asp cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
leu thr pro val val gln glu cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
gln thr pro val ala gln asp cys tyr arg gly asn gly glu ser tyr
gln thr pro val pro gln asp cys tyr his gly asn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

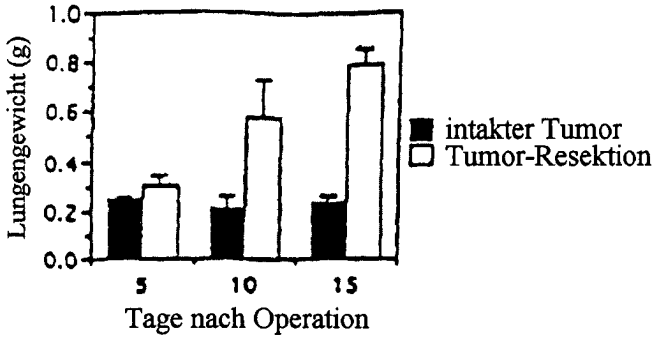
ala ala met phe pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro
ser ser met thr pro his arg his gln lys thr pro glu asn tyr pro
ser ser met thr pro his trp his glu lys thr pro glu asn phe pro
val ser met thr pro his arg his glu lys thr pro gly asn phe pro
ser ser met thr pro his arg his leu lys thr pro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

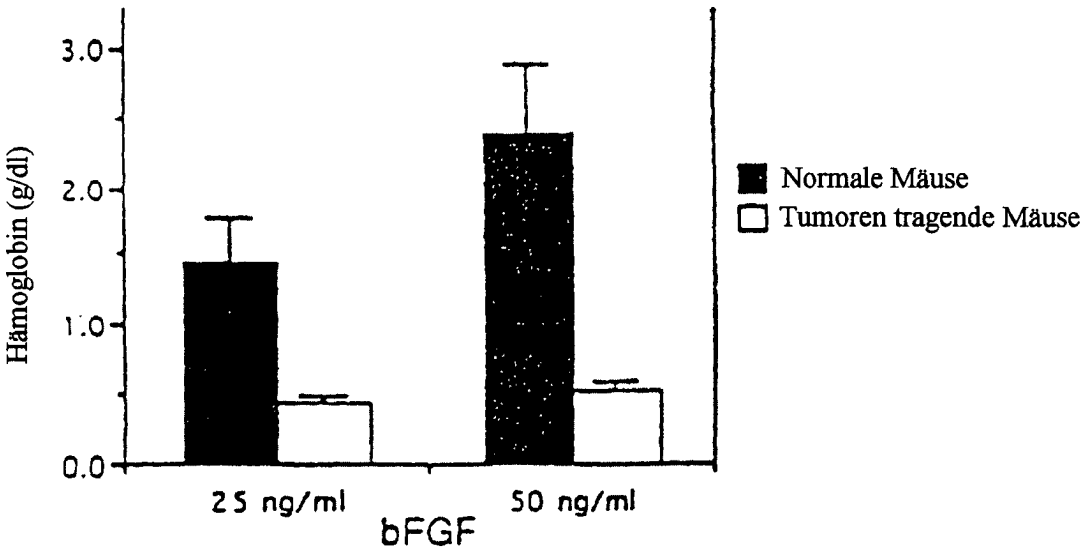
gly pro trp
gly pro trp
gly pro trp
ser pro trp
ser pro trp



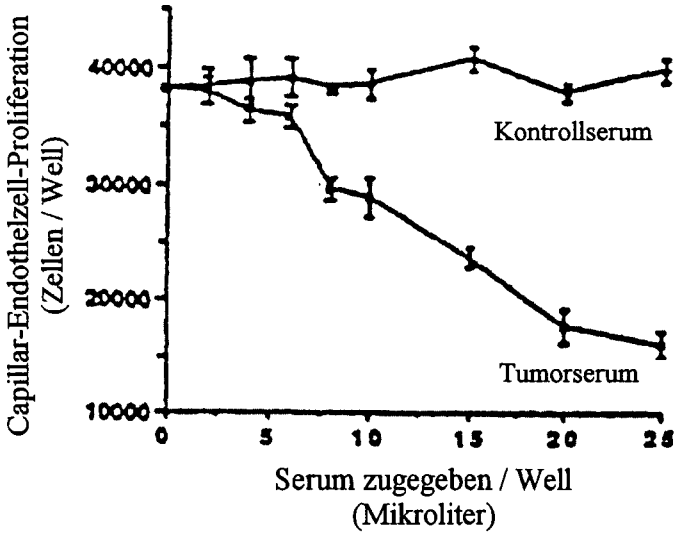
FIGUR 3A



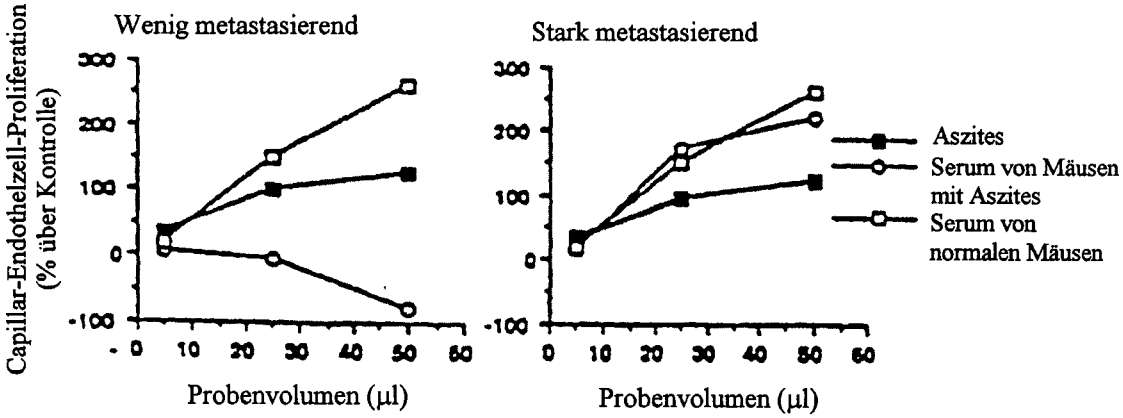
FIGUR 3B



FIGUR 4

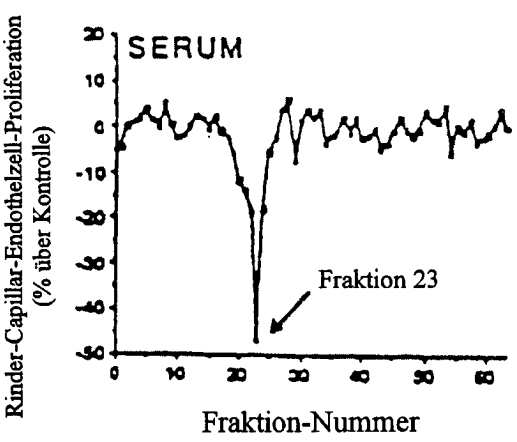


FIGUR 5

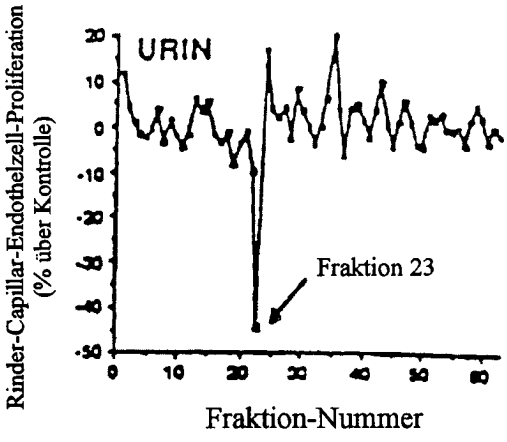


FIGUR 6A

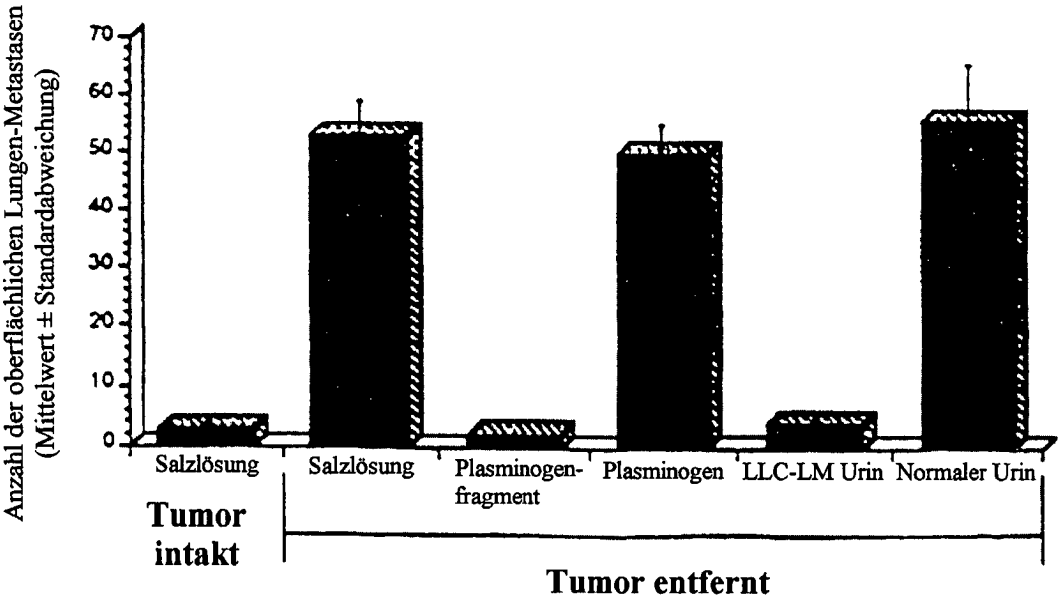
FIGUR 6B



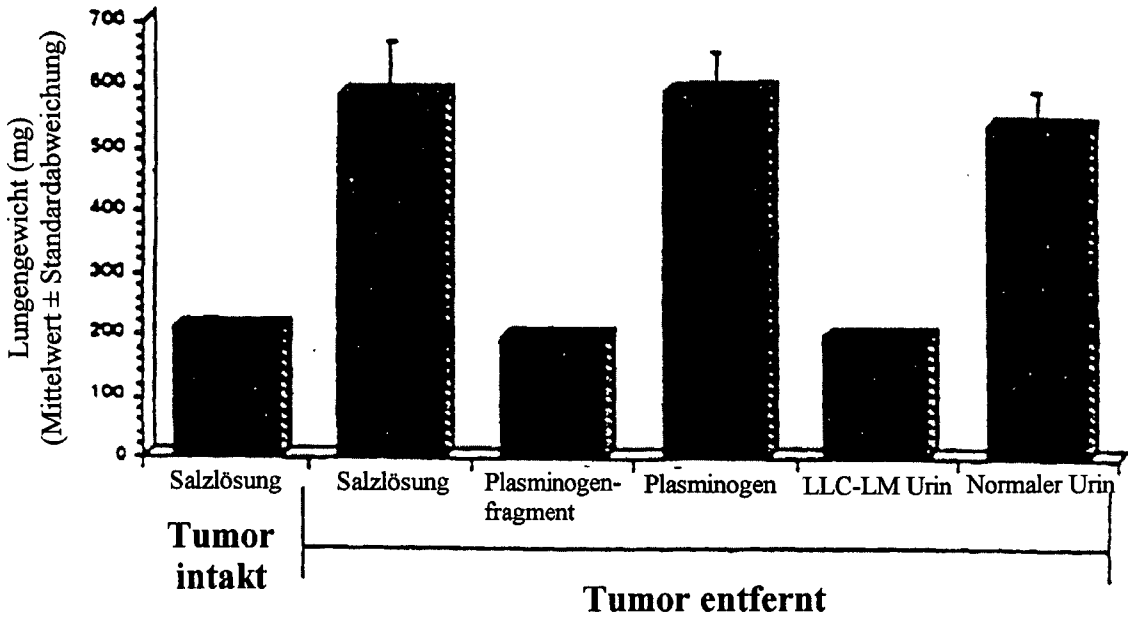
FIGUR 7A



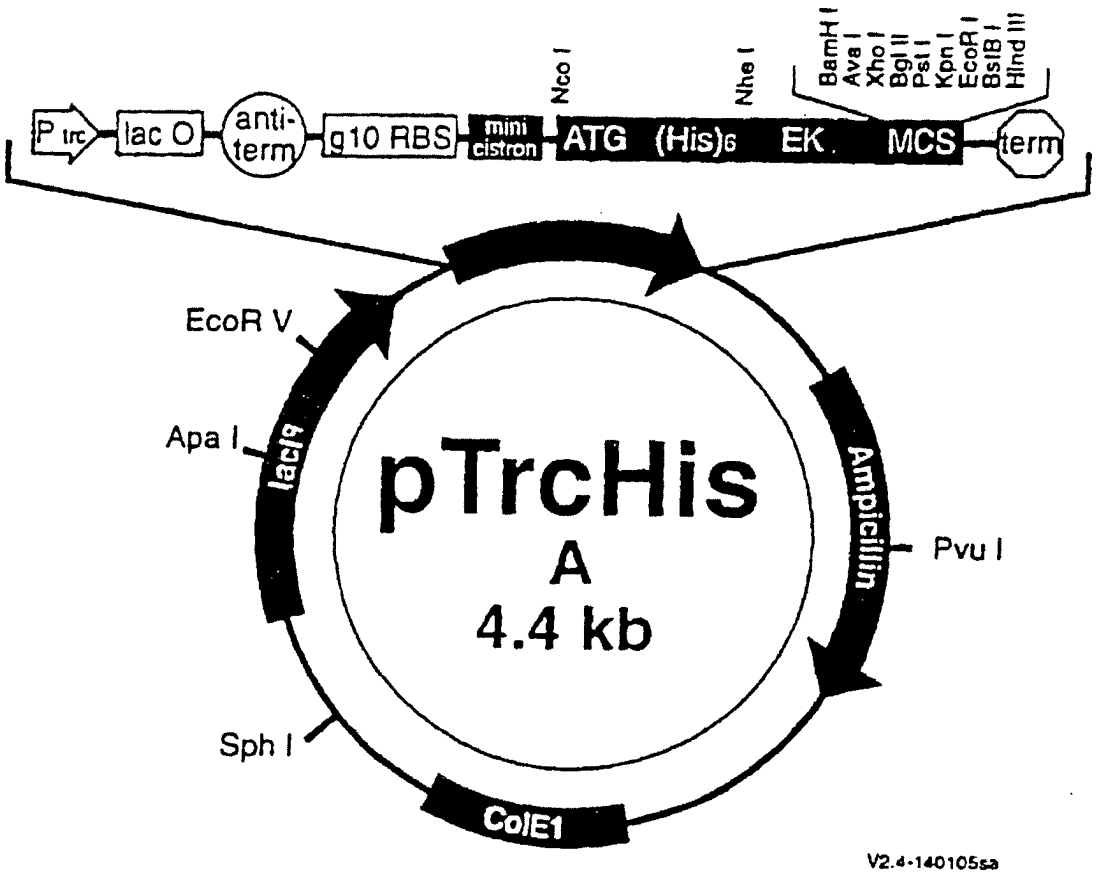
FIGUR 7B



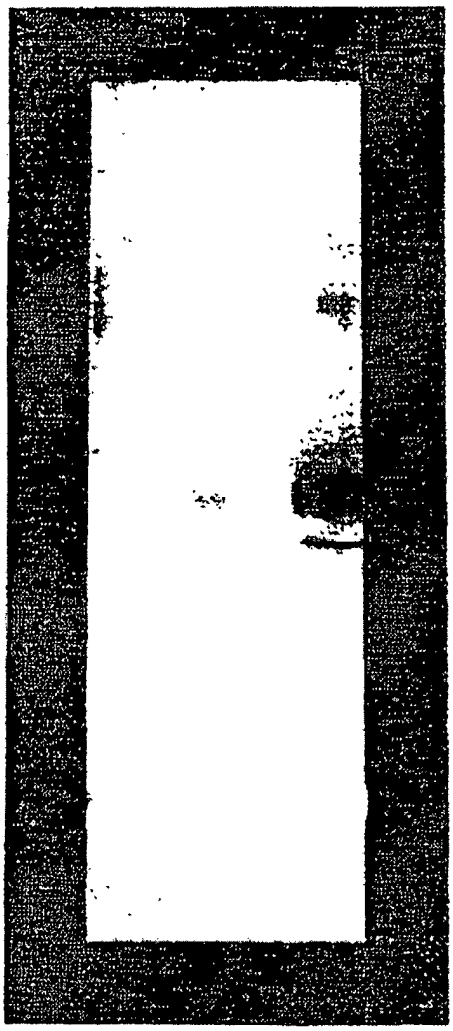
FIGUR 8


Lungengewicht (mg)
(Mittelwert ± Standardabweichung)
700
600
500
400
300
200
100
0
Salzlösung
Salzlösung
Plasminogen-fragment
Plasminogen
LLC-LM Urin
Normaler Urin
Tumor intakt
Tumor entfernt

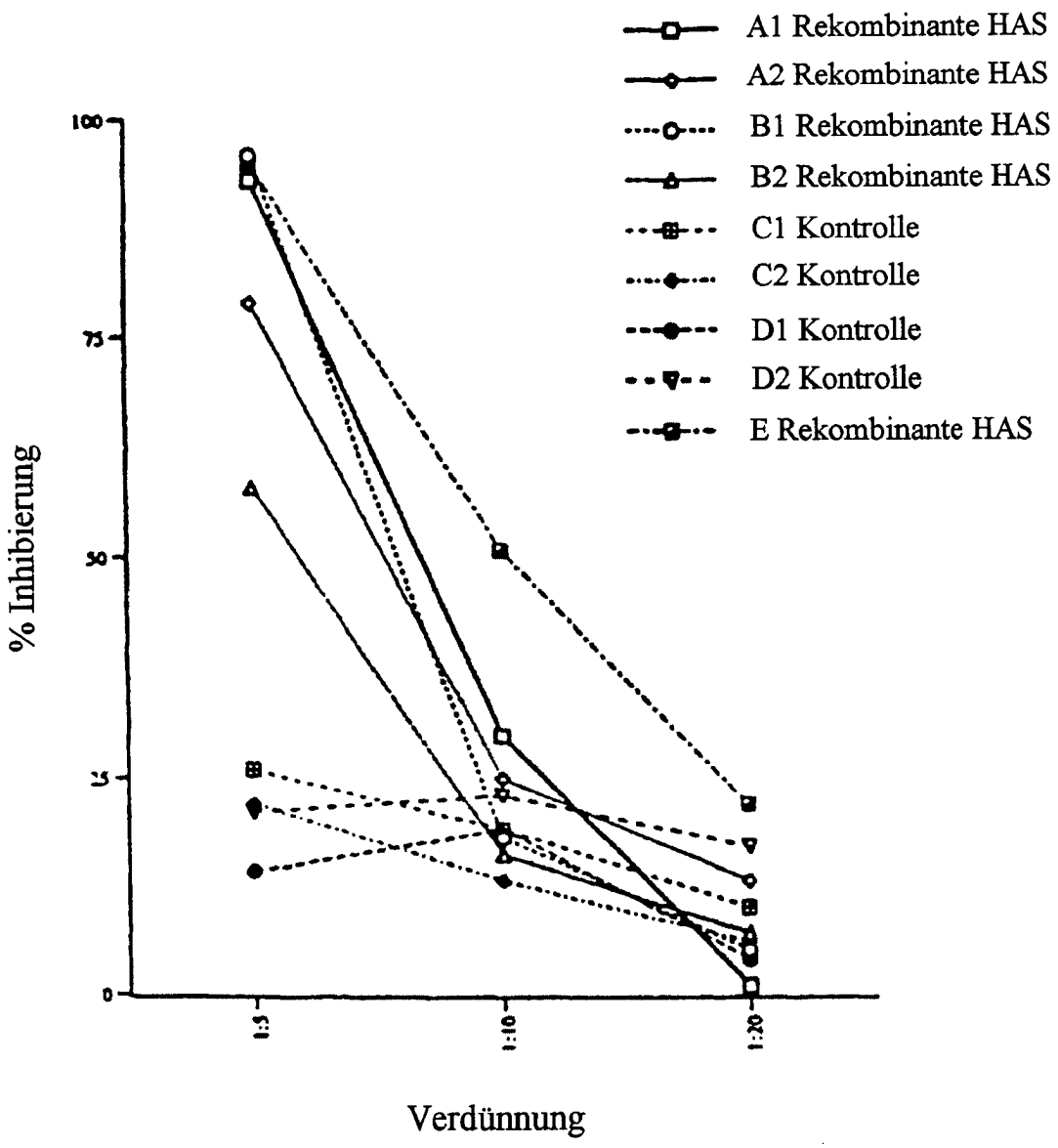
FIGUR 9


P trc
lac O
anti-term
g10 RBS
mini cistron
Nco I
Nhe I
BamH I
Ava I
Xho I
Bgl II
Psi I
Kpn I
EcoR I
BsiB I
Hind III
ATG
(His)6
EK
MCS
term
EcoR V
Apa I
lacIq
pTrcHis
A
4.4 kb
Ampicillin
Pvu I
Sph I
ColE1
V2.4-140105sa

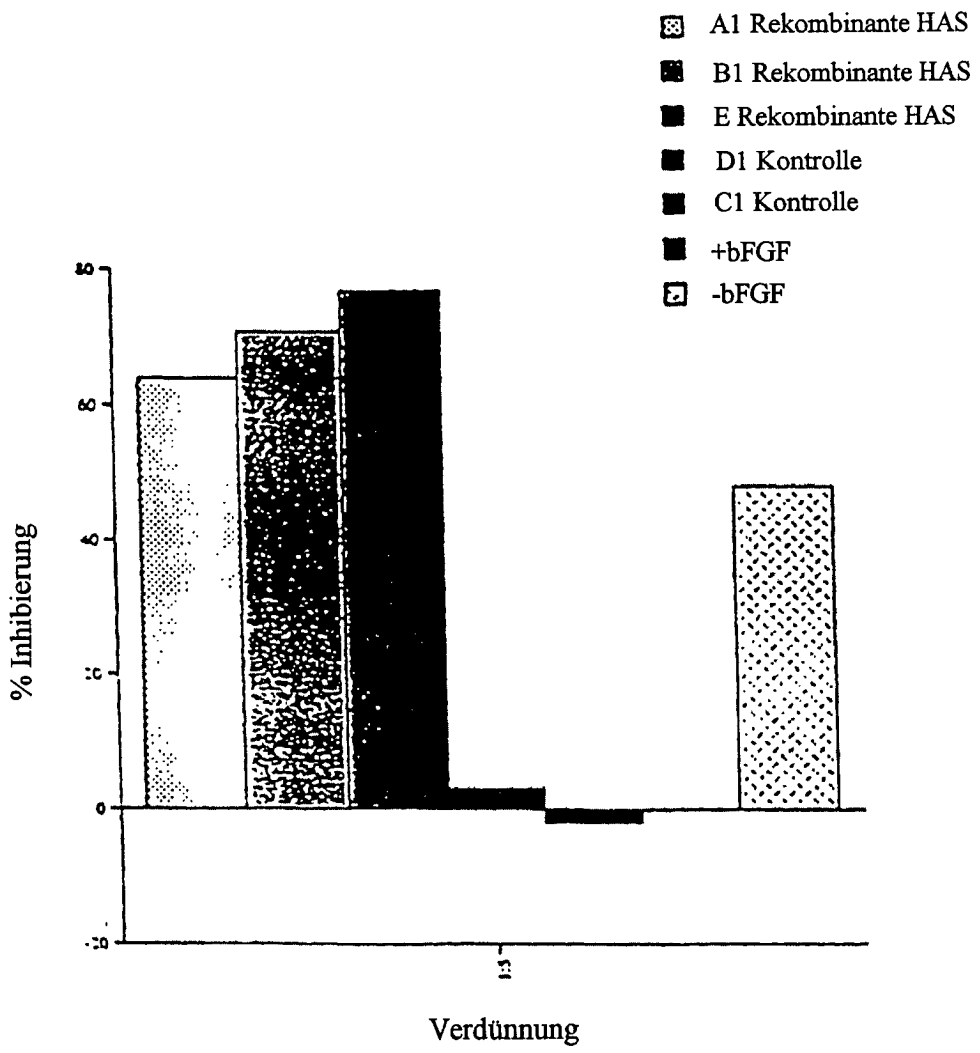
FIGUR 10



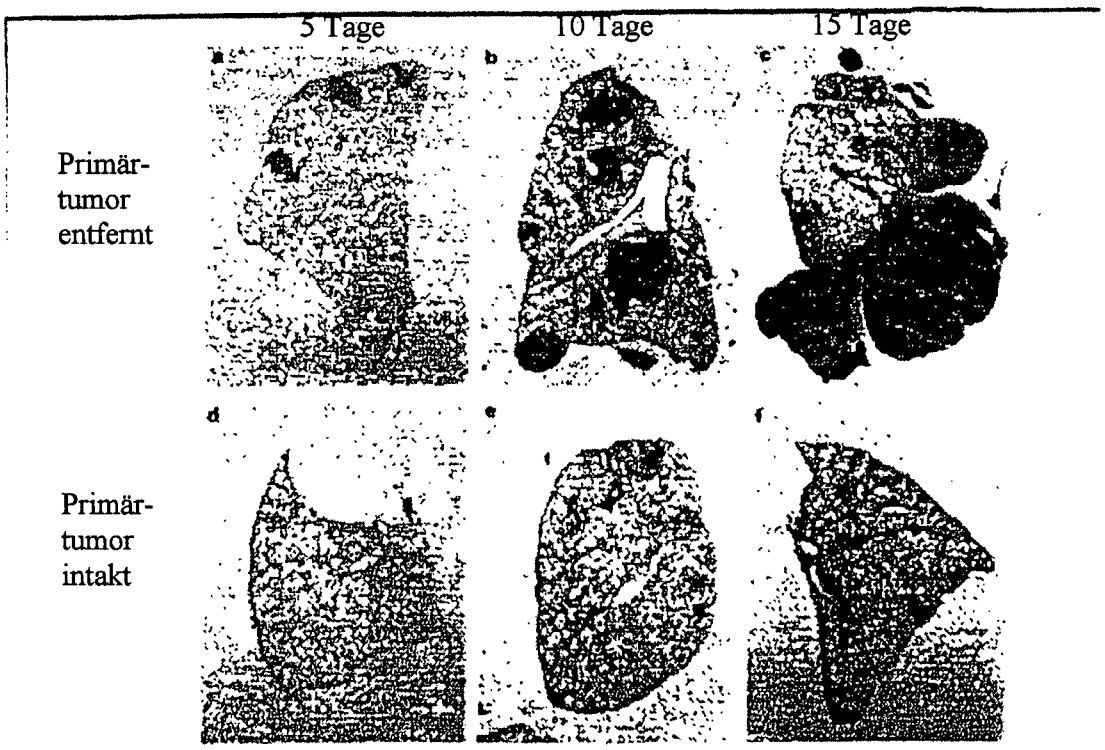
FIGUR 11


A1 Rekombinante HAS
A2 Rekombinante HAS
B1 Rekombinante HAS
B2 Rekombinante HAS
C1 Kontrolle
C2 Kontrolle
D1 Kontrolle
D2 Kontrolle
E Rekombinante HAS
% Inhibierung
100
75
50
25
0
1:5
1:10
1:20
Verdünnung

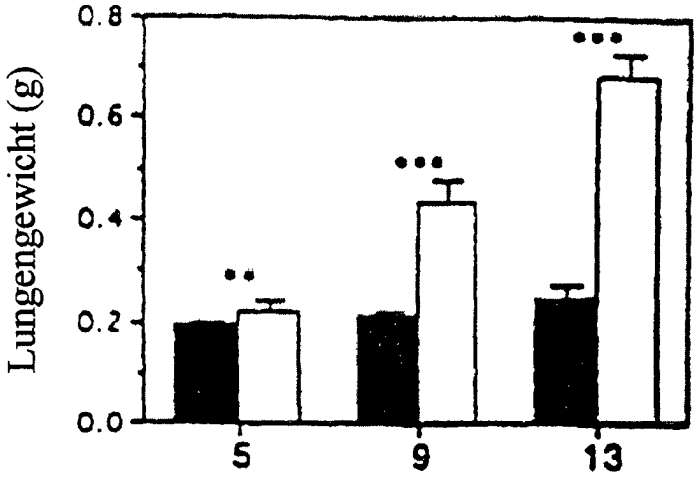
FIGUR 12


A1 Rekombinante HAS
B1 Rekombinante HAS
E Rekombinante HAS
D1 Kontrolle
C1 Kontrolle
+bFGF
-bFGF
% Inhibierung
Verdünnung

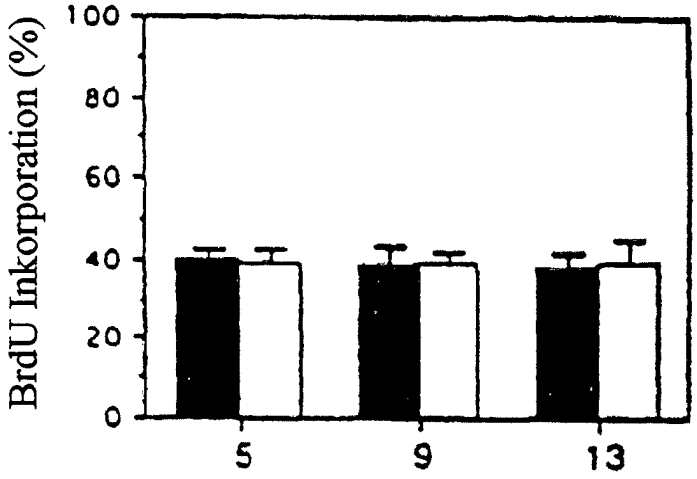
FIGUR 13


5 Tage
10 Tage
15 Tage
Primär-
tumor
entfernt
Primär-
tumor
intakt

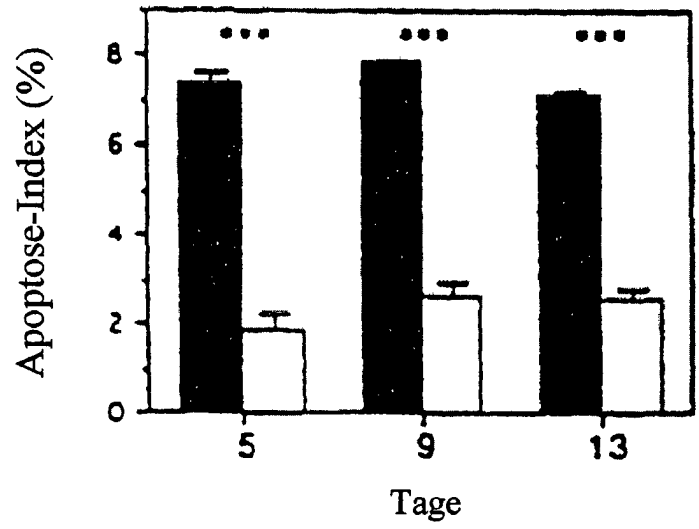
FIGUR 14



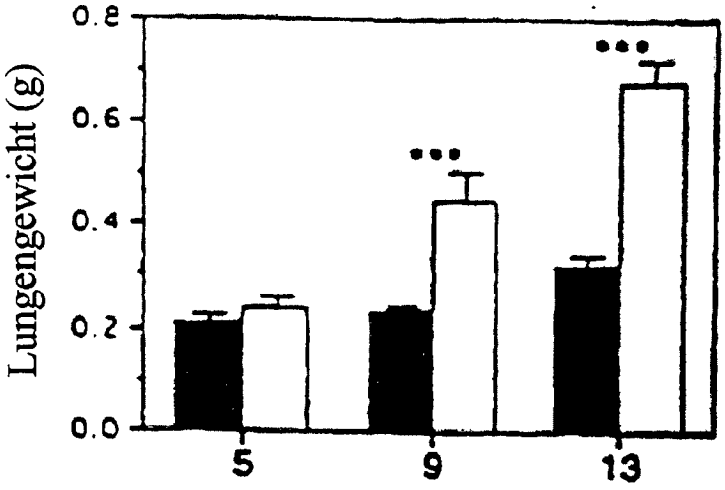
FIGUR 15A



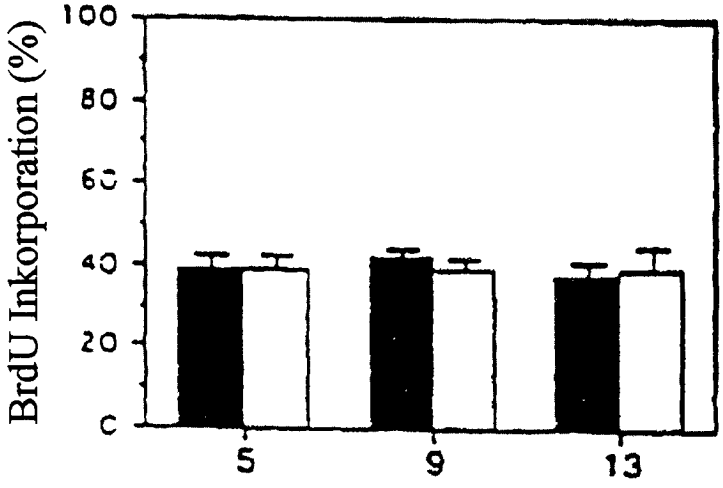
FIGUR 15B



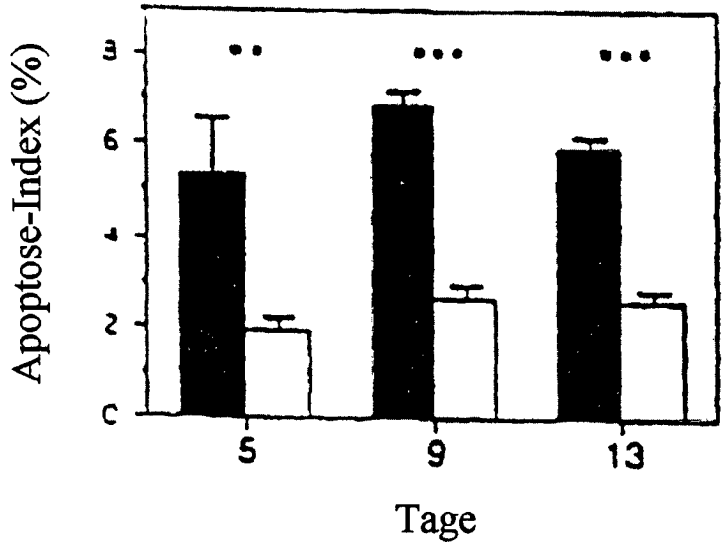
FIGUR 15C



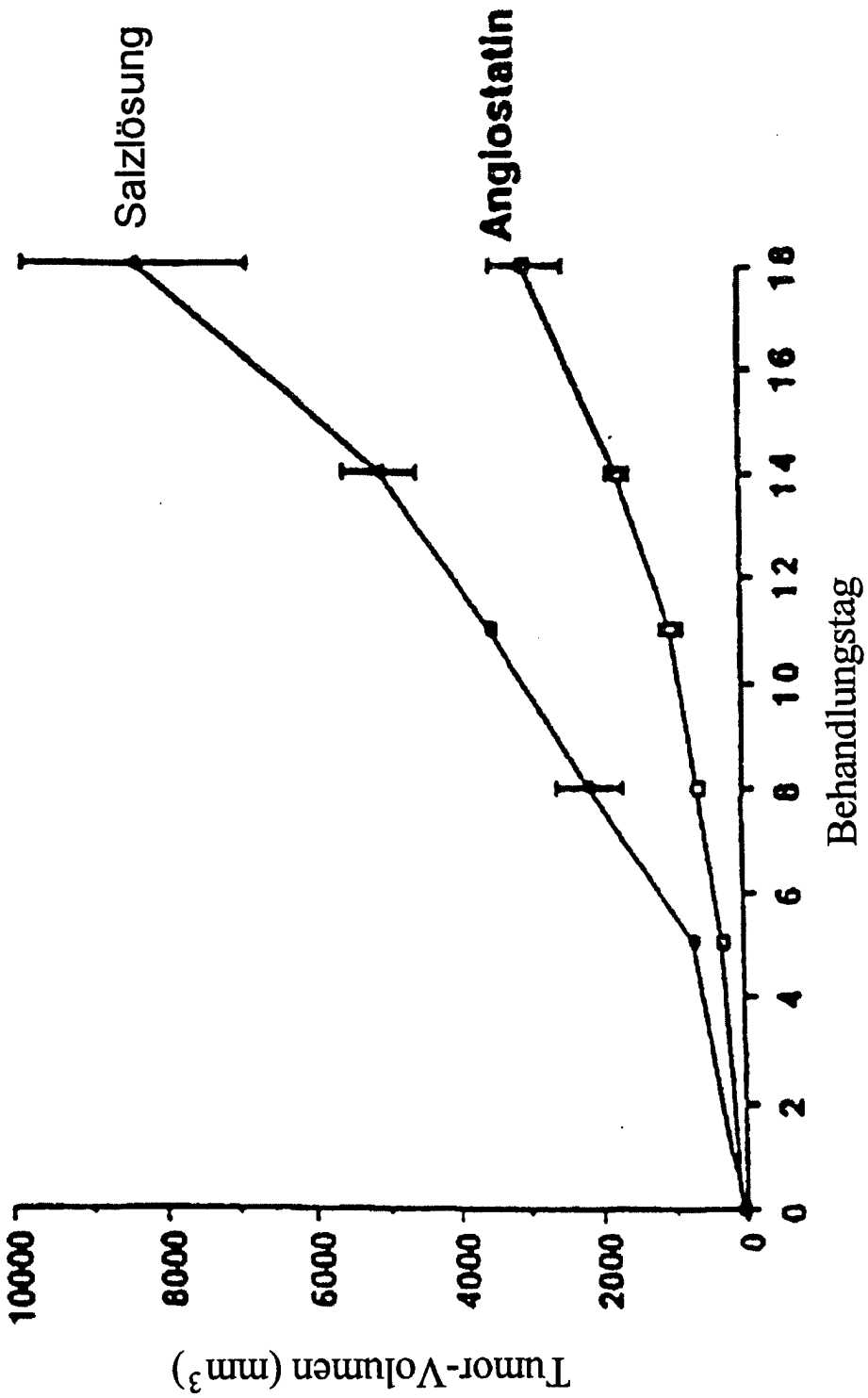
FIGUR 16A



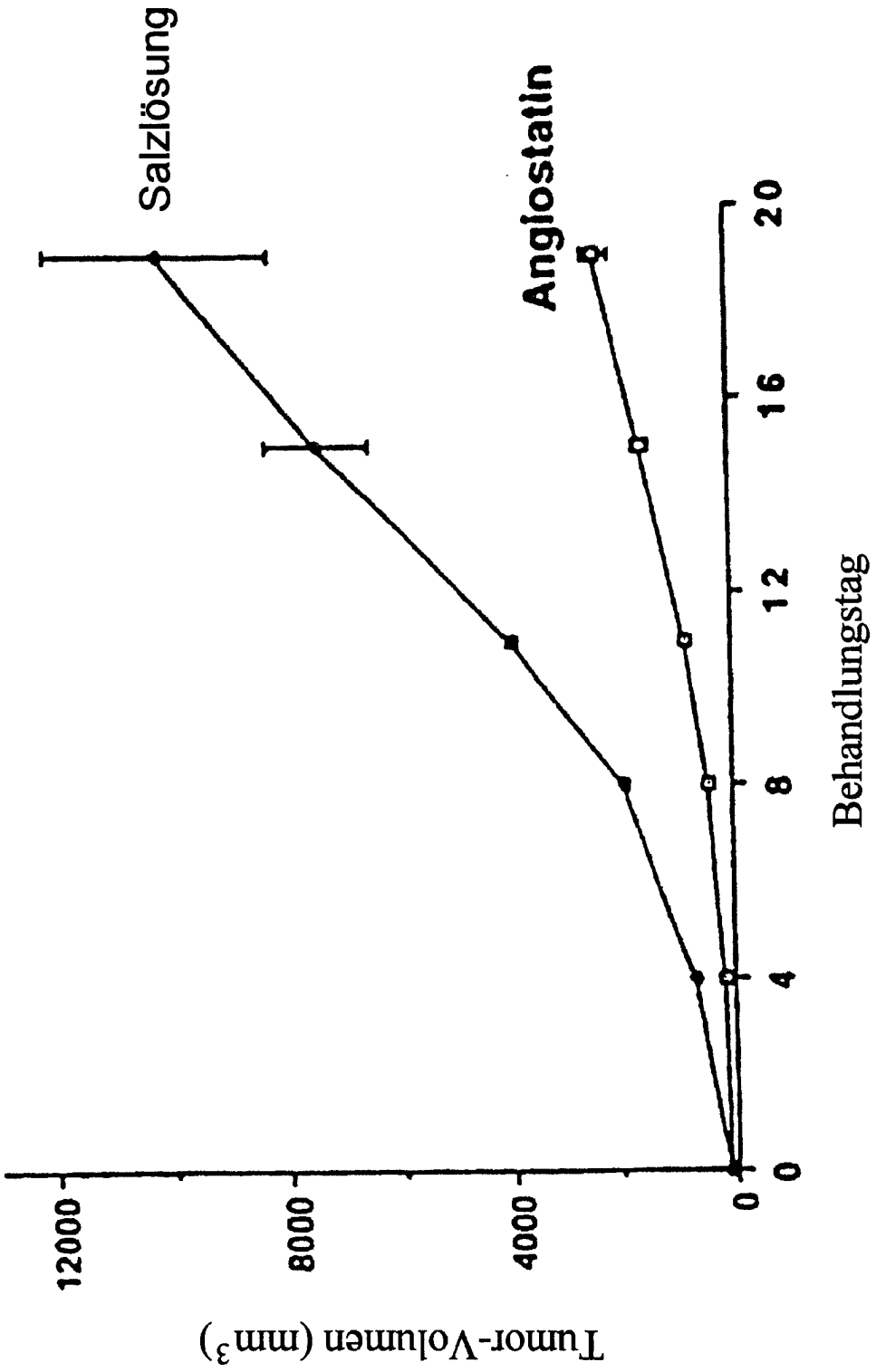
FIGUR 16B



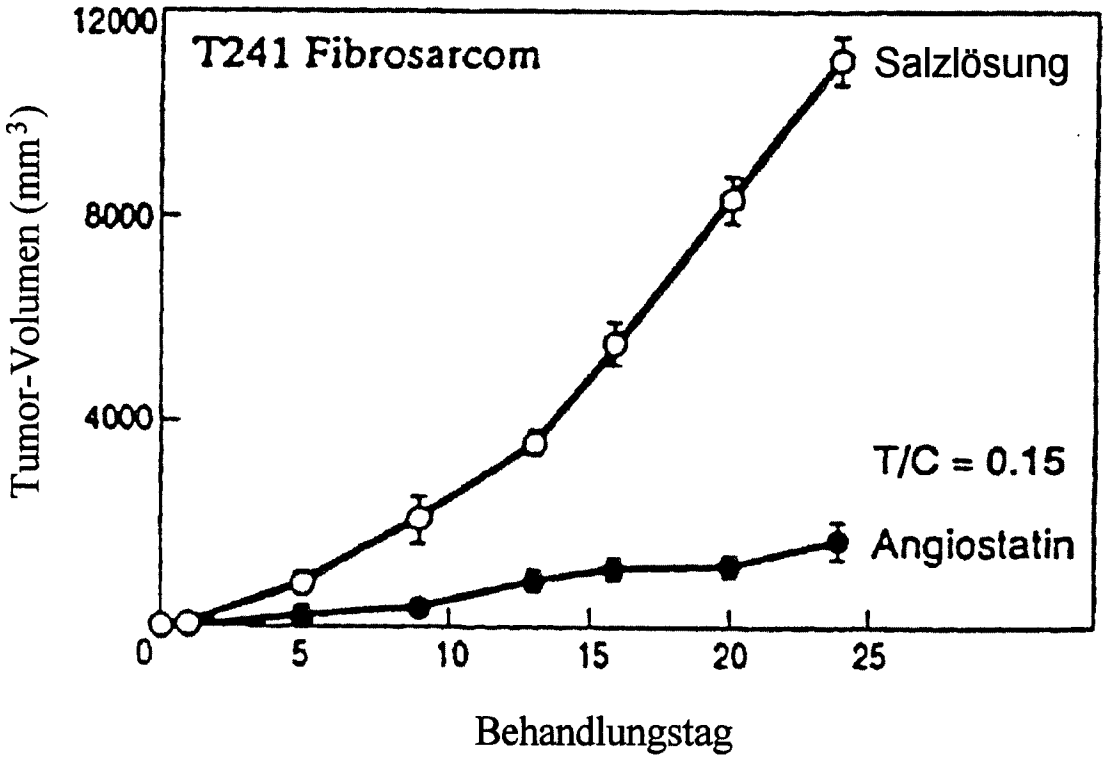
FIGUR 16C


Salzlösung
Anglostatin
Tumor-Volumen (mm³)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Behandlungstag

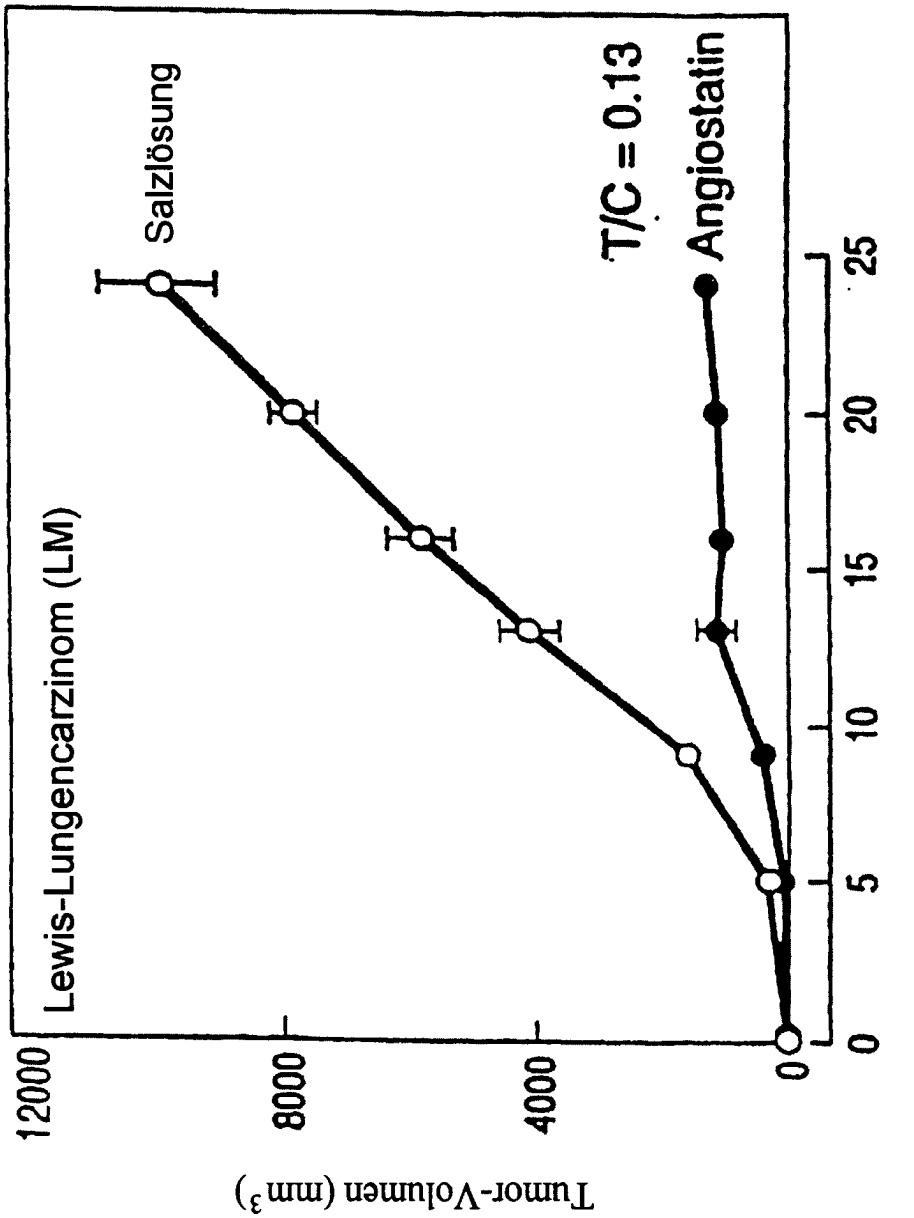
FIGUR 17


Salzlösung
Angiostatin
Tumor-Volumen (mm³)
12000
8000
4000
0
0
4
8
12
16
20
Behandlungstag

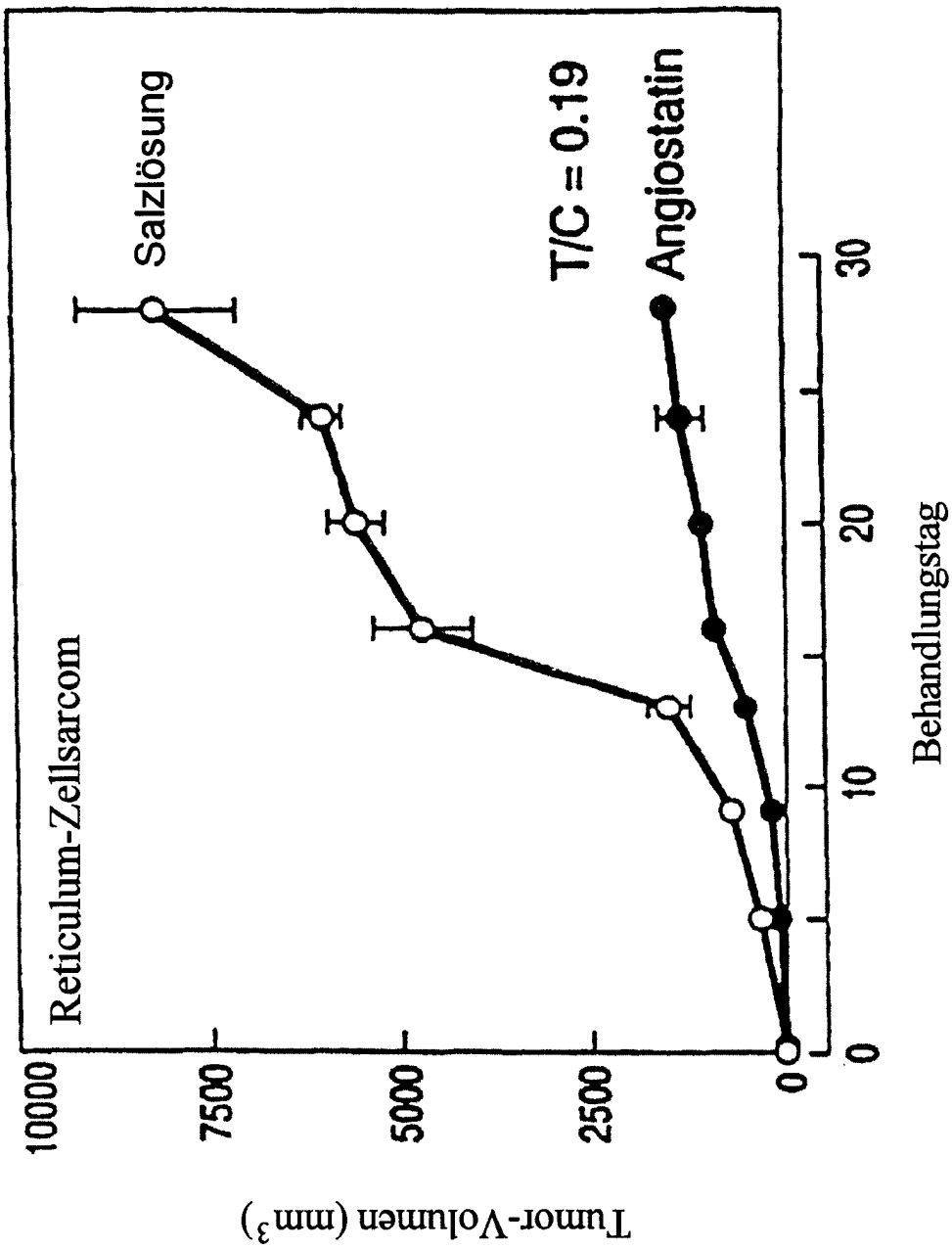
FIGUR 18


T241 Fibrosarcom
Salzlösung
T/C = 0.15
Angiostatin
Tumor-Volumen (mm³)
12000
8000
4000
0
5
10
15
20
25
Behandlungstag

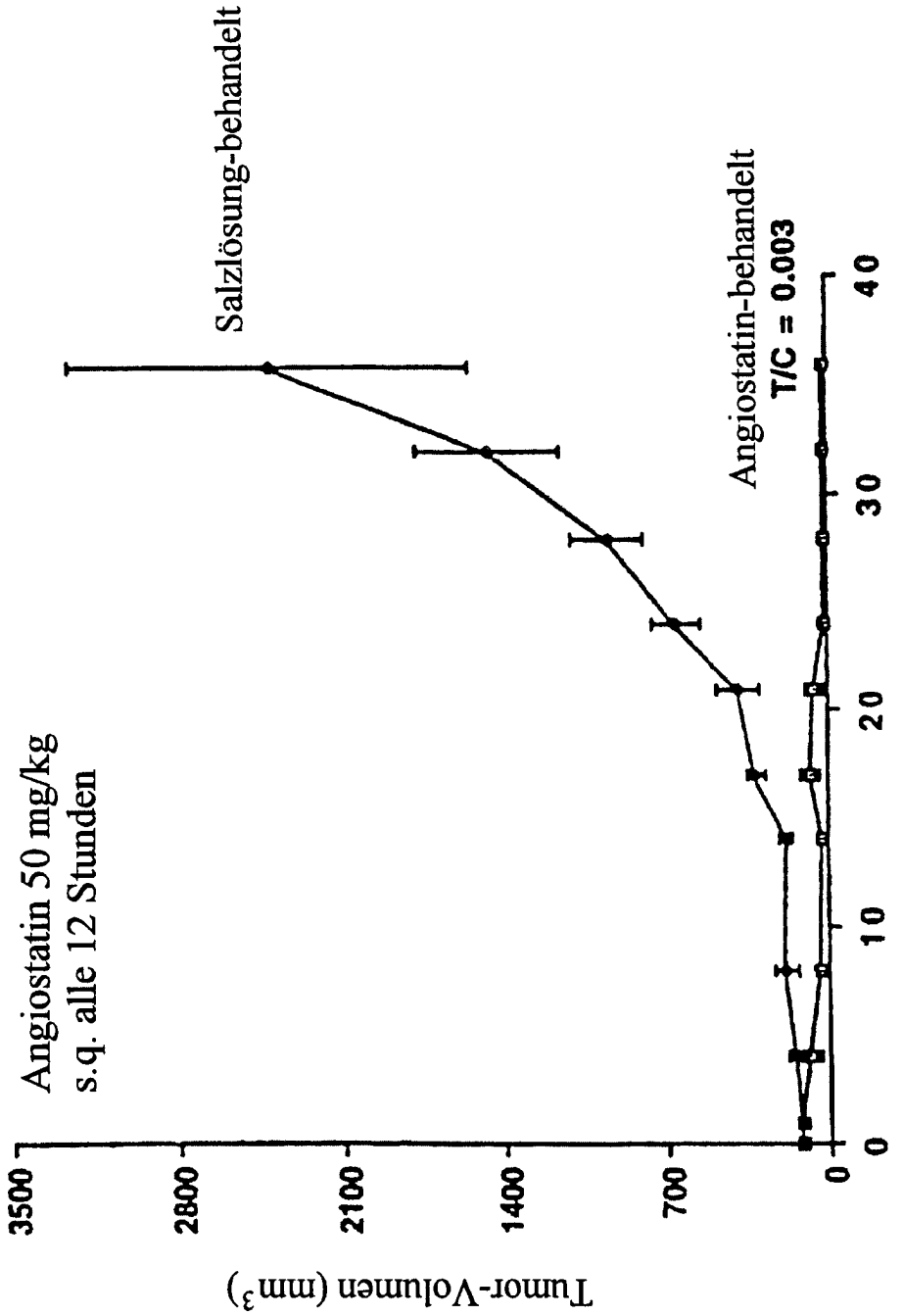
FIGUR 19


Lewis-Lungencarzinom (LM)
Salzlösung
T/C = 0.13
Angiostatin
Tumor-Volumen (mm³)
12000
8000
4000
0
0
5
10
15
20
25
Behandlungstag

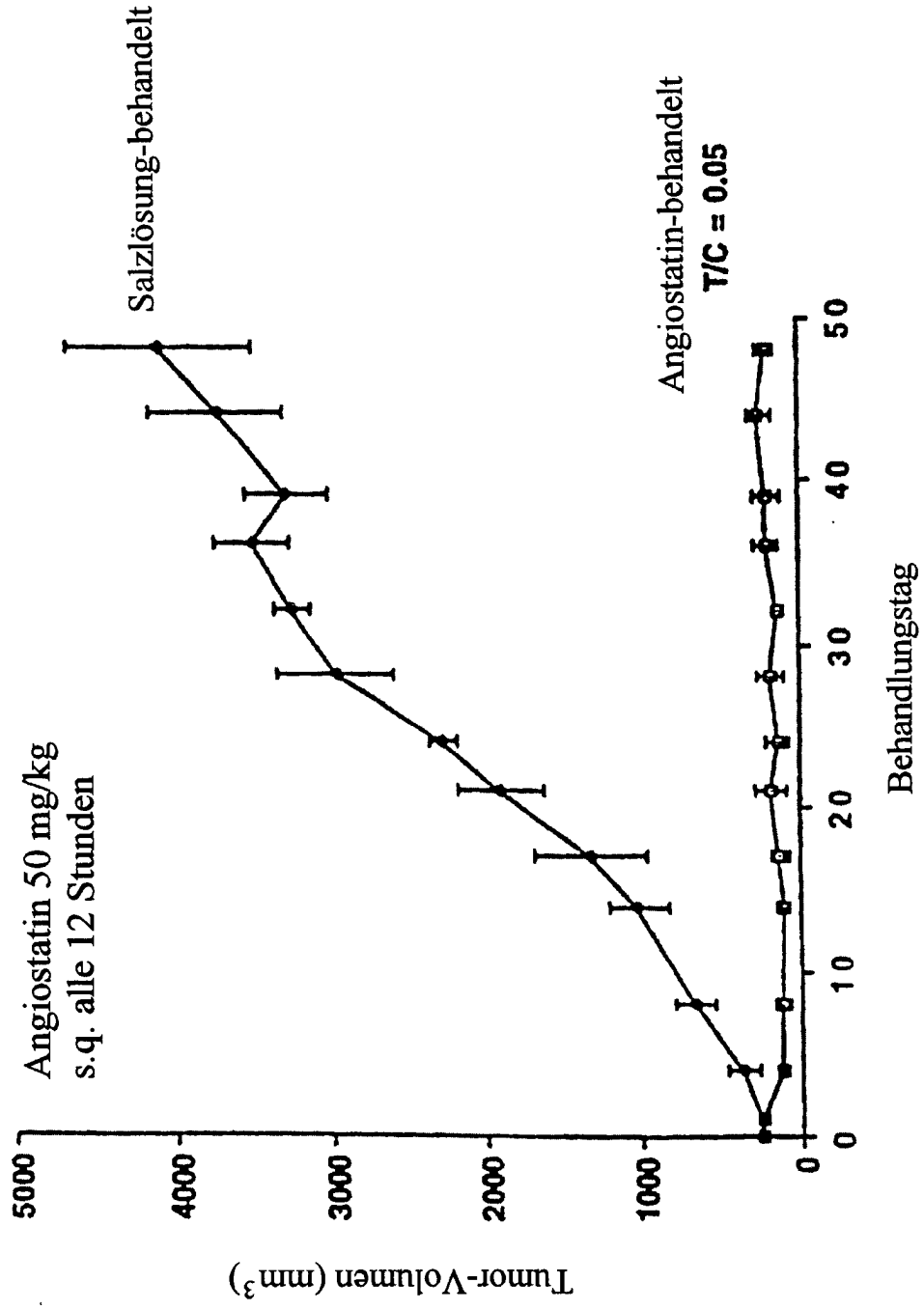
FIGUR 20


Reticulum-Zellsarcom
Salzlösung
T/C = 0.19
Angiostatin
Tumor-Volumen (mm³)
10000
7500
5000
2500
0
0
10
20
30
Behandlungstag

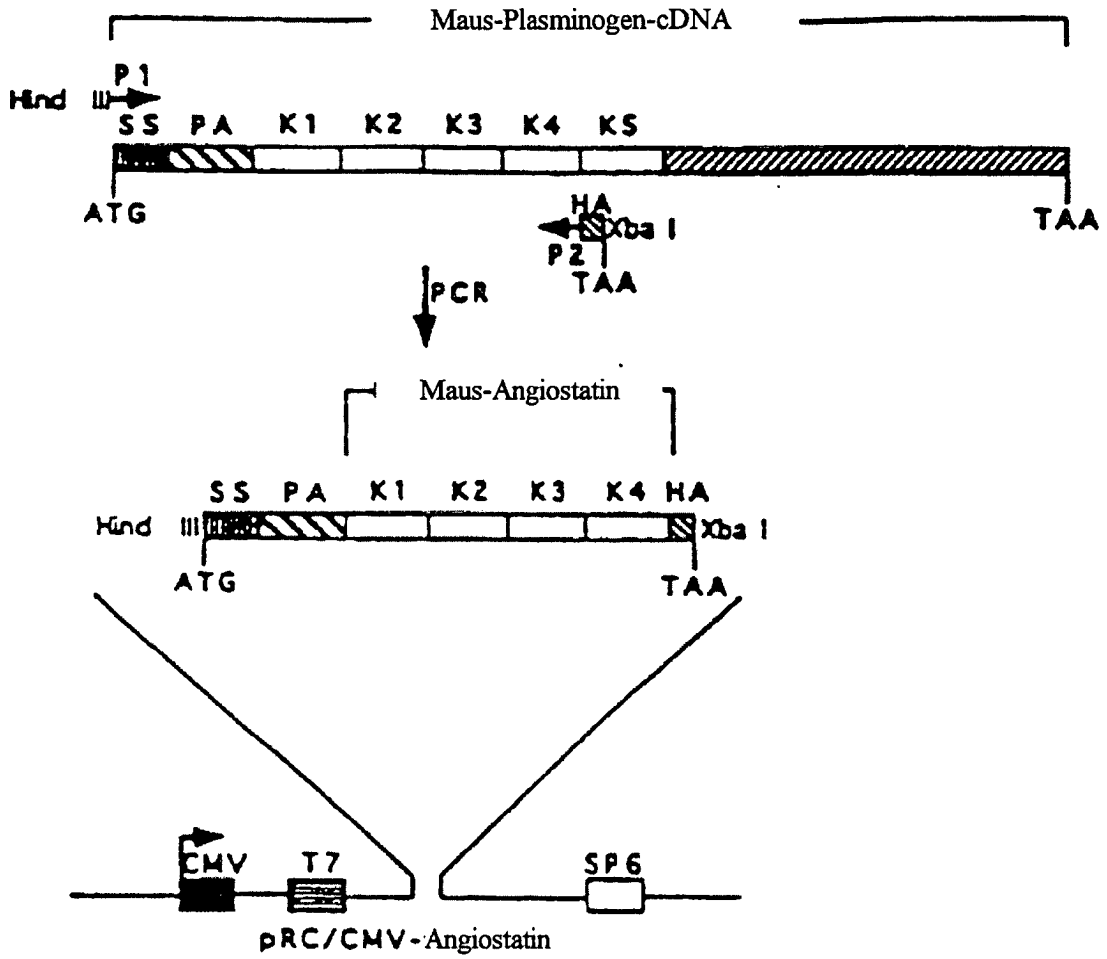
FIGUR 21


Salzlösung-behandelt
Angiostatin-behandelt
T/C = 0.003
Angiostatin 50 mg/kg
s.q. alle 12 Stunden
Tumor-Volumen (mm³)
Behandlungstag
3500
2800
2100
1400
700
0
0
10
20
30
40

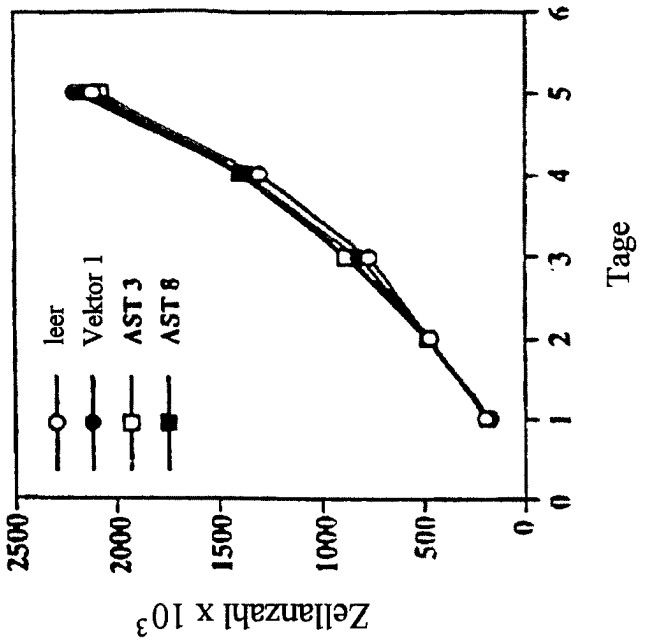
FIGUR 22


Salzlösung-behandelt
Angiostatin 50 mg/kg
s.q. alle 12 Stunden
Angiostatin-behandelt
T/C = 0.05
Tumor-Volumen (mm³)
Behandlungstag
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50

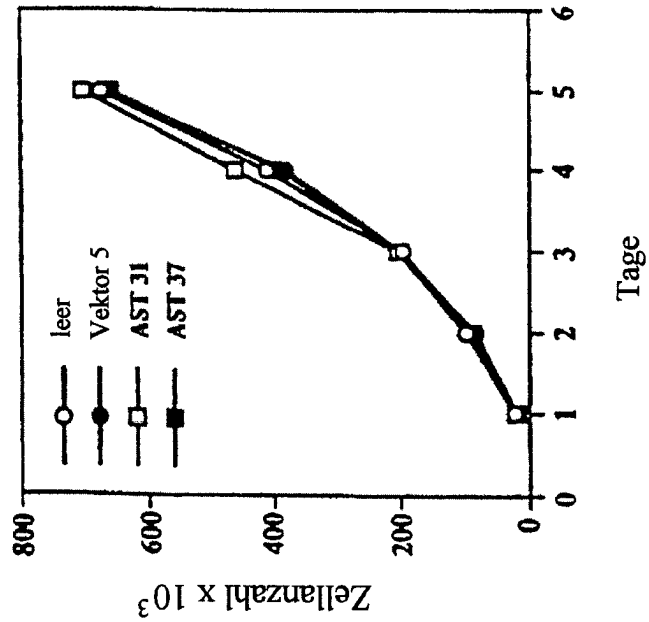
FIGUR 23


Maus-Plasminogen-cDNA
P1
Hind III
SS PA K1 K2 K3 K4 KS
ATG
HA
Xba I
P2
TAA
TAA
PCR
Maus-Angiostatin
SS PA K1 K2 K3 K4 HA
Hind III
Xba I
ATG
TAA
CMV
T7
SP6
pRC/CMV-Angiostatin

FIGUR 24

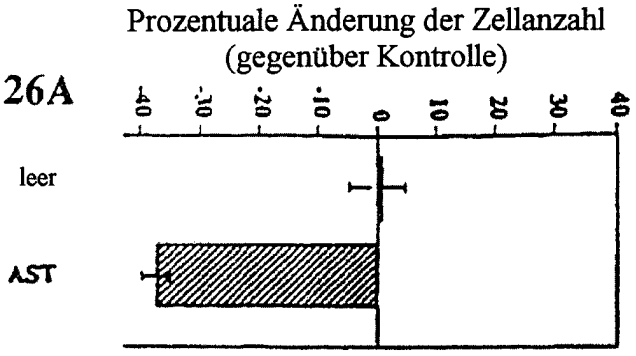


FIGUR 25B

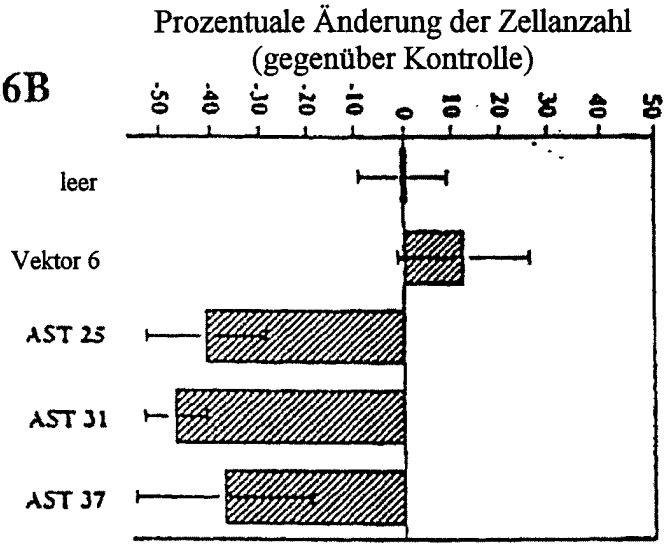


FIGUR 25A

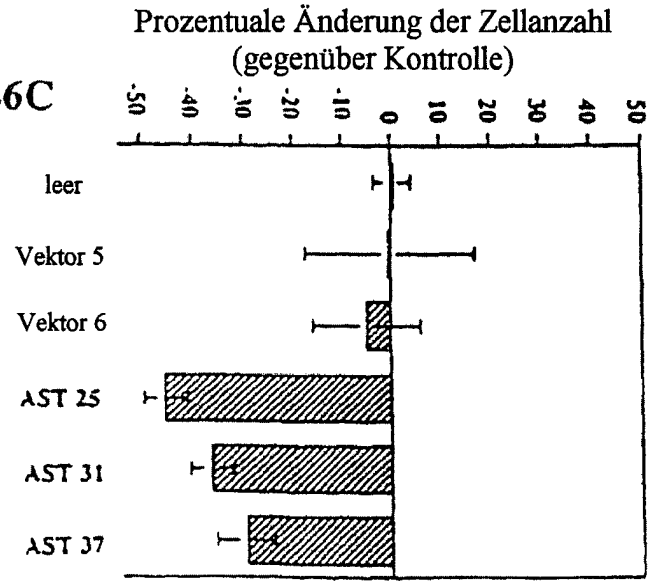
FIGUR 26A

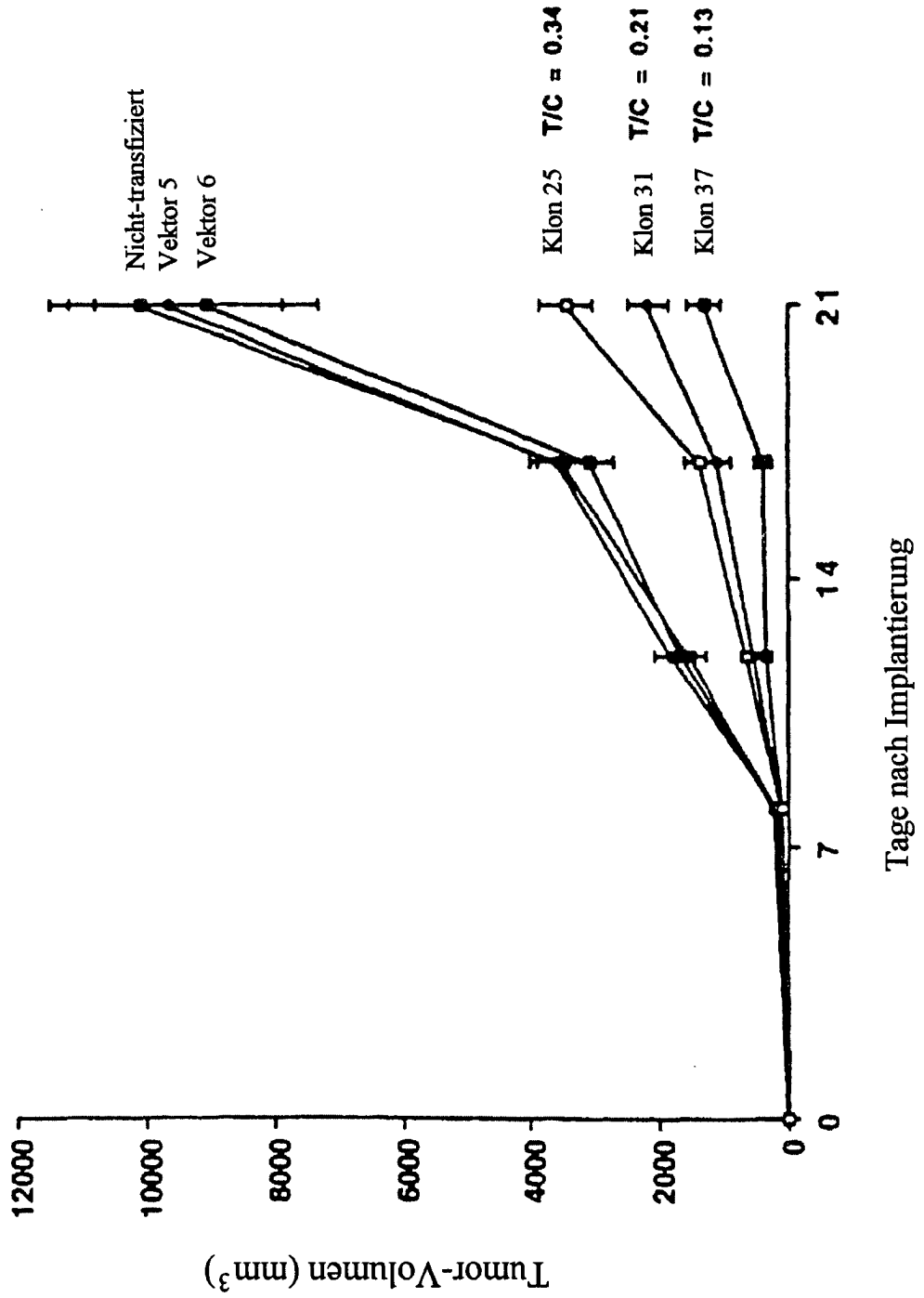


FIGUR 26B



FIGUR 26C




Tumor-Volumen (mm³)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
7
14
21
Tage nach Implantierung
Nicht-transfiziert
Vektor 5
Vektor 6
Klon 25 T/C = 0.34
Klon 31 T/C = 0.21
Klon 37 T/C = 0.13

FIGUR 27