

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0605212-6 A**



(22) Data de Depósito: 12/12/2006  
(43) Data de Publicação: **05/08/2008**  
(RPI 1961)

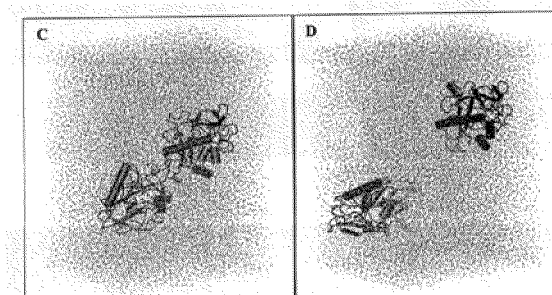
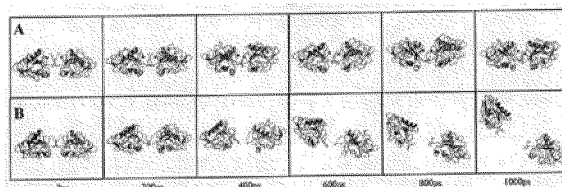
(51) *Int. Cl.:*  
**A61K 38/39 (2008.04)**  
**C07K 14/78 (2008.04)**  
**C12N 15/12 (2008.04)**  
**A61P 35/00 (2008.04)**

(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA, ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**

(57) Resumo: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA, ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA". Apresente invenção está relacionada à preparação de endostatina para o tratamento de cânceres pela sua capacidade de regredir formação de vasos sanguíneos de um tumor pré-estabelecido. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada à preparação de endostatina naturalmente dimerizada ou oligomérica, formada pela associação não covalente entre subunidades da proteínas, apresentada na forma solúvel e sendo de fácil aplicação clínica.

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Tatiana Lobo Coelho de Sampaio, Gabriel Limaverde Soares Costa Sousa, Pedro Geraldo Pascutti



## Relatório Descritivo

### PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA, ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

#### Campo da Invenção

A presente invenção está relacionada à preparação de endostatina para o tratamento de câncer pela sua capacidade de regredir a formação de vasos sangüíneos de um tumor pré-estabelecido. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada à preparação de endostatina naturalmente dimerizada ou oligomérica, apresentada na forma solúvel e sendo de fácil aplicação clínica.

#### Antecedentes da Invenção

Atualmente, uma nova estratégia de combate a tumores sólidos vem ganhando importância como alternativa de tratamento para pacientes com câncer. Trata-se da terapia antiangiogênica, a inibição da formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento de nutrientes ao tumor em crescimento, proposta inicialmente há mais de 30 anos por Judah Folkman, da Universidade de Harvard.

Em fevereiro de 2004, a FDA (Food and Drug Administration) aprovou o primeiro fármaco baseado nesta estratégia de combate ao câncer, a Avastina. A estratégia de tratar tumores através do bloqueio da angiogênese é essencialmente diferente das terapias tradicionais, porque, ao invés de ter como alvo a destruição das células tumorais, visa a impedir a formação de novos vasos sanguíneos. A formação de novos vasos é fundamental para que a massa tumoral continue crescendo, rompendo a barreira da difusão tecidual de nutrientes. Sem o aporte sangüíneo necessário para o transporte de oxigênio, moléculas, nutrientes e fatores de crescimento, o tumor cessa o desenvolvimento e sucumbe por falta de alimento.

As técnicas tradicionalmente empregadas para o tratamento do câncer apresentam limitações tanto na efetividade da cura, relacionadas ao

desenvolvimento de resistência ao tratamento, quanto pela grande quantidade de efeitos colaterais.

5 A endostatina, uma proteína descoberta em 1997 pelo grupo de Judah Folkman, foi considerada uma das mais promissoras da nova geração de drogas contra o câncer. Isto ocorreu devido aos encorajadores estudos feitos em camundongos, onde a droga se mostrou eficaz na regressão de diversos tipos de tumores avançados, resistentes aos tratamentos convencionais, a tamanhos microscópicos, mantendo-os dormentes indeterminadamente após alguns ciclos de tratamento. O que chamou mais a atenção dos pesquisadores foi o fato de que isso foi alcançado na completa ausência de toxicidade, e sem 10 o aparecimento de resistência. Dado o entusiasmo pela descoberta, a endostatina foi uma das substâncias que mais rapidamente entrou em testes clínicos, apenas três anos após ter sido isolada.

15 A endostatina é um fragmento de 20kDa da porção C-terminal do colágeno XVIII, um proteoglicano encontrado principalmente na membrana basal dos vasos sanguíneos. A endostatina foi primeiramente isolada de uma cultura de células do tumor hemangioendotelioma. É curioso imaginar que uma molécula com potente ação anti-tumoral seja produzida pelo próprio tumor. No entanto, existem explicações para isso como discutido a seguir.

20 Tumores primários são capazes de gerar promotores e inibidores de angiogênese. O que determina se um tumor irá apresentar ou não um fenótipo angiogênico é o equilíbrio entre essas duas habilidades. É descrito em observações clínicas que, quando um tumor primário é extirpado, mesmo em condições e procedimentos operatórios ótimos, é comum a ocorrência do 25 aparecimento de metástases, inexistentes antes da cirurgia. Isso se deve, provavelmente, ao desbalanço causado pela diminuição sistêmica de fatores antiangiogênicos produzidos anteriormente pelo tumor primário. Sendo assim, microtumores, antes dormentes pela ação destes inibidores, tornam-se angiogênicos e iniciam seu desenvolvimento.

30 Uma das principais hipóteses para o funcionamento antiangiogênico da endostatina é que esta se ligue a glicosaminoglicanos de heparan sulfato de superfície das células endoteliais. Desta forma, ela poderia impedir que fatores de crescimento que também demandam a ligação com heparan sulfato (bFGF e VEGF) fossem apresentados aos seus receptores protéicos. Ou ainda, esta

interação serviria para apresentar a própria molécula de endostatina a um terceiro receptor celular que dispararia a cascata antiangiogênica. Estas hipóteses ganharam forças pelo fato da proteína ser purificada em coluna de afinidade por heparina e possuir grande parte de seus aminoácidos de carga positiva espacialmente próximos.

A estrutura tridimensional da endostatina murina foi determinada por Cristalografia e Difração de Raios-X primeiramente em 1998 por Hohenester e colaboradores, sendo seguida pela estrutura da proteína humana homóloga em 1999 (Ding e colaboradores).

Diferentemente da endostatina murina, a proteína humana foi cristalizada em pH alcalino (8.5) e foi resolvida organizada sob a forma de dímeros. Na região N-terminal de cada molécula observou-se a ligação de um íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) coordenado e estabilizado por resíduos de histidina, ligação esta estável somente em pH neutro ou alcalino. No cristal da endostatina murina (obtido em pH 5,0), apesar da boa resolução de 1,5Å, não foi possível resolver a conformação dos seis primeiros resíduos da região N-terminal nem dos cinco últimos, também ausentes na estrutura da endostatina humana. A dificuldade em resolver a estrutura destas regiões é justificada por sua alta flexibilidade, o que impede a determinação estrutural destes resíduos por Difração de Raios-X.

A importância do íon  $Zn^{2+}$  presente na estrutura da endostatina humana para sua atividade biológica vem sendo estudada por diversos grupos e sua relevância ainda é discutida. Um papel especulado para este íon seria na estabilização do N-terminal da proteína, região onde foi localizado na estrutura humana. No entanto, este papel não foi demonstrado.

Desde o ano 2000, a endostatina vem sendo testada em pacientes. Foi descrita a ausência de efeitos tóxicos mesmo em faixas de concentrações plasmáticas consideradas altas. Contudo, não foi observada em humanos a eficácia descrita nos primeiros estudos com endostatina em animais experimentais. Com isso, os testes clínicos não avançaram para a fase III e o programa de tratamento experimental foi suspenso. Apesar dos pacientes terem alegado melhoras na qualidade de vida, não foi observada a regressão do volume tumoral. Por outro lado, nos primeiros testes em camundongos

havia sido obtida a reversão completa de tumores primários e metastáticos através da administração de endostatina em um preparado insolúvel.

Estudos mais recentes mostraram que oligômeros covalentes de endostatina, induzidos artificialmente por manipulação genética, eram capazes de desestabilizar tubos endoteliais *in vitro*. No entanto, tais oligômeros não se mostraram eficazes em ensaios *in vivo*, provavelmente pela ausência de um equilíbrio entre as formas associada e dissociada. Para tentar contornar esse problema, produzimos dímeros naturais da proteína através de uma modificação simples do meio de expressão da proteína, ou seja, sem modificação genética da endostatina. Esses dímeros podem se associar e dissociar livremente, respondendo às condições do meio. O teste das propriedades da endostatina na forma proposta nesta invenção demonstrou a reversão de tubos endoteliais.

O racional para se chegar à formulação da hipótese de que a formação de dímeros naturais seria a chave para manter simultaneamente a solubilidade e a eficácia da endostatina na reversão de tubos endoteliais pré-formados foi a realização de simulações computacionais projetadas a partir da observação da estrutura tridimensional da proteína. Posteriormente, com a expressão da proteína e ensaios biológicos, foi observada a ação na reversão de tubos endoteliais pela proteína dimérica na formulação objeto desta invenção. Vale ressaltar que a preparação de endostatina disponível comercialmente não é capaz de tal feito.

A literatura patentária contempla várias patentes relacionadas à utilização de endostatina para a inibição de angiogênese. Algumas delas são citadas aqui como referência:

A patente norte-americana US 6,174,861 apresenta métodos de inibição de angiogênese através do aumento da concentração da proteína endostatina ou de fragmentos de endostatina *in vivo*. Neste caso, a regressão tumoral é observada com uma preparação insolúvel.

A patente norte-americana US 6,346,510 relata composições de endostatina capazes de inibir a proliferação de células endoteliais, inibindo a angiogênese e provocando redução de tumor. Mais especificamente, são descritas seqüências de aminoácidos e de ácidos nucléicos codificadas para a

endostatina. Neste caso, a regressão tumoral é observada com uma preparação insolúvel.

A patente norte-americana US 6,380,253 está relacionada a um método de estabilização e potencialização da ação de moléculas de substâncias como Endostatina e Angiostatina através da utilização conjugada com ácidos graxos cis-insaturados.

O pedido de patente norte-americano US 2006/0058232 A1 descreve métodos de tratamento de doenças relacionadas a angiogênese utilizando uma quantidade terapêuticamente efetiva de endostatina modificada. Esta endostatina modificada não regride tumores pré-formados.

O pedido de patente PI 9611174-7 apresenta uma proteína endostatina isolada e composições terapêuticas antiangiogênicas formadas com a mesma, inibindo a angiogênese e causando regressão de tumor. Neste caso, a regressão tumoral é observada com uma preparação insolúvel.

As patentes referenciadas descrevem a produção de endostatina insolúvel ou solúvel, porém sendo necessário um protocolo de renaturação da proteína para que haja a solubilização. Outros trabalhos descrevem preparações solúveis, porém exclusivamente monoméricas da endostatina. Estas preparações são capazes de inibir o crescimento de novos vasos sangüíneos tumorais, mas não são eficazes na reversão de vasos em tumores pré-formados. Até hoje, apenas a preparação insolúvel regride tumores pré-formados.

A presente invenção consta da preparação de endostatina naturalmente dimerizada ou oligomérica, que pode ser utilizada para o tratamento de câncer pela sua capacidade de regredir capilares sangüíneos pré-estabelecidos. Esta preparação é solúvel e de pronta aplicação clínica.

### **Sumário da Invenção**

A formação de novos vasos é fundamental para que a massa tumoral continue crescendo, rompendo a barreira da difusão tecidual de nutrientes. Nas atuais formulações de endostatina só é observada a inibição da neoformação de vasos sangüíneos, o que pode acarretar na estabilização, mas não na regressão de tumores. É, portanto, um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo de produção de dímeros naturais de

endostatina, capazes de reverter a formação de tubos endoteliais, podendo promover a regressão de tumores já estabelecidos.

É ainda um dos objetos da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica contendo dímeros naturais de endostatina.

5

### **Breve Descrição das Figuras**

A **Figura 1** apresenta a estabilização da estrutura quaternária dimérica da endostatina pelo íon  $Zn^{2+}$ , onde: (A) Seqüência de quadros da Dinâmica Molecular do dímero de endostatina com  $Zn^{2+}$ ; (B) Seqüência de quadros de Dinâmica Molecular do dímero de endostatina sem  $Zn^{2+}$ ; (C) Estado final da Dinâmica Molecular com  $Zn^{2+}$ : dímero; (D) Estado final da Dinâmica Molecular sem  $Zn^{2+}$ : monômero.

A **Figura 2** apresenta SDS-PAGE do meio de expressão condicionado de *Pichia pastoris* (GS 115) expressando endostatina. Marcação por prata. Duas preparações de endostatina em pH 6,0 (padrão), e em pH 7,5 (com o protocolo desta invenção).

A **Figura 3** mostra a análise por gel filtração em HPLC da endostatina expressa em pH 6,0 (padrão) e em pH 7,5 (segundo o protocolo desta invenção).

A **Figura 4** mostra a análise por gel filtração em HPLC da endostatina produzida nesta invenção (pH 7,5) e a endostatina comercial (Entremed).

A **Figura 5** apresenta o ensaio de Reversão de Tubos em Matrigel. (A) Controle, (B) Endostatina Entremed e (C) Endostatina produzida em pH 7,5 (segundo o protocolo desta invenção).

25

### **Descrição Detalhada da Invenção**

Existem diversas preparações de endostatina descritas atualmente. A preparação em bactéria *E. coli* possui alto rendimento, mas a proteína apresenta-se insolúvel. Esta preparação (definida como apresentando consistência de pasta de dente) não pode ser injetada em pacientes, contudo, é eficaz na reversão de tumores em camundongos.

Testes com a proteína desnaturada e reenovelada mostraram que, além de haver uma perda de 90% do material inicial, a porção renaturada não promovia a regressão de tumores.

A endostatina utilizada nos testes clínicos foi expressa em levedura *P. pastoris* e se apresenta solúvel e monomérica. Contudo essa preparação não foi capaz de regredir o volume de tumores como previamente observado em modelos experimentais, tendo sido possível apenas comprovar sua capacidade de desacelerar o crescimento de alguns tumores.

A preparação de endostatina descrita nesta invenção é eficaz na reversão de tubos endoteliais e se apresenta na forma solúvel, sendo de fácil aplicação clínica.

A importância do íon  $Zn^{2+}$  presente na estrutura da endostatina humana para sua atividade biológica vem sendo estudada por diversos grupos e sua relevância ainda é discutida. Um papel esperado para este íon é na estabilização do N-terminal da proteína, região de interface do dímero de endostatina, o que levaria à estabilização da estrutura quaternária. Como pode ser observado na Figura 1, a presente invenção inclui a compreensão do papel do zinco na estrutura da proteína, bem como na manutenção da atividade biológica da endostatina.

Esta invenção prevê que dímeros ou oligômeros solúveis de endostatina poderão ser usados para o tratamento de tumores humanos. Desta forma, a obtenção de dímeros ou oligômeros, através de quaisquer protocolos alternativos, onde se consegue alteração na estrutura quaternária da endostatina favorecendo a formação destas estruturas, está prevista por esta invenção.

### **Exemplo 1 - Expressão em leveduras em meio neutro-alcálico de endostatina humana.**

A expressão de endostatina em linhagem de levedura em meio neutro ou alcalino, deve ser realizada preferencialmente em pHs na faixa de 6,5 a 8,5, ou mais especificamente em pH 7,5.

Endostatina humana recombinante foi expressa em linhagem de *Pichia pastoris*. Em manuais de expressão de proteínas em *Pichia pastoris*, utiliza-se um meio em pH ácido (pH 6,0) para o crescimento da levedura (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen). Contudo, isso causaria problemas para a estabilização do íon  $Zn^{2+}$  pelas histidinas da molécula de endostatina, uma vez que o pKa deste aminoácido está em torno de 6,5. Assim, durante a fase de



expressão da proteína, enquanto esta está sendo secretada para o meio de cultura, os resíduos de histidina assumiriam um estado protonado e não mais conseguiriam coordenar metais.

5 A região N-terminal da endostatina é estabilizada pela presença do íon  $Zn^{2+}$  na molécula e interage com outro monômero de endostatina. Sugerimos que, uma vez perdida esta organização da porção N-terminal diminuiria significativamente a probabilidade do íon voltar a ser coordenado pelos seus ligantes, restabelecendo a conformação inicial e as interações quaternárias que estabilizam a conformação ativa da proteína,.

10 Portanto, a presente invenção, onde se altera o protocolo de expressão, aumentando o pH durante a fase de expressão da proteína, busca minimizar essa possível perda de estabilidade causada pela protonação dos resíduos de histidina e a conseqüente perda do íon  $Zn^{2+}$ .

#### Materiais e Protocolo de Expressão de Endostatina Humana

##### 15 Recombinante:

- YPD+Zeocina - Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (1 litro)

1% extrato de levedo

2% peptona

2% dextrose (glicose)

20 Zeocina (100  $\mu$ g/ml)

- BMGH - Buffered Minimal Glycerol + Histidine (1 litro)

Solução 100mM de fosfato de potássio, pH 6,0

1.34% de YNB

4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina

25 1% de glicerol

0.004% histidina

- BMMH - Buffered Minimal Methanol + Histidine (1 litro)

Solução 100 mM de fosfato de potássio, pH 7.5

1.34% de YNB

30 4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina

0.5% de metanol

0.004% histidina

### **Fase I – Amplificação do Clone**

A linhagem de levedura *Pichia pastoris* GS115, contendo o plasmídeo com o gene da endostatina humana é plaqueada e incubada em estufa a 30°C por 48 horas. Um dos clones crescidos na placa de Petri é, então, inoculado em 5ml de meio BMGH em tubos de 50ml e incubado em shaker a 30°C, 250 rpm, por 36 horas. Após esse período, verifica-se se a D.O.<sub>600</sub> atingiu um valor entre 4-6. Nesse caso, centrifuga-se, então, o pré-inóculo a 5.700rpm, a 37°C durante 5 minutos. Ressuspendeu-se as células em 35ml de BMGH em Erlenmeyer de 250ml. Incuba-se por mais 36 horas nas mesmas condições da etapa anterior. Atingindo uma D.O.<sub>600</sub> de 16-20, as células são centrifugadas como no passo anterior, ressuspendendo-as em um volume final de 1 litro de meio BMGH em Erlenmeyer de 2 litros. O inóculo cresce por 48 horas, a 250rpm, a 30°C.

15

### **Fase II – Expressão de endostatina humana recombinante**

A expressão se dá em três etapas de coleta de sobrenadantes. Cada indução dura 24 horas. Com a D.O.<sub>600</sub> em torno de 16-20, o sobrenadante é centrifugado e ressuspende-se em 300-400 ml de meio de indução BMMH. Dá-se, então, a primeira indução por 24 horas, a 250 rpm, a 30°C. Centrifuga-se a 8000rpm por 20 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante é coletado e estocado em freezer a -80°C. As células são ressuspendidas em 300-400ml de BMMH, sendo feita a segunda indução nas mesmas condições da primeira.

Após 24 horas, a segunda coleta é feita como descrito no passo anterior. Realiza-se, então, a última indução com metanol. Ao fim de mais 24 horas, realizamos a última coleta de sobrenadante. Adicionamos à última coleta, os sobrenadantes das coletas I e II. A diálise é feita em seguida.

A dosagem aproximada da proteína é realizada por espectrofotometria, com leitura de absorbância em D.O.<sub>280</sub>. O fator de conversão para a endostatina em 280 nm é de 1,336 para 1g / litro. Para confirmação da obtenção da proteína com peso aproximado de 20 kDa, realizamos um SDS-PAGE 15%, conforme mostrado na Figura 2.

### **Fase III – Purificação/Caracterização**

#### ***Diálise***

A etapa de diálise é realizada em câmara fria (entre 2°C e 6°C, preferencialmente 4°C). As amostras são dialisadas contra 6 litros de tampão 10mM Tris (pH 7,5) com 150mM NaCl por 24 horas a 4° C.

#### ***Cromatografia de Gel-Filtração – HPLC e FPLC***

A cromatografia de gel filtração possibilita a separação de proteínas por peso molecular. As amostras foram aplicadas em uma coluna preenchida com uma resina com poros. De acordo com o tamanho, a proteína percorre um caminho maior ou menor pelos poros da resina, sendo separada de acordo com o tempo de retenção na coluna. Proteínas maiores são eluídas primeiramente enquanto as menores ficam mais tempo retidas na coluna. A coluna utilizada, Superdex 75, possui uma resolução satisfatória na faixa de 70 a 3kDa. Através de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) é possível separar por peso molecular, agregados ou formas oligoméricas da endostatina purifica. As amostras são corridas em um fluxo de 0,5 ml por minuto, em tampão Tris 10mM, 150mM NaCl, pH 7,5. Como pode ser observado na Figura 3, a leitura é feita em 214nm durante um tempo de corrida de 35 minutos. Por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), utilizando a coluna analítica GPC100, comparamos a endostatina obtida através do protocolo descrito neste invento com a endostatina comercial (Entremed), utilizada nos testes clínicos, conforme apresentado na Figura 4.

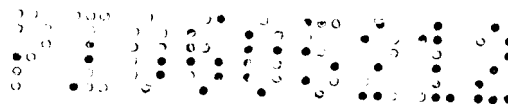
#### **Exemplo 2 - Ensaios de Reversão de Formação de Tubos em Matrigel**

Para avaliar a atividade biológica da endostatina, utilizamos um ensaio onde tubos são previamente formados em matrigel e posteriormente postos em contato com a endostatina para se observar possíveis mudanças na estabilidade dos vasos. Este tipo de ensaio é interessante porque podemos acompanhar a reversão de vasos enquanto esta ocorre. Além disso, podemos controlar melhor as variáveis no ensaio, porque a experiência é feita in vitro.

Para este experimento, utilizamos placas de 48 poços cobertas com 150µl de matrigel por poço. Células HUVEC (endoteliais de veia de cordão umbilical humano) são semeadas sobre o matrigel solidificado ( $1 \times 10^5$ /poço),

induzindo-se a diferenciação celular em tubos. Após 16 horas de incubação em meio 199 suplementado com 5% de soro fetal bovino, a pH 6,8 em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, observa-se a formação de uma rede bidimensional semelhante à capilar. Este é considerado o tempo 0 do ensaio e neste momento, o meio é  
5 trocado por 199 contendo 5% de soro fetal bovino a pH 7,5, contendo ou não endostatina a 500 ng/ml. A placa fica em observação durante 24 horas. Como mostrado na Figura 5 os tubos se mantêm inalterados na ausência de endostatina e na presença da proteína monomérica obtida da fonte comercial (Entremed), mas são desfeitos pela adição da preparação de endostatina  
10 expressa a pH 7,5, objeto desta invenção.

Pequenas variações na forma de conduzir a invenção aqui descrita devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e do escopo das reivindicações anexas.



## Reivindicações

1. Processo de produção de endostatina dimerizada ou oligomerizada sob forma solúvel para utilização no tratamento de tumores humanos  
5 **caracterizado por** ser expressa em leveduras em meio neutro-alcálico.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o processo de produção ocorrer em três fases distintas: amplificação do clone, expressão de endostatina humana recombinante e purificação/caracterização.  
10
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** a referida levedura ser, preferencialmente, *Pichia pastoris*.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** a  
15 expressão em leveduras ser realizada em pHs na faixa de 6,5 a 8,5, preferencialmente 7,5.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** a endostatina apresentar uma região N-terminal estabilizada pela presença de  
20 cátions divalentes, preferencialmente o íon  $Zn^{2+}$ .
6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** a proteína ter um peso na faixa de 15kDa a 25kDa, preferencialmente 20 kDa.
- 25 7. Proteína endostatina dimerizada ou oligomerizada **caracterizada por** ser expressa em leveduras, em meio neutro-alcálico e sob a forma solúvel.
8. Proteína endostatina, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** ser, preferencialmente, a endostatina humana, e por ela ser usada para  
30 reversão de angiogênese.
9. Proteína, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** a endostatina apresentar uma região N-terminal estabilizada pela presença do íon  $Zn^{2+}$ .

10. Composição farmacêutica, **caracterizada por** compreender dímeros ou oligômeros naturais, formados pela associação não covalente entre subunidades da proteína endostatina, expressa em sistema de expressão de proteína recombinante, preferencialmente leveduras, e estar sob forma solúvel.

5

11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo fato de** o monômero da referida proteína ter um peso na faixa de 15 kDa a 25 kDa, preferencialmente 20 kDa.

10 12. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** ser utilizada no tratamento da angiogênese patológica bem como na reversão de vasos tumorais.

15 13. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** a proteína estar em solução de pH acima de 6,5, preferencialmente pH 7,5.

**Figuras**

Figura 1

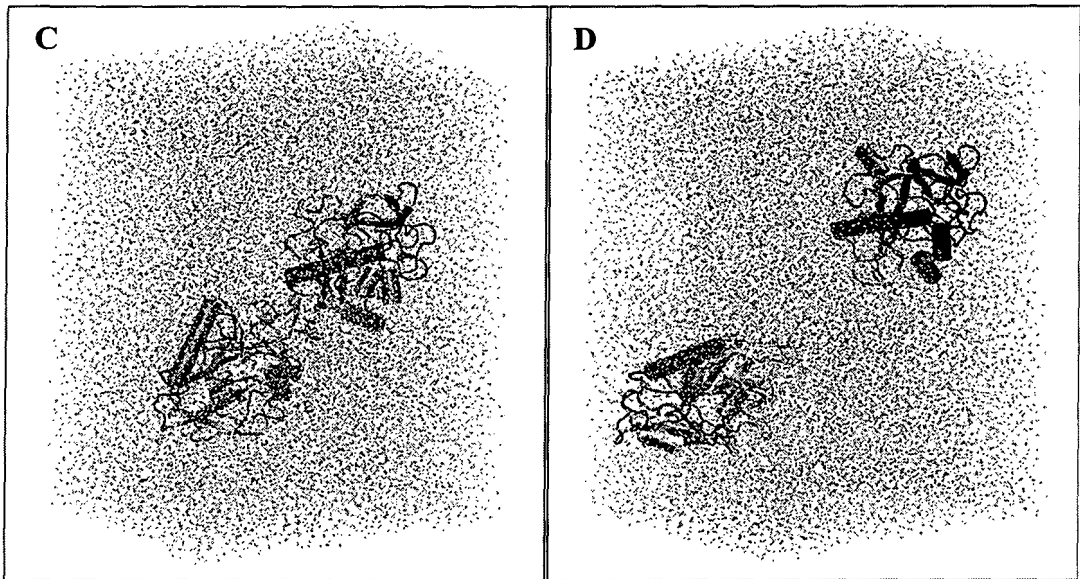
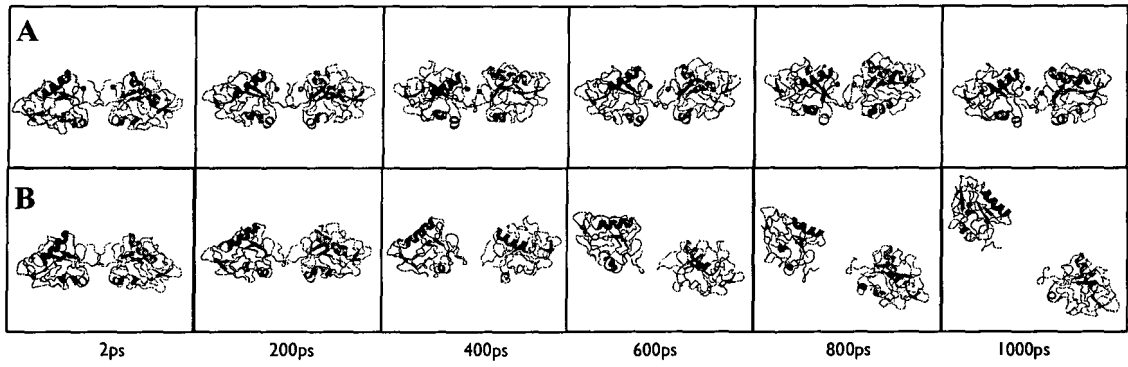


Figura 2

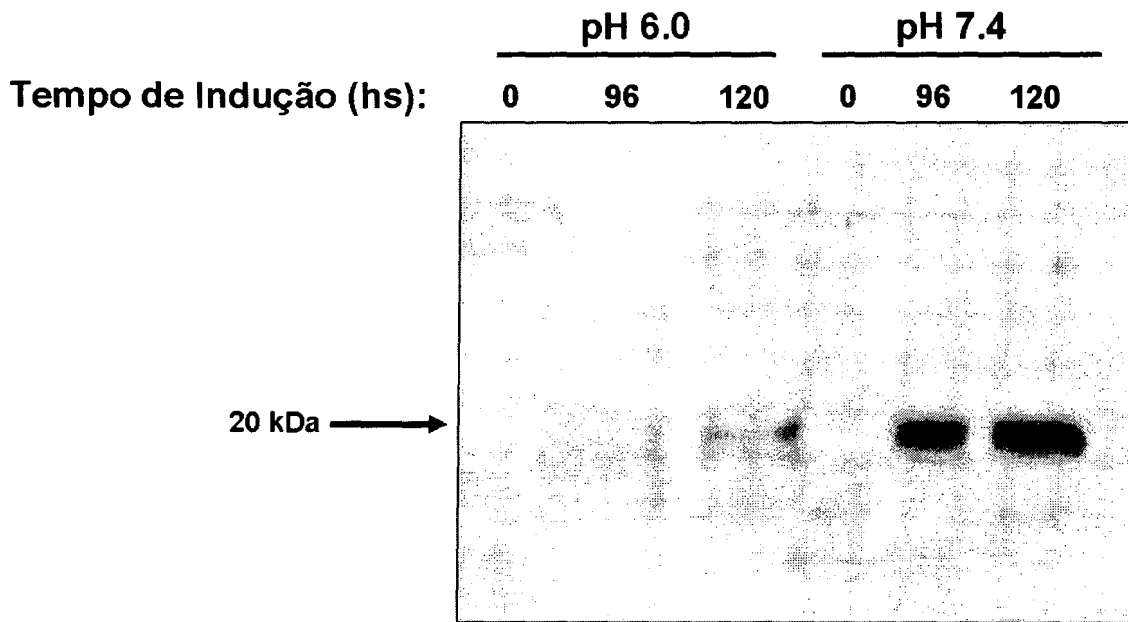


Figura 3

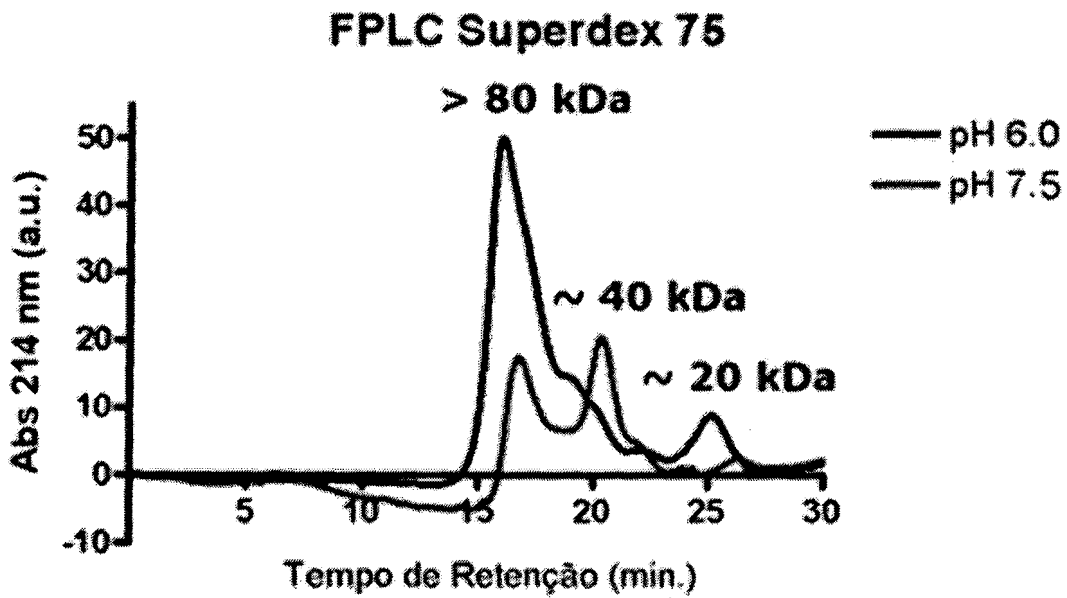


Figura 4



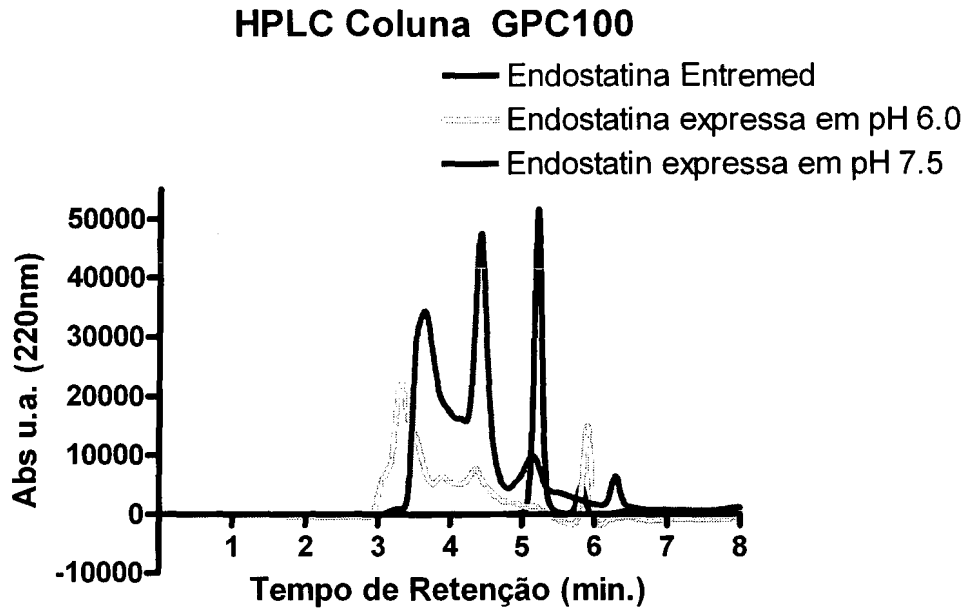
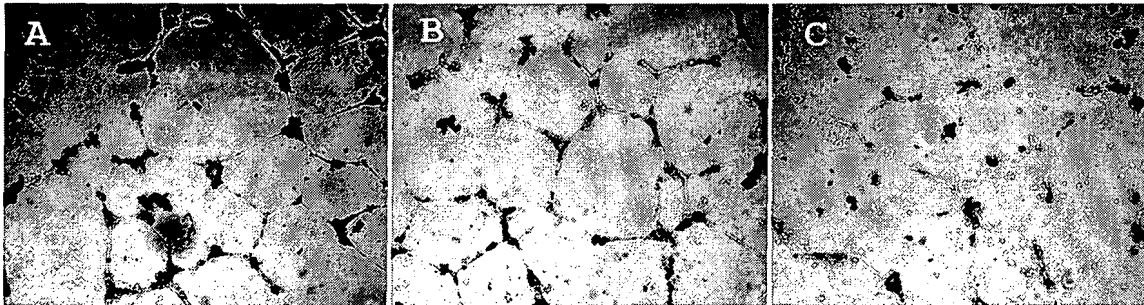


Figura 5



## Resumo

### PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA, ENDOSTATINA DIMERIZADA OU OLIGOMERIZADA E COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA

A presente invenção está relacionada à preparação de endostatina para o tratamento de câncer pela sua capacidade de regredir a formação de vasos sanguíneos de um tumor pré-estabelecido. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada à preparação de endostatina naturalmente dimerizada ou oligomérica, formada pela associação não covalente entre subunidades da proteína, apresentada na forma solúvel e sendo de fácil aplicação clínica.