



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 370**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/71** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07805753 .6**  
96 Fecha de presentación : **31.07.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2054440**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **Péptido obtenido del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular que se enlaza con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que presenta una actividad proangiogénica.**

30 Prioridad: **31.07.2006 IT RM06A0409**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.05.2011**

73 Titular/es: **Provincia Italiana della Congregazione dei Figli dell'Immacolata Concezione - Istituto Dermopatico dell'Immacolata  
Via dei Monti di Creta 104  
00167 Roma, IT  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE y  
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"**

72 Inventor/es: **D'Atri, Stefania;  
Failla, Cristina Maria;  
Lacal, Pedro Miguel;  
Orecchia, Angela;  
Zambruno, Giovanna;  
Tramontano, Anna;  
Soro, Simonetta y  
Morea, Veronica**

74 Agente: **Morgades Manonelles, Juan Antonio**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptido obtenido del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular que se enlaza con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que presenta una actividad proangiogénica.

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y, en particular, a la secuencia peptídica aislada en el dominio de la Ig de tipo II del VEGFR-1 que se puede enlazar con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  y activar la misma. En particular, la secuencia peptídica aislada, objetivo de la presente invención, se puede utilizar ventajosamente en la preparación de fármacos que presenten una actividad proangiogénica en el tratamiento de patologías que se benefician de la formación de nuevos vasos sanguíneos.

10 El receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1) es una tirosina cinasa del receptor para elementos específicos de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGFR-1 está estrechamente relacionado con los receptores del factor de crecimiento obtenidos de la tirosina cinasa-Fms/kit/trombocito de tipo III, pero se clasifican, con el VEGFR-2 y el VEGFR-3, en una clase distinta de receptores extracelulares cuya región se compone de siete dominios de tipo inmunoglobulina (Ig). El dominio de tipo Ig II comprende la región que participa en el enlace con el VEGF y del factor de crecimiento placentario (PIGF), mientras que los dominios de tipo Ig III y IV intervienen en el enlace con la heparina, y el dominio III es asimismo responsable de la interacción con la neuropilina-1.

20 El VEGFR-1 se expresa principalmente en las células endoteliales y musculares lisas, pero también en otros tipos celulares de génesis hematopoyética y de las células del músculo esquelético. No se conoce bien la transducción de señales en la célula procedente del VEGFR-1, como resultado de la interacción con el factor de crecimiento.

25 Los estudios con genes desactivados demostraron que el VEGFR-1 resulta esencial para el desarrollo y la diferenciación de la vasculatura embrionaria, y que sus resultados de inactivación en la participación en el aumento hemangioblástico y la desorganización de los vasos sanguíneos. Sin embargo, los ratones con una delección homocigótica del dominio cinasa intracelular presentan un desarrollo correcto de los vasos sanguíneos, lo que indica que la región extracelular del VEGFR-1 resulta suficiente para soportar la angiogénesis embrionaria.

30 La actividad con respecto a la tirosina cinasa del VEGFR-1 resulta esencial para la señalización quimiotáctica provocada por el VEGF y el PIGF en monocitos y macrófagos y las células germinales hematopoyéticas.

35 Los estudios sobre el PIGF, un ligando específico del VEGFR-1, han demostrado que dicho receptor se interviene en la angiogénesis patológica en adultos.

Más recientemente se ha demostrado que los factores de crecimiento que se enlazan con el VEGFR-1 pueden provocar la transfosforilación del VEGFR-2 y que la estimulación de la angiogénesis se puede obtener mediante la formación de complejos heterodiméricos VEGFR-1/VEGFR-2.

40 Además de la isoforma transmembrana del VEGFR-1, las células endoteliales (EC) producen una forma soluble del receptor, procedente del corte y empalme alternativo del mismo gen. El VEGFR-1 soluble (sVEGFR-1) comprende los primeros seis dominios de tipo Ig de la región extracelular del receptor y una cola específica de 30 aminoácidos en su extremo carboxiterminal. Ambas isoformas del VEGF se enlazan con gran afinidad y el sVEGFR-1 actúa como un potente antagonista de la señalización del VEGF secuestrando el factor de crecimiento y, por lo tanto, inhibiendo su interacción con los receptores transmembrana.

45 Los presentes inventores demostraron anteriormente que el sVEGFR-1 secretado por las EC en cultivo pasa a formar parte de la matriz extracelular y puede intervenir en la adherencia de las EC mediante el enlace directo con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . (Orecchia A. *et al.*, 2003).

50 Se ha destacado anteriormente un papel clave de dicha integrina en la estimulación de la vasculogénesis y la angiogénesis mediante el fenotipo vascular defectuoso de ratones con genes inactivados  $\alpha 5$  y por la capacidad de cualquiera de tanto los anticuerpos contra dicha integrina como de péptidos antagonistas para bloquear *in vitro* e *in vivo* la angiogénesis.

55 El enlace de la integrina con sus ligandos se realiza habitualmente mediante el reconocimiento de secuencias cortas de aminoácidos. Muchas integrinas, entre ellas la  $\alpha 5\beta 1$ , se enlazan con péptidos que contienen arginina - glicina - ácido aspártico (RGD), aunque se han identificado otros motivos.

60 Basándose en lo que se conoce en el estado de la técnica y suponiendo que la secuencia del sVEGFR-1 no contiene el motivo RGD, los inventores de la presente invención se centraron en la identificación de los determinantes moleculares responsables de su interacción con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

65 Los experimentos, que se describen detalladamente a continuación, dieron a conocer por primera vez que un anticuerpo contra un péptido cartografiado en el dominio de la Ig de tipo II impide el enlace del VEGF-1 con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Por lo tanto, los esfuerzos experimentales se centraron en dicho dominio II que soporta tanto la adherencia de las EC como el enlace directo con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

## ES 2 358 370 T3

Posteriormente, basándose en la información disponible en las estructuras determinadas experimentalmente de dicho dominio II, se desarrollaron doce péptidos que imitaban supuestamente toda la superficie del dominio, que se probaron posteriormente con respecto a la interacción con la integrina. De dichos doce péptidos, uno pudo soportar la adherencia de las EC así como competir con la adherencia entre el sVEGFR-1 y las EC y la migración de las EC hacia la sVEGFR-1.

Además, el péptido presentó actividad proangiogénica *in vitro*. La sustitución de alanina explorando la mutagenia del péptido ha permitido, finalmente, identificar los aminoácidos del péptido responsables de su actividad biológica, que representan un motivo de enlace de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos NYLTHRQ con el mismo efecto proangiogénico, así como el péptido que consiste en la secuencia YLXHR en el que X puede ser cualquier aminoácido según la reivindicación 1, pero preferentemente es Thr/T.

Otro objetivo de la presente invención es la utilización de dichos péptidos en la preparación de un compuesto farmacéutico apto para el tratamiento de estados clínicos que requieran la inducción de la angiogénesis, tales como: la hipertensión arterial periférica, las patologías vasculares dependientes de la diabetes, las heridas, la isquemia del músculo, el cerebro, el riñón, el intestino, el corazón o las extremidades, las patologías vasculares oclusivas u obstructivas graves, las enfermedades vasculares periféricas, la isquemia pericárdica, el infarto o cualquier patología vascular.

Otro objetivo de la presente invención es la utilización de los péptidos de la presente invención para dirigir moléculas o partículas, asimismo partículas víricas, hacia la integrina  $\alpha 5\beta 1$  *in vitro*.

Otras características de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, provista de los experimentos, haciendo referencia a las figuras adjuntas en las que:

La figura 1A representa los resultados de una prueba de ensayo de enlace en fase sólida de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  con el sVEGFR-1 en presencia/ausencia de anticuerpos dirigidos contra regiones específicas de la proteína sVEGFR-1; la cantidad de proteínas se determinó mediante ensayo colorimétrico (absorbancia a 405 nm).

La figura 1B representa los resultados de una prueba de adherencia de las células endoteliales (EC) incubadas en placas cubiertas con la proteína de fusión VEGFR-1 con el dominio de FC de las inmunoglobulinas humanas (VEGFR-1 Fe), con el dominio de la Ig de tipo II recombinante (d II), con la fibronectina (FN) o la seroalbúmina bovina (BSA), seguido por un ensayo colorimétrico (absorbancia a 540 nm).

La figura 1C representa los resultados de una prueba de adherencia en fase sólida de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en placas cubiertas con el dominio de la Ig de tipo II recombinante o con el VEGFR-1 Fe, seguido por un ensayo colorimétrico (absorbancia a 405 nm).

La figura 2A representa en el panel derecho la ubicación de los péptidos 2, 4, 5, 7 y 12 en la estructura del dominio II y en el panel izquierdo la ubicación de los péptidos 1, 3, 5, 7, 9 y 11.

La figura 2B representa los resultados de una prueba de adherencia de las EC en placas cubiertas con VEGFR-1/Fe o fibronectina, en presencia de los doce péptidos; el resultado se expresa como el porcentaje de adherencia de las EC sobre los mismos sustratos en ausencia de péptidos.

La figura 2C representa los resultados de una prueba de adherencia de las EC sobre placas cubiertas con los péptidos 4, 5, 7, 12, 1 y RGD, seguida por un ensayo colorimétrico (absorbancia a 540 nm).

La figura 3A representa los resultados de una prueba de adherencia de las EC en placas cubiertas con el péptido 12 en presencia de ácido edético, EGTA, un anticuerpo contra la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  y  $\alpha 6$ , seguida por un análisis colorimétrico (absorbancia a 540 nm).

La figura 3B representa, en los paneles a-e, los resultados de la inmunotinción de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  de las EC incubadas con perlas magnéticas recubiertas con el péptido RGE (panel a), el péptido RGD (paneles b, d) o con el péptido 12 (paneles c, e).

La figura 3C representa los resultados de una prueba de migración de las EC provocada por VEGF-1/Fc o fibronectina (FN) en presencia del péptido 1 o 12; el resultado se expresa como el porcentaje de inhibición de la migración observada en ausencia de péptidos.

La figura 4A representa el efecto de la sustitución de la alanina de diversos residuos aminoacídicos del péptido 12 en la adherencia celular.

La figura 4B representa el efecto de la sustitución de la alanina de los distintos residuos aminoacídicos del péptido 12 en el enlace de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

## ES 2 358 370 T3

La figura 5 representa los resultados de una prueba de formación de vasos endoteliales en presencia o ausencia del péptido 12 (paneles a, g), Q225A (panel c), Y220A (panel d) y las concentraciones de VEGF (100 nM) (paneles b, d), y 20 mg/ml de VEGFR-1 Fe (paneles e, f, g).

5 Las figuras 6A y 6B representan el efecto sobre la angiogénesis del péptido 12 o del Y220 en comparación con el VEGF a diferentes concentraciones *in vivo*.

La figura 7 representa los resultados del análisis histológico e inmunohistoquímico de la angiogénesis en la córnea.

10 1. *Efecto del anticuerpo para reconocer un péptido cuya secuencia se encuentra presente en el dominio II del VEGFR-1 en la interacción sVEGFR-1/integrina*

15 Se conoce que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se enlaza con la proteína VEGFR-1/Fc y, tal como han demostrado anteriormente los presentes inventores, un anticuerpo, que pueda reconocer un péptido cuya secuencia se encuentre presente en el dominio II del VEGFR-1, compite con la adherencia de las EC con el sVEGFR-1 en la que interviene la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ; el efecto del propio anticuerpo se analizó (puede reconocer un péptido cuya secuencia se encuentra presente en el dominio II del VEGFR-1) en la interacción directa sVEGFR-1/integrina.

20 En una prueba de enlace en fase sólida, las placas cubiertas con VEGFR-1/Fc se trataron con diversos anticuerpos anti-VEGFR-1 y se incubaron con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  purificada, se cuantificó la cantidad de enlaces con la integrina mediante la incubación con un anticuerpo antiintegrina  $\alpha 5\beta 1$  y la identificación colorimétrica de este último. La capacidad del anticuerpo para reconocer un péptido cuya secuencia se encuentra presente en el dominio II del VEGFR-1 (DII Ab) inhibió completamente el enlace de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  con el VEGFR-1. Un anticuerpo policlonal (Flt-1 H225) dirigido contra un fragmento proteico que comprende los residuos aminoacídicos 1 a 225 del VEGFR-1, no inhibió la interacción VEGFR-1/integrina. Tal como era de esperar, la inhibición no se obtuvo con un anticuerpo (Flt-1 C17) dirigido contra el dominio intracelular del VEGFR-1 (figura 1A).

30 2. *Construcción de una proteína recombinante correspondiente al dominio II del VEGFR-1*

35 Basándose en los límites del dominio observados en las estructuras determinadas experimentalmente disponibles en la base de datos de PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), se diseñó una proteína recombinante correspondiente al dominio II (aminoácidos 129 a 229). La proteína se produjo en la estirpe celular de insecto SF9 utilizando el sistema de expresión en el que intervienen baculovirus y se purificó mediante cromatografía de afinidad. La proteína recombinante presentó el peso molecular esperado en SDS-PAGE y se reconoció mediante un anticuerpo policlonal anti-VEGFR-1.

40 El ADNc completo del VEGFR-1 utilizado para la producción del dominio II recombinante lo proporcionó amablemente por el Dr. Shibuya (Instituto de Ciencia Médica de la Universidad de Tokio, Japón). El ADNc se modificó en el laboratorio del Dr. Ballmer-Hofer (Paul Scherrer Institut, Villigen-PSI, Suiza) para introducir el sitio KPN I seguido por una secuencia Kozak, un codón de iniciación hasta el extremo 5', un sitio BSI W1 seguido por una etiqueta HA y un codón de terminación en el extremo 3'. El poliligador del vector pFastBac 1 de los baculovirus (Invitrogen, Life Technologies) se sustituyó por un ligador que contiene un sitio KPN I y un BSI W1 junto con una etiqueta His.

45 En primer lugar, el ADNc del VEGFR-1 se clonó en pFastBac 1 utilizando los sitios KPN I y BSI W1. Para construir el dominio II recombinante, se amplificó la secuencia del VEGFR-1 mediante PCR utilizando los oligonucleótidos:

5' -GCGCGGATCCGGTACCGC-3' y

5-GTGATGCGTACGTGAACCTGAACTAGATCCTGTG-3'

50 y se clonó en PFastBac modificado previamente.

A continuación, se amplificó el dominio II con los oligonucleótidos:

55 5' -GTGATGCGTACGAGTGATACAGGTAGACCTTTC-3' y

5' -GTGATGCGTACGTCCGATTGTATTGGTTTGTGCGATG-3'.

60 El fragmento de PCR se clonó en el vector modificado pFastBac que presentaba la secuencia de la señal del VEGFR-1. Se obtuvieron los baculovirus recombinantes mediante el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, Life Technologies). La estirpe celular SF9 (*Spodoptera frugiperda*) se adquirió en Invitrogen y se mantuvo en cultivo a 27°C en un medio TC100 (Invitrogen, Life Technologies), que contenía suero fetal de ternera inactivado térmicamente al 10%. Las células SF9 infectadas se cultivaron en el medio SF-900 sin suero (Invitrogen, Life Technologies). Para la expresión de proteínas, se sembraron las células SF9 hasta el 60% de confluencia y se infectaron con el virus recombinante. Cuarenta y ocho horas tras la infección, se recogieron las células y se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad con el kit de purificación B-PER His Fusión Protein (Pierce, Rockford, IL).

## ES 2 358 370 T3

### 3. Capacidad del dominio II para soportar la adherencia de las EC

Las células endoteliales obtenidas de la vena umbilical humana (HUVEC) se utilizaron para examinar la capacidad del dominio II para soportar la adherencia de las EC en placas cubiertas con la proteína recombinante.

Las HUVEC se incubaron en placas cubiertas con el VEGFR-1 FC, con el dominio II (dII) recombinante, con la fibronectina (FN) o seroalbúmina bovina (BSA). Se utilizaron la proteína VEGFR-1/Fc y la fibronectina como controles positivos y la BSA como control negativo.

Se tiñeron las células analizadas y se determinó la absorbancia.

El dII recombinante soportó la adherencia de las HUVEC (figura 1B) de un modo análogo al VEGFR-1/Fc.

Se había determinado el enlace directo de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  con el dominio y también con la prueba de enlace en fase sólida. La integrina  $\alpha 5\beta 1$  purificada se añadió a las placas cubiertas con dII o con VEGFR-1/Fc como control positivo y se determinó la integrina enlazada utilizando un anticuerpo antiintegrina  $\alpha 5\beta 1$  y una prueba colorimétrica. Tal como se representa en la figura 1C una cantidad similar de integrina interaccionó con el VEGFR-1/Fc y el dII recombinante.

### 4. Selección de péptidos en el dominio II del VEGFR-1

A fin de identificar una región del dominio II que interaccione potencialmente con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se utilizaron las estructuras determinadas del dominio con cristalografía de rayos X disponibles en el banco de datos PDB. Las estructuras tridimensionales se examinaron a fin de identificar las secuencias aminoacídicas contiguas en la superficie de la proteína que podrían imitar toda la región expuesta del dominio II.

Se elaboraron doce péptidos (tabla I), basándose los siguientes criterios:

1) que se encuentren en la superficie de la proteína y presenten un área superficial accesible al disolvente en conjunto elevada;

2) que correspondan a distintas regiones de la superficie de dominio, cubriendo el mismo casi por completo;

3) que presenten menos de 15 aminoácidos;

4) que contengan un porcentaje elevado de aminoácidos polares y, cuando resulte posible, aminoácidos cargados en valores de pH fisiológico (Asp, Glu, Lys y Arg);

5) que contengan porcentaje bajo de aminoácidos hidrófobos (es decir, Leu, Val, Ile, Met, Phe y Trp), a fin de minimizar problemas de solubilidad;

6) que no contengan aminoácidos Cys, que podrían provocar la formación de péptidos diméricos.

TABLA I

P1	GRPFVEMYSE	132-141
P2	YSEIPEIIH	139-147
P3	ETTHMTEGR	144-152
P4	TEGRELVIPARVT	149-161
P5	NITVTLKKFPL	164-174
P6	KKFPLD	170-175
P7	KFPLDTLIPDG	171-181
P8	DTLIPDGKRII	175-185
P9	DSRKGFIISNAT	107-198
P10	TYIKEIGL	198-204
P11	EATVNGHLYKT	208-218
P12	NYLTHRQ	219-225
sP12	LTQNYRH	—

Para satisfacer el requisito 6, el aminoácido Cys 158 del VEGFR-1 se sustituyó por Ala en el péptido 4. Además, para explorar si la presencia de dos aminoácidos hidrófobos ramificados contiguos puede provocar problemas de solubilidad, se sustituyeron la Ile 145 y la Ile 146 adyacentes por Thr en el péptido 3. Anteriormente se ha publicado y descrito que la secuencia peptídica 5 actúa como inhibidor de la angiogénesis sin enlazarse con el VEGF o inhibir el enlace del VEGF con sus receptores.

### 5. Ensayo sobre la capacidad de doce péptidos para inhibir la adherencia intervenida de la $\alpha 5\beta 1$ de las EC con el VEGFR-1

Para analizar la capacidad de los doce péptidos seleccionados para inhibir la adherencia de las EC con el VEGFR-1 en la que interviene la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , cada péptido se añadió a una suspensión de HUVEC cultivadas previamente en placas cubiertas con VEGFR-1/Fc o fibronectina (FN). Los datos se indicaron como porcentaje de adherencia, calculado para el número de células adheridas al propio sustrato en ausencia de los péptidos.

Tal como se representa en la figura 2B, los péptidos 4, 5, 7 y 12 bloquearon efectivamente la adherencia de las EC con el VEGFR-1/Fc. Además, los péptidos 4, 7 y 12 pudieron inhibir parcialmente la adherencia de las EC con la fibronectina, lo que indica alguna interferencia con el sitio de enlace de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

La localización de los péptidos 4, 7 y 12 en la estructura del dominio II del VEGFR-1 se representa en la figura 2A (la representación de la banda de la pista de carbono determinada mediante cristalografía de rayos X): el péptido 4 se superpone prácticamente entero a la cadena B en la primera lámina  $\beta$  (ABED); el péptido 12 se encuentran en la hoja  $\beta$  opuesta dentro de la cadena de G con respecto al carboxiterminal del dominio; el péptido 7 comprende partes de C, la cadena C' y el asa C' D, que conecta las dos láminas  $\beta$  entre sí.

### 6. Efectos de los péptidos en la adherencia de las EC

Para determinar si los cuatro péptidos fueron capaces de inhibir la adherencia de las EC con el VEGFR-1, sopor-tando directamente la adherencia de las EC, los péptidos se unieron por enlace covalente con las placas y se incubaron las HUVEC en las placas durante 1 hora. Se utilizó el péptido 1 como control negativo y el péptido RGD como control positivo. Se determinó la adherencia no específica mediante la absorbancia en las placas cubiertas con BSA. En dicha prueba únicamente el péptido 12 provoca la adherencia de las EC (figura 2C).

### 7. Interferencia de los cationes divalentes con la adherencia de las EC con el péptido 12

El enlace de las proteínas de la matriz extracelular con las integrinas depende generalmente de la presencia de cationes divalentes, por lo que se investigó la interferencia de los cationes divalentes con la adherencia de la EC con péptido 12. El péptido de 12 o la BSA, como control no específico de la adherencia, se enlazaron en placas y se añadieron las HUVEC en presencia de agentes quelantes (ácido edético o EGTA).

Tal como se representa en la figura 3A, el tratamiento con ácido edético o EGTA eliminó completamente la adherencia de las EC, lo que indica que la adherencia de las EC con el péptido 12 requiere cationes divalentes.

A fin de demostrar que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  era la proteína que intervenía en la adherencia de las EC con el péptido 12, se probaron anticuerpos antiintegrina. Se incubaron previamente las HUVEC con un anticuerpo contra la integrina  $\alpha 5\beta 1$  o contra la subunidad  $\alpha 6$  de la integrina y se dejaron adherir en placas cubiertas con el péptido 12 o BSA. La incubación previa de las HUVEC con el anticuerpo contra la integrina  $\alpha 5\beta 1$  inhibió la adherencia de las EC con el péptido 12, mientras que el anticuerpo contra  $\alpha 6$  resultó inefectivo (figura 3A).

### 8. Provocación de la agregación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ mediante el enlace con el péptido 12

Las integrinas sin enlazar se encuentran ampliamente distribuidas en la membrana celular, pero tras la unión del ligando y la activación se fusionan en distintas estructuras denominadas contactos focales y contactos ECM.

Se examinó si el péptido 12 podía provocar la agregación de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  después del enlace. Las células adherentes EC se incubaron con perlas magnéticas recubiertas con el péptido 12 o el péptido RGD o el péptido RGE, respectivamente, como controles positivos y negativos, y se inmunotifieron con un anticuerpo contra la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

Se observó una fluorescencia distinta para la integrina  $\alpha 5\beta 1$  alrededor de las perlas recubiertas con el péptido 12 (figura 3B, paneles c, e), similar a la observada en las perlas cubiertas con el péptido RGD (figura 3B, paneles b, d). Las perlas cubiertas con el péptido RGE no se unieron con las HUVEC en esta prueba (figura 3B, panel a).

### 9. Efectos del péptido 12 en la migración y la proliferación celular

A fin de investigar la capacidad del péptido 12 para influir en la migración de las EC provocada por el VEGFR-1/Fc, un proceso en el que interviene la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , se incubaron previamente las HUVEC con el péptido 12 y el péptido 1 y se dispusieron en cámaras de Boyden a fin de analizar la migración provocada por el VEGFR-1/Fc o la fibronectina (FN). Los datos representan la media de 14 campos microscópicos y se indican como porcentaje de inhibición en comparación con la migración observada en ausencia de péptidos. Tal como se representa en la figura 3C, el péptido 12 anuló completamente la respuesta migratoria provocada por el VEGFR-1 FC mientras que la incubación

## ES 2 358 370 T3

de células con un péptido de control resultó totalmente inefectiva. El efecto inhibitor del péptido 12 en la migración celular resultó específico para el VEGFR-1, mientras que no se observó una inhibición significativa de la migración provocada por la fibronectina.

5

### 10. Efectos del péptido 12 en la formación de estructuras vasculares

Se analizó la capacidad del péptido 12 para provocar la formación de túbulos de EC. Se sembraron células HUVEC en placas de 24 pocillos cubiertos previamente con una mezcla de gel de colágeno de tipo I, en ausencia o presencia de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido 12 o el péptido 1. Se dispuso una segunda capa de gel de colágeno de tipo I en las células adherentes. Tal como se representa, en ausencia o presencia de péptidos, se añadieron al medio de cultivo distintas concentraciones de VEGF (40 o 100 nM), o 20 mg/ml de proteína VEGFR-1/Fc. La capacidad del péptido 12 para provocar la formación de túbulos de EC sobre la matriz de colágeno I resultó similar a la del VEGF (figura 5). Además, cuando se utilizó el VEGF a una concentración baja (40 nM), el tratamiento simultáneo con el péptido 12 aumentó la formación de túbulos provocada por el VEGF. En cambio, el péptido 1 no provocó la formación de túbulos ni aumentó el efecto del VEGF. La adición del VEGFR-1 Fe, que regula negativamente la función del VEGF mediante la retención del factor de crecimiento y la consiguiente inhibición de su interacción con la isoforma tirosina cinasa del receptor, se utilizó como control negativo y provocó una fuerte inhibición de la constitución de los túbulos.

En presencia del VEGFR-1/Fc, el péptido 12 mantiene parcialmente su capacidad de provocar la formación de estructuras vasculares, lo que indica que su mecanismo de acción es independiente de la del VEGF (datos no representados).

Para estudiar el papel angiogénico, *in vivo*, se dispusieron gránulos que liberaban el péptido 12 en el tejido corneal de conejo y se controló la neovascularización durante 17 días. Tal como se representa en la figura 6A y la figura 7, el péptido 12 provocó fuertemente la neoangiogénesis.

### 11. Identificación de los aminoácidos del péptido 12 que participan en el enlace con la integrina

30

Para determinar los aminoácidos del péptido 12 que desempeñan un papel en la adherencia con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , se sintetizaron diez péptidos distintos, presentando cada uno una sustitución simple o doble con alanina (ALA). Dichos péptidos se analizaron con respecto a su capacidad para soportar directamente la adherencia celular. Los diez péptidos se enlazaron covalentemente a las placas y se analizaron asimismo, como controles negativos, un péptido "codificado" en el que se modificó la secuencia de aminoácidos del péptido 12 (véase la tabla 1) (SP12) y BSA. Se sembraron las HUVEC se sembraron y se dejaron adherir. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la adherencia celular observada en las placas cubiertas con el péptido 12.

Tal como se representa en la figura 4A, la sustitución de únicamente 3 aminoácidos con ALA influye en la capacidad del péptido 12 para soportar la adherencia de las EC: la sustitución de la Tyr 220 con ALA eliminó completamente la adherencia celular con el péptido, la mutación de la Leu 221 en ALA tuvo como resultado una reducción parcial de la adherencia celular, comparable a la observada en el péptido mutante His 223 en Ala. Dichos resultados demostraron que los aminoácidos que resultan importantes interviniendo en la unión de las células son la Tyr 220, la Leu 221 y la His 223. Se analizó asimismo el enlace directo con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  con péptidos mutantes mediante una prueba de enlace en fase sólida. La integrina  $\alpha 5\beta 1$  purificada se añadió a las placas cubiertas con diversos péptidos y se determinó la cantidad enlazada utilizando un anticuerpo antiintegrina  $\alpha 5\beta 1$  con un método colorimétrico. Los datos se expresaron como porcentaje de proteína enlazada observado en las placas cubiertas con el péptido original 12.

Tal como se representa en la figura 4B, la Tyr 220 es el aminoácido más importante para el enlace de la integrina y la Leu 221 y la His 223 son importantes en el soporte de la interacción proteína/proteína. A diferencia de la adherencia celular, la Arg 224 desempeña asimismo un papel interviniendo en el enlace de la integrina con el péptido 12.

El péptido 12 se encuentra en el extremo carboxílico de la cadena G de dominio II (figura 2A). Sus aminoácidos resultan accesibles al disolvente, con la excepción de la Tyr 222 cuya cadena lateral se cierra en el núcleo central del dominio. La cadena lateral de la Tyr 220 está protegida parcialmente del solvente mediante el grupo carboxilato del Glu 144 de la cadena lateral. El último aminoácido es, sin embargo, muy flexible, tal como lo demuestran los valores elevados del factor B en todas las estructuras cristalinas de los dominios disponibles y la variabilidad observada en la conformación de las estructuras de NMR.

60

Por lo tanto, se supone que la Tyr 220 estaba disponible para enlazarse con el ligando.

### 12. Especificidad de los aminoácidos YLXHR

65

A fin de verificar la especificidad de los aminoácidos YLXHR (X = cualquier aminoácido) en las proteínas extracelulares, las proteínas humanas anotadas del consorcio UniProtKB/Swissprot se habían buscado con respecto a su repetición. Se encontró el motivo en 20 (0,2%) de 8.687 proteínas analizadas, ninguna de las cuales era extracelular,

## ES 2 358 370 T3

lo que indica que esta secuencia de enlace para la integrina  $\alpha 5\beta 1$  es característica del sVEGFR-1. En cambio, el motivo RGD se encontró de nuevo en el 7,9% de todas las proteínas humanas y resultó más frecuente en las proteínas extracelulares (9,7%).

5 Tal como se indica en los experimentos descritos detalladamente en la presente memoria, las investigaciones han producido muchos resultados importantes, que se resumen a continuación:

10 - Las dos isoformas, obtenidas del corte y empalme alternativo del receptor 1 del VEGF desempeñan un papel biológico distinto durante la angiogénesis. En particular, la isoforma transmembrana del receptor es una tirosina A cinasa, mientras que la forma soluble actúa como molécula en la matriz extracelular, implicada en la adherencia y la migración celular, y como regulador negativo de la actividad de la señal del VEGF.

15 - Un anticuerpo contra un péptido cuya secuencia se encuentra presente en el dominio II del VEGFR-1 inhibe la adherencia celular en el sVEGFR-1 y bloquea la interacción con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

- Un fragmento del VEGFR-1, que corresponde al dominio II, se enlaza directamente con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  y resulta suficiente para soportar la adherencia de las células endoteliales (EC).

20 - De los doce péptidos que imitan las regiones seleccionadas de la superficie del receptor, cuatro péptidos (4, 5, 7 y 12) inhiben la adherencia celular con el sVEGFR-1.

- El péptido 12 es el único que soporta directamente la adherencia de las EC y, por lo tanto, interactúa directamente con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . De hecho, el enlace EC/péptido 12 es sensible a los cationes divalentes y se inhibe mediante los anticuerpos contra la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

25 - La interacción directa entre el péptido 12 y la integrina  $\alpha 5\beta 1$  activa la integrina.

- El péptido 12 inhibe la migración celular hacia el VEGFR-1, proceso en el que interviene la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

30 - El péptido 12 puede provocar la formación *in vitro* de estructuras vasculares (túbulos), lo que sugiere que el sVEGFR-1, cuyo dominio II contiene la secuencia peptídica 12, participa en la formación de vasos sanguíneos, la adherencia y migración de las células endoteliales y es un modulador positivo de la morfogénesis de los vasos sanguíneos.

35 - Tres aminoácidos del péptido 12, la Tyr 220, la Leu 221 y la His 223, si mutan, reducen significativamente la capacidad de soporte del péptido de la adherencia celular.

40 - El motivo que presenta la secuencia YLXHR, representa la región, en el dominio II del receptor VEGFR-1, estrictamente necesaria para la interacción con la integrina.

- Dicha secuencia no interacciona con los factores de crecimiento, VEGF y PIGF, por lo tanto, aunque los aminoácidos responsables del enlace con los factores de crecimiento y la integrina están próximos, las dos interacciones pueden ser mutuamente excluyentes.

45 Por último, los efectos biológicos del VEGF-1 en las células endoteliales y la identificación de las moléculas que interfieren en las distintas funciones de dicho receptor podrían constituir la base para el desarrollo de productos terapéuticos más efectivos.

50 De hecho, el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos YLXHR se podría utilizar efectivamente como agente proangiogénico en el tratamiento de procesos clínicos que requieren la activación de la angiogénesis celular.

Dichos procesos clínicos comprenden el grupo que consiste en:

55 Hipertensión, patologías vasculares periféricas que dependen de la diabetes, heridas, isquemia de: músculo, cerebro, riñón, intestinos, corazón o arterias; patologías vasculares oclusivas u obstructivas graves, patologías vasculares periféricas, isquemia pericárdica, infarto de miocardio, enfermedades de las arterias coronarias, patologías vasculares cerebrales, patologías vasculares viscerales.

### 60 Referencias

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000) *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.

65 - Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T. & DiPalma, T. (2001) *Nat Med* 7, 575-583.

- Christinger, H. W., Fuh, G., de Vos, A. M. & Wiesmann, C. (2004) *J Biol Chem* 279, 10382-10388.

## ES 2 358 370 T3

- Davis-Smyth, T., Presta, L. G. & Ferrara, N. (1998) *J Biol Chem* 273, 3216-3222.
- Dayringer, H. E., Tramontano, A., Spang, S. R. & Fletterick, R. J. (1986) *J Mol Graph* 4, 82-87.
- 5 - Folkman, J. (1995) *N Engl J Med* 333, 1757-1763.
- Fong, G., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. (1995) *Nature* 376, 66-70.
- Fong, G., Zhang, L., Bryce, D. & Peng, J. (1999) *Development* 126, 3015-3025.
- 10 - Francis, S. E., Goh, K. L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B. L., Stark, M., Davidson, D. & Hynes, R. O. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 927-33.
- Fuh, G., Garda, K. C. & de Vos, A. M. (2000) *J Biol Chem* 275, 26690-26695.
- 15 - Germani, A., Di Carlo, A., Mangoni, A., Straino, S., Giacinti, C., Turrini, P., Turrini, P., Biglioli, P. & Capogrossi, M. C. (2003) *Am J Pathol* 163, 1417-28.
- Gimbrone, M. A. (1976) *Prog Hemost Thromb* 3, 1-28.
- 20 - Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. & Shibuya, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9349-9354.
- Humphries, M. J. (2000) *Biochem Soc Trans* 28, 311-229.
- 25 - Inoue, T., Kibata, K., Suzuki, M., Nakamura, S., Motoda, R. & Orita, K. (2000) *FEBS Lett* 469, 14-18.
- Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M. & Wijelath, E. (2001) *J Cell Physiol* 188, 359-68.
- 30 - Kearney, J. B., Kappas, N. C., Ellerstrom, C., DiPaola, F. W. & Bautch, V. L. (2004) *Blood* 103, 4527-4535.
- Kendall, R. L. & Thomas, K. A. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10705-10709.
- Kim, S., Bell, K., Mause, S. A. & Varner, J. A. (2000) *Am J Pathol* 156, 1345-1362.
- 35 - Koivunen, E., Gay, D. A. & Ruoslahti, E. (1993) *J Biol Chem* 268, 20205-20210.
- Koivunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E. (1994) *J Cell Biol* 124, 373-80.
- 40 - Korpelainen, E. & Alitalo, K. (1998) *Curr Opin Cell Biol* 10, 159-164.
- Leahy, D. J., Aukhil, I. & Erickson, H. P. (1996) *Cell* 84, 155-164.
- Leu, S., Lam, S. & Lau, L. (2002) *J Biol Chem* 277, 46248-55.
- 45 - Mould, A. P., Burrows, L. & Humphries, M. J. (1998) *J Biol Chem* 273, 25664-25672.
- O'Donovan, C., Apweiler, R. & Bairoch, A. (2001) *Trends Biotechnol* 19, 178-181.
- 50 - Orecchia, A., Lacal, P. M., Schietroma, C., Morea, V., Zambruno, G. & Fulla, C. M. (2003) *J Cell Sci* 116, 3479-3489.
- Roberts, D. M., Kearney, J. B., Johnson, J. H., Rosenberg, M. P., Kumar, R. & Bautch, V. L. (2004) *Am J Pathol* 164, 1531-1535.
- 55 - Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M., Shiara, K., Nakahata, T. & Shibuya, M. (2001) *Blood* 97, 785-791.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushima, H. & Sato, M. (1990) *Oncogene* 8, 519-527.
- 60 - Shimaoka, M. & Springer, T. A. (2003) *Nat Rev Drug Discov* 2, 703-716.
- Tan, D. C. W., Manjunatha Kini, R., Jois, S. D. S., Lim, D. K. F., Xin, L. & Ge, R. (2001) *FEBS-Lett* 494, 150-156.
- 65 - Wang, H. & Keiser, J. (1998) *Circ Res* 83, 832-840.

- **Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A. & de Vos, A. M.** (1997) *Cell* 91, 695-704.

- **Yamada, K. M. & Geiger, B.** (1997) *Curr Opin Cell Biol* 9, 76-85.

5

### Referencias citadas en la descripción

La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.

### Documentos que no corresponden a patentes citados en la descripción

15

• **Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.** *Nucleic Acids Res*, 2000, vol. 28, 235-242 [0060]

20

• **Carmeliet, P.; Moons, L.; Lutun, A.; Vincenti, V.; Compernelle, V.; De Mol, M.; Wu, Y.; Bono, F.; Devy, L.; Beck, H.** *Nat Med*, 2001, vol. 7, 575-583 [0060]

• **Christinger, H. W.; Fuh, G.; de Vos, A. M.; Wiesmann, C.** *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 10382-10388 [0060]

25

• **Davis-Smyth, T.; Presta, L. G.; Ferrara, N.** *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 3216-3222 [0060]

• **Dayringer, H. E.; Tramontano, A.; Spang, S. R.; Fletterick, R. J.** *J Mol Graph*, 1986, vol. 4, 82-87 [0060]

• **Folkman, J.** *N Engl J Med*, 1995, vol. 333, 1757-1763 [0060]

30

• **Fong, G.; Rossant, J.; Gertsenstein, M.; Breitman, M.** *Nature*, 1995, vol. 376, 66-70 [0060]

• **Fong, G.; Zhang, L.; Bryce, D.; Peng, J.** *Development*, 1999, vol. 126, 3015-3025 [0060]

35

• **Francis, S. E.; Goh, K. L.; Hodivala-Dilke, K.; Bader, B. L.; Stark, M.; Davidson, D.; Hynes, R. O.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, vol. 22, 927-33 [0060]

• **Fuh, G.; García, K. C.; de Vos, A. M.** *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 26690-26695 [0060]

40

• **Germani, A.; Di Cario, A.; Mangoni, A.; Straino, S.; Giacinti, C.; Turrini, P.; Turrini, P.; Biglioli, P.; Capogrossi, M. C.** *Am J Pathol*, 2003, vol. 163, 1417-28 [0060]

• **Gimbrone, M. A.** *Prog Hemost Thromb*, 1976, vol. 3, 1-28 [0060]

45

• **Hiratsuka, S.; Minowa, O.; Kuno, J.; Noda, T.; Shibuya, M.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, 9349-9354 [0060]

• **Humpries, M. J.** *Biochem Soc Trans*, 2000, vol. 28, 311-229 [0060]

50

• **Inoue, T.; Kibata, K.; Suzuki, M.; Nakamura, S.; Motoda, R.; Orita, K.** *FEBS Lett*, 2000, vol. 469, 14-18 [0060]

• **Ishida, A.; Murray, J.; Saito, Y.; Kanthou, C.; Benzakour, O.; Shibuya, M.; Wijelath, E.** *J Cell Physiol*, 2001, vol. 188, 359-68 [0060]

55

• **Kearney, J. B.; Kappas, N. C.; Ellerstrom, C.; DiPaola, F. W.; Bautch, V. L.** *Blood*, 2004, vol. 103, 4527-4535 [0060]

• **Kendall, R. L.; Thomas, K. A.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 10705-10709 [0060]

60

• **Kim, S.; Bell, K.; Mause, S. A.; Varner, J. A.** *Am J Pathol*, 2000, vol. 156, 1345-1362 [0060]

• **Koivunen, E.; Gay, D. A.; Ruoslahti, E.** *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, 20205-20210 [0060]

• **Koivunen, E.; Wang, B.; Ruoslahti, E.** *J Cell Biol*, 1994, vol. 124, 373-80 [0060]

65

• **Korpelainen, E.; Alitalo, K.** *Curr Opin Cell Biol*, 1998, vol. 10, 159-164 [0060]

• **Leahy, D. J.; Aukhil, I.; Erickson, H. P.** *Cell*, 1996, vol. 84, 155-164 [0060]

## ES 2 358 370 T3

- **Leu, S.; Lam, S.; Lau, L.** *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, 46248-55 [0060]
- **Mould, A. P.; Burrows, L.; Humphries, M. J.** *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 25664-25672 [0060]
- 5 • **O'Donovan, C.; Apweiler, R.; Bairoch, A.** *Trends Biotechnol*, 2001, vol. 19, 178-181 [0060]
- **Orecchia, A.; Lacal, P. M.; Schietroma, C.; Morea, V.; Zambruno, G.; Failla, C. M.** *J Cell Sci*, 2003, vol. 116, 3479-3489 [0060]
- 10 • **Roberts, D. M.; Kearney, J. B.; Johnson, J. H.; Rosenberg, M. P.; Kumar, R.; Bautch, V. L.** *Am J Pathol*, 2004, vol. 164, 1531-1535 [0060]
- **Sawano, A.; Iwai, S.; Sakurai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Nakahata, T.; Shibuya, M.** *Blood*, 2001, vol. 97, 785-791 [0060]
- 15 • **Shibuya, M.; Yamaguchi, S.; Yamane, A.; Ikeda, T.; Tojo, A.; Matsushime, H.; Sato, M.** *Oncogene*, 1990, vol. 8, 519-527 [0060]
- **Shimaoka, M.; Springer, T. A.** *Nat Rev Drug Discov*, 2003 vol. 2, 703-716 [0060]
- 20 • **Tan, D. C. W.; Manjunatha Kini, R.; Jois, S. D. S.; Lim, D. K. F.; Xin, L.; Ge, R.** *FEES Lett*, 2001, vol. 494, 150-156 [0060]
- **Wang, H.; Keiser, J.** *Circ Res*, 1998, vol. 83, 832-840 [0060]
- 25 • **Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H. W.; Eigenbrot, C.; Wells, J. A.; de Vos, A. M.** *Cell*, 1997, vol. 91, 695-704 [0060]
- **Yamada, K. M.; Geiger, B.** *Curr Opin Cell Biol*, 1997, vol. 9, 76-85 [0060]
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

5 1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos YLXHR que presenta efecto proangiogénico **caracterizado** porque X se selecciona de entre el grupo que consiste en: Ala/A, Arg/R, Asn/N, Asp/D, Cys/C, Glu/E, Gln/Q, Gly/G, Ile/I, Leu/L, Lys/K, Met/M, Phe/F, Pro/P, Ser/S, Thr/T, Trp/W, Tyr/Y y Val/V.

2. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos YLXHR que presenta efecto proangiogénico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque X es Thr/T.

10 3. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos NYLTHRQ que presenta efecto proangiogénico.

4. Utilización del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de una composición farmacéutica.

15 5. Utilización del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de una composición farmacéutica que se pueda emplear para el tratamiento de procesos clínicos que requieran la provocación de angiogénesis.

20 6. Utilización según la reivindicación 5 **caracterizada** porque el proceso clínico que requiere angiogénesis se selecciona de entre el grupo que consiste en: hipertensión, patologías vasculares periféricas que dependen de la diabetes, heridas, isquemia del músculo, isquemia cerebral, isquemia renal, isquemia intestinal, isquemia cardíaca o isquemia de las extremidades, patologías vasculares oclusivas u obstructivas graves, patologías vasculares periféricas, isquemia pericárdica, infarto de miocardio, enfermedades de las arterias coronarias, patologías vasculares cerebrales, patologías vasculares viscerales.

25 7. Utilización del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para dirigir moléculas o partículas, también víricas, hacia la integrina  $\alpha 5\beta 1$  *in vitro*.

30

35

40

45

50

55

60

65

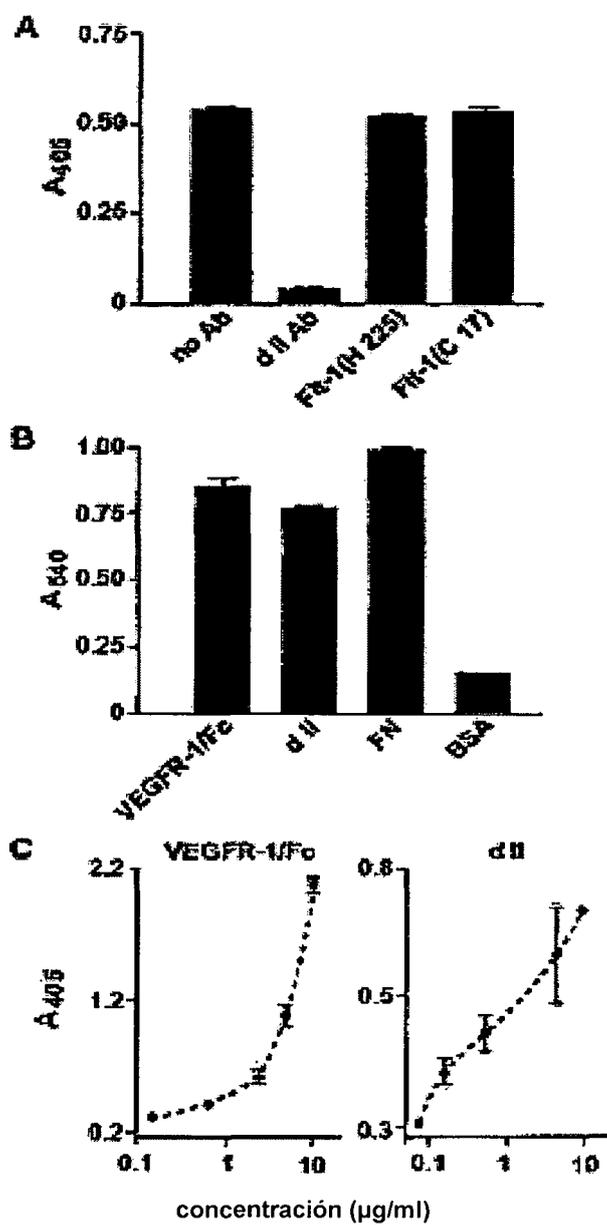


Fig. 1

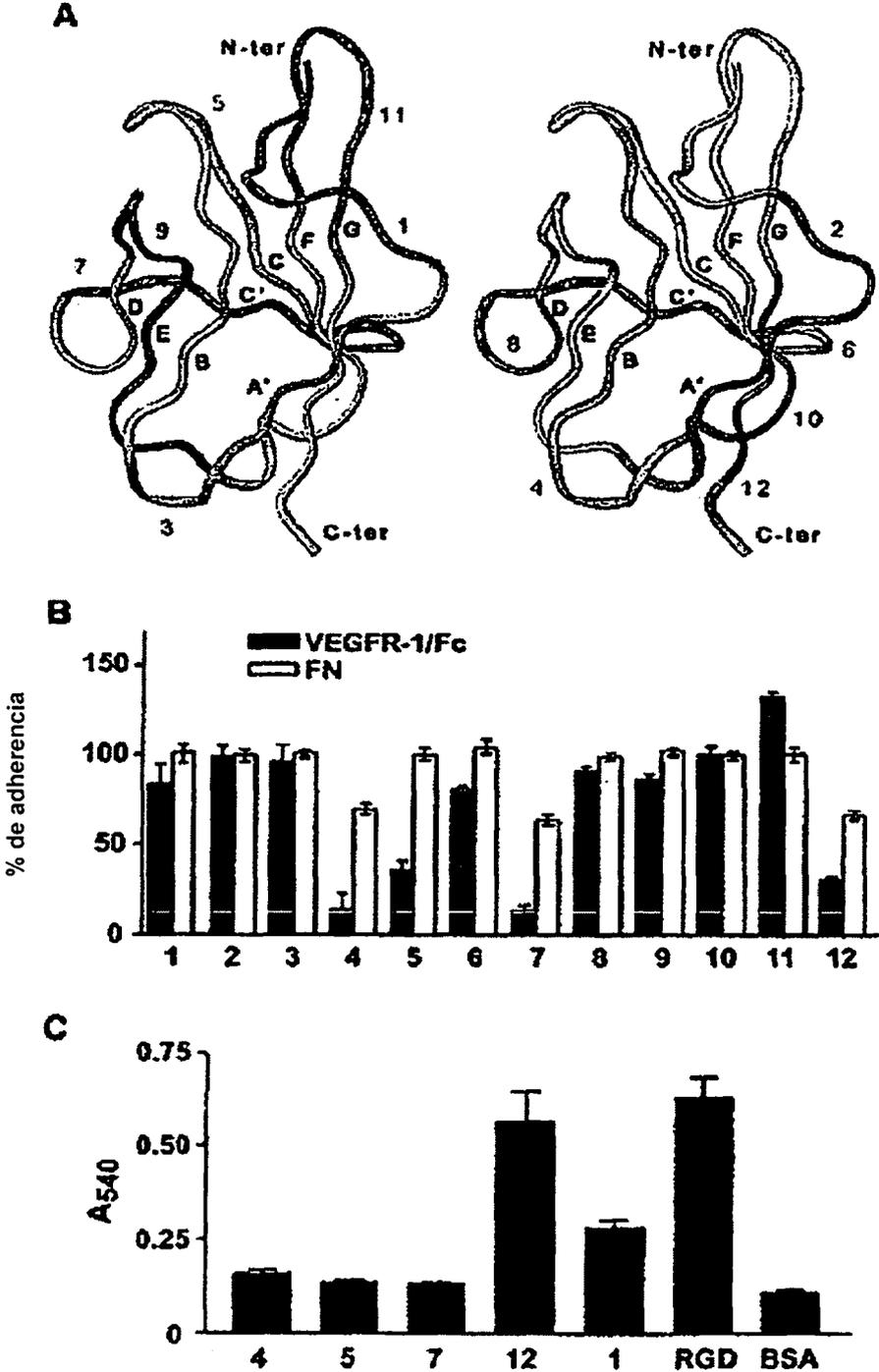


Fig. 2

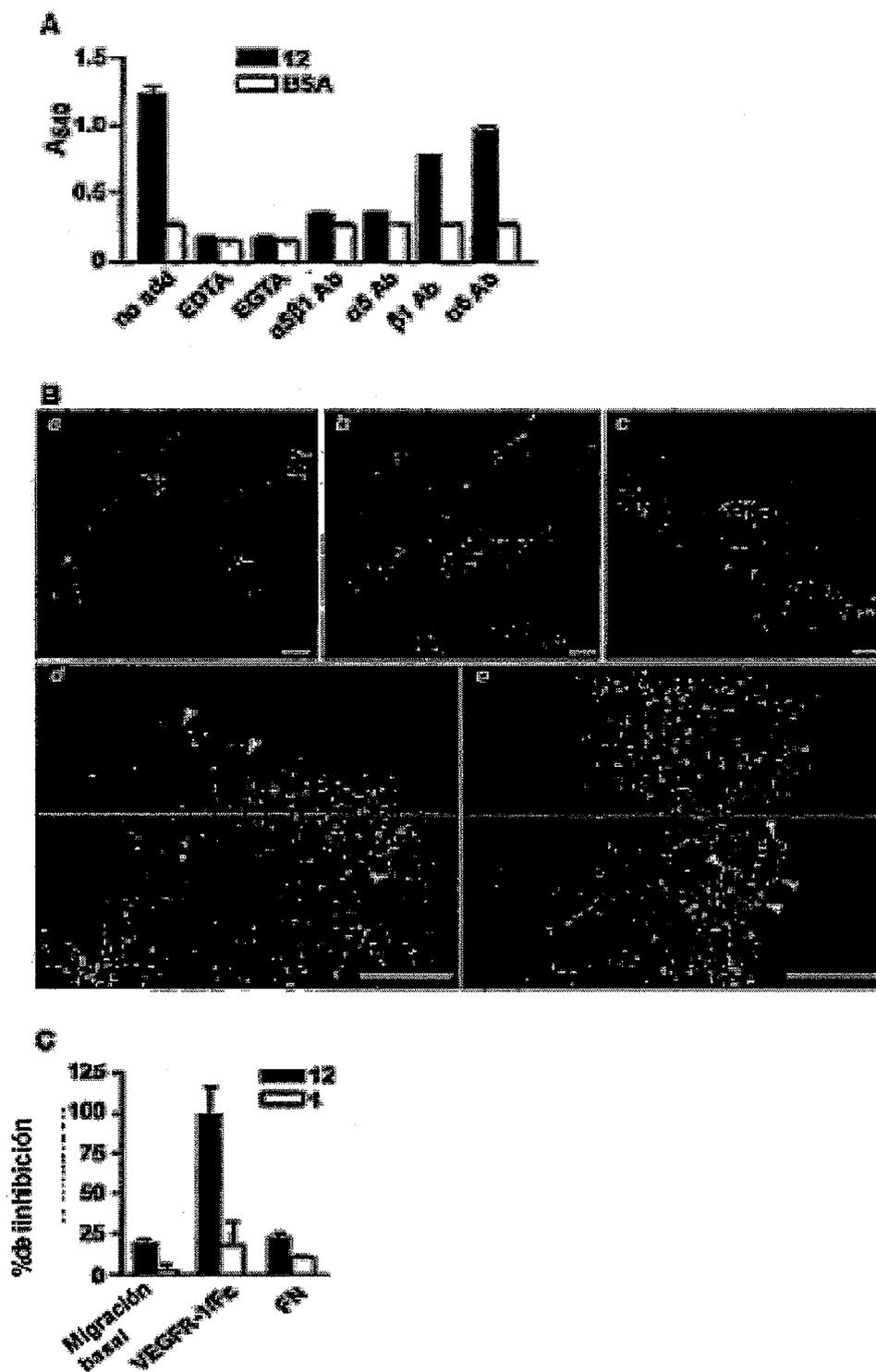


Fig. 3

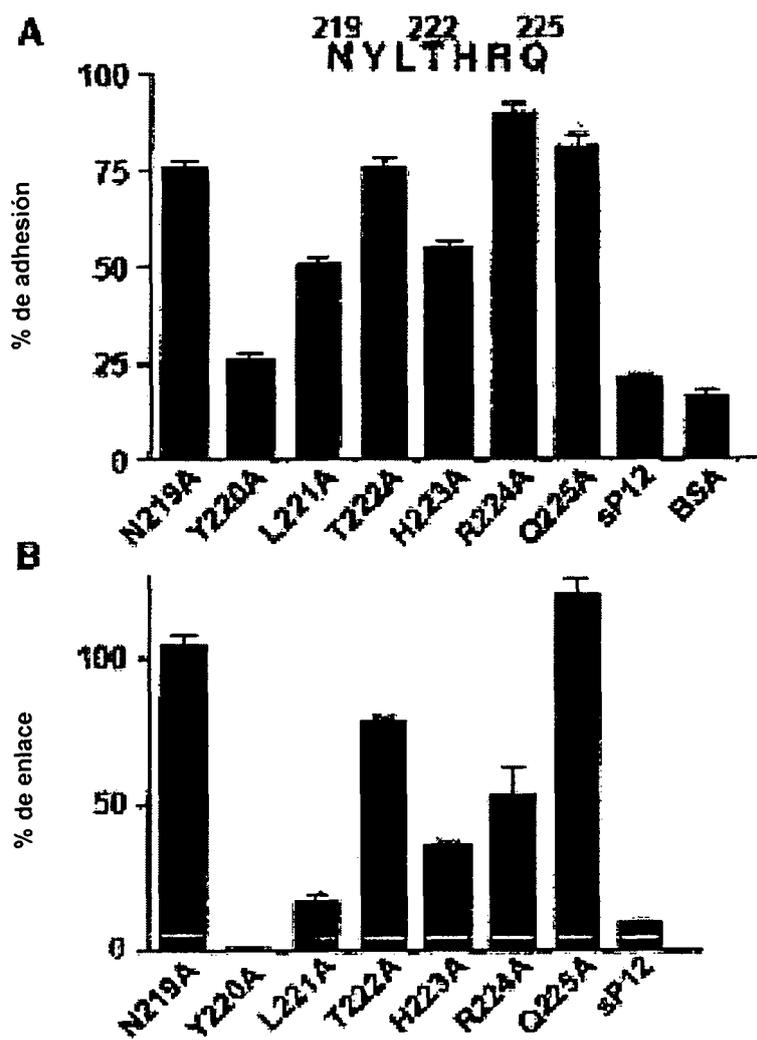
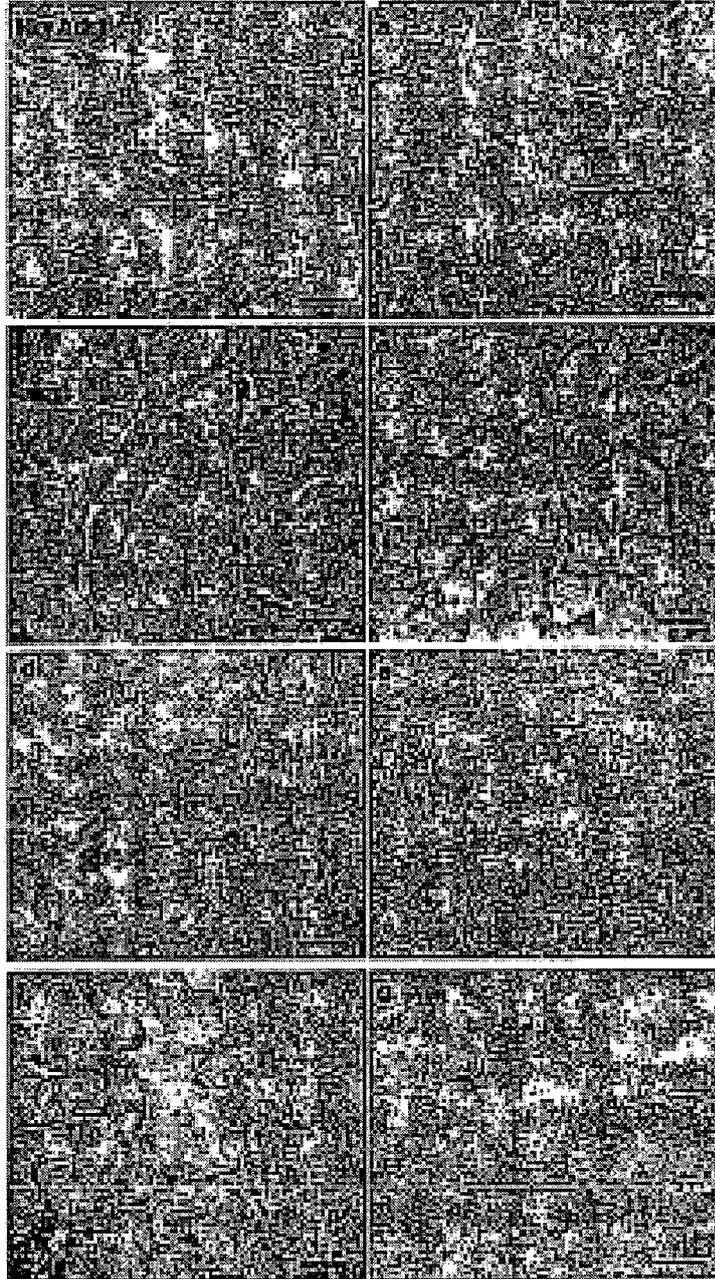


Fig. 4



**Fig.5**

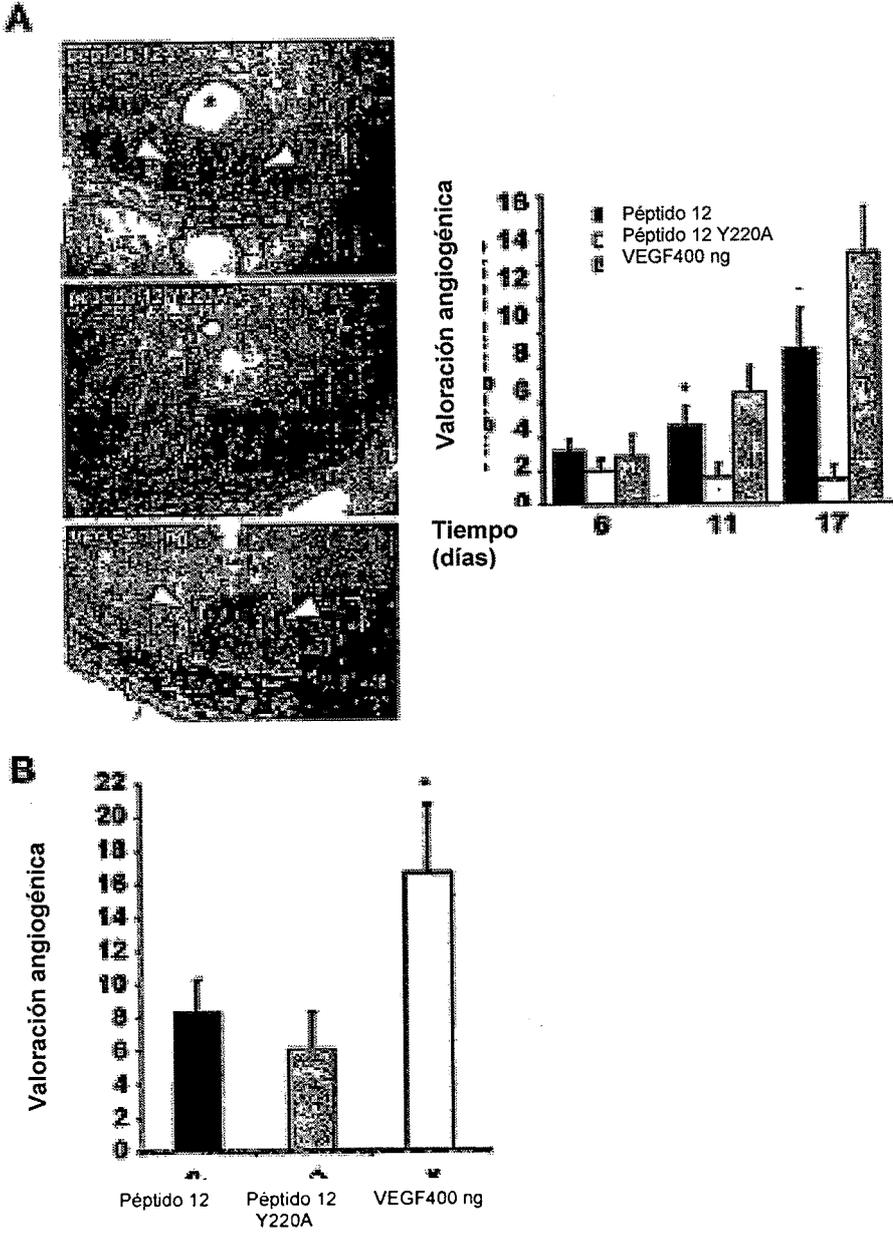
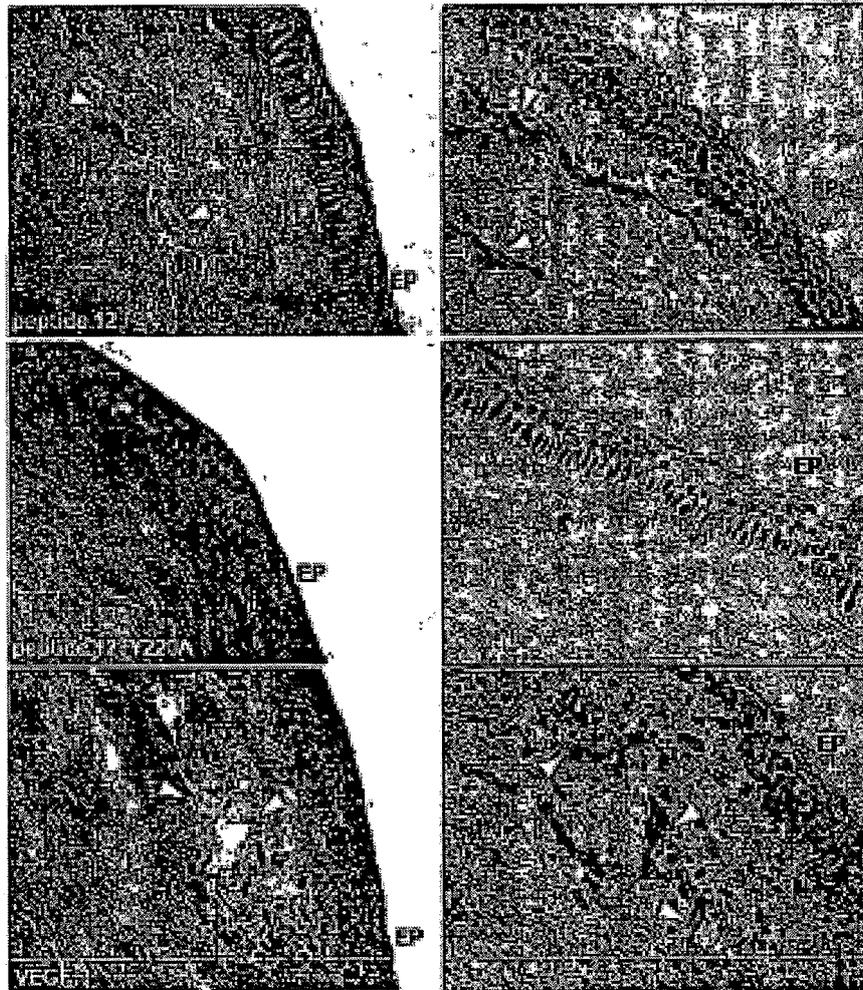


Fig. 6



**Fig. 7**