

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 275**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61L 29/16 (2006.01)

A61L 33/16 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2002 E 02707514 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **20.10.2004 EP 1467749**

54 Título: **Péptidos derivados de la trombina para estimular la reparación del tejido cardíaco**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2013

73 Titular/es:

CAPSTONE THERAPEUTICS CORP. (100.0%)
1275 West Washington Street
Tempe, AZ 85281, US

72 Inventor/es:

CARNEY, DARRELL H.

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 275 T3

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 [0001] La alfa-trombina humana parece tener actividad estimuladora de crecimiento para una amplia variedad de células de diversos tejidos. Por ejemplo, se ha mostrado que la alfa-trombina inicia la proliferación de células fibroblásticas en cultivo sin adición de suero u otros factores purificados de crecimiento, para tener un efecto sinérgico con el factor de crecimiento epidérmico en ciertos fibroblastos de hamster y células endoteliales humanas, para iniciar división celular o síntesis de ADN en células lenticulares epiteliales y del bazo y activar monocitos y neutrófilos. Sin embargo, el uso de trombina como factor de crecimiento y su potencial importancia para cicatrización de heridas no ha sido ampliamente aclamado. En parte, esto se debe a la complejidad de la implicación de la trombina con la coagulación, activación de plaquetas e iniciación de proliferación celular así como a la compleja regulación de moléculas de trombina y similares a trombina por inhibidores de proteasa de suero y por nexinas de proteasa liberadas por células. Esta complejidad y alto grado de regulación fisiológica, sin embargo, soporta la importancia potencial de esta ruta de iniciación en la cicatrización de heridas.

10 [0002] La trombina también puede jugar un papel tanto en la revascularización y migración normal de las células de la sangre a la zona de la lesión como en la metástasis y la angiogénesis anormal asociadas con tumores. La capacidad de la trombina para aumentar la proliferación de células endoteliales y alterar la función de barrera de los vasos sanguíneos puede contribuir a la angiogénesis y la inflamación en los sitios de lesión tisular.

15 [0003] Han sido descritos por los presentes inventores péptidos derivados de la trombina para la actividad agonista y antagonista de la trombina y / o del receptor de trombina, como en el tratamiento de heridas. La patente de Estados Unidos N° 5.500.412 o 5.352.664, el contenido de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Sin embargo, la patente no enseña el uso novedoso de los péptidos derivados de trombina para el tratamiento del tejido cardíaco dañado, para revascularización, o para la inhibición de la oclusión vascular y reestenosis.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 [0004] La invención se refiere a un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico para uso tal como se establece en la reivindicación 1 y la reivindicación 9. La invención también se refiere a un stent como se establece en la reivindicación 11 y el uso de la reivindicación 13. Otras realizaciones se establecen en las reivindicaciones 2 a 8, 10 y 12.

25 [0005] Equivalentes fisiológicamente funcionales de péptidos angiogénicos derivados de trombina están dentro del alcance de la invención. Estos péptidos están amidados en el extremo carboxilo con-C (O)-NH₂ o amidados según lo especificado y acetilados en el extremo amino. En realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 se representa como los siguientes equivalentes fisiológicamente funcionales: Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis -Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N° 4); o Ac-Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg -Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val- CONH₂ (SEC ID N° 6). ("Ac" es CH₃-C (O) -). El péptido que tiene la secuencia de SEC ID N° 4 también es referido aquí como "TP5O8".

30 [0006] El péptido preferentemente puede ser administrado durante o después de cirugía cardíaca, por ejemplo, por inyección directa o mediante catéter en el tejido cardíaco dañado o isquémico como un péptido soluble o en una formulación de liberación sostenida.

35 [0007] La invención también se refiere al uso del péptido para estimular la revascularización que comprende administrar al tejido cardíaco una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos angiogénicos derivados de trombina, como se describe en este documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 [0008] Las enfermedades cardiovasculares se caracterizan generalmente por un suministro deficiente de sangre al corazón u otros órganos de destino. El infarto de miocardio (MI) es resultado de estrechamiento o bloqueo de las arterias coronarias en el corazón que priva al corazón de nutrientes y el oxígeno necesarios. Cuando el suministro de sangre al corazón se ve comprometido, las células responden generando compuestos que inducen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos con el fin de aumentar el suministro de sangre al corazón. Estos nuevos vasos sanguíneos son llamados vasos sanguíneos colaterales. El proceso por el cual los vasos sanguíneos nuevos son inducidos a crecer fuera de los vasos existentes se denomina angiogénesis, y las sustancias que se producen por las células para inducir la angiogénesis son los factores angiogénicos.

45 [0009] Cuando el músculo cardíaco se ve privado de oxígeno y nutrientes debido a oclusión vascular, el tejido muscular del corazón se vuelve isquémico y pierde su capacidad de contraerse y funcionar. Esta pérdida de función puede ser restaurada por señales naturales del músculo cardíaco isquémico que inducen revascularización angiogénica a través del desarrollo de vasos colaterales que eluden la oclusión. Este revascularización o angiogénesis implica la estimulación de la proliferación de células endoteliales y la migración y gemación de nuevos vasos sanguíneos. En muchos casos, sin embargo, las señales naturales no son suficientes para causar el

crecimiento de vasos colaterales y el tejido isquémico puede hacerse fibrótico o necrótico. Si este proceso no se invierte mediante procedimientos para abrir los vasos ocluidos o inducción adicional de vasos sanguíneos colaterales, el corazón puede llegar a ser totalmente disfuncional y requerirse trasplante.

5 [0010] Los péptidos descritos aquí pueden ser empleados para inducir la proliferación angiogénica y la migración de células endoteliales que resulta en la formación de nuevos capilares y vasos colaterales para ayudar a restaurar la función al tejido cardíaco dañado o isquémico. Estos péptidos preferentemente pueden ser inyectados directamente en o aplicados al tejido cardíaco durante procedimientos a corazón abierto para cirugía de bypass o inserción de dispositivos de asistencia ventricular o entregados por inyección de catéter en el corazón como un péptido soluble o en una formulación de liberación sostenida.

10 [0011] La proliferación de células endoteliales, como la que ocurre en la angiogénesis, es también útil en la prevención o inhibición de la reestenosis tras angioplastia con balón. El procedimiento de angioplastia con balón a menudo lesiona las células endoteliales que revisten las paredes internas de los vasos sanguíneos y rompe la integridad de la pared del vaso. Las células musculares lisas y las células inflamatorias a menudo se infiltran en los vasos sanguíneos dañados causando una obstrucción secundaria en un proceso conocido como reestenosis. La estimulación de la proliferación y migración de las células endoteliales situadas en la periferia de la zona dañada inducida por balón con el fin de cubrir la superficie luminal del vaso con una nueva monocapa de células endoteliales restauraría potencialmente la estructura original del vaso sanguíneo.

15 [0012] Preferiblemente, la endotelialización comprende re-endotelialización después de la angioplastia, para reducir, inhibir o evitar la reestenosis. Los expertos en la materia reconocen que los pacientes tratados con los péptidos de la invención puede ser tratados con o sin stent.

20 [0013] Un catéter con balón inflable con péptido recubriendo el balón o un catéter que inyecta directamente el péptido en la pared del vaso se puede también emplear para entregar la sustancia a una arteria de destino.

25 [0014] La angioplastia con balón es un tratamiento común de la cardiopatía isquémica que implica el inflado de un balón en un vaso sanguíneo obstruido con el fin de abrir el vaso sanguíneo bloqueado. Por desgracia, este método de tratamiento provoca lesión a las células endoteliales que revisten las paredes internas de los vasos sanguíneos a menudo conduciendo a la reestenosis. Los péptidos descritos en este documento pueden ser empleados para inducir proliferación y migración de las células endoteliales situadas en la periferia de la zona dañada inducida por balón con el fin de cubrir la superficie luminal del vaso con una nueva monocapa de células endoteliales, con la esperanza de restaurar la estructura original de los vasos sanguíneos. La angioplastia coronaria se acompaña con frecuencia de despliegue de un stent intravascular para mantener la función de los vasos y evitar la reestenosis. Los stents se han recubierto con heparina para prevenir la trombosis hasta que el nuevo canal formado por el stent puede endotelializar. Los péptidos descritos en este documento pueden ser aplicados directamente al stent, utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. Los péptidos pueden ser aplicados localmente o administrados por vía sistémica para mejorar la endotelización del vaso o pared del vaso y /

30 o para modular otros procesos para inhibir o reducir la trombosis y la reestenosis.

35 [0015] La presente invención emplea preferiblemente polipéptidos sintéticos o naturalmente derivados agonistas de sucesos mediados por el receptor de trombina. Estas dos clases de agentes poseen un dominio de unión del receptor de trombina que incluye un segmento del polipéptido que es capaz de unirse selectivamente al receptor de trombina de alta afinidad. Este segmento del polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos homóloga a un dominio de unión de células tripéptido de fibronectina.

40 [0016] Además del dominio de unión del receptor de trombina, los polipéptidos estimulantes (agonistas) poseen una secuencia de aminoácidos que tiene secuencias derivadas de los aminoácidos N-terminal de un dodecapéptido que ha demostrado previamente ser altamente conservado entre proteasas de serina. Sin embargo, los polipéptidos inhibidores no incluyen estas secuencias conservadas en serin esterasa.

45 [0017] Por ejemplo, la invención proporciona un número de polipéptidos útiles para promover la reparación del tejido cardíaco. Para tales aplicaciones, la invención proporciona un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico que tiene un dominio de unión del receptor de trombina, así como un dominio con una secuencia conservada en serin esterasa de al menos 12 aminoácidos. La invención también proporciona un compuesto polipéptido de al menos 23 L-aminoácidos, que tiene tanto un dominio de unión del receptor de trombina como un dominio con una secuencia de aminoácidos conservada en serin esterasa. Los péptidos utilizados en los métodos descritos en este documento suelen tener entre 12 y 33 aminoácidos, preferiblemente entre 12 y 23.

50 [0018] La invención proporciona varios polipéptidos que contienen secuencias específicas de aminoácidos, tal como un compuesto polipéptido en el que el dominio de unión del receptor de trombina incluye la secuencia de L-aminoácidos Arg-Gli Asp-Ala (SEC ID N ° 1) junto con la secuencia de aminoácidos conservada en serin esterasa, Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val (SEC ID N ° 2). En una realización preferida, el compuesto polipéptido incluye la secuencia de L-aminoácidos Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser -Gli-Gli-Pro-Fen-Val (SEC ID N ° 3).

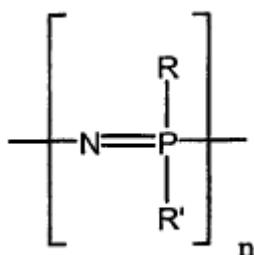
[0019] Los equivalentes fisiológicamente funcionales de derivados angiogénicos de trombina están amidados en el extremo carboxilo con-C (O)-NH₂ o amidados como especificado y acetilados en el extremo amino. En realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 3 se representa como los siguientes equivalentes fisiológicamente funcionales: Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro - Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N° 4.), Ac-Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val (SEC ID N° 5) o Ac-Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Glu Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N° 6). ("Ac" es CH₃-C (O) -). El péptido que tiene la secuencia de SEC ID N° 4 también se conoce aquí como "TP508".

[0020] La invención también proporciona una composición farmacéutica para promover la reparación de tejidos que incluye una concentración terapéuticamente efectiva de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente combinado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, tales composiciones incluyen, por ejemplo, concentraciones suficientes de los polipéptidos para efectuar una acción estimulante sobre el receptor de la trombina como aquí se demuestra. Por lo tanto, dichas composiciones deberían normalmente incluir concentraciones suficientes para obtener niveles de los polipéptidos en el sitio de destino que han demostrado in vitro que estimulan el receptor. Cuando se cree que los niveles endógenos de una señal secundaria son inadecuados, pueden empleadas composiciones que incluyen además la adición de una concentración terapéuticamente eficaz de VEGF, alfa-trombina, gammatrombina u otros factores de crecimiento. Estas combinaciones pueden ejercer un efecto aditivo o sinérgico. En algunos casos, si el daño del tejido es tan extenso que no están presentes las células capaces de responder a los polipéptidos en cantidades suficientes, se espera que las células sensibles podrían ser co-inyectadas para proporcionar una combinación terapéutica eficaz.

[0021] Vehículos adecuados también aseguran la liberación del principio activo y preferiblemente para una liberación lenta, sostenida en el tiempo en el lugar de destino. Una serie de polímeros sintéticos biodegradables pueden servir como vehículos con características de liberación sostenida. Ejemplos de estos polímeros incluyen poli (hidroxi ésteres) tales como homopolímeros y copolímeros de ácido poliláctico / poliglicólico, polifosfacenos (PPHOS), polianhídridos y poli (propileno fumaratos).

[0022] Homo y copolímeros de ácido poliláctico / ácido poliglicólico (PLGA) son bien conocidos en la técnica como vehículos de liberación sostenida. El ritmo de liberación puede ser ajustado por el experto en la materia por variación de la relación ácido poliláctico a ácido poliglicólico y el peso molecular del polímero (ver Anderson, et al., Adv. Drugs Deliv. Rev. 28:5 (1997), todas cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia). La incorporación de poli (etilenglicol) en el polímero como una mezcla para formar portadores de micropartículas permite la atenuación adicional del perfil de liberación del principio activo (ver Cleek et al., J. Control Release 48:259 (1997), todas cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia). Las micropartículas PGLA se mezclan a menudo con geles plurónicos o colágeno para evitar la agregación y hacer las micropartículas adecuadas para inyección directa.

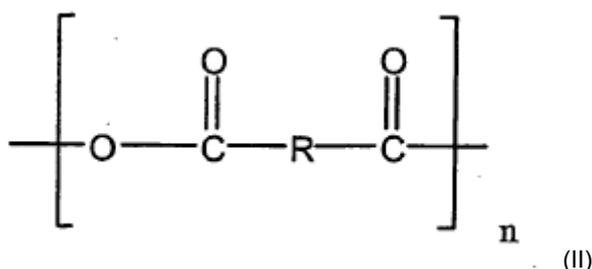
[0023] Los polímeros PPHOS contienen nitrógeno y fósforo alternos sin carbono en el esqueleto del polímero, como se muestra a continuación en la Fórmula estructural (I):



(I)

[0024] Las propiedades del polímero pueden ser ajustadas por la variación adecuada de las cadenas laterales R y R' que están unidas al esqueleto del polímero. Por ejemplo, la degradación de y liberación de fármacos por PPHOS puede ser controlada variando la cantidad de cadenas laterales hidrolíticamente inestables. Con una mayor incorporación de cualquiera de PPHOS sustituido con imidazolil o etilglicinato, por ejemplo, se observa un aumento del ritmo de degradación (ver Laurencin et al, JBiomed Mater Res 27: 963 (1993), todas cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia), por lo que aumenta el ritmo de liberación de fármaco.

[0025] Los polianhídridos, mostrados en la Fórmula estructural (II), tienen características bien definidas de degradación y liberación que pueden ser controladas mediante la inclusión de distintas cantidades de monómeros hidrófobos o hidrófilos, como el ácido sebácico y el 1,3-bis (p-carboxifenoxi) propano (ver Leong et al., J. Biomed. Mater. Res. 19:941 (1985), todas cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia).



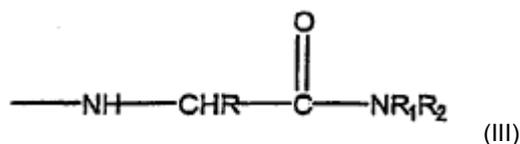
[0026] Los poli (propileno fumaratos) (PPF) son portadores implantables biocompatibles altamente deseables debido a que son un material biodegradable inyectable, polimerizable in situ. "inyectable" significa que el material se puede inyectar con una jeringa mediante una aguja estándar utilizada para la inyección de pastas y geles. PPF, combinado con un vinilo monómero (N- vinilpirrolidiona) y un iniciador (peróxido de benzoilo), forma una solución inyectable que se puede polimerizar in situ (ver Suggs et al. *Macromolecules* 30:4318 (1997), Peter et al. 01:41, *J. Biomater. Sci. Poly.*, Ed. 10:363 (1999) y Yaszemski et al., *Tissue Eng.* (1995)).

[0027] Como se usa aquí, una concentración terapéuticamente efectiva se define como una concentración del agente particular que proporciona un aumento satisfactorio en el ritmo de reparación o angiogénesis, o que proporciona una reducción o inhibición satisfactoria de la reestenosis u oclusión vascular. Una vez más, se cree que estas concentraciones corresponden a niveles suficientes para provocar una estimulación del receptor de trombina de alta afinidad in vitro. Sin embargo, se cree que las composiciones resultarán más eficaces cuando los polipéptidos estimulantes (agonistas) están presentes en una concentración de 0,1 μM a 10 μM .

[0028] A los efectos de la presente invención, un derivado de la trombina se define como cualquier molécula con una secuencia de aminoácidos derivada al menos en parte de la de la trombina, ya sea sintetizada in vivo o in vitro. En consecuencia, un derivado de la trombina, como se refiere aquí, designa una molécula de polipéptido que comprende menos aminoácidos que la trombina.

[0029] Un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina incluye moléculas que difieren de los péptidos derivados de trombina en detalles que no afectan la función del dominio de unión del receptor de trombina o la secuencia de aminoácidos conservada serin esterasa. Tales detalles adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones y modificaciones conservadoras de aminoácidos, por ejemplo, acetilación del término amino, conjugación del polipéptido a una molécula portadora fisiológicamente inerte, o alteraciones en la secuencia de conformidad con las secuencias conservadas serin esterasa.

[0030] La amidación del carboxilo terminal se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Así, el aminoácido C-terminal se representa en la Fórmula estructural (III):



donde R es la cadena lateral de aminoácido, y R_1 y R_2 son H.

[0031] La acetilación del amino terminal se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Así, el aminoácido N-terminal está representado en la Fórmula estructural (IV):



donde R es la cadena lateral de aminoácido, y R_1 es un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ (cadena ramificada y recta). R es preferiblemente metilo ($-\text{CH}_3$).

[0032] Un dominio de unión del receptor de trombina se define como una secuencia de polipéptido que se une directamente al receptor de trombina y / o inhibe competitivamente la unión entre los receptores de alta afinidad de la trombina y la trombina alfa.

[0033] Un dominio que tiene una secuencia conservada serin esterasa comprende una secuencia de polipéptido que contiene al menos 4.12 de los aminoácidos N-terminal del dodecapéptido que previamente ha mostrado ser altamente conservado entre serin proteasas (Asp- X_1 -Cis - X_2 -Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro- X_3 -Val- SEC ID N ° 7), en donde X_1 es o Ala o Ser, X_2 es Glu o Gln, y X_3 es Fen, Met, Leu, His, o Val).

[0034] Un polipéptido estimulante se define como un derivado polipéptido de la trombina, o un equivalente fisiológicamente funcional del mismo que tiene la capacidad de a la vez ligar y estimular el receptor de trombina. Por

lo tanto, los péptidos estimulantes incluirá tanto un dominio de unión del receptor de trombina como un dominio con una secuencia de aminoácidos conservada serin esterasa.

[0035] La invención se ilustra con los ejemplos siguientes, que no tienen la intención de ser limitantes en manera alguna.

5 EJEMPLIFICACIÓN

Ejemplo 1 TP508 Estimula la proliferación y migración de células endoteliales humanas in vitro

[0036] Para determinar si TP508 podría inducir directamente la proliferación de células endoteliales, se adquirieron células endoteliales microvasculares de Clonetics, se colocaron sobre plástico de grado de cultivo de tejidos en placas de cultivo de 24 pocillos y se privaron de suero durante 24 horas. Las células fueron estimuladas en un medio con o sin TP508 durante 48 horas, en cuyo momento se evaluó la proliferación en el tiempo mediante un recuento directo de células. TP508 estimuló la proliferación de células endoteliales microvasculares en un 30 a un 50% más de las tratadas sólo en medio (1,0 µg / ml de TP508). Este efecto parece ser específico ya que el crecimiento de células musculares lisas aisladas de aorta de rata no se vió afectado por TP 508.

[0037] Los efectos de TP503 sobre la migración de células endoteliales humanas se evaluó mediante un ensayo de herida monocapa in vitro en el cual las células endoteliales se colocaron en platos de cultivo de 3 5 mm y se dejaron crecer a cerca de la confluencia durante tres días, momento en el que la monocapa fue "herida "raspando en el centro del plato con una varilla de policía para eliminar un grupo de células. Se tomaron fotografías en este punto, y las células fueron luego tratadas con medio fresco solamente o medio que contenía diferentes concentraciones de TP508 y se dejaron crecer durante 48 horas. Las células fueron re-fotografiadas, y fue medida la distancia que migraron las células endoteliales a la zona de la herida. El TP508 estimuló la migración de células endoteliales, incluso cuando las células fueron cultivadas sobre plástico solamente.

[0038] Estos estudios demostraron que TP508 tiene efectos angiogénicos directos en las células endoteliales humanas que causan aumento de la proliferación y migración in vitro: Estudios adicionales indican que la exposición de las células endoteliales a TP508 tiene un efecto protector para evitar la muerte de las células causada por exposición oxidativa. Este efecto protector puede también contribuir a procesos de re-endotelización y angiogénesis.

Ejemplo 2 TP508 Estimula la Angiogénesis In Vitro en un Modelo de Membrana Corioalantoidea

[0039] Los estudios con incisiones cutáneas quirúrgicas completas y heridas abiertas por escisión en espaldas de ratas mostraron que una única aplicación tópica de TP508 estimula la revascularización y la permeabilidad de los vasos sanguíneos que atraviesan una incisión quirúrgica. Dos heridas por incisión quirúrgica se realizaron en la espalda de una rata Una herida fue tratada con una sola aplicación de TP508 (0,1 Pg), y la otra no fue tratada. Fueron atraídos vasos sanguíneos a la herida tratada en lugar de al control.

[0040] La adición de TP508 a discos de agar colocados en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo dio lugar a un desarrollo angiogénico de vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos se estimularon para crecer en discos de agar conteniendo TP508. También hubo un aumento en desarrollo de vasos colaterales en vasos distales al tapón similar al observado con otros factores angiogénicos.

Ejemplo 3 TP508 Mostró una Eficacia en el Tratamiento de la Isquemia Miocárdica en un Modelo Porcino.

[0041] Mini cerdos de Yucatán tenían oclusores ameroides en forma de toroide colocado en sus arterias circunflejas izquierda proximales. El ameroide agua embebió con el tiempo, causando constricción del vaso. La oclusión se verificó cuatro semanas después de la cirugía por angiografía de contraste mejorado. En ese momento, se volvió a abrir el pecho de cada animal, después de lo cual se inyectó la región de isquemia con una formulación de liberación lenta de TP508, es decir, microesferas PGLA conteniendo TP508, suspendidas en un gel Pluronic. Las microesferas de PLGA, que se prepararon como se describe en el Ejemplo 6, dieron una liberación súbita inicial de medicamento (50% de la carga en 24 horas) y luego desplegaron una liberación controlada durante otros 3-4 días, momento en el cual el 80% de la carga había sido liberada. El gel utilizado fue de 30% p / v de Pluronic F68 en 0,9% de solución salina. Para cada mililitro de gel, en hielo para reducir la viscosidad, se agregaron 3.3 mg de microesferas de PLGA inmediatamente antes de la inyección. Esto dio una dosis de TP508 de 100 µg/ml de gel, que se inyectó en diez sitios (100 µl por sitio) en la zona isquémica. Los controles recibieron microesferas de PLGA en gel Pluronic sin TP508. Fueron obtenidas la línea de base, y angiografías y ecocardiogramas post-tratamiento.

[0042] Los índices de engrosamiento de la pared del miocardio y fracción de eyección cardíaca mostraron tendencias de que animales tratados con TP508 toleraban el estrés inducido por dobutamina mejor que los controles. Después de tres semanas, los animales fueron evaluados con ecocardiografía de contraste mejorado. Los resultados iniciales de este número limitado de animales demostraron que los animales tratados con TP508 bajo estrés con dobutamina tuvieron un incremento ligeramente mayor en la fracción de eyección y engrosamiento de la pared mejor mantenido en comparación con los controles. Por lo tanto, este tratamiento parece ayudar a restaurar la funcionalidad del músculo cardíaco isquémico.

Ejemplo 4 TP508 Estimula la Revascularización Miocárdica en un Modelo de Conejo

[0043] TP508, formulado en microesferas PLGA de liberación sostenida, se inyectó en el miocardio isquémico de conejo. Un oclisor ameroide fue colocado sobre la división lateral de la arteria coronaria izquierda principal de dos conejos justo por debajo del surco A-V, como se describe en Operschall et al., J. Appl. Physiol. 88:1438 (2000). Dos semanas después de la colocación, los pechos de los animales fueron reabiertos. En un animal, se inyectaron microesferas TP508 en gel plurónico (como se describe en el ejemplo 3) en ocho lugares discretos en el interior, y alrededor, del área servida por el vaso ocluido. El otro animal sirvió como un control no tratado. Aproximadamente cuatro semanas después de la inyección, los animales fueron sacrificados y sus corazones fijados en formalina tamponada al 10% durante 24 horas. Los corazones fueron seccionados a continuación por el área de interés y se tiñeron con hematoxilina-eosina e inmuno etiquetados contra el Factor Von Willebrand (VWF), un marcador de células endoteliales.

[0044] La histología demostró que el animal de control tenía fibrosis significativa en el área servida por el oclisor. El corazón tratado con TP508, por el contrario, tenía miocardio aparentemente sano con un mayor número de capilares funcionales con glóbulos rojos evidentes.

Ejemplo 5 TP508 Suprime la Reestenosis en un Modelo de Conejo Hipercolesterolémico

[0045] Este procedimiento fue diseñado para proporcionar un sistema para probar la eficacia de una Muestra de Ensayo para inhibir la formación de la neointima y la oclusión vascular después de la angioplastia en Conejos Blancos de Nueva Zelanda hipercolesterolémicos. Los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasa consistente de colesterol 0.5% y 2.0% de aceite de cacahuete durante 3 semanas. Los animales fueron pretratados 24 horas antes de la cirugía, la arteria ilíaca fue lesionada con angioplastia con balón como se ha descrito, y los animales fueron tratados con TP-508 durante 7 días. Los animales se mantuvieron en una dieta alta en grasas durante 4 semanas. La angiografía se realizó antes de la angioplastia con balón y a la terminación del experimento. Las arterias ilíacas lesionadas y no lesionadas fueron recogidas y preparadas para histología. Se hicieron medidas morfométricas del lumen, la neointima (si existe), y la túnica media.

[0046] Las muestras de ensayo de TP-508 fueron disueltas/diluidas en una solución salina estéril libre de pirógenos a la concentración deseada y administradas por inyección intravenosa en un volumen de 0,2 ml un día antes de la cirugía, el día de la cirugía, y durante los sucesivos 6 días después de la cirugía.

[0047] Se hizo una incisión de 5 cm en la línea media del cuello y se expuso la carótida derecha, se ligó proximalmente, y se cortó. Luego se introdujo un catéter angiográfico con balón 4 P. Berman en la aorta. Una vaina 5 Fr se introdujo en la aorta mediante el catéter angiográfico con balón 4 P. Berman. Tres ml de sangre se recogieron para recuento de colesterol. El conejo se inyectó después con heparina y más anestésicos (si es necesario). Para visualizar las arterias ilíacas, se inyectaron 6 ml de Hypaque 76% mezclado con 4 ml de solución salina estéril a través del catéter. Fue obtenida proyección de imagen de las arterias ilíacas (imagen está marcada con rejilla y las tijeras se colocan en el lado derecho). El catéter angiográfico con balón 4 P. Berman fue retirado de la vaina. A continuación se insertó un catéter de balón 0,014 "/ 3,0 mm x 20,0 mm/120cm a través de la vaina en la aorta y a la arteria ilíaca. El balón se infló 3 veces a 10 atm durante 30 segundos con intervalos de 1 minuto. El catéter y la vaina se retiraron luego. La arteria carótida derecha, se ligó con suturas de seda 3.0. La incisión en el cuello se cerró con PDS y la piel grapó y recubrió con un ungüento antibiótico doble.

[0048] Se administraron luego al conejo la(s) muestra(s) de ensayo o la(s) muestra(s) de control. La muestra de ensayo se diluyó de la siguiente manera: se introdujeron 0,3 ml de solución salina en una jeringa de 1,0 ml con una aguja 23 G 1". El volumen se inyecta en el vial de TP-508. Después de que se disolvió el TP-508, se retiraron y se administraron 0,25 ml de la solución. El tubo de canulación se lavó con solución salina a continuación. Si el conejo era un control, se inyectaron 0,2 ml de solución salina y se lavaron con solución salina adicional. El conejo también recibió 0,3 ml de buprenorfina por inyección subcutánea.

[0049] Después de la cirugía, se dio tiempo al conejo volver a estar alerta mientras descansaba sobre la almohadilla eléctrica. El conejo fue devuelto a su jaula y se le dejó comida y agua ad libitum. Los conejos se mantuvieron en la dieta durante 4 semanas adicionales hasta el sacrificio.

[0050] Cuatro semanas después del procedimiento, las dos arterias ilíacas se fijaron in situ, se recogieron y prepararon para la histología. Fueron entonces capturadas imágenes digitales de la serie de secciones histológicas espaciadas entre sí aproximadamente un milímetro y se realizaron mediciones morfométricas del lumen, la neointima (si existe) y la túnica media en toda la región de la lesión.

Resumen Histológico

[0051] Se realizaron análisis histomorfos de 19 muestras utilizando software Image-Pro Plus y Excel. De las 19 muestras, 2 demostraron compromiso de la lámina elástica externa. Una muestra de las 19 parecía exigir corte adicional. Por lo tanto, fueron comparadas 16 muestras comprendiendo 7 tratadas y 9 controles de solución salina.

[0052] El espesor de la lesión reestenótica se determinó midiendo el área de la neointima mediante análisis digital. La túnica media de los vasos se midió de forma similar. Estos valores se normalizaron luego sumando el área de estas dos regiones y dividiendo ese resultado por el área de una media normal (sin lesión) encontrado dentro de la misma serie de diapositivas histológicas. Se verificó que no hubo diferencias significativas entre grupos en las áreas encontradas para las medias no lesionadas.

[0053] Al comparar los animales tratados respecto a los controles, el grado de reestenosis fue analizado a través de tres métodos distintos: el método "peor valor único", el método "espesor medio de lesión" y el método "promedio de todas las secciones". El método "peor valor único" compara el valor máximo de reestenosis obtenido entre los vasos operados. El método "espesor medio de lesión" compara los promedios de todos los puntos anormales en una región bien definida de lesión entre los vasos operados. Por último, el método "promedio de todas las secciones" compara el espesor promedio de todas las muestras medidas, independientemente de si parecían o no ser parte de la lesión. Las medias de estos resultados se comprobaron en cuanto a significado estadístico por la T de Student.

Resumen de Datos

[0054] Todos los análisis de datos se completaron con la prueba t de dos colas suponiendo varianzas desiguales. Alfa es 0,05 y la diferencia media se supone que es 0. Cada análisis incluye n = 7 para tratados y n = 9 para control de solución salina. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 1. El valor "diferencia" mostrado se refiere a la variación porcentual del tratado en comparación con el control correspondiente. Los valores señalados con un asterisco fueron estadísticamente significativos.

Tabla 1

Técnica:	Peor Valor Único			Espesor Medio de Lesión			Promedio Todas las Secciones		
Área Medida:	Tratada	Control	Dif.	Tratada	Control	Dif.	Tratada	Control	Dif.
Neointima	.202	.332	-39%*	.158	.245	-36%	.117	.185	-37%*
Media	.113	.133	-15%*	.123	.152	-19%	.116	.140	-17%*
Neo + Media/ Media no Lesionada	4.56	7.73	-41%*	4.18	5.87	-29%*	3.49	5.55	-37%*

Conclusión

[0055] Los datos muestran que el TP-508 suprimió de forma significativa la reestenosis y la oclusión vascular en el modelo de conejo hipercolesterolémico. Este resultado es robusto, ya que es independiente de la técnica elegida para cuantificar los resultados.

Ejemplo 6 Preparación de Microesferas de Copolímero de Ácido Poliláctico / Ácido Poliglicólico de TP508

[0056] Una técnica de doble emulsión se utilizó para preparar microesferas de copolímero de ácido poliláctico / ácido poliglicólico (PLA / PGA) conteniendo TP508. En resumen, los componentes de la matriz se disolvieron en cloruro de metileno y TP508 se disolvió en agua. Los dos fueron mezclados gradualmente juntos, mientras se revolvió para formar una emulsión de agua en aceite (W / O). Se añadió alcohol polivinílico (0,3% en agua) a la emulsión con más agitación para formar la segunda emulsión (O / W), formar por ello una emulsión doble: una emulsión O / W compuesta por gotas PLA / PGA, y dentro de esas gotas, una segunda fase dispersa consistiendo de TP508 en agua. Tras la separación de fases, las gotitas de PLA / PGA formaron cavidades discretas conteniendo microesferas que tenían TP508. Para dar lugar a la separación de fases de las microesferas, se añadió una solución al 2% de alcohol isopropílico. Las partículas se recogieron por centrifugación, y luego se liofilizaron para eliminar la humedad residual. La composición de la matriz se varió para formar microesferas con diferentes cinéticas de liberación (Tabla 2).

Tabla 2: Composición de diferentes formulaciones de microesferas

Formulación	PLA-PGA	Polímero M. P.	% TP508	% polietilenglicol
A	50:50	46.700	5	0
B	50:50	7.200	5	0

C	50:50	46.700	5	5
D	50:50	46.700	5	0
E	75:25	120.000	5	0

[0057] El diámetro medio de las microesferas se midió en un contador Coulter y la eficiencia de la captura del fármaco se midió mediante un ensayo espectrofotométrico a 276 nm tras la disolución de una muestra ponderada de microesferas en cloruro de metileno y extracción del fármaco liberado en agua (Tabla 3).

5 Tabla 3: Diámetro de formulación y eficiencia de captura

Formulación	Diámetro, μm	Captura TP508, %
A	26.0	53.8
B	16.2	27.1
C	17.6	58.9
D	23.9	42.6
E	25.8	36.2

10 [0058] Para medir la liberación de TP508 de las diferentes matrices PLA / PGA, 20 mg de microesferas se colocaron en 1,0 ml de PBS contenido en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml. Los tubos se incubaron a 37°C y se agitaron a 60 rpm. En varios momentos, los tubos fueron centrifugados y el sobrenadante conteniendo TP508 liberado fue retirado y congelado para posterior análisis. Se añadió PBS nuevo a las microesferas y se continuó la incubación. Se midió al TP508 en el sobrenadante por absorbancia a 276 nm. Para cada formulación, se realizaron determinaciones cuadruplicadas de liberación. Las formulaciones B y D no mostraron liberación detectable de fármaco durante 28 días de incubación a 37°C. Todas las formulaciones restantes liberaron cantidades detectables de TP508, aunque en todos los casos la cantidad de fármaco liberado cayó por debajo de los límites detectables (<1 μg / mg matriz / día) en 3-4 días. Las formulaciones A y C mostraron la mayor liberación de TP508, liberando 60-80% del fármaco capturado en 3-4 días. La formulación con la cinética de liberación más rápida, C, fue elegida para realizar más ensayos en estudios in vivo descritos en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico para uso en promover reparación de tejido cardíaco, en donde el equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico comprende un dominio de unión del receptor de trombina que tiene la secuencia Arg-Gli-Asp-Ala (SEC ID N° 1), y una secuencia conservada serin esterasa, y en donde dicho equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico es o C-amidado con -C(O)-NH₂, o C amidado con -C(O)-NH₂ y N -acetilado.
- 10 2. Equivalente peptídico para uso en promover reparación de tejido cardíaco, según la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos: Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val (SEC ID N° 3).
3. Equivalente peptídico para uso en promover reparación de tejido cardíaco, según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli Gli-Pro-Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N ° 4).
- 15 4. Equivalente peptídico para uso en promover reparación de tejido cardíaco, según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos Ac-Ala-Gli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N ° 6.)
5. Equivalente peptídico para uso en promover reparación de tejido cardíaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es para administración durante o después de la cirugía cardíaca.
- 20 6. Equivalente peptídico para uso en promover reparación de tejido cardíaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es para administración por inyección en el tejido cardíaco.
7. Equivalente peptídico para uso en promover reparación de tejido cardíaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la forma de una formulación de liberación sostenida para administración en el tejido cardíaco.
- 25 8. Equivalente péptido para uso en promover reparación de tejido cardíaco según la reivindicación 7 en donde la formulación de liberación sostenida es micropartículas de ácido poliláctico / ácido poliglicólico que comprende el equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico.
- 30 9. Un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico para uso en la estimulación de la revascularización del tejido cardíaco, en donde dicho equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico comprende un dominio de unión del receptor de trombina que tiene la secuencia Arg-Gli-Asp-Ala (SEC ID N° 1), y una consecuencia conservada serin esterasa, y en donde dicho equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico es o C-amidado con -C(O)-NH₂, o C amidado con -C(O)-NH₂ y N-acetilado.
- 35 10. Equivalente peptídico para uso en la estimulación de la revascularización del tejido cardíaco, según la reivindicación 9, que es Ala-Cli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N° 4).
- 40 11. Un stent revestido con un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico, en donde el equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico comprende un dominio de unión del receptor de trombina que tiene la secuencia Arg-Gli-Asp-Ala (SEC ID N ° 1); y una secuencia conservada serin esterasa, y en donde dicho equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico es o C-amidado con -C(O)-NH₂, o C amidado con -C(O)-NH₂ y N-acetilado.
- 45 12. El stent de la reivindicación 11 en donde el equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico es: Ala-Cli-Tir-Lis-Pro-Asp-Glu-Gli-Lis-Arg-Gli-Asp-Ala-Cis-Glu-Gli-Asp-Ser-Gli-Gli-Pro-Fen-Val-CONH₂ (SEC ID N ° 4).
13. El uso de un equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénicos en la fabricación de un medicamento para promover la reparación del tejido cardíaco, en donde el equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico comprende un dominio de unión del receptor de trombina que tiene la secuencia -Arg-Gli-Asp -Ala (SEC ID N ° 1), y una secuencia conservada de serin esterasa, y en donde dicho equivalente fisiológicamente funcional de un péptido derivado de la trombina angiogénico es o C-amidado con -C(O)-NH₂, o C amidado con -C(O)-NH₂ y N-acetilado.