

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 541**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2005 E 12002027 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 2484364**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de enfermedades neovasculares**

30 Prioridad:

04.06.2004 US 577156 P

01.07.2004 US 585273 P

24.02.2005 US 655801 P

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

25.03.2014

73 Titular/es:

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)

10550 North Torrey Pines Road

La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

FRIEDLANDER, MARTIN;

AGUILAR, HILDA EDITH y

DORRELL, MICHAEL I.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 450 541 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

Composiciones para el tratamiento de enfermedades neovasculares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades neovasculares, tales como enfermedades neovasculares retinianas. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos destinados al tratamiento de enfermedades neovasculares mediante la administración de una combinación de fármacos angióstáticos y angiogénicos a un paciente, y a composiciones para su utilización en dichos procedimientos.

Antecedentes de la invención

La inmensa mayoría de enfermedades que producen pérdida muy grave de la visión lo hacen como resultado de la neovascularización ocular. Por ejemplo, la degeneración macular por la edad (ARMD) afecta a 12 a 15 millones de norteamericanos con más de 65 años de edad y produce la pérdida de visión en el 10 a 15% de ellos como efecto directo de la neovascularización coroidea (subretiniana). La causa principal de la pérdida de visión para los norteamericanos menores de 65 años de edad es la diabetes; 16 millones de personas en los Estados Unidos son diabéticos y 40.000 al año padecen complicaciones oculares de la enfermedad, con frecuencia como resultado de la neovascularización retiniana. Aunque la fotocoagulación con láser ha sido eficaz para prevenir la pérdida grave de visión en subgrupos de pacientes diabéticos en alta situación de riesgo, la frecuencia general de 10 años de la retinopatía continúa permaneciendo sustancialmente inalterada. Para los pacientes con neovascularización coroidea debido a ARMD o la enfermedad ocular inflamatoria tales como la histoplasmosis ocular, la fotocoagulación, con pocas excepciones es ineficaz para prevenir la pérdida de visión. Aunque se han desarrollado recientemente, las terapias fotodinámicas no destructivas continúan siendo prometedoras para la pérdida individual con reducción temporal en pacientes con neovascularización coroidea no tratable anteriormente, solamente el 61,4% de los pacientes tratados cada 3 a 4 meses ha mejorado o estabilizado la visión en comparación con el 45,9% del grupo tratado con placebo.

La ARMD y la retinopatía diabética son las causas principales de la pérdida de visión en las naciones industrializadas y es así como resultado de la neovascularización retiniana anormal. Dado que la retina consta de capas bien definidas de elementos neuronales, gliales y vasculares, alteraciones relativamente pequeñas tales como las observadas en la proliferación vascular o el edema pueden conducir a la pérdida significativa de la función visual. Las degeneraciones retinianas hereditarias, tales como la retinosis pigmentaria (RP), están también asociadas a anomalías vasculares tales como el estenosis arteriolar y la atrofia vascular. Aunque se ha hecho un avance significativo en la identificación de los factores que estimulan e inhiben la angiogenia, actualmente no existe ningún tratamiento disponible para tratar específicamente la vasculopatía ocular.

Las degeneraciones hereditarias de la retina afectan como mucho a 1 de cada 3.500 personas y se caracterizan por la ceguera nocturna progresiva, la pérdida de campo visual, la atrofia del nervio óptico, la atenuación arteriolar, la permeabilidad vascular alterada y la pérdida central de la visión con frecuencia evolucionando hasta la ceguera completa (Heckenlively, J. R., editor, 1988; *Retinitis Pigmentosa*, Filadelfia: JB Lippincott Co.) El análisis genético molecular de estas enfermedades ha identificado mutaciones en más de 110 genes diferentes lo que explica solamente un porcentaje relativamente pequeño de las personas afectadas conocidas (Humphries *et al.*, 1992, *Science* 256:804-808; Farrar *et al.* 2002, *EMBO J.* 21:857-864). Muchas de estas mutaciones están asociadas a componentes enzimáticos y estructurales del sistema de fototransducción incluyendo rodopsina, GMPc fosfodiesterasa, *rds* periférica y RPE65. A pesar de estas observaciones, existen todavía tratamientos ineficaces para ralentizar o invertir la evolución de las enfermedades retinianas degenerativas. Los avances recientes en terapia génica han conducido a la inversión lograda de los fenotipos *rds* (Ali *et al.* 2000, *Nat. Genet.* 25:306-310) y *rd* (Takahashi *et al.* 1999, *J. Virol.* 73:7812-7816) en ratones y el fenotipo de RPE65 en perros (Acland *et al.* 2001, *Nat. Genet.* 28:92-95) cuando el transgén natural es suministrado a fotorreceptores o al epitelio retiniano pigmentado (ERP) en animales con una mutación específica.

La angiogenia es el procedimiento mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos. En respuesta a señales químicas específicas, los capilares salen de los vasos existentes, aumentando de tamaño finalmente según necesita el organismo. Inicialmente, las células endoteliales, que recubren los vasos sanguíneos, dividen en una dirección octogonal al vaso existente, formando un brote sólido. Las células endoteliales adyacentes forman a continuación grandes vacuolas y las células se reordenan de modo que las vacuolas se orientan unidas por los extremos y finalmente emergen para formar la luz de un nuevo capilar (formación tubular).

La angiogenia es estimulada por numerosas condiciones, tal como en respuesta a una herida, y acompaña casi todo el crecimiento tisular en los organismos vertebrados tales como de los mamíferos. La angiogenia también desempeña una función en determinadas enfermedades tales como determinados cánceres. El crecimiento de tumores, por ejemplo, requiere crecimiento de los vasos sanguíneos para proporcionar oxígeno y nutrientes al tejido del tumor en desarrollo. Además, la neovascularización ocular está asociada a la inmensa mayoría de las enfermedades oculares que conducen a la pérdida muy grave de la visión.

La angiogenia puede detenerse o inhibirse interfiriendo con las señales químicas que estimulan el proceso angiogénico. Por ejemplo, las células endoteliales angiogénicas producen proteasas para digerir la lámina basal que rodea los vasos sanguíneos, eliminando de este modo un camino para el nuevo capilar. La inhibición de estas proteasas, o su inhibición, puede evitar que se formen nuevos vasos. Así mismo, las células endoteliales proliferan en respuesta a señales químicas. Las señales de proliferación particularmente importantes incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las familias del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) de proteínas. Se ha demostrado que VEGF está implicado en la vascularización de determinados tumores. La interferencia con estos procesos de señalización de la proliferación pueden también inhibir la angiogenia.

En la angiogenia están implicados varios factores. Las moléculas del factor de crecimiento de fibroblastos tanto ácidas como básicas son mitógenos para las células endoteliales y otros tipos de células. Un mitógeno muy selectivo para las células endoteliales vasculares es el VEGF.

En el adulto normal, la angiogenia está estrictamente regulada, y se limita a la cicatrización de heridas, el embarazo y el ciclo uterino. La angiogenia se pone en marcha por moléculas angiogénicas específicas tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico y ácido (FGF), el VEGF, la angiogenina, el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor α de la necrosis tumoral (FNT- α) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La angiogenia puede ser suprimida por moléculas inhibitoras tales como interferón- α , trombospondina-1, angioestatina y endostatina. Es el equilibrio de estos estimulantes e inhibidores naturales el que controla el sistema vascular capilar normalmente inactivo. Cuando este equilibrio se altera, como en determinadas enfermedades, las células endoteliales capilares están inducidas a proliferar, emigrar y por último diferenciarse.

La angiogenia desempeña una función principal en una variedad de enfermedades incluyendo el cáncer y la neovascularización ocular. El crecimiento mantenido y la metástasis de una variedad de tumores se ha demostrado también que depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos del hospedador en el tumor en respuesta a factores angiogénicos procedentes del tumor. La proliferación de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a una variedad de estímulos se produce como el descubrimiento dominante en la mayoría de las enfermedades oculares y que ciegan incluyendo la retinopatía diabética proliferante, ARMD, el glaucoma rubeótico, la queratitis intersticial y la retinopatía precoz. En estas enfermedades, el daño tisular puede ocasionar la liberación de factores angiogénicos produciendo la proliferación capilar. El VEGF desempeña una función dominante en la neovascularización del iris y en las retinopatías neovasculares. Aunque los informes demuestran claramente una correlación entre los niveles de VEGF intraoculares y la neovascularización ocular retinopática isquémica, FGF desempeña probablemente también una función. Los FGF ácido y básico son conocidos porque están presentes en la retina del adulto normal, aún cuando niveles detectables no se correlacionan sistemáticamente con la neovascularización. Esto puede ser en gran medida debido a que el FGF se une muy fuertemente a los componentes cargados de la matriz extracelular y puede no estar fácilmente disponible en una forma libremente difundible que se detectaría mediante ensayos normalizados de los fluidos intraoculares.

Una ruta frecuente final en la respuesta angiogénica implica el cambio de información mediado por la integrina entre una célula endotelial vascular proliferante y la matriz extracelular. Esta clase de receptores de adhesión, denominados integrinas, se expresan como heterodímeros con una subunidad α y β en todas las células. Dicha integrina, $\alpha_v\beta_3$, es el miembro más promiscuo de esta familia y permite a las células endoteliales interactuar con una amplia variedad de componentes de la matriz extracelular. Los antagonistas de péptidos y de anticuerpos de esta integrina inhiben la angiogenia provocando de manera selectiva la apoptosis de las células endoteliales vasculares proliferantes. Existen dos rutas de angiogenia dependientes de citocinas y pueden definirse por su dependencia de distintas integrinas de las células vasculares, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. Específicamente, la angiogenia inducida por el FGF básico y el VEGF depende de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, respectivamente, ya que los antagonistas de anticuerpos de cada integrina bloquean selectivamente una de estas rutas angiogénicas en los modelos de de la córnea de conejo y de la membrana corioalantoica de pollo (CAM). Los antagonistas de péptidos que bloquean todas las integrinas α_v inhiben la angiogenia estimulada por FGF y VEGF. Aunque los vasos sanguíneos oculares humanos normales no presentan una de las dos integrinas, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ las integrinas se presentan selectivamente en los vasos sanguíneos en los tejidos de los pacientes con enfermedad ocular neovascular activa. Aunque solamente $\alpha_v\beta_3$ se observó sistemáticamente en el tejido de los pacientes con ARMD, tanto $\alpha_v\beta_3$ como $\alpha_v\beta_5$ estaban presentes en los tejidos de pacientes con retinopatía diabética proliferante. Los antagonistas de integrinas de péptidos administrados en todo el sistema bloquearon la formación de nuevos vasos sanguíneos en un modelo de ratón de vasculogenia retiniana.

El documento US 2003/0191098 divulga una composición inhibitora de la angiogénesis que comprende un compuesto inhibidor de la angiogénesis y un fármaco antiinflamatorio.

El documento US 2003/0017564 divulga un polipéptido soluble en agua derivado de la triptofanil-ARNt sintetasa que resulta útil para la inhibición de la angiogénesis.

Por consiguiente, los agentes antiangiogénicos desempeñan una función en el tratamiento de la degeneración retiniana al evitar los efectos dañinos de estos factores tróficos y del crecimiento. Los agentes angiogénicos, desempeñan también una función en la estimulación deseable de la vascularización al retardar la degeneración

retiniana aumentando la circulación sanguínea a las células.

Inmensos esfuerzos de investigación han contribuido a la comprensión de los autores de los mecanismos de la angiogenia durante la evolución de la enfermedad, y como resultado de estos estudios, un gran número de moléculas angiostáticas ha sido, o está siendo actualmente, probado en pruebas clínicas. Sin embargo, hasta la fecha, los resultados de estas pruebas clínicas han sido decepcionantes, y los beneficios de estos tratamientos antiangiogénicos en los pacientes han sido mínimos en el mejor de los casos.

Muchos factores pueden necesitar consideración antes de que las terapias angiostáticas lleguen a tener éxito finalmente. Los mecanismos compensadores naturales pueden finalmente hacer obsoletas las monoterapias angiogénicas. Los fármacos angiostáticos generalmente se dirigen a una sola citocina o ruta angiogénica intracelular. La angiogenia *in vivo* es probable que se inicie mediante la señalización combinada de múltiples rutas. Por lo tanto, el bloqueo de una sola ruta puede ser insuficiente para prevenir la angiogenia durante el tratamiento de enfermedades neovasculares. Lo que complica más las cosas, es también probable que al bloquear una sola ruta provoque la compensación y aumento de las funciones de otras rutas angiogénicas.

Se ha descubierto ahora que una administración simultánea de una combinación de compuestos angiostáticos que se dirigen a diferentes rutas aumenta la potencia angiostática y además interfiere con los mecanismos compensadores naturales.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona unas composiciones para su utilización en el tratamiento de una enfermedad neovascular, tal como una enfermedad neovascular retiniana, al administrar a un mamífero que padece una enfermedad neovascular una cantidad de una combinación de fármacos supresores de angiogenia suficiente para inhibir la nueva formación de vasos sanguíneos. Estos fármacos son una combinación de un fragmento angiostático de la triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS), un agente antiinflamatorio y un inhibidor de señalización de integrina. Adicionalmente, el agente terapéutico puede comprender un esteroide angiostático, un agente antineoplásico, un agente antibacteriano, un agente antiviral, y similares. Preferentemente el mamífero es humano.

Un procedimiento relacionado comprende la administración a un mamífero que padece una enfermedad neovascular de una cantidad inhibidora del desarrollo vascular de una mezcla de fármacos que comprende un fragmento angiostático de TrpRS (por ejemplo, el fragmento T1, el fragmento T2, o el fragmento mini- TrpRS descrito en la presente memoria) y por lo menos un compuesto seleccionado de entre un inhibidor de señalización de VEGF y un inhibidor de señalización de integrina. Otra forma de realización en este contexto es la combinación triple del fragmento angiostático T2-TrpRS, un inhibidor de señalización de VEGF tal como un aptámero VEGF, y un inhibidor de señalización de integrina tal como un inhibidor de señalización de integrina $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$. Una combinación triple particularmente preferida comprende el fragmento T2 de la TrpRS, un aptámero VEGF específico para VEGF-165 (por ejemplo, el pegaptanib sódico), y un inhibidor de señalización de integrina $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$ peptidomimético (por ejemplo, el compuesto (1) descrito en la presente memoria). Esta combinación triple particular presenta un efecto sinérgico fuerte sobre la inhibición de la neovascularización en el ojo del mamífero.

Las enfermedades neovasculares que pueden tratarse mediante los procedimientos comprenden, de manera no limitativa, enfermedades oculares tales como las enfermedades degenerativas retinianas, las enfermedades degenerativas vasculares retinianas, las retinopatías isquémicas, las hemorragias vasculares, la fuga vascular, y coroidopatías en mamíferos neonatos, infantiles, juveniles, o completamente desarrollados. Los procedimientos pueden ser utilizados para tratar enfermedades neovasculares tales como cánceres con tumor sólido (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de próstata) y la artritis reumatoide, por ejemplo.

Una composición terapéutica útil para la inhibición de la angiogénesis, y por lo tanto para el tratamiento de las enfermedades neovasculares, comprende una mezcla de un fragmento angiostático de la triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS), un inhibidor de señalización de VEGF, y un inhibidor de señalización de integrina, junto con un excipiente y portador farmacéuticamente aceptables para la misma. Opcionalmente, las composiciones terapéuticas presentes pueden comprender asimismo uno o más de entre un esteroide angiostático, un agente antineoplásico, un agente antibacteriano, un agente antiviral, un agente antiinflamatorio, y agentes terapéuticos similares. En particular, la presente invención pertenece a:

1. Composición que comprende (i) un fragmento angiostático de triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS); (ii) un agente antiangiogénico que es un inhibidor de señalización de la integrina; y (iii) un agente terapéutico en la que el agente terapéutico es un agente antiinflamatorio.
2. Composición según el punto 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta un tamaño molecular de más de aproximadamente 48 KDa.
3. Composición según el punto 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta un tamaño molecular de más de aproximadamente 46 KDa.

4. Composición según el punto 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta un tamaño molecular de más de aproximadamente 43 KDa.
- 5 5. Composición según el punto 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4.
- 10 6. Composición según cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que el inhibidor de señalización de integrina es un antagonista de integrina angiostática.
7. Composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de los puntos 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable para la misma.
- 15 8. Composición según cualquiera de los puntos 1 a 6 para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neovascular.
- 20 9. Composición según el punto 8, en la que la enfermedad neovascular se selecciona de entre el grupo constituido por enfermedades neovasculares oculares, glaucoma rubeótico, pterigión, cánceres con tumor sólido, artrosis, artritis reumatoide, anomalías vasculares, malformaciones vasculares y psoriasis.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 representa las secuencias de aminoácidos de fragmentos angiostáticos de triptofanil-ARNt sintetasa denominada T2-TrpRS, SEC ID n° 1 y T2-TrpRS-GD, SEC ID n° 2 (un mutante de la misma).

La Figura 2 representa las secuencias de aminoácidos de fragmentos angiostáticos de triptofanil-ARNt sintetasa denominada mini-TrpRS, SEC ID n° 3 y T1-TrpRS, SEC ID n° 4

30 La Figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de TrpRS completa (SEC ID n° 5) e indica la posición de T1, T2 y minifragmentos de la misma.

35 La Figura 4 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 1 inyectados por vía intravítrea con PBS.

40 La Figura 5 representa microfotografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 1 inyectados por vía intravítrea con (A) una concentración 0,5 x (10 mg/ml) del compuesto 1 inhibidor de señalización peptidomimético de la integrina; (B) una concentración 1 x (2 mg/ml) del compuesto (2) aptámero VEGF; y (C) una combinación del compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina y el compuesto (2) aptámero VEGF.

45 La Figura 6 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 2 inyectados por vía intravítrea con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La Figura 7 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 2 inyectados por vía intravítrea con una concentración 0,1 x (0,05 mg/ml) de T2-TrpRS.

50 La Figura 8 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 2 inyectados por vía intravítrea con una concentración 0,1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

55 La Figura 9 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 2 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 0,1 x de T2-TrpRS y una concentración 0,1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

La Figura 10 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 3 inyectados por vía intravítrea con PBS.

60 La Figura 11 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 3 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS.

65 La Figura 12 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 3 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

La Figura 13 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 3 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS y una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

5 La Figura 14 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 4 inyectados por vía intravítrea con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

10 La Figura 15 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 4 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS.

15 La Figura 16 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 4 inyectados por vía intravítrea con una concentración 0,5 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

La Figura 17 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 4 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS y una concentración 0,5 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

20 La Figura 18 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 5 inyectados por vía intravítrea con PBS.

25 La Figura 19 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 5 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS.

La Figura 20 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 5 inyectados por vía intravítrea con una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

30 La Figura 21 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 5 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de T2-TrpRS y una concentración 0,5x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

35 La Figura 22 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con PBS.

La Figura 23 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS.

40 La Figura 24 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

45 La Figura 25 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

50 La Figura 26 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de T2-TrpRS y una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

55 La Figura 27 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de T2-TrpRS y una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

La Figura 28 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 6 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de T2-TrpRS, una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina y una concentración normal del compuesto (2) aptámero VEGF.

60 La Figura 29 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 7 inyectados por vía intravítrea con PBS.

65 La Figura 30 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 7 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS.

La Figura 31 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 7 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

5 La Figura 32 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 7 inyectados por vía intravítrea con una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

10 La Figura 33 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 7 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina y una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

15 La Figura 34 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 7 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de T2-TrpRS, una concentración 0,5 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina y una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

20 La Figura 35 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones de referencia del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con PBS.

La Figura 36 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

25 La Figura 37 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF.

30 La Figura 38 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS.

35 La Figura 39 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x de T2-TrpRS y del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina.

La Figura 40 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una concentración 1 x del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina y del compuesto (2) aptámero VEGF.

40 La Figura 41 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de T2-TrpRS y del compuesto (2) aptámero VEGF.

45 La Figura 42 representa fotomicrografías de las capas vasculares primaria y secundaria de las retinas de los ratones del ejemplo 9 inyectados por vía intravítrea con una combinación de una concentración 1 x de cada uno de los inhibidores T2-TrpRS, del compuesto (1) inhibidor peptidomimético de señalización de integrina y del compuesto (2) aptámero VEGF.

50 La Figura 43 es una representación gráfica de los datos de un experimento de dosificación de T2-TrpRS.

La Figura 44 es una representación gráfica de los datos de un experimento de dosificación del aptámero VEGF.

55 La Figura 45 es una representación gráfica de los datos que presentan la inhibición de la formación del plexo vascular profundo en función de la concentración óptima administrada del aptámero VEGF y del compuesto T2-TrpRS, solo y en combinación.

La Figura 46 es una representación gráfica de los datos del experimento de dosificación del antagonista de integrina $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$.

60 La Figura 47 es una representación gráfica de los datos que presentan la inhibición de la formación del plexo vascular profundo en función de la concentración óptima administrada de una pequeña molécula antagonista de integrina $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$ y T2-TrpRS, solo y en combinación.

65 La Figura 48 es un resumen gráfico de los datos que presentan la inhibición de la formación del plexo vascular profundo en varias combinaciones de terapias.

La Figura 49 es un resumen gráfico de los datos que presentan el grado de inhibición de la formación del plexo vascular profundo en varias combinaciones de terapias.

5 La Figura 50 es un serie de fotomicrografías de las capas vasculares primaria y profunda (secundaria) en varias terapias y combinaciones de las mismas a los niveles de dosificación mostrados en la figura 49.

La Figura 51 es una representación gráfica de los niveles de inhibición de la formación del plexo vascular con triple terapia a varios niveles de dosificación.

10 La Figura 52 es una representación gráfica similar a la Figura 51 pero mostrando la inhibición de >75%, >90% y 100%.

15 La Figura 53 es una representación gráfica de los niveles de inhibición de la formación del plexo vascular comparando las monoterapias con las politerapias a varios niveles de dosificación.

La Figura 54 es una representación gráfica de los niveles de inhibición >75%, >90% y 100% de la formación del plexo vascular comparando las monoterapias con las politerapias a varios niveles de dosificación.

20 La Figura 55 es una representación gráfica de los datos que muestran una zona de ovillos neovasculares en función de varias monoterapias así como una politerapia triple utilizando una sola inyección de un agente o agentes terapéuticos.

25 La Figura 56 es similar a la Figura 55 pero muestra los datos de una inyección doble de un agente o agentes terapéuticos.

La Figura 57 es una representación gráfica de los datos que muestra zonas de ovillos neovasculares en función de varias monoterapias, terapias dobles y una terapia triple.

30 La Figura 58 es un serie de fotomicrografías que muestra las retinas de ratón tratadas con compuestos angiostáticos individualmente y en combinación.

La Figura 59 presenta la estructura del compuesto (2) aptámero VEGF (SEC ID n° 6), pegaptanib sódico.

35 La Figura 60 muestra un gráfico de supervivencia de ratas que tienen tumor tratadas con una composición de la invención (cuadrados) frente a ratas de referencia tratadas solamente con PBS (triángulos).

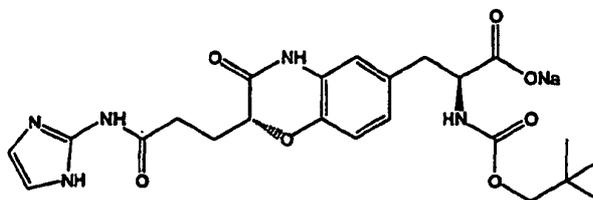
Descripción detallada de las formas de realización preferidas

40 Una composición apropiada para el tratamiento de una enfermedad neovascular comprende un fragmento angiostático de la triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS), un agente antiangiogénico que es un inhibidor de señalización de integrina (por ejemplo, un antagonista de la integrina angiostática), y un agente terapéutico es un agente antiinflamatorio.

45 Los fragmentos angiostáticos preferidos de TrpRS incluyen un fragmento de 43 kDa (es decir, el fragmento T2, "T2-TrpRS", SEC ID n° 1, un mutante de T2-TrpRS, "T2-TrpRS-GD", SEC ID n° 2; ambos se muestran en la Figura 1), un fragmento de 48 kDa tal como la TrpRS truncada conocido como mini-TrpRS (SEC ID n° 3, mostrado en la Figura 2) y un fragmento de 46 kDa tal como la TrpRS truncada conocido como T1-TrpRS (SEC ID n° 4, mostrado en la Figura 2). La secuencia de restos de aminoácidos de T2-TrpRS-GD (SEC ID n° 2) difiere de la SEC ID. n° 1 en dos aminoácidos (es decir, S121G e Y122D). La secuencia de restos de aminoácidos de TrpRS humano completo (SEC ID n° 5) se muestra en la figura 3, junto con una indicación de la posible posición de los T1, T2 y minifragmentos de la misma. Sin vincularse a la teoría, se cree que los fragmentos angiostáticos de TrpRS pueden formar dímeros no covalentes (véase p. ej., Yu *et al. J. Biol. Chem.* 2004, 279:8378-8388), que pueden contribuir a la actividad biológica de los fragmentos. Por consiguiente, cualquier referencia en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas a un fragmento angiostático de TrpRS (p. ej., T1-TrpRS, T2-TrpRS, mini-TrpRS) debe considerarse como una referencia a la forma monómero, a la forma dímero o a una mezcla de las mismas.

60 Los inhibidores de señalización de integrina preferidos son los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$, que incluyen los péptidos RGD, tales como los descritos en la patente US n° 5.693.612, la patente US n° 5.766.591, la patente US n° 5.767.071, la patente US n° 5.780.426 y la patente US n° 6.610.826, y los antagonistas de integrina peptidomiméticos tales como los descritos en la patente US n° 5.614.531, la patente US n° 5.614.535, la patente US n° 6.326.403, la patente US n° 6.455.529, la patente US n° 6.521.646, la patente US n° 6.559.144, la patente US n° 6.576.637, la patente US n° 6.602.876, la patente US n° 6.645.991, y la patente US n° 6.649.613. Un inhibidor de señalización de integrina peptidomimético particularmente preferido es un compuesto que presenta la fórmula del compuesto (1), disponible en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) como EMD 472523.

Compuesto (1)



5 Los inhibidores de señalización de VEGF preferidos incluyen aptámeros selectivos de VEGF (oligonucleótidos de unión a proteína), preferentemente aptámeros resistentes a la nucleasa que se unen a VEGF-165, tales como aptámeros a base de 2'-fluoropirimidina ARN que se unen a VEGF-165 descritos por Ruckman et al. J. Biol. Chem. 1998, 273: 20556-20567, y similares; anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos que se unen a VEGF, tales como el anticuerpo Rhu disponible en Genentech (San Francisco, CA) y un fragmento Fab del mismo (RhuFab V2);
 10 receptores de VEGF solubles tales como VEGFR1 soluble; y los ARN pequeños de interferencia (siRNA) que dianizan VEGF o sus receptores, tales como los siRNA descritos por Reich et al. Mol. Vis. 2003; 9:210-216. Los inhibidores de señalización de VEGF preferidos son los aptámeros de VEGF resistentes a la nucleasa, más preferentemente aptámeros a base de 2'-fluoropirimidina ARN, tal como pegaptanib sódico (Compuesto (2)) que es un oligonucleótido polietoxilado que tiene la fórmula siguiente (SEC ID n° 6, Figura 59, R en la Figura 59 es una
 15 cadena de polietilenglicol (PEG) de 40 kiloDaltons):

PEG de 5'-40K-aminoenlazador C5-CfGmGmArArUfCfAmGmUfGmAmAmUfGmCfUfAmUfAmCfAmUfCfCfGm3'-3'dT

20 en la que

Cf = 2'fluoro C	Ar = 2' OH (ribo) A
Uf = 2'fluoro U	3'-3'dT = desoxiT invertido
Am = 2'OMe A	aminoenlazador de C5 = enlazador pentil amino
Gm = 2'OMe G	PEG 40K = polietilenglicol amida de 40K.

25

Un oligonucleotido polietoxilado de la SEC ID n° 6 se comercializa bajo la marca registrada MACUGEN® por Eyetech Pharmaceuticals, Inc., y es conocido también como NX1838 o pegaptanib sódico.

30 En una forma de realización la combinación de fármacos incluye también por lo menos un agente terapéutico adicional tal como un esteroide angiostático, un agente antineoplásico, un agente antibacteriano, un agente antivírico, un agente antiinflamatorio y similares.

35 Los ejemplos de esteroides angiostáticos adecuados incluyen acetato de anecortave y triamcinolona acetónido.

Los ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados incluyen Aclarrubicina; Hidrocloruro de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametrantona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramycin; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Hidrocloruro de Bisantremo; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bromopirimina; Busalfán; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatino; Carmustina; Hidrocloruro de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Melisato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Hidrocloruro de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diazicuona; Docetaxel; Doxorubicina; Hidrocloruro de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Hidrocloruro de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Hidrocloruro de Epirubicina; Erbulozol; Hidrocloruro de Esorubicina; Estramustina; Estramustina Fosfato de de Sodio; Etanidazol; Aceite I 131 de Etiodized; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Hidrocloruro de Fadzozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Fluorocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Hidrocloruro de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; Hidrocloruro de Idarrubicina; Ifosfamida; Imofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1b; Iproplatino; Hidrocloruro de Irinotecán; Acetato de Lanreotido; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Hidrocloruro de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Hidrocloruro de Losoxantona; Masoprocol; Maytansina; Hidrocloruro de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedopa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogillina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Hidrocloruro de Mitoxantrona; Ácido Mifofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatino; Oxisurano; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromano; Puposulfano; Hidrocloruro de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico;

50
55

5 Porfiromicina; Prednimustina; Hidrocloruro de Procarbazina; Puomicina; Hidrocloruro de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Hidrocloruro de Safingol; Semustina; Simtraceno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Hidrocloruro de Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalán Sódico; Tegafur; Hidrocloruro de Teloxantrona; Temoporfin; Tenipósido; Teróxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Hidrocloruro de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Hidrocloruro de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredapa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina e Hidrocloruro de Zorubicina.

15 Los ejemplos de agentes antibacterianos adecuados comprenden de manera no limitativa penicilinas, aminoglucósidos, macrólidos, monobactams, rifamicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, imipenem, ácido fusídico, novobiocina, fosfomicina, fusidato sódico, neomicina, polimixina, capreomicina, colistimetato, colistina, gramicidina, minociclina, doxiciclina, vanomicina, vacitracina, kanamicina, gentamicina, eritromicina y cefalosporinas.

20 Los ejemplos de agentes antiinflamatorios adecuados comprenden de manera no limitativa aspirina (ácido acetyl salicílico), indometacina, indometacina sódica trihidratada, salicilamida, naproxeno, colquicina, fenoprofeno, sulindaco, diflunisal, diclofenaco, indoprofeno y salicilamida sódica.

25 Ejemplos de agentes antivíricos adecuados comprenden de manera no limitativa alfa-metil-P-adamantano metilamina, 1-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida, 9-(2-hidroxi-etoxi)metilguanina, adamantanamina, 5-yodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferón, adenina arabinósido, CD4, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 9-(2-hidroxietoximetil)-guanina (aciclovir), ácido fosfonofórmico, 1-adantanamina, péptido T y 2',3'-didesoxicididina.

30 Un procedimiento particularmente preferido para el tratamiento de enfermedades neovasculares comprende la administración a un mamífero que padece una enfermedad neovascular de una cantidad inhibidora del desarrollo vascular de una combinación de fármacos que comprende T2-TrpRS, por lo menos un inhibidor de señalización de VEGF-165, y opcionalmente, por lo menos un inhibidor de señalización de integrina $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$.

35 Las enfermedades neovasculares tratables por las composiciones de la presente invención comprenden de manera no limitativa enfermedades neovasculares de los ojos (por ejemplo, enfermedades neovasculares retinianas y coroideas), glaucoma rubeotico, pterigión, cánceres con tumor sólido (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de próstata, artrosis, artritis reumatoide, anomalías y malformaciones vasculares (p. ej., hemangiomas, linfangiomas y similares) y psoriasis.

40 Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse en un procedimiento de tratamiento de enfermedades neovasculares retinianas en un mamífero. Preferentemente, el procedimiento comprende inyectar por vía intravítrea dentro del ojo de un mamífero que padece una enfermedad neovascular una cantidad inhibidora de desarrollo vascular de una combinación de composiciones antiangiogénicas y angiostáticas que proporcionan un fragmento angiostático de TrpRS, como se describió anteriormente, el inhibidor de señalización VEGF, como se describió anteriormente, y el inhibidor de señalización de integrina, pegaptanib sódico.

45 El presente procedimiento para el tratamiento de enfermedades neovasculares retinianas en un mamífero comprende preferentemente inyectar de manera intravítrea en el ojo de un mamífero que padece una enfermedad neovascular una cantidad inhibidora del desarrollo vascular de una combinación de unas composiciones angiostáticas y antiangiogénica que proporcionan un fragmento angiostático de TrpRS, un inhibidor de señalización de VEGF, y un inhibidor de señalización de integrina.

50 Este procedimiento puede utilizarse para tratar enfermedades oculares tales como las enfermedades vasculares degenerativas, retinopatías isquémicas, hemorragias vasculares, fuga vascular y coroidopatías en mamíferos recién nacidos, jóvenes o muy maduros. Ejemplos de dichas enfermedades incluyen la degeneración macular por la edad, la retinopatía diabética, la presunta histoplasmosis ocular, la retinopatía precoz, la anemia depreanocítica; el hemangioma, la pterigión, la oclusión de la vena retiniana central isquémica, la oclusión de la vena retiniana difuminada, el melanoma ocular, el blastoma retiniano y la retinosis pigmentaria así como lesiones retinianas.

60 Otro aspecto consiste en una composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades neovasculares, que comprende un fragmento angiostático de TrpRS como se describió anteriormente, el inhibidor de señalización de VEGF pegaptanib sódico y el inhibidor de señalización de integrina, compuesto (1), junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

65 En una forma de realización preferida, la composición comprende además por lo menos un agente terapéutico adicional tal como un esteroide angiostático, un agente antineoplásico, un agente antibacteriano, un agente antivírico, un agente antiinflamatorio y similares.

Un procedimiento de tratamiento de una enfermedad neovascular comprende administrar a un mamífero que padece una enfermedad neovascular una cantidad inhibidora del desarrollo vascular de una combinación de fármacos que comprende un fragmento angiostático de la triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS) y por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un inhibidor de señalización de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y un inhibidor de señalización de integrina.

Generalmente, una cantidad inhibidora de desarrollo vascular de una composición de la presente invención es por lo menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal y, en la mayoría de los casos, no excede de aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal al día para tratamientos generales. Preferentemente la dosis está comprendida en el intervalo de aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal al día. Para tratamiento ocular, intravítreo de pacientes humanos, la dosis preferida está comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 miligramos por ojo para un tratamiento dado. Las composiciones pueden administrarse en una sola dosis o en dosis múltiples a lo largo del tiempo. Cualquier experto en la materia puede determinar la dosis terapéutica eficaz óptima de una composición de la presente invención, teniendo en cuenta el paciente específico, los fármacos presentes en la invención, la enfermedad y otros factores que son muy conocidos en la técnica.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden incorporarse en varias formas físicas. Estas formas incluyen, por ejemplo, formas galénicas sólidas, semisólidas y líquidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones o suspensiones líquidas, aerosoles, liposomas, supositorios, soluciones inyectables e infusibles y formas de liberación prolongada. Cualquier experto en la materia seleccionará una forma galénica adecuada dependiendo del modo de administración deseado y de la enfermedad que va a tratarse, utilizando principios farmacológicos bien conocidos en la técnica.

Una composición terapéutica según la presente invención puede administrarse por vías de administración convencionales tales como las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraesternal, intravítrea, intracraneal o en aerosol. Pueden utilizarse también vías tópicas de administración, con aplicación de las composiciones localmente a una parte específica del cuerpo (p. ej., ojos, piel, tubo intestinal inferior, vagina, recto) según proceda. Las composiciones terapéuticas incluyen también vehículos y excipientes convencionales farmacéuticamente aceptables que son conocidos por los expertos en esta materia.

Generalmente, las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden formularse y administrarse utilizando procedimientos y composiciones similares a las utilizadas para cada una de las clases de principios activos presentes en las composiciones. Un experto en la materia entenderá que las dosis convencionales variarán en función de los principios activos específicos en la composición, así como con la salud, el peso, la edad, el sexo, la dolencia o enfermedad del paciente y del modo deseado de administración.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen portadores, excipientes y vehículos farmacológicamente apropiados y farmacéuticamente aceptables. En general, estos portadores incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólico/acuosas, incluyendo la solución salina y medios tamponados tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución lacteada de Ringer o aceites fijados. Además, los vehículos intravenosos pueden incluir reforzadores fluidos y nutritivos, y reforzadores de electrolitos, tales como aquellos a base de dextrosa de Ringer. Pueden estar presentes también excipientes tales como conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Los adyuvantes, vehículos, otros excipientes de formulación adecuados y procedimientos de formulación de composiciones farmacéuticas se dan a conocer en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 14^a Ed., Mack Publishing Co., 1970, particularmente la parte VIII, "Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture", páginas 1461-1762.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden envasarse en frascos o viales esterilizados apropiadamente, ya sea en forma de multidosis o en dosis unitaria. Los recipientes se sellan preferentemente herméticamente después de rellenarse con una composición de la invención. Preferentemente, la composiciones se envasan en un recipiente que presenta una etiqueta fijada al mismo, etiqueta que identifica los fármacos presentes en la invención, y lleva una nota en una forma prescrita por una agencia gubernamental como la United States Food and Drug Administration, que refleja la aprobación de la composición en leyes apropiadas, la posología y similares. La etiqueta contiene preferentemente información acerca de la composición que es útil para que un profesional de atención sanitaria administre la composición a un paciente. El paquete también contiene preferentemente materiales de información impresos referentes a la administración de la composición, instrucciones, indicaciones y algunas advertencias necesarias requeridas.

Procedimientos

Modelo de angiogenia retiniana en ratón recién nacido

Descripción del modelo. Inmediatamente después del nacimiento (día cero tras el nacimiento "P0"), el sistema vascular retiniano falta prácticamente en el ratón. Cuatro semanas después del nacimiento (P28) la retina ha

alcanzado un modelo adulto de vasos retinianos coincidente con el comienzo de la visión. La neovascularización fisiológica de la retina tiene lugar durante este periodo mediante un modelo de angiogenia de desarrollo bifásico, estereotípico. Durante la fase primaria del desarrollo vascular retiniano, vasos peripapilares escalonados crecen radialmente desde la arteria y vena retiniana central, llegando a estar progresivamente interconectados por un plexo intercapilar que se forma entre ellos. Este “plexo retiniano interno” se desarrolla en superficie, volumen y complejidad, de manera centrífuga, como una monocapa dentro de la capa de fibra nerviosa durante los primeros siete a diez días después del nacimiento.

La segunda fase de formación de vasos retinianos comienza entre los días 7 (P7) y 10 (P10) después del nacimiento cuando las ramificaciones colaterales brotan de los capilares del plexo superficial y penetran en la retina donde sus puntas se ramifican y anastomosan lateralmente para formar un “plexo vascular profundo plano”. Mientras el plexo vascular profundo está en su lugar por P14, experimenta una extensa remodelación desde P14 hasta P21. Es de interés señalar que la formación de estas redes vasculares en el ratón recién nacido son sorprendentemente similares a los casos que ocurren en el feto humano del tercer trimestre.

Ventajas y cuantificación del modelo. La reproducibilidad del proceso de desarrollo retiniano murino y su fácil accesibilidad en los animales neonatales proporcionan una oportunidad para evaluar la eficacia de los compuestos antiangiogénicos en un modelo de angiogenia fisiológicamente relevante. Las ventajas adicionales del modelo de ratón recién nacido son la capacidad para evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto angiostático de supuestos antagonistas de angiogenia. Se evaluó la actividad angiostática basándose en el grado de angiogenia en la capa vascular retiniana profunda, más externa (capa secundaria) que se desarrolla entre P8 y P12. El aspecto de la red de vasos sanguíneos internos (capa primaria) se evaluó para el desarrollo normal y signos de toxicidad. No se observaron anomalías en la capa vascular más interna en algunos de los ensayos realizados y descritos en la presente memoria. La evaluación cualitativa de la vascularización de la capa secundaria puede realizarse fotografiando al microscopio las capas superficial y profunda teñidas de manera apropiada de las retinas escindidas y determinando el porcentaje de ojos en los que está inhibida completa o parcialmente la formación de la capa vascular profunda. Todos los datos presentados en la presente memoria se basan en análisis cualitativos del porcentaje de ojos que demostraron un 75 a 100% de inhibición de la formación de la red vascular retiniana profunda después del tratamiento. En la mayoría de los casos, se proporcionan también el porcentaje de ratones que presentaba >95% y 100% de inhibición de formación de la red vascular retiniana profunda.

Preparación de composiciones. El compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina peptidomimético se disuelve en PBS a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml en PBS (concentración 1 x). T2-TrpRS se disuelve en PBS a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml (concentración 1 x). El aptámero VEGF (pegaptanib sódico; compuesto (2)) se disuelve en PBS a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml (1 x concentración) para conseguir una inyección de aproximadamente 1 µg/ojo a la concentración 1 x. Para todos los ensayos de la combinación los compuestos se prepararon en 2 ó 3 veces a la concentración 1 x de cada material y a continuación se combinaron para producir una solución final que contenía cada uno de los compuestos a la misma concentración que se utilizaban solos (p. ej., 1 x, 0,5 x, 0,25 o 0,1 x como puede darse el caso). Para todos los ensayos, se administró por vía intravítrea una sola inyección de 0,5 µl de soluciones de PBS de los fármacos con relación al número de compuestos que se inyectó. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “0,1 x” se refiere a un décimo de la concentración 1 x de un material dado, “0,25 x” se refiere a un cuarto de la concentración 1 x de un material dado, “0,5 x” se refiere a un medio de la concentración 1 x de un material dado, y así sucesivamente para designaciones similares.

Modelo en ratón de retinopatía producida por oxígeno (OIR). Este modelo es descrito por Smith, L., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 101-111 (1994). Se colocaron ratones en hiperoxia (75% de O₂) en P7-P12, seguido de retorno a normoxia. Mientras que bajo hiperoxia se destruyen los vasos retinianos centrales y el sistema vascular profundo no puede formarse. En la vuelta a la normoxia, la retina se vuelve hipóxica y se produce neovascularización patológica.

La cuantificación de la neovascularización en el modelo OIR implicaba la cuantificación de la formación del ovillo neovascular, así como la cuantificación de la obliteración. Se preparan preparaciones microscópicas de toda la retina y los vasos sanguíneos de la misma se tiñen con isolectina GS-IB₄. Se lleva a cabo la detección por la imagen confocal, que se enfoca justo por encima del plexo vascular superficial, y se hace un montaje de cuatro cuadrantes. Se identifican los ovillos neovasculares (Adobe PHOTOSHOP®) y se cuantifica la superficie de pixelación. Además, se hace el seguimiento de las zonas de obliteración (Adobe PHOTOSHOP®), y se cuantifica la superficie de pixelación. Se aplica a continuación en factor de conversión basándose en la obtención de la imagen (resolución, tamaño, etc...) para obtener un valor en µm².

Procedimiento general del ensayo de angiogenia

Para evaluar la actividad angiostática del compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina, T2-TrpRS, y del compuesto (2) aptámero VEGF se utilizó un ensayo de angiogenia *in vivo* en el ratón recién nacido (Balb/C, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Se efectuó la inyección intravítrea y el aislamiento de la retina con un microscopio de disección (SMZ 645, Nikon, Japón). Se practicó una fisura en el párpado el día 7 tras el nacimiento

(P7) con una cuchilla fina para exponer el globo para la inyección. Se inyectaron las muestras (0,5 µl) con una jeringuilla Hamilton provista de una aguja del calibre 32 (Hamilton Company, Reno, NV). La inyección se efectuó entre el ecuador y el limbo de la córnea. Durante la inyección, la posición de la punta de la aguja se controló por observación directa para determinar que estaba en la cavidad vítrea. Los ojos con lesión en los cristalinicos o en la retina producida por la aguja se excluyeron del estudio. Después de la inyección, se volvieron a colocar los párpados para cerrar la fisura.

El día 12 después del nacimiento (P12) se practicó la eutanasia a los animales y se extirparon los núcleos de los ojos. Después de aproximadamente 10 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4% se escindieron la córnea, los cristalinicos, la esclerótica y el humor vítreo mediante una incisión en el limbo. La retina aislada se preparó para la tinción agitando en metanol durante aproximadamente 10 minutos en hielo, seguido de bloqueo en suero bovino fetal al 50% (Gibco, Grand Island, NY) con suero de cabra normal al 20% (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) en PBS durante aproximadamente una hora en hielo. Se observaron específicamente los vasos sanguíneos tiñendo la retina durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 4°C con un anticuerpo de colágeno IV antiratón en conejo (Chemicon, Temecula, CA) diluido 1:200 en tampón de bloqueo o con una isolectina fluorescente conjugada (*Griffonia simplicifolia*, Molecular Probes). Se incubó anticuerpo IgG anticonejo en cabra (Molecular Probes, Eugene, OR) conjugado con ALEXA FLUOR® (Alexa) 594 (dilución 1:200 en tampón de bloqueo) con la retina durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4°C. Las retinas se prepararon a continuación para evaluación microscópica con un medio de preparación microscópica de decoloración lenta (Molecular Probes, Eugene, OR).

Ejemplo 1. Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un inhibidor de señalización de integrina peptidomimético y un inhibidor de señalización de VEGF.

Siguiendo el procedimiento general de ensayo de angiogenia (“Procedimiento General”) descrito anteriormente en la presente memoria, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el día 8 después del nacimiento (P8) con una concentración 0,25 x del compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina (cinco ratones), una concentración 0,5 x de compuesto (2) de aptámero VEGF (cinco ratones) o una combinación de compuesto (1) de 0,25x y una concentración de 0,5 x de compuesto (2) (seis ratones). Como referencia, otro grupo de seis ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en las figuras 4 y 5.

Tabla 1

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%
PBS	100	0	0	0	0
0,5x Compuesto (2)	20	20	20	20	40
0,1x Compuesto (1)	40	0,5	20	20	20
Combinación	0	17	0	0	83

Ejemplo 2. Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS y un inhibidor de señalización de VEGF.

Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 0,1 x de T2-TrpRS (ocho ratones), una concentración 0,1 x de compuesto (2) de aptámero VEGF (ocho ratones) o una combinación de T2-TrpRS a una concentración 0,1 x y una concentración 0,1 x de compuesto (2) (diez ratones). Como referencia, otro grupo de ocho ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 2 y en las figuras 6, 7, 8 y 9.

Tabla 2

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
0,1 x Comp. (2)	87,5	12,5	0	0	0	0	0
0,1x T2-TrpRS	50	37,5	12,5	0	0	0	0
Combinación	10	30	20	20	20	0	0

Ejemplo 3. Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS y un inhibidor de señalización de VEGF.

5 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS (ocho ratones), una concentración 1 x de compuesto (2) aptámero VEGF (ocho ratones), o una combinación de T2-TrpRS a una concentración de 1 x y una concentración de 0,1 x de compuesto (2) (diez ratones). Como referencia, otro grupo de seis ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 3 y en las figuras 10, 11, 12 y 13.

Tabla 3

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
1 x Comp. (2)	37,5	12,5	12,5	12,5	25	0	0
1x T2-TrpRS	12,5	12,5	0	12,5	62,5	12,5	12,5
Combinación	0	30	10	10	80	40	20

Ejemplo 4. Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS y un inhibidor de señalización de VEGF.

20 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS (ocho ratones), una concentración 0,5 x de compuesto (2) aptámero VEGF (diez ratones), o una combinación de T2-TrpRS a una concentración de 1 x y una concentración de 0,5 x de compuesto (2) (diez ratones). Como referencia, otro grupo de seis ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en las figuras 14, 15, 16 y 17.

Tabla 4

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	66,6	16,7	16,7	0	0	0	0
0,5 x Comp. (2)	60	30	0	0	10	0	0
1x T2-TrpRS	12,5	37,5	12,5	12,5	25	0	0
Combinación	0	0	10	10	70	30	20

Ejemplo 5. Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS y un inhibidor de señalización de integrina.

35 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS, una concentración 0,5 x de compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina o una combinación de T2-TrpRS a una concentración de 1 x y una concentración de 0,5 x de compuesto (1), en grupos de seis ratones para cada régimen de tratamiento. Como referencia, otro grupo de cuatro ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 5 y en las figuras 18, 19, 20 y 21.

Tabla 5

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	50	25	25	0	0	0	0
0,5 x Comp. (1)	50	33,3	16,7	0	0	0	0
1x T2-TrpRS	33,3	16,7	33,3	0	16,7	16,7	0
Combinación	0	33,3	16,7	0	50	16,7	0

Ejemplo 6. Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS, un inhibidor de señalización de VEGF y un inhibidor de señalización de integrina.

5 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS, una concentración 0,5 x de compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina, una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF, una combinación de T2-TrpRS a una concentración 1 x y una concentración de 0,5 x de compuesto (1), una combinación de T2-TrpRS a una concentración de 1 x y una concentración 1 x de compuesto (2), o una combinación de T2-TrpRS a una concentración de 1 x y una concentración de 0,5 x de compuesto (1), y una concentración 1 x de compuesto (2), en grupos de ocho ratones para cada régimen de tratamiento. Como referencia, otro grupo de ocho ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 6 y en las figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28.

Tabla 6

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
0,5 x Comp. (1)	50	12,5	12,5	12,5	12,5	0	0
1 x Comp. (2)	37,5	25	12,5	25	0	0	0
1 x T2-TrpRS	50	25	12,5	12,5	0	0	0
T2-TrpRS + Comp. (2)	25	25	25	0	25	25	12,5
T2-TrpRS + Comp. (1)	50	0	0	0	50	37,5	25
T2-TrpRS + (1) y (2)	0	0	0	0	100	87,5	75

20 **Ejemplo 7.** Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS, un inhibidor de señalización de VEGF y un inhibidor de señalización de integrina.

25 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS, una concentración 0,5 x de compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina, una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF, una combinación de compuesto (1) a una concentración 0,5 x y una concentración de 1 x de compuesto (2), o una combinación de T2-TrpRS a una concentración 1 x, una concentración 0,5 x de compuesto (1) y una concentración 1 x de compuesto (2), en grupos de ocho ratones para cada régimen de tratamiento. Como referencia, otro grupo de seis ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 7 y en las figuras 29, 30, 31, 32, 33 y 34.

Tabla 7

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
0,5 x Comp. (1)	12,5	25	12,5	12,5	37,5	0	0
1 x Comp. (2)	25	25	0	12,5	37,5	0	0
1 x T2-TrpRS	25	12,5	12,5	0	50	12,5	0
Comp. (1) + Comp. (2)	0	12,5	12,5	25	50	25	25
T2-TrpRS + (1) y (2)	0	0	0	0	100	62,5	50

40 **Ejemplo 8.** Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS y un inhibidor de señalización de VEGF.

45 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS (diez ratones), una concentración 0,25 x de compuesto (2) aptámero VEGF (once ratones), o una combinación de T2-TrpRS a una concentración de 1 x y una concentración de 0,25 x de compuesto (2) (once ratones). Como referencia, otro grupo de ocho ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
0,25 x Comp. (2)	54,5	36,4	0	0	9,1	0	0
1x T2-TrpRS	30	30	20	10	10	0	0
Combinación	18,2	18,2	9,1	18,2	27,3	0	0

5 **Ejemplo 9.** Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con una combinación de un fragmento angiostático de TrpRS, un inhibidor de señalización de VEGF y un inhibidor de señalización de integrina.

10 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos (en grupos de ocho ratones cada uno) se inyectaron por vía intravítrea el P4 con una concentración 1 x de T2-TrpRS, una concentración 1 x de compuesto (1) inhibidor de señalización de integrina, una concentración 1 x del compuesto (2) aptámero VEGF, una
 15 combinación de compuesto (1) a una concentración 1 x y una concentración de 1 x de compuesto (2), o una combinación de T2-TrpRS a una concentración 1 x, una concentración 1 x de compuesto (2) y una concentración 1 x de compuesto (2). Como referencia, otro grupo de ocho ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 9 y en las figuras 35 a 42.

Tabla 9

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	75	25	0	0	0	0	0
1 x Comp. (1)	25	12,5	12,5	37,5	12,5	0	0
1 x Comp. (2)	25	0	12,5	12,5	50	25	12,5
1 x T2-TrpRS	12,5	0	25	12,5	50	12,5	0
Comp. (1) + T2-TrpRS	0	12,5	12,5	25	50	25	12,5
Comp. (1) + (2)	12,5	12,5	0	12,5	62,5	62,5	50
T2-TrpRS + Comp. (2)	0	12,5	12,5	12,5	62,5	37,5	25
T2-TrpRS + (1) + (2)	0	25	0	0	75	75	62,5

20 **Ejemplo 10.** Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con dosis variables de un fragmento angiostático de TrpRS.

25 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos (en grupos de ocho a doce ratones cada uno) se inyectaron por vía intravítrea el P4 con T2-TrpRS, a las concentraciones de 0,1 x (8 ratones), 0,3 x (12 ratones), 1 x (12 ratones), 2 x (12 ratones) y 3 x (12 ratones). Como referencia, otro grupo de 10 ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como
 30 se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%
PBS	100	0	0	0	0
0,1 x Comp. (2)	75	25	0	0	0
0,3 x T2-TrpRS	33,3	16,7	8,3	16,7	25
1 x T2-TrpRS	8,3	16,7	25	8,7	41,7
2 x T2-TrpRS	8,3	25	0	16,7	41,7
3 x T2-TrpRS	66,7	25	8,7	0	0

35 **Ejemplo 11.** Tratamiento de los ojos de ratón recién nacido con dosis variables de un fragmento angiostático de TrpRS.

40 Siguiendo el Procedimiento General, los ojos de ratones Balb/C recién nacidos (en grupos de seis a catorce ratones cada uno) se inyectaron por vía intravítrea el P4 con T2-TrpRS, a las concentraciones de 0,3 x (6 ratones), 1 x (14 ratones), 2 x (8 ratones), 3 x (7 ratones) y 5 x (6 ratones). Como referencia, otro grupo de 10 ratones recibió solamente una inyección intravítrea de PBS. El P12, se practicó la eutanasia a los ratones y se extirparon las retinas de los ojos inyectados, se tiñeron, se montaron las preparaciones microscópicas y se evaluaron al microscopio como
 45 se describe en el Procedimiento General. Se evaluó la vascularidad de la capa secundaria (vascular retiniana

externa) basándose en el porcentaje de vascularización comparado con los ojos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%
PBS	60	40	0	0	0
0,3 x Comp. (2)	33,3	16,7	0	0	50
1 x T2-TrpRS	14,3	14,3	7,1	14,3	50
2 x T2-TrpRS	12,5	12,5	12,5	12,5	50
3 x T2-TrpRS	14,3	14,3	14,3	28,5	28,5
5 x T2-TrpRS	16,6	33,3	33,3	16,6	0

Los datos para los ratones que presentan >95% y 100% de inhibición en los ejemplos anteriores demuestran que incluso las composiciones que comprenden por lo menos dos materiales seleccionados del grupo consistente en un fragmento angiostático de TrpRS, un inhibidor de señalización de VEGF y un inhibidor de señalización de integrina proporcionan inesperadamente mayor eficacia para la inhibición de neovascularización en el modelo de ojo de ratón recién nacido que los niveles esperados de inhibición de los efectos aditivos simples de la combinación de los componentes individuales. Esto es también evidente cuando se combinan los resultados de varios ejemplos como en la tabla 12, que compila los resultados de los ejemplos a concentraciones de 1 x a 2 x del compuesto (1) inhibidor de integrina, 0,5 x a 1 x del compuesto (2) aptámero de VEGF y 1 x de T2-TrpRS así como composiciones de la presente invención (valores de inhibición en negrita en la tabla 12) que comprenden combinaciones de por lo menos dos de entre el compuesto (1), compuesto (2) y T2-TrpRS. El número de ratones en cada grupo se indica entre paréntesis para cada grupo. Los datos en la tabla 12 presentan claramente un mayor nivel de inhibición inesperadamente de formación del vaso sanguíneo en la capa vascular profunda para los ojos de ratones tratados con las composiciones que comprenden combinaciones de por lo menos dos de entre el compuesto (1), el compuesto (2) y T2-TrpRS comparadas con los niveles de inhibición de los tratamientos con los inhibidores individuales por ellos mismos o la suma numérica de los mismos.

Tabla 12. Datos de los compuestos de los ejemplos.

% Inhibición	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS (38 ratones)	84,2	10,5	5,3	0	0	0	0
1 x-2 x Comp. (1) (30 ratones)	33,3	20	13,3	16,7	16,7	0	0
1x Comp. (2) (30 ratones)	39,1	20	7,6	11,9	21,4	4,7	2,4
1x T2-TrpRS (46 ratones)	23,9	17,4	15,2	8,7	34,8	8,7	2,2
Comp. (1) + T2-TrpRS (22 ratones)	18,2	13,6	9,1	9,1	50	27,3	13,6
Comp. (1) +(2) (16 ratones)	6,3	12,5	6,3	18,8	56,3	43,7	37,5
T2-TrpRS + Comp. (2) (36 ratones)	5,6	11,1	13,9	8,3	61,1	33,3	19,4
T2-TrpRS + (1) + (2) (24 ratones)	0	8,3	0	0	91,7	79,2	62,5

Los resultados de los ejemplos 10 y 11 (tablas 10 y 11) demuestran que la eficacia de T2-TrpRS alcanzó un máximo a aproximadamente 1 x a 2 x de concentración y no proporcionaban ninguna más del 50% de ratones con una inhibición de 75-100% en la capa vascular profunda. La eficacia comenzó a disminuir a 2 x y mayor concentración. Por lo tanto aún con dosis crecientes, T2 no proporcionó más de aproximadamente 50% de eficacia al nivel de inhibición de 95 a 100%.

Ejemplo 12. Efectos sinérgicos de la administración del fragmento angiostático T2-TrpRS, del aptámero VEGF y del inhibidor peptidomimético de señalización de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

Para estudiar el efecto de la combinación de diferentes moléculas angiostáticas, se utilizaron tres compuestos angiostáticos conocidos por identificar rutas angiogénica, críticas, pero independientes: una pequeña molécula antagonista de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (compuesto (1)), "EMD 472523" adquirido en Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, un antagonista de VEGF₁₆₅ (compuesto (2); pegaptanib sódico) y una forma truncada de triptófano ARNt sintetasa (T2-TrpRS, adquirida en Angiosyn Inc., La Jolla, CA). Aunque el mecanismo exacto de actuación para T2-TrpRS no se ha aclarado completamente, su mecanismo de actuación no está directamente ligado a VEGF o al antagonismo de integrina.

El modelo de angiogenia retiniana de ratón recién nacido se utilizó para probar la eficacia de cada monoterapia, y varias combinaciones de estos compuestos individuales. Como se expuso anteriormente en la presente memoria, los ratones nacen sin un sistema vascular retiniano. Durante las tres primeras semanas después del nacimiento se desarrolla un sistema vascular similar al del adulto. El sistema vascular retiniano forma tres plexos planos distintos desarrollando el plexo vascular superficial durante la primera semana después del nacimiento. El día 8 después del nacimiento (P8), los vasos del plexo superficial se ramifican y emigran hacia el plexo profundo en el borde externo de

la capa nuclear interna. Para demostrar las propiedades angiostáticas de cada monoterapia como solución de combinación, se realizaron inyecciones intravítreas el P7, cuando la formación de la red superficial está próxima a la terminación, pero antes de que haya comenzado la formación de los plexos profundos. Los efectos sobre la formación del plexo vascular profundo se analizaron a continuación cinco días después (P12). El grado de inhibición de cada retina inyectada se puntuó como 0-10%, 10-25%, 25-50%, 50-75% o 75-100% (figura 48) con el grupo de inhibición 75-100% más separado en los niveles de inhibición >90% y 100% (figura 49). El aspecto del plexo vascular primario formado anteriormente, así como la morfología retiniana total, se evaluaron para los signos de toxicidad.

Preparación de muestras. El antagonista de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (compuesto (1)) se almacenó en forma de polvo liofilizado en un desecador a temperatura ambiente (I.A.) o -20°C (V.A.) y se disolvió en 1x PBS sin ARNasa estéril inmediatamente antes de uso. Se sintetizó el aptámero VEGF (compuesto (1)) como compuesto conjugado de PEG 40kDa (Transgenomic Inc., Boulder, CO) basándose en la información publicada, Bridonneau, *et al.*, *J. Chromatogr. B. Diomed. Sci. App.* 726:237-47 (1999). Se determinó que el compuesto era puro por cromatografía líquida en fase inversa. Las concentraciones publicadas en la presente memoria se refieren a la concentración final del aptámero VEGF activo en lugar de la concentración total del compuesto conjugado PEG y se determinaron por análisis espectrofotométrico a 260/280 nm. El péptido T2-TrpRS se preparó como compuesto recombinante como se describe en Otani, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA.* 99: 178-183 (2002) y en la solicitud provisional US de la patente n° de serie 60/598.019 presentada el 2 de agosto de 2004, incorporados a la presente memoria como referencia en su totalidad. El producto purificado se almacenó en glicerol al 50% a -20°C y se dializó en 1 x PBS estéril inmediatamente antes de su uso. Se prepararon soluciones de la combinación creando inicialmente 3 x soluciones madre de cada compuesto individual. Los compuestos se mezclaron a continuación y con PBS cuando procedía, para hacer una solución final que contenía cada compuesto deseado a una concentración equivalente a cada concentración de monoterapia correspondiente.

Inyecciones intravítreas. Todo el trabajo en animales contempla las directrices estrictas del protocolo para la atención humana y la utilización de animales. Se llevaron a cabo inyecciones intravítreas, se diseccionaron las retinas y se observó el sistema vascular. Se indujo OIR según el protocolo descrito por Smith, *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:101-111 (1994), exponiendo crías 7 días (P7) después del nacimiento y a sus madres a un medio de 75% de oxígeno (hiperoxia) durante 5 días, seguido por un retorno al aire ambiente (normoxia). Se realizaron inyecciones intravítreas el P12, inmediatamente después del retorno a la normoxia y las retinas se analizaron el P17. Se tiñeron los vasos sanguíneos utilizando isolectina GS-IB₄ de *Griffonia simplicifolia* (lectina GS), conjugada con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, dilución 1:150 en PBS). Se toman imágenes confocales utilizando una lente objetivo 4x, enfocando minuciosamente justo antes de la membrana del límite interno de la retina, haciendo prominentes los ovillos neovasculares prelaminares. Se tomaron cuatro imágenes superpuestas de cada retina y cada una de las imágenes se convirtió en un tamaño de 2 x 2 pulgadas con 300 píxeles por pulgada. Las zonas del ovillo neovascular fueron cuantificadas por individuos enmascarados utilizando preparaciones microscópicas completas de la retina. Los ovillos se seleccionaron específicamente basándose en su aspecto característico y la intensidad mayor de la tinción con isolectina, utilizando la herramienta varita mágica en el programa Adobe PHOTOSHOP®. Se determinó a continuación la zona total en píxeles. Las zonas de formación del ovillo neovascular se normalizaron para las retinas OIR de referencia inyectadas con PBS.

Dosificación. Se realizaron en primer lugar experimentos de dosificación para determinar la dosis eficaz máxima para cada compuesto. Se observó que cada compuesto tiene una curva de eficacia en forma de campana con dosis eficaces máximas de 5 a 10 μg (10 a 20 nmoles) por ojo para el antagonista de integrina (figura 46), 1,0-2,0 μg (108-215 pmoles) por ojo para el aptámero VEGF (figura 44) y 0,25-0,5 μg (5,2-10,4 pmoles) por ojo para T2-TrpRS (figura 43). Las inyecciones individuales de cada monoterapia a la dosis óptima, y soluciones que contienen combinaciones apropiadas de cada compuesto a dosis equivalentes se realizaron a continuación para comparar las actividades angiostáticas. A las dosis individuales máximas, aproximadamente 35% de las retinas resultaron inafectadas por la inyección del antagonista de integrina o del aptámero VEGF. El otro 67% de las retinas estaba comprendido básicamente uniformemente dentro del intervalo 10-25%, 25-50%, 50-75% o 75%-100 (tabla 13A más adelante). La inhibición de la red vascular profunda con el péptido T2-TrpRS fue ligeramente mejor. El 24% de las retinas inyectadas con el T2-TrpRS desarrolló un plexo vascular profundo normal y completo mientras que el 35% de las retinas inyectadas con el péptido T2-TrpRS presentaba más del 75% de inhibición en comparación con el 17 y el 21% para el antagonista de integrina y el aptámero VEGF respectivamente (tabla 13A a continuación). Cuando los compuestos angiostáticos se inyectaban en combinación, los efectos angiostáticos sobre la neovascularización eran sorprendentes. Cada combinación doble, antagonista de integrina + T2-TrpRS, antagonista de integrina + aptámero VEGF y T2-TrpRS + aptámero VEGF, demostraban la mejora significativa de la actividad angiostática sobre las monoterapias. Significativamente pocas retinas eran resistentes al tratamiento angiostático utilizando las politerapias. La neovascularización fue inhibida por más del 75% en una mayoría de las retinas tratadas con alguna de las combinaciones dobles (tabla 13A a continuación).

Cuando los tres compuestos se inyectaron conjuntamente a las mismas dosis óptimas que las inyecciones de monoterapias correspondientes (1x triple combinación) más del 90% de las retinas tenía >75% de inhibición. A diferencia de la monoterapia o de las retinas tratadas con la combinación doble, todas las retinas tratadas con la combinación triple presentaban algún grado de inhibición neovascular. Además, solamente el 8% de las retinas

inyectadas tenían todavía algunos niveles significativos de neovascularización en absoluto. Se observó inhibición casi completa de la angiogenia en otro 92% de las retinas inyectadas con el compuesto de triple combinación (tabla 13A más adelante; figura 48). Las diferencias en la eficacia angiostática se volvieron aún más pronunciadas cuando >75% de la categoría de inhibición se subclasificó dentro de los niveles del >90% de inhibición y del 100% de inhibición (figura 49). Más del 80% de las retinas inyectadas con la combinación triple presentaban más del 90% de inhibición de formación del plexo vascular profundo y el 63% presentaban 100% de inhibición de neovascularización donde ni incluso un sólo brote neovascular pudo observarse. Esta es una mejora sustancial sobre ambas monoterapias que demuestra 100% de inhibición en <5% de las retinas tratadas y las politerapias dobles. Además, el plexo vascular superficial de muchas de las retinas tratadas por triple combinación recordaba el de una retina P7 normal en lugar de las retinas P12, lo que indica que más crecimiento vascular dentro del plexo superficial había sido evitado también por la triple combinación inmediatamente después de la combinación. La inhibición del crecimiento del plexo superficial no se observó en ninguna retina tratada con monoterapia o terapia doble. Los vasos más centrales del plexo superficial que ya se habían formado antes de la inyección permanecieron normales, lo que indica niveles despreciables de toxicidad para el sistema vascular preexistente. Además, no se observaron señales de actividad neuronal, y la morfología retiniana permaneció inalterada, lo que indica que no había ocurrido ningún efecto secundario negativo observable por la inyección de la solución de triple combinación. Las imágenes de los plexos vasculares superficial y profundo de un experimento representativo completo se presentan en la figura 50.

Para analizar la sinergia, y para probar si actividad angiostática potente podría mantenerse utilizando dosis menores de la triple combinación, se probaron diluciones en serie. La combinación triple fue todavía muy eficaz para inhibir la angiogenia cuando se diluyó hasta 100 veces (0,01x triple combinación) (tabla 13B más adelante; figuras 52 y 53). Cuando se preparó la triple combinación combinando los compuestos individuales a un décimo de su dosis óptima, casi el 80 de las retinas tratadas todavía presentaban >75% de inhibición y el 50% de las retinas presentaban inhibición completa (100%) de neovascularización. A 0,1 x concentraciones (1 µg/antagonista de integrina en el ojo, 0,2 µg/aptámero VEGF en el ojo y 0,025 µg/T2-TrpRS en el ojo), la inhibición de neovascularización por cada uno de los compuestos angiostáticos fue insignificante (tabla 13C más adelante; figura 54). Se observó alguna eficacia después de la inyección de la combinación doble 0,1 x T2-TrpRS y 0,1 x aptámero VEGF. Sin embargo, a pesar de que esta combinación era el angiostático más eficaz de todas las combinaciones dobles probadas, la actividad angiostática era todavía mínima en comparación con los niveles de inhibición observados por la inyección de la 0,1 x triple combinación.

TABLA 13

A. Experimento de combinación del modelo de angiogenia en ratón recién nacido

Porcentaje de retinas con los niveles de inhibición neovascular indicados

Inyección	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>90%	100%
PBS	38	84,2	10,5	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
5-10 µg antagonista de integrina	30	33,3	20,0	13,3	16,7	16,7	0,0	0,0
1-2 µg aptámero VEGF	42	39,1	20,0	7,6	11,9	21,4	4,7	2,4
0,25 µg T2-TrpRS	46	23,9	17,4	15,2	8,7	34,8	8,7	2,2
T2-TrpRS + ant. de integrina	22	18,2	13,6	9,1	9,1	50,0	27,3	13,6
Ant. de integrina + apt. VEGF	21	6,3	12,5	6,3	18,8	56,3	43,7	28,5
T2-TrpRS + apt. CEGF	36	5,6	11,1	13,9	8,3	61,1	38,3	19,4
Triple combinación	24	0	8,3	0	0	91,7	83,2	62,6

B. Experimento de dilución en serie de la triple combinación

Inyección	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>90%	100%
PBS	14	71,4	14,3	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0
1x triple combinación	16	0,0	0,0	0,0	7,1	92,8	71,4	57,1
0,5x triple combinación	16	0,0	0,0	0,0	0,5	100,0	87,5	50,0
0,25x triple combinación	16	0,0	0,0	0,0	0,5	100,0	68,8	43,8
0,1x triple combinación	18	0,0	5,5	11,1	5,5	77,8	61,1	44,4
0,05x triple combinación	10	0,0	10,0	20,0	20,0	50,0	30,0	20,0
0,01x triple combinación	10	10,0	10,0	30,0	30,0	20,0	20,0	10,0

C. Monoterapia a baja dosis frente a experimento de combinación

Niveles de inhibición:	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>90%	100%
PBS	8	100	0	0	0	0	0	0
0,1x ant. de integrina (1,0µg)	10	90	10	0	0	0	0	0
0,1x apt. VEGF (0,20µg)	8	75	25	0	0	0	0	0
0,1x T2-TrpRS (0,025µg)	10	50	37,5	12,5	0	0	0	0

Niveles de inhibición:	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>90%	100%
0,1x T2-TrpRS + apt. VEGF	10	10	30	20,0	20	20	0	0
0,1x triple combinación	18	0	5,5	11,1	5,5	77,8	61,1	44,4

Ejemplo 13. Efectos sinérgicos de una "terapia triple"

5 El modelo para ratón de retinoterapia provocada por oxígeno (OIR) descrito anteriormente en la presente memoria es un modelo muy aceptado de neovascularización provocada por hipoxia en la retina. Los cambios vasculares asociados son consecuentes, reproducibles y cuantificables. En los últimos años la utilización de este modelo se ha extendido al estudio general de las vasculopatías isquémicas relacionadas con la enfermedad y a las intervenciones antiangiogénicas relacionadas. Para estudiar las propiedades sinérgicas de estos compuestos angiostáticos en un modelo más patológico de angiogenia, se probaron los efectos de monoterapias y politerapias sobre la formación de la neovascularización patológica en el modelo OIR en ratón. Para los experimentos iniciales, se utilizaron las dosis óptimas obtenidas en el modelo de angiogenia en recién nacidos. En cada caso, las politerapias demostraron actividades angiostáticas mejoradas en comparación con las monoterapias. Sin embargo, debido a las actividades angiostáticas de cada monoterapia, fue difícil determinar si los resultados de combinar varios compuestos eran sinérgicos o sencillamente aditivos. De este modo basándose en los resultados observados utilizando el modelo de angiogenia retiniana en ratón recién nacido que demostraba eficacias equivalentes de las politerapias a dosis relativamente bajas, cada monoterapia y varias terapias de combinación se probaron a un décimo de las dosis óptimas.

20 De nuevo, la concentración de compuesto en las soluciones de la combinación fue equivalente a la concentración correspondiente de la monoterapia. A concentraciones inferiores, no se observó ninguna inhibición significativa de la formación patológica del ovilleo neovascular después de los tratamientos de monoterapia. Sin embargo, se observaron reducciones significativas en las formaciones del ovilleo neovascular utilizando cada combinación doble (figura 57). Cuando el antagonista de integrina se combinaba con el péptido T2-TrpRS, la formación patológica del ovilleo se redujo >50%. Combinando el antagonista de integrina con el aptámero VEGF se reducía la formación del ovilleo >40%. Cuando el péptido T2-TrpRS se combinaba con el aptámero VEGF, se redujo la neovascularización patológica casi el 80% en comparación con las retinas tratadas con la referencia. Muchas de las retinas tratadas con la combinación doble T2-TrpRS/aptámero VEGF parecían casi normales con prácticamente ninguna neovascularización patológica evidente (figura 58).

30 Se ha demostrado un aumento drástico en la actividad angiostática por los compuestos angiostáticos de múltiple combinación que se dirigen a distintas rutas de angiogenia. Se observaron actividades angiostáticas potentes tanto en un modelo de desarrollo como en uno patológico de angiogenia incluso después de combinar los compuestos a dosis que no tienen actividad monoterapéutica. Esto sugiere un efecto sinérgico en lugar de simplemente un efecto aditivo. Estos datos sugieren también que rutas de direccionamiento múltiple pueden ser necesarias para la terapia antiangiogénica clínica eficaz y puede proporcionar un nuevo paradigma para el tratamiento de enfermedades neovasculares. Preferentemente, por lo menos dos terapias angiogénicas se combinan (p. ej., una combinación del inhibidor de señalización de VEGF, tal como un aptámero VEGF, combinado con un fragmento angiostático de TrpRS, tal como el fragmento T2 de TrpRS y opcionalmente un antagonista de integrina).

40 Al dirigir e inhibir tres rutas angiogénicas independientes, se consiguió la inhibición casi completa de la angiogenia en dos modelos independientes de angiogenia. La inhibición completa de la neovascularización puede ser importante para el tratamiento eficaz de las enfermedades relacionadas con la angiogenia utilizando terapias angiostáticas. En el modelo de los autores, incluso los mejores resultados en las inyecciones de monoterapia generalmente solo bloquearon el 50 al 75% de desarrollo de nuevos vasos. Esto significa que en la mayoría de los casos, todavía se desarrollaba una cantidad significativa de neovascularización. Por el contrario, dos tercios de las retinas del ratón recién nacido inyectadas con la terapia de triple combinación presentaban la inhibición completa del 100% de formación neovascular (tabla 13). Así mismo, en el modelo OIR de angiogenia patológica, una gran parte de los ratones tratados demostraron poca o ninguna formación del ovilleo neovascular patológica (figura 58). Durante el tratamiento del cáncer, pueden ser necesarios altos niveles de inhibición de angiogenia para dar lugar a la inanición completa de las células tumorales y a evitar más crecimiento del tumor. Las monoterapias que solamente inhiben el 50% del crecimiento neovascular sólo es probable que reduzcan, en lugar de eliminar, el oxígeno y los nutrientes disponibles para que crezcan rápidamente las células tumorales. Aunque esto puede inicialmente ralentizar el crecimiento, puede no ser suficiente para evitar más crecimiento del tumor. En estos casos, las politerapias que pueden conseguir la inhibición completa de la neovascularización mejorarían en gran medida los resultados de las terapias antiangiogénicas durante los tratamientos del cáncer. Además, utilizando dosis relativamente bajas mientras se mantiene un fuerte potencial angiostático, la posibilidad de efectos secundarios desfavorables generados por tratamientos angiostáticos puede minimizarse. Conjuntamente, los datos anteriores demuestran la utilidad beneficiosa de combinar diferentes moléculas angiostáticas para el tratamiento de la neovascularización asociado a la enfermedad.

60 Las composiciones de la presente invención, que comprenden un fragmento angiostático de triptofanil de ARNt sintetasa (TrpRS), un inhibidor de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y un inhibidor de señalización de integrina, y sus procedimientos de utilización, proporcionan un régimen de tratamiento nuevo y

sorprendentemente eficaz para las enfermedades neovasculares, particularmente para las enfermedades neovasculares de los ojos.

Ejemplo 14. Tratamiento de un tumor

5 El glioblastoma multiforme es un tumor cerebral maligno incurable normalmente mortal al año de diagnóstico. La
 10 estirpe celular 9L de gliosarcoma de rata se utiliza como modelo para gliomas malignos. En ambas formas de
 glioma, el tumor está muy vascularizado y se infiltra en el tejido cerebral normal. El animal no tratado que recibe una
 inyección de células 9L por vía intracerebral tiene un vínculo de supervivencia de aproximadamente 3 semanas, una
 vez se han implantado las células del tumor. El día 0, se crearon tumores 9L intracerebrales por inoculación
 estereotática de aproximadamente 50.000 células en aproximadamente 2 µl de medio de Eagle modificado por
 Dulbecco (MEMD; Life Technologies, Gaithersburg, MD) en el lóbulo frontal derecho de ratas Fisher CD 344 que
 habían sido previamente anestesiadas con ketamina y xilacina.

15 El día 6, se inyectó por vía estereotática una inyección intravenosa rápida de 10µl de una composición de la
 invención (4,5 mg/l de T2-TrpRS, 30 ml/l de compuesto (1) y 6 mg/l de compuesto (2); pegaptanib sódico) durante
 aproximadamente 2 minutos en la misma región del cerebro que se habían implantado las células 9L. Después de la
 inyección intravenosa rápida, se insertó una bomba en la bolsa subcutánea entre las escápulas. Se insertó un
 20 catéter conectado por tubuladura a la bomba en el mismo orificio de la arandela practicado para la introducción de
 las células 9L y se fijó en el sitio. Cada bomba tenía un caudal de aproximadamente 8µl por hora. Una cantidad
 adicional de la composición de la invención se bombeaba continuamente dentro del cerebro de cada animal durante
 aproximadamente 24 horas. El bombeo continuo distribuyó la composición en todo el hemisferio del cerebro en el
 que se habían implantado las células tumorales. Nueve ratas recibieron la composición de la invención y otras nueve
 recibieron PBS convencional como grupo de referencia.

25 El día 13, se hizo una incisión entre las escápulas, se retiró la bomba y se sustituyó por una bomba nueva. El
 tratamiento con la composición de la invención o PBS se reanudó durante 24 horas más con la nueva bomba a los
 mismos caudales de bombeo. Hubo un aumento del 21 por ciento de supervivencia en las ratas tratadas con la
 composición de la invención en comparación con el grupo de referencia tratado con PBS (véase la figura 60).

Listado de secuencias

<110> The Scripps Research Institute

35 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
 NEOVASCULARES

<130> 18-209 T2

40 <140> EP
 <141> 2005-06-06

<150> US 60/577,156
 <151> 2004-06-04

45 <150> US 60/585,273
 <151> 2004-07-01

50 <150> US 60/655,801
 <151> 2005-02-24

<160> 6

55 <170> FastSEQ para la versió windows 4.0

<210> 1
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

60 <400> 1

Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly
 1 Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr
 20 Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His
 35 Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe
 50 Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly
 65 His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn
 85 Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys
 100 Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Val Glu Asn Ala Lys
 115 Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser
 130 Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val
 145 Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly
 165 Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln
 180 Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg
 195 Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr
 210 Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
 225 Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
 245 Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr
 260 Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly
 275 Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val
 290 Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys
 305 Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly
 325 Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu
 340 His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe
 355 Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
 375

- <210> 2
- 5 <211> 379
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

- <400> 2

```

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

<210> 3
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 3

Met Ser Tyr Lys Ala Ala Ala Gly Glu Asp Tyr Lys Ala Asp Cys Pro
 1 5 10 15
 Pro Gly Asn Pro Ala Pro Thr Ser Asn His Gly Pro Asp Ala Thr Glu
 20 25 30
 Ala Glu Glu Asp Phe Val Asp Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser Ser Ala
 35 40 45
 Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser Ser Lys
 50 55 60
 Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly Gln Arg
 65 70 75 80
 Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg Asp Met
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr Leu Tyr
 100 105 110
 Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly His Leu Ile
 115 120 125
 Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn Val Pro Leu
 130 135 140
 Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp Ile Ile
 165 170 175
 Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp Leu Asp
 180 185 190
 Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys Ile Gln
 195 200 205
 Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe Thr Asp
 210 215 220
 Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro
 225 230 235 240
 Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile
 245 250 255
 Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met
 260 265 270
 Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu
 275 280 285
 His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser
 290 295 300
 Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln
 305 310 315 320
 Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr
 325 330 335
 Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser
 340 345 350
 Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln
 355 360 365
 Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys
 370 375 380
 Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala
 385 390 395 400
 Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro
 405 410 415
 Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
 420

<210> 4
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 4

Ser 1 Asn 5 His 10 Gly 15 Pro 20 Asp 25 Ala 30 Thr 35 Glu 40 Ala 45 Glu 50 Glu 55 Asp 60 Phe 65 Val 70 Asp 75 Lys 80 Ser 85 Thr 90 Val 95 Ile 100 Arg 105 Thr 110 Ser 115 Gly 120 Phe 125 Arg 130 Thr 135 Lys 140 Ile 145 Val 150 Glu 155 Asp 160 Tyr 165 Thr 170 Phe 175 Lys 180 Ile 185 Thr 190 Val 195 Gly 200 Phe 205 Thr 210 Ser 215 Ala 220 Ile 225 Glu 230 Arg 235 Thr 240 Asp 245 Lys 250 Thr 255 Phe 260 Tyr 265 Ser 270 Thr 275 Ile 280 Lys 285 Thr 290 Phe 295 Thr 300 Glu 305 Ala 310 Arg 315 Thr 320 Glu 325 Val 330 Asp 335 Thr 340 Lys 345 Ile 350 Tyr 355 Thr 360 Glu 365 Val 370 Ile 375 Ala 380 Thr 385 Val 390 Phe 395 Lys 400 Ser 405 Phe 410 Thr 415 Lys 420 Thr 425 Thr 430 Thr 435 Thr 440 Thr 445 Thr 450 Thr 455 Thr 460 Thr 465 Thr 470 Thr 475 Thr 480 Thr 485 Thr 490 Thr 495 Thr 500 Thr

<210> 5
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 5

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

5

10

	50					55					60					
	Gly	Asn	Pro	Ala	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Gly	Pro	Asp	Ala	Thr	Glu	Ala
	65					70					75					80
	Glu	Glu	Asp	Phe	Val	Asp	Pro	Trp	Thr	Val	Gln	Thr	Ser	Ser	Ala	Lys
					85					90					95	
	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Ile	Val	Arg	Phe	Gly	Ser	Ser	Lys	Ile
				100					105					110		
	Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Gln	Arg	Pro
			115					120					125			
	His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His	Arg	Asp	Met	Asn
							135					140				
	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Thr
	145					150					155					160
	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly	His	Leu	Ile	Pro
					165					170					175	
	Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn	Val	Pro	Leu	Val
				180					185					190		
	Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys	Asp	Leu	Thr	Leu
			195					200					205			
	Asp	Gln	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys	Asp	Ile	Ile	Ala
							215					220				
	Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr
	225					230					235					240
	Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val	Lys	Ile	Gln	Lys
					245					250					255	
	His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Thr	Asp	Ser
				260					265					270		
	Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser
			275					280					285			
	Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg	Thr	Asp	Ile	Gln
							295					300				
	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr	Phe	Arg	Met	Thr
	305					310					315					320
	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Arg	Ile	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro	Ala	Leu	Leu	His
					325					330					335	
	Ser	Thr	Phe	Phe	Pro	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr	Lys	Met	Ser	Ala
				340					345					350		
	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr	Ala	Lys	Gln	Ile
			355					360					365			
	Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly	Arg	Asp	Thr	Ile
							375					380				
	Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Phe
	385					390					395					400
	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys	Leu	Glu	Gln	Ile
					405						410				415	
	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys
				420					425					430		
	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	His	Gln	Ala	Arg
								440					445			
	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe	Met	Thr	Pro	Arg
		450					455					460				
	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln									
	465					470										

<210> 6
 <211> 27
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> 2'fluoro C enlazado en la posición 5' mediante un enlazador pentil amino a una cadena de polietilenglicol de 40 kiloDalton

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2), C3), (9), (11), (15)
 <223> 2'OMe G

<220>
<221> misc_feature
<222> (4), (5)
5 <223> 2'OH (ribo) A

<220>
<221> misc_feature
<222> (6), (10), (14), (17), (18), (20), (24)
10 <223> 2'fluoro U

<220>
<221> misc_feature
<222> (7), (16), (22), (25), (26)
15 <223> 2'fluoro C

<220>
<221> misc_feature
<222> (8), (12), (13), (19), (21), (23)
20 <223> 2'OMe A

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
25 <223> 2'OMe G enlazado en la posición 3' al extremo 3' de desoxi T

<400> 6
cggaucagu gaaugcuuau acauccg 27

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende (i) un fragmento angiostático de triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS); (ii) un agente antiangiogénico que es un inhibidor de señalización de la integrina; y (iii) un agente terapéutico en la que el agente terapéutico es un agente antiinflamatorio.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta un tamaño molecular de más de aproximadamente 48 KDa.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta un tamaño molecular de más de aproximadamente 46 KDa.
- 15 4. Composición según la reivindicación 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta un tamaño molecular de más de aproximadamente 43 KDa.
5. Composición según la reivindicación 1, en la que el fragmento angiostático de TrpRS presenta una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el inhibidor de señalización de integrina es un antagonista de integrina angiostática.
- 25 7. Composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable para la misma.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neovascular.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8, en la que la enfermedad neovascular se selecciona de entre el grupo constituido por enfermedades neovasculares oculares, glaucoma rubeótico, pterigión, cánceres con tumor sólido, artrosis, artritis reumatoide, anomalías vasculares, malformaciones vasculares y psoriasis.

T2 - TrPRS (SEC ID N°: 1)

MSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPSSEAM
HVGHLIPFI FTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYSAYAVENAKDIIACGFDINKTFIFSDLDYMGMSG
FYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTSDDCIGKISFPAIQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDV
APRIGYPKALLHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTD TAKQIKTKVNKHAFSGGRDTIEEHRQFGGNCDDVDSF
MYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFQ

T2 - TrPRS - GD (SEC ID N°: 2)

MSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPSSEAM
HVGHLIPFI FTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYGD AVENAKDIIACGFDINKTFIFSDLDYMGMSG
FYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTSDDCIGKISFPAIQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDV
APRIGYPKALLHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTD TAKQIKTKVNKHAFSGGRDTIEEHRQFGGNCDDVDSF
MYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFQ

FIG. 1

Mini Trprs (SEC ID N°: 3)

MSYKAAAGEDYKADCPGNPAPTSNHGPDATEAEEDFVDPWTVQTSSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERAT
GQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKPFYLYTGRGPPSEAMHVGHLPFI FTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKY
LWKDLTLDQAYSAYAVENAKDIIACGFDINKTFIFSDLDYMGSSGFYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTDSDCIGKI
SFPAIQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDVAPRIGYPKPALHSTFFPALQGAQTKMSASDP
NSSIFLTD TAKQIKTKVNHAFSGGRDTIEEHRQFGGNCVDVVSFMYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKK
ALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFQ

T1-Trprs (SEC ID N°: 4)

SNHGPDATEAEEDFVDPWTVQTSSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVL
DAYENKPFYLYTGRGPPSEAMHVGHLPFI FTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYSAYAVENAKDIIA
CGFDINKTFIFSDLDYMGSSGFYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTDSDCIGKISFPAIQAAPSFNSFPQIFRDR
DIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDVAPRIGYPKPALHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTD TAKQIKTKVNHAFS
GGRDTIEEHRQFGGNCVDVVSFMYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDE
IVKEFMTPRKLSFDFQ

FIG. 2

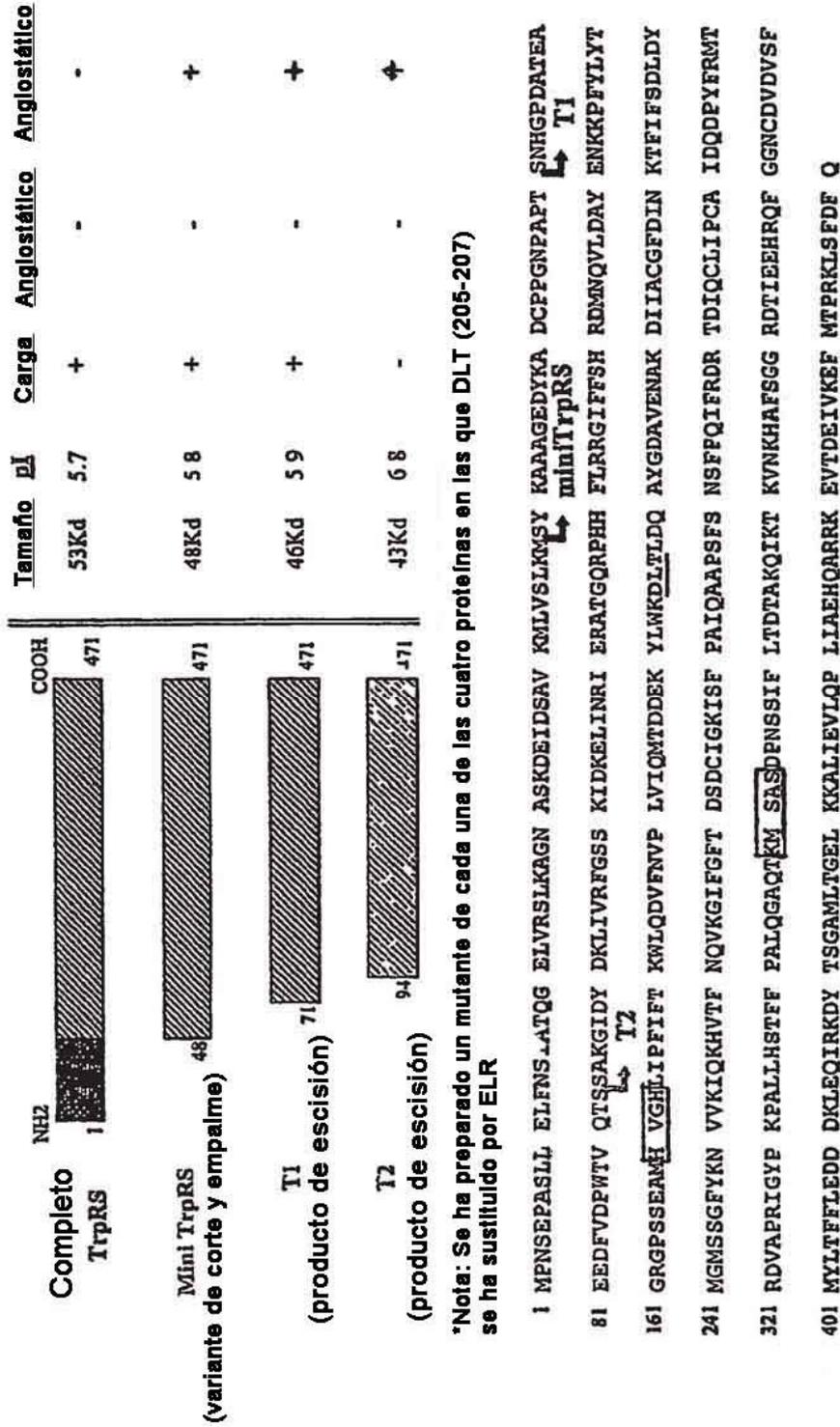


FIG. 3

FIG. 4

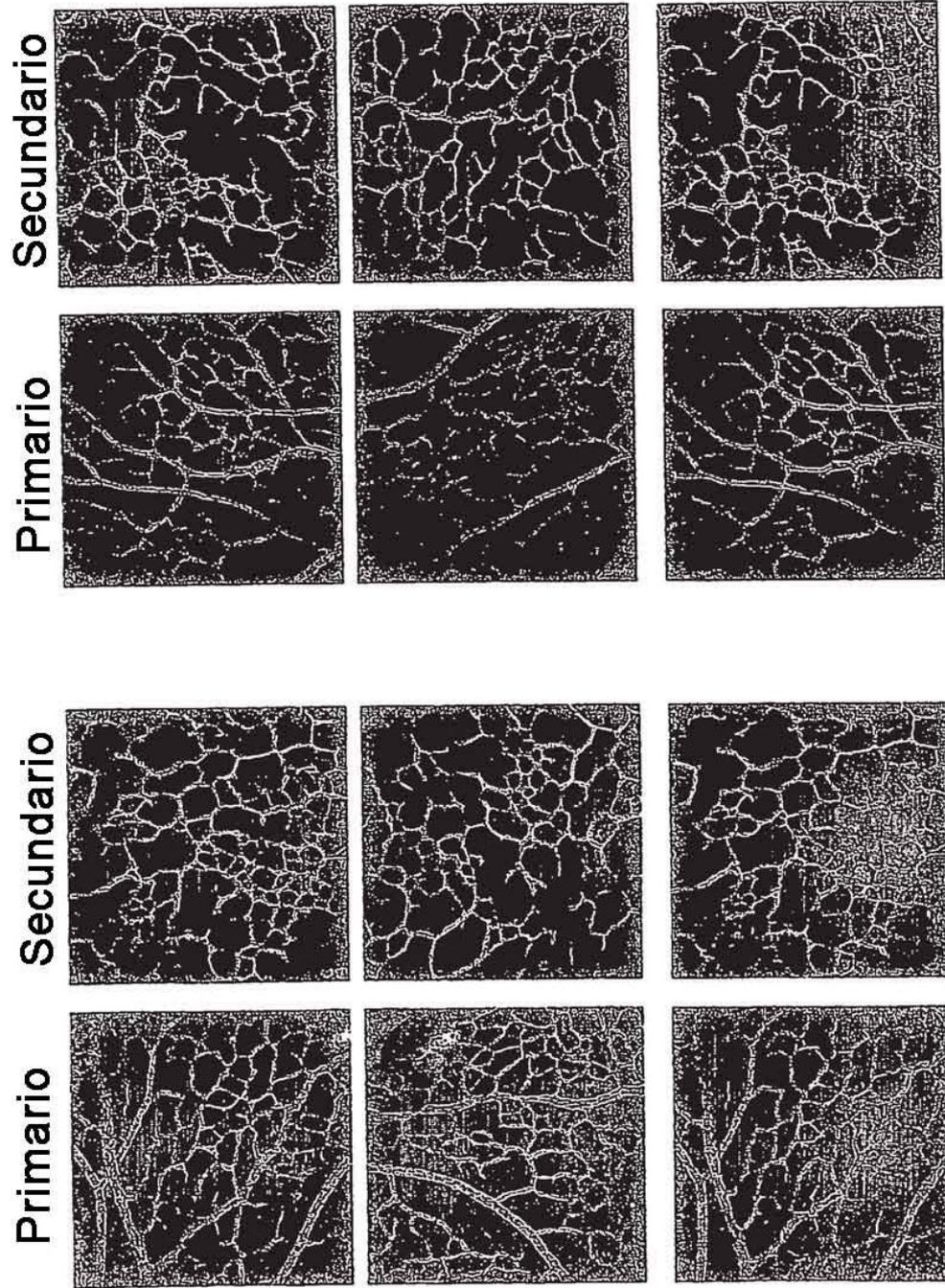
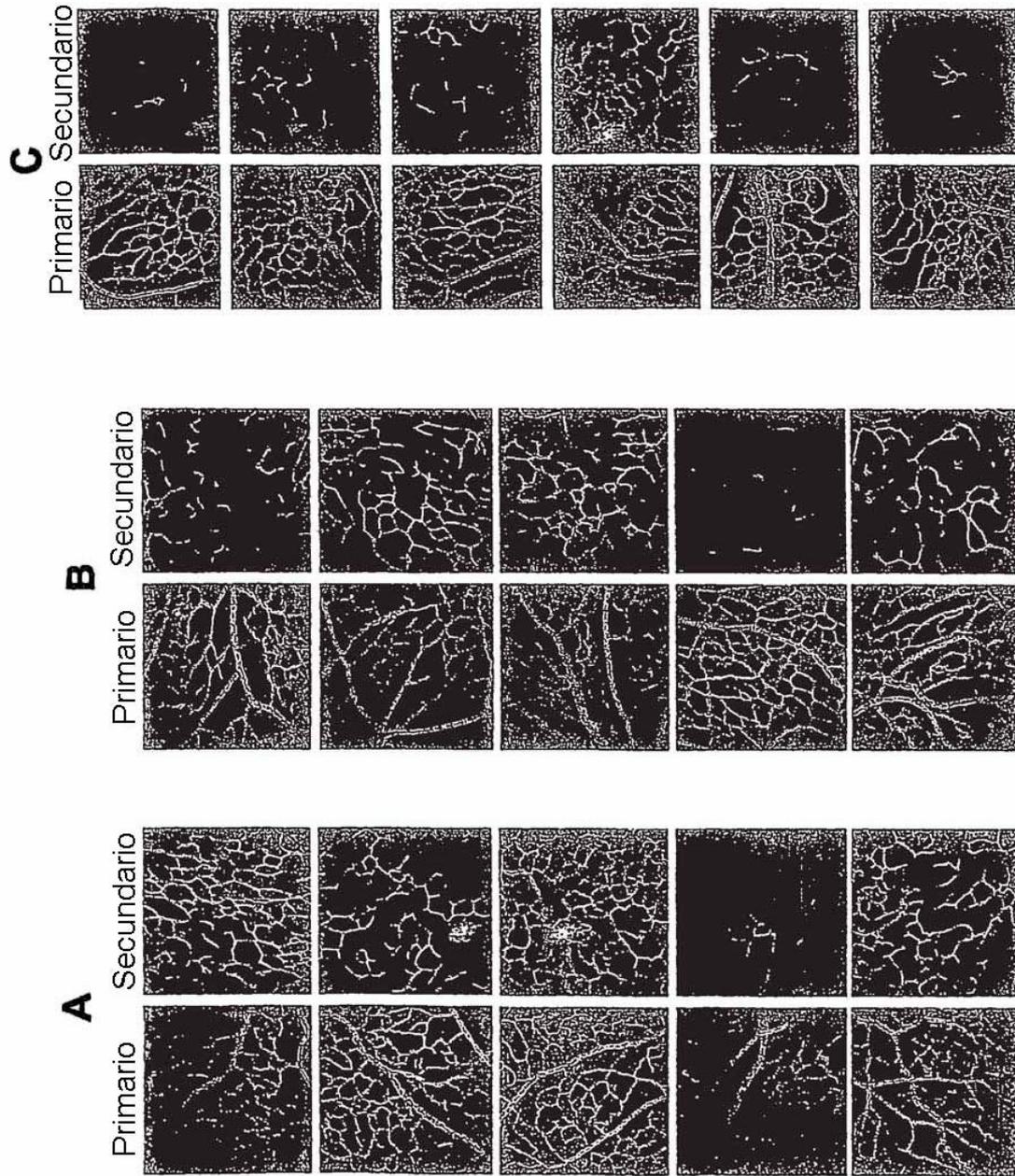
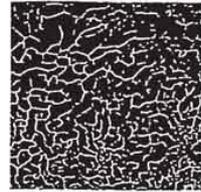
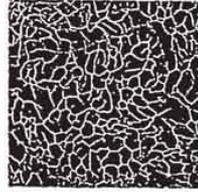


FIG. 5



Secundario

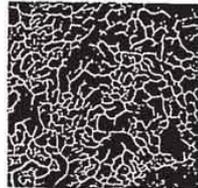
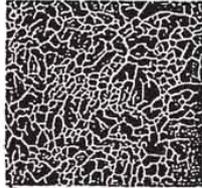


Primario



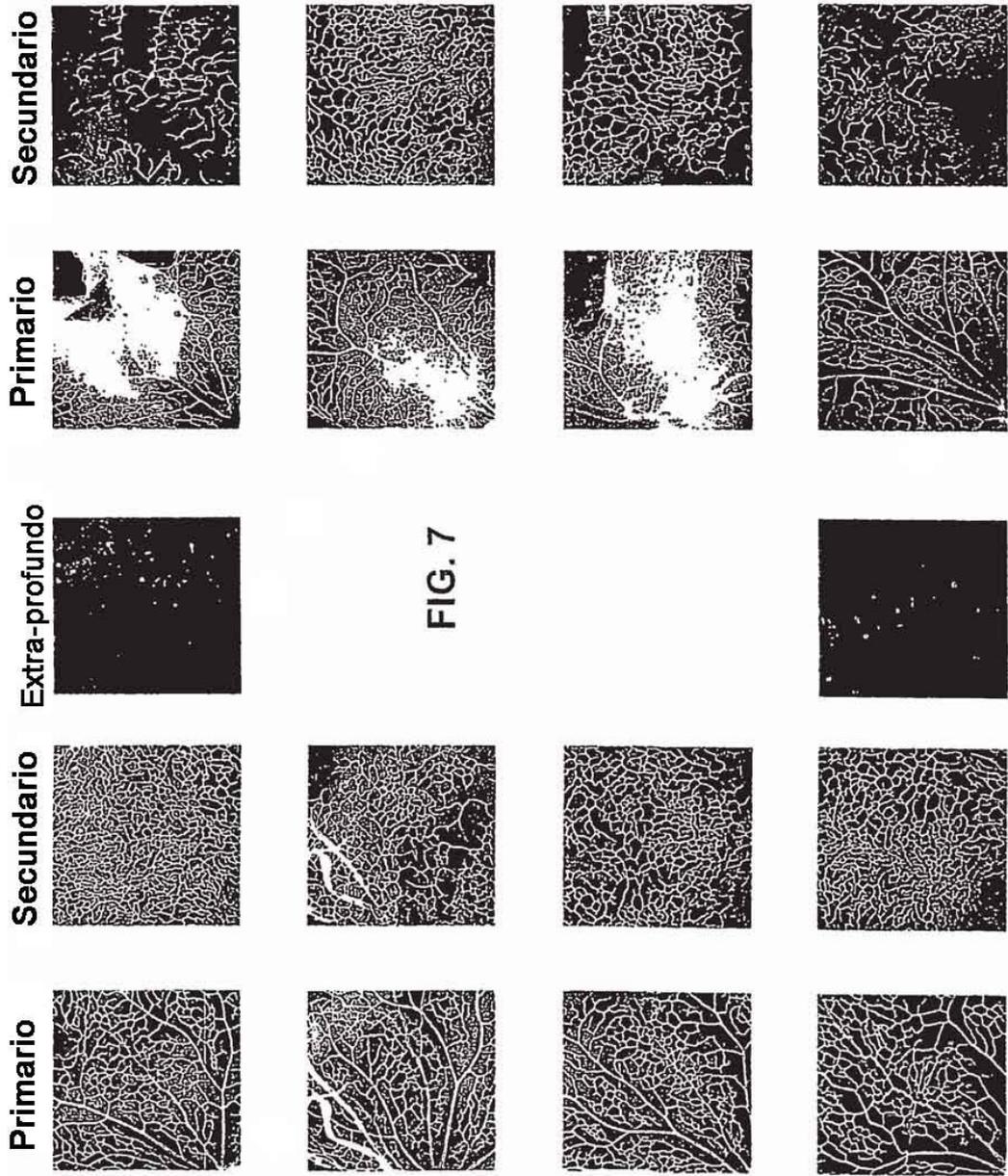
FIG. 6

Secundario



Primario





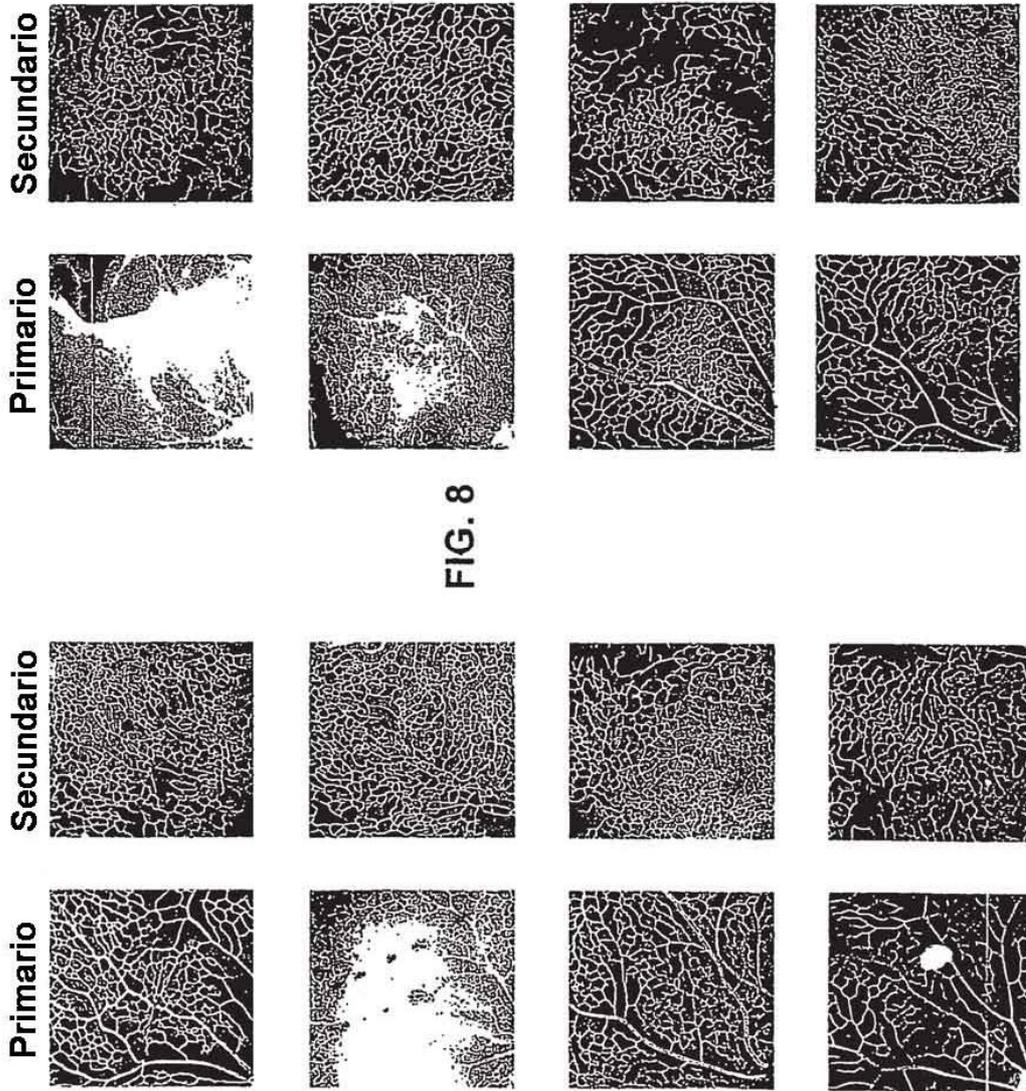
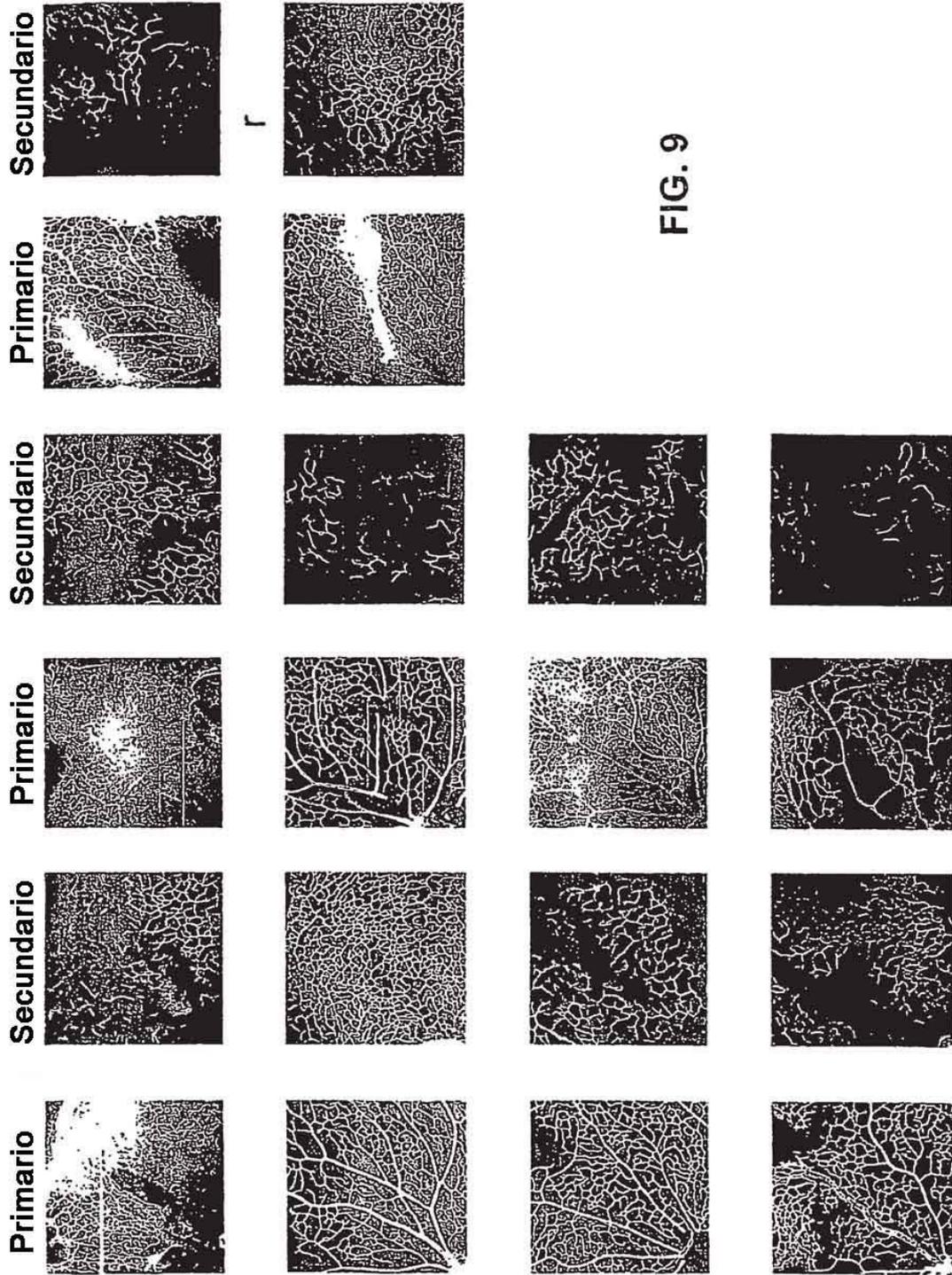


FIG. 8



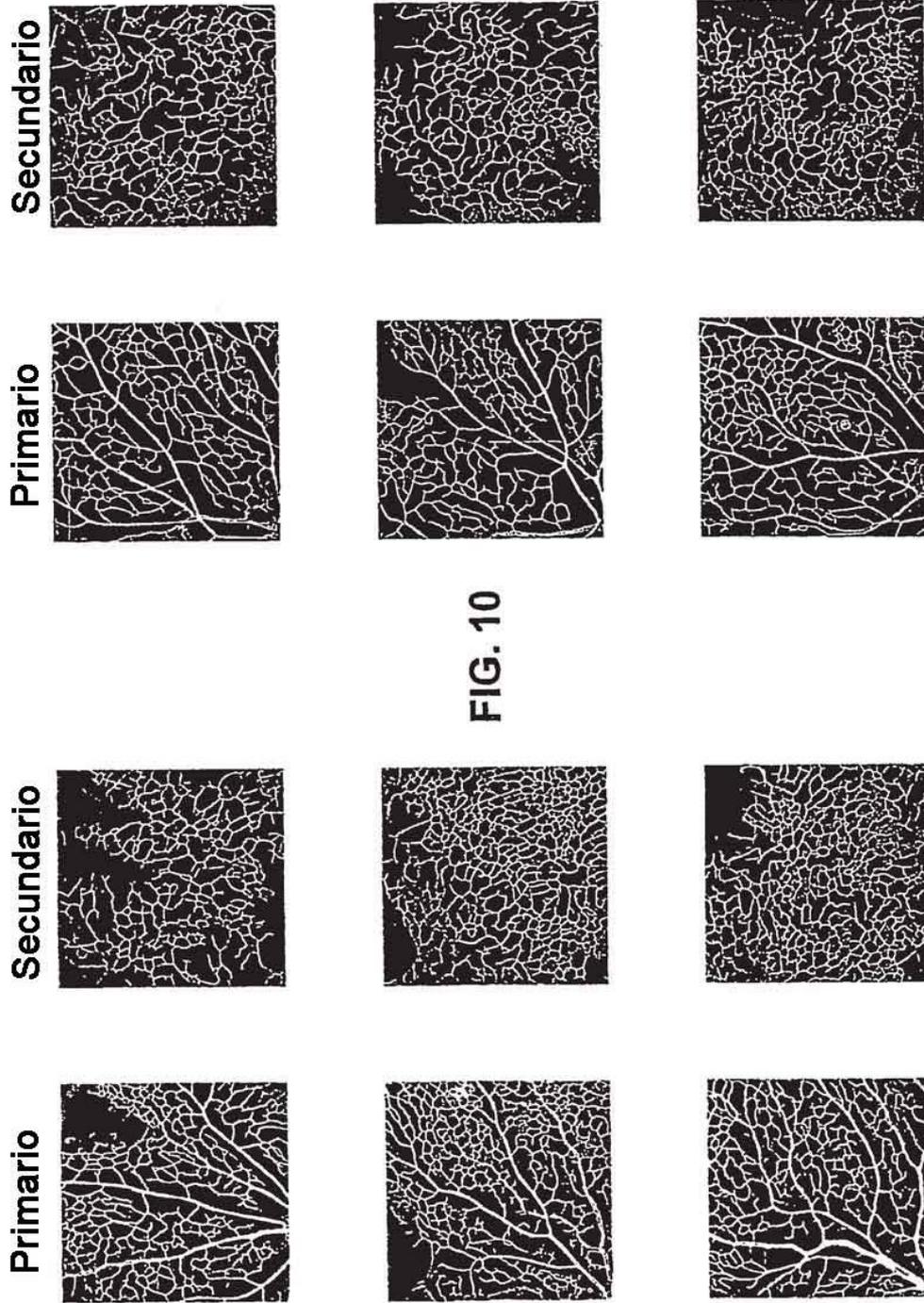
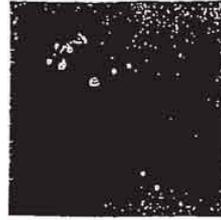


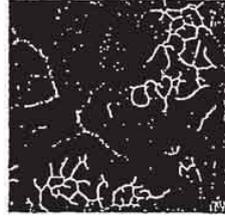
FIG. 10

Extra-
profundo

FIG. 11



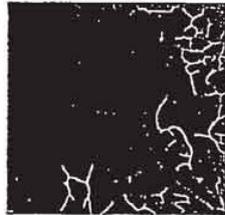
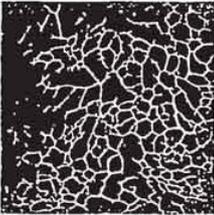
Secundario



Primario

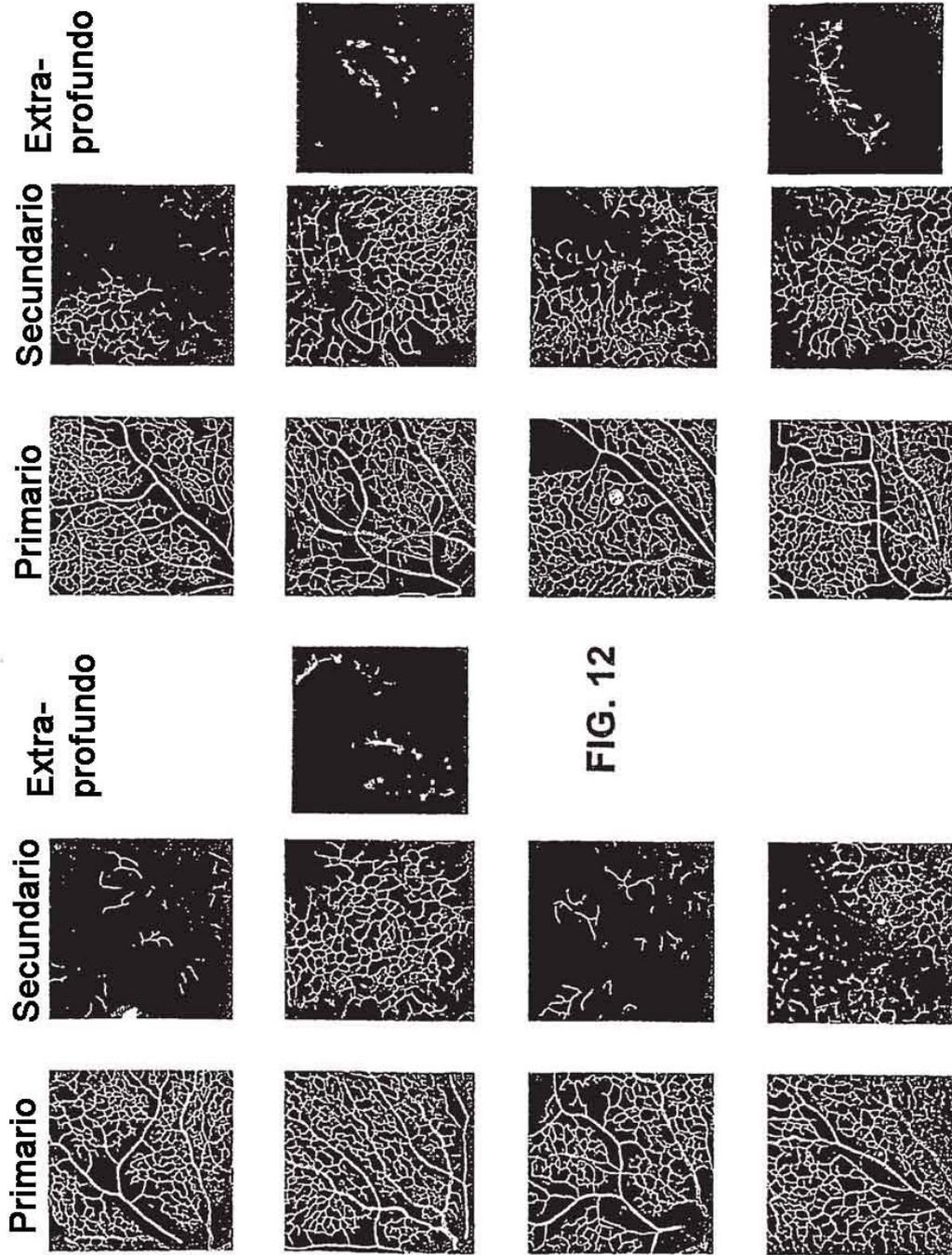


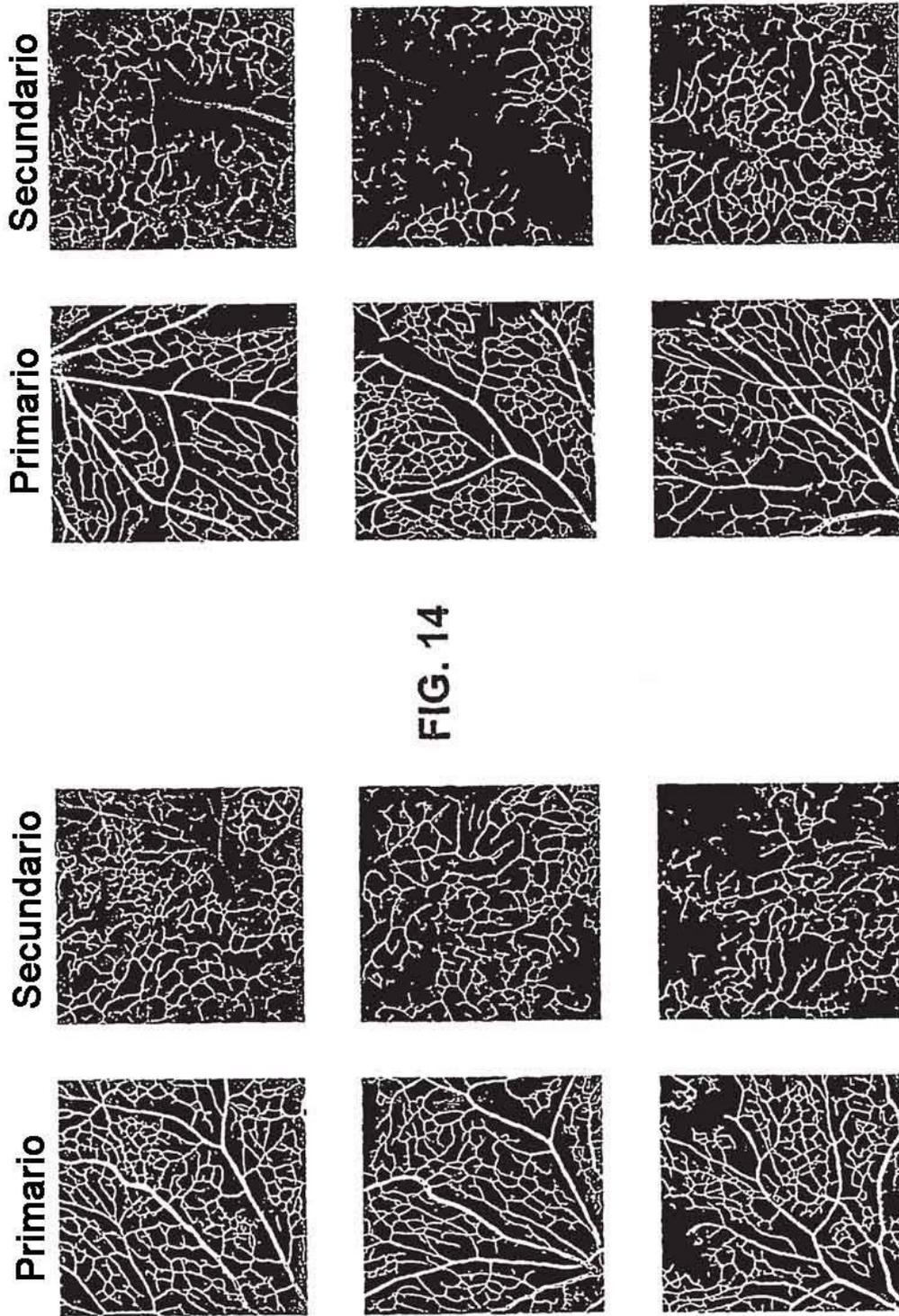
Secundario

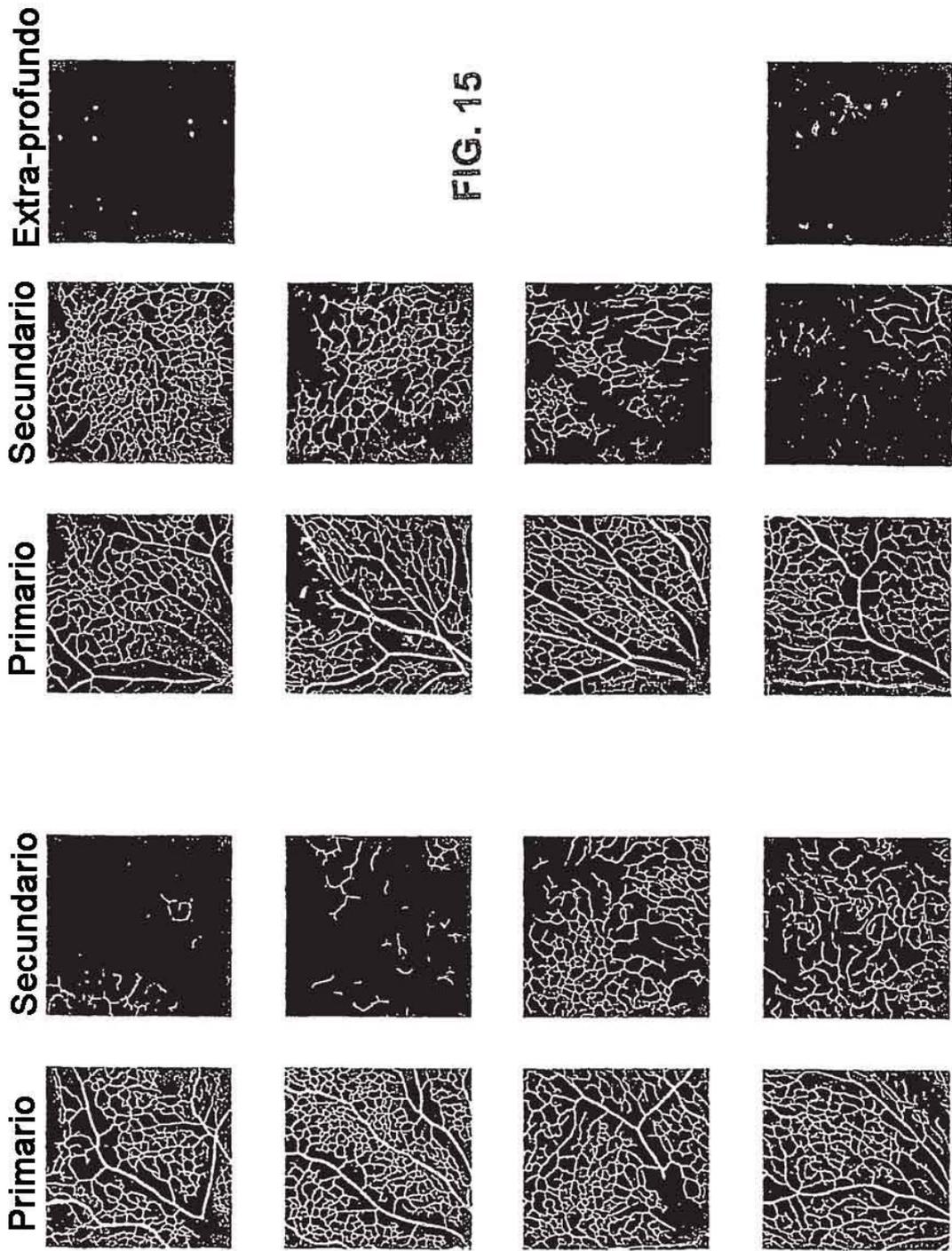


Primario









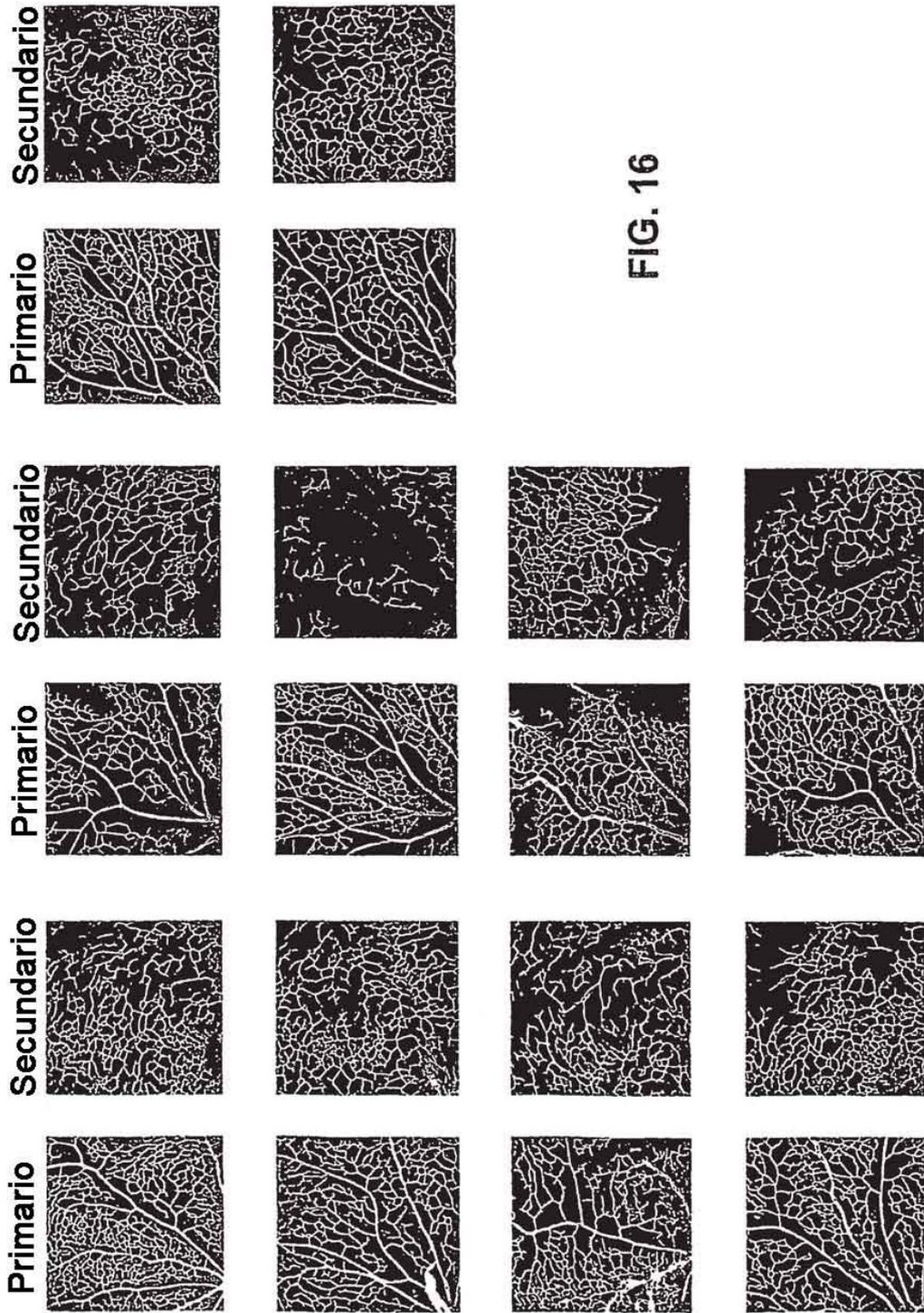


FIG. 16

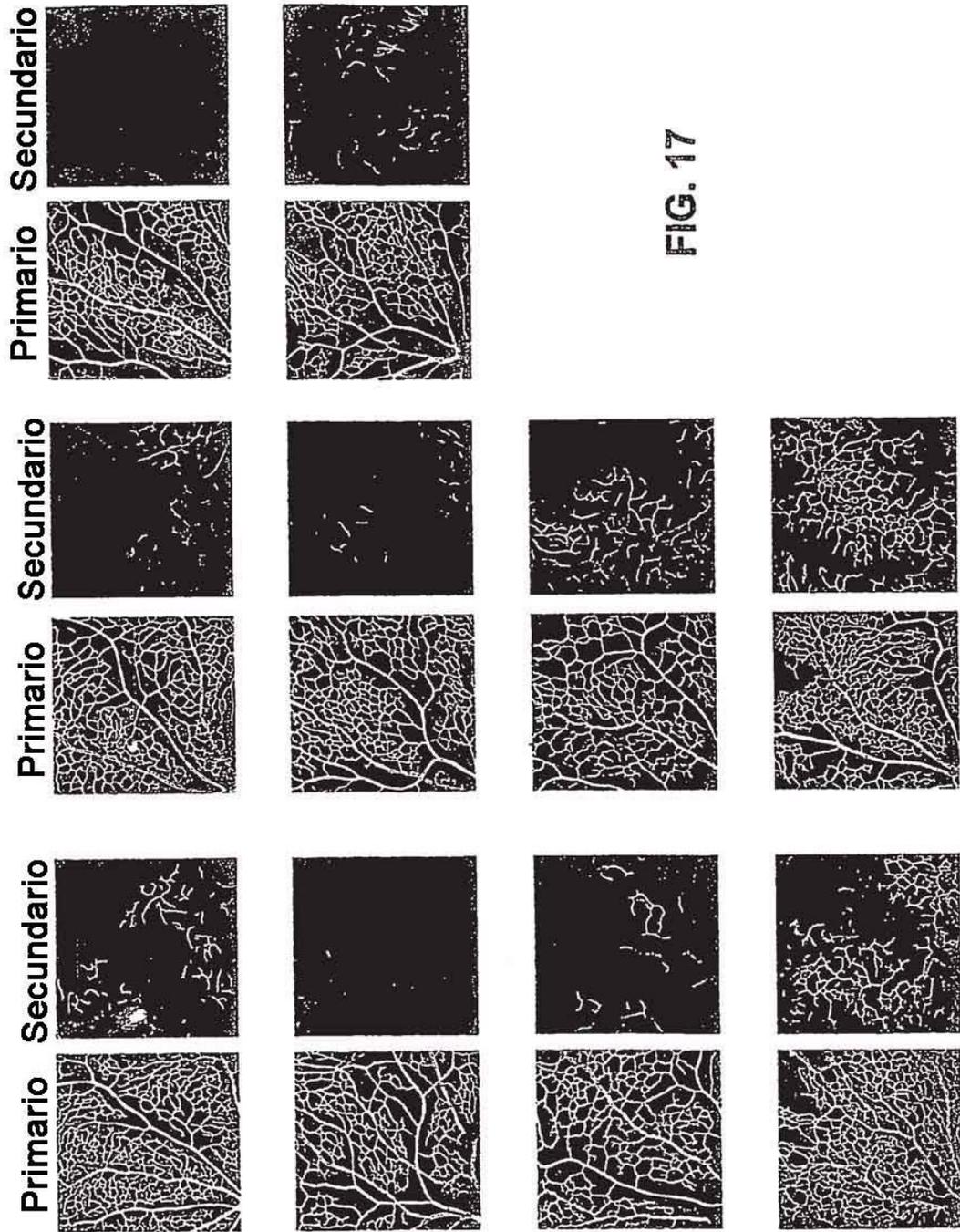


FIG. 17

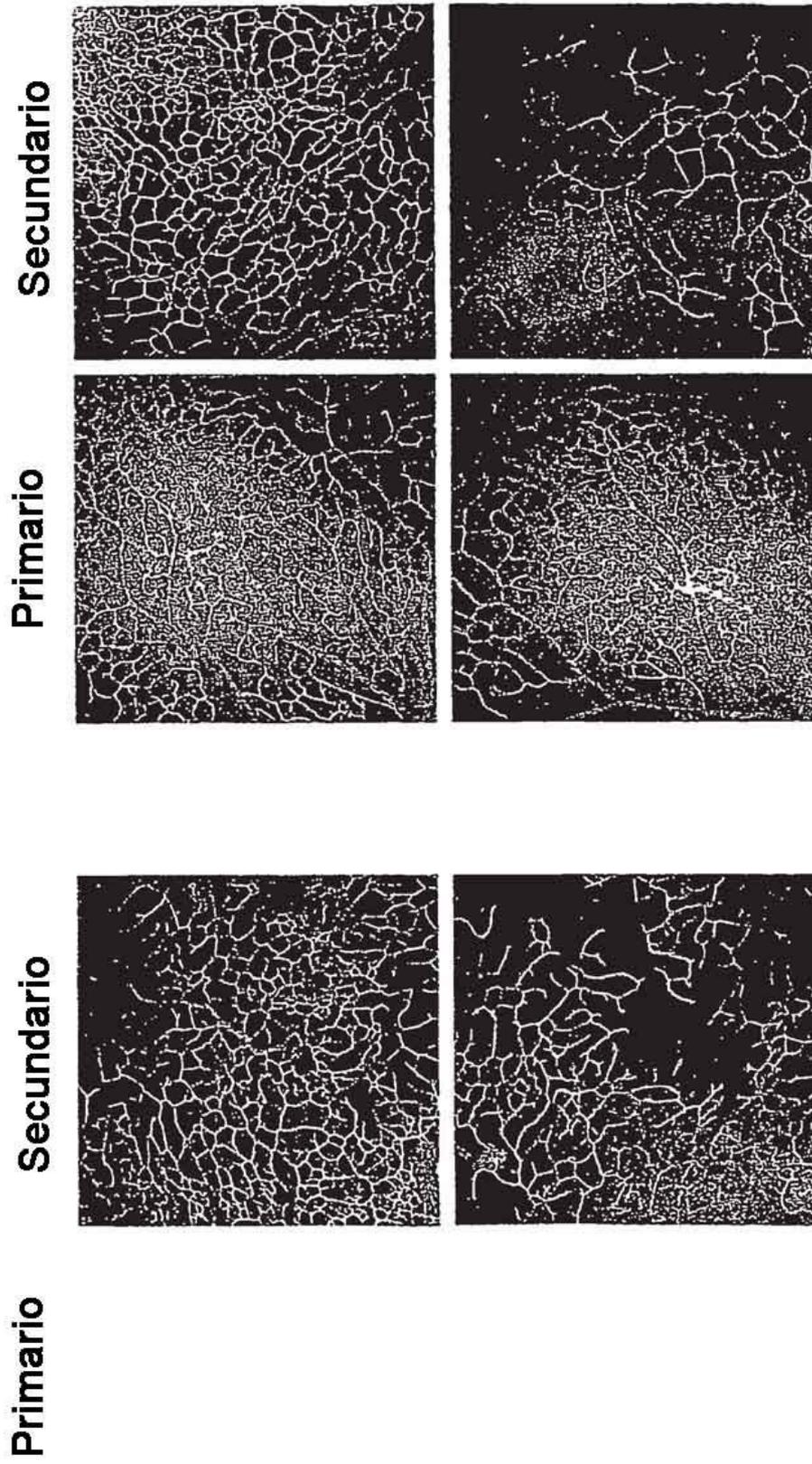


FIG. 18

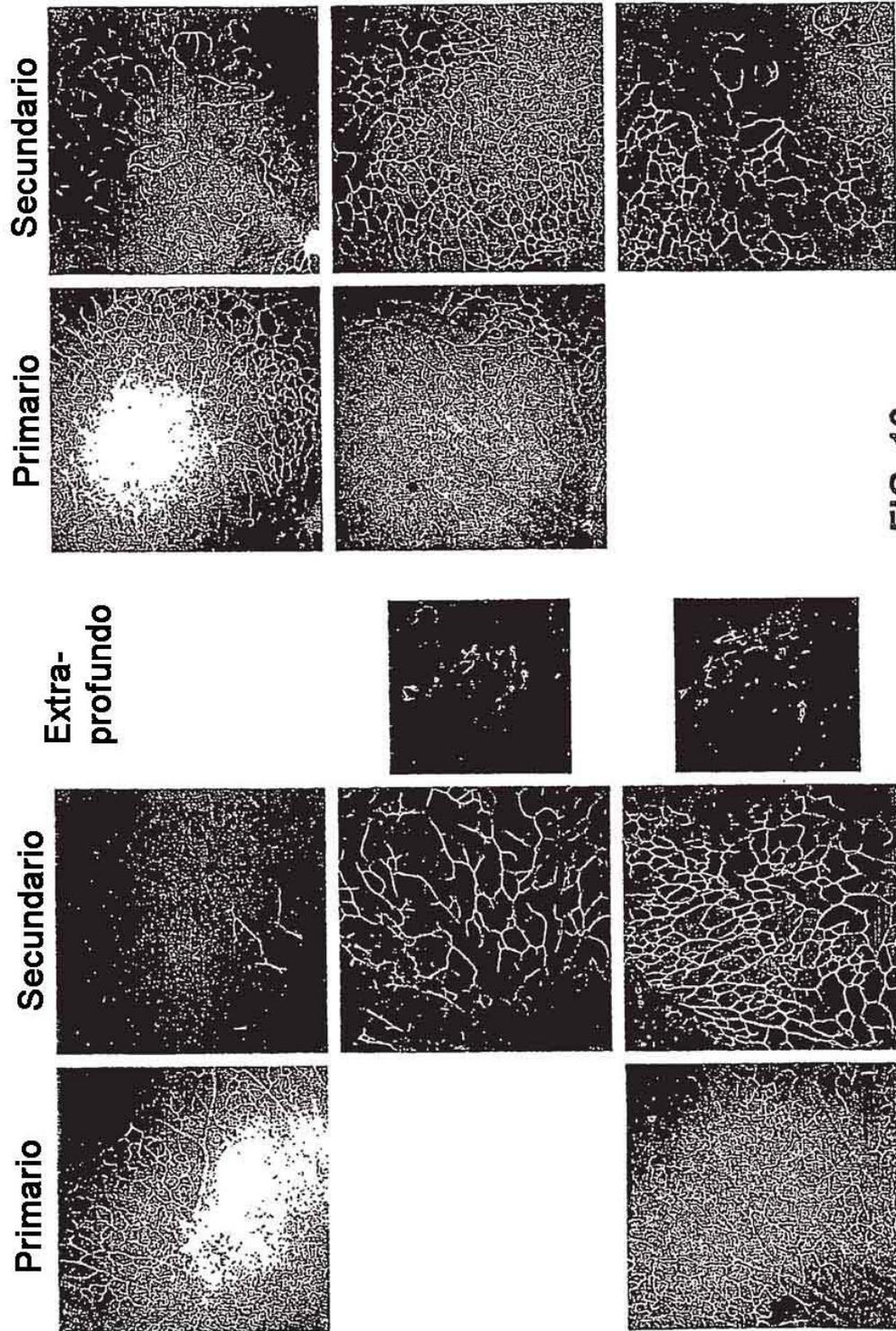


FIG. 19

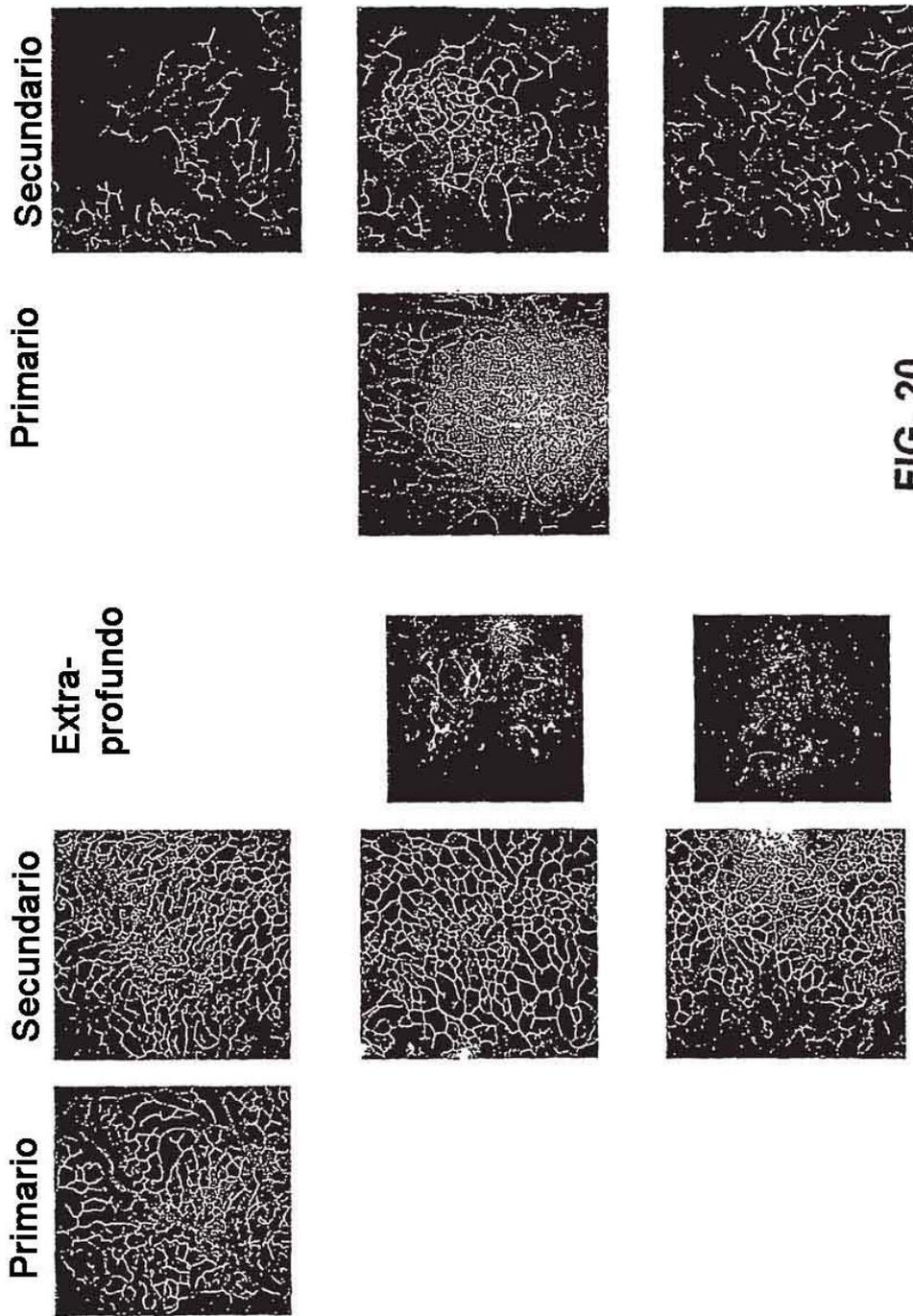


FIG. 20

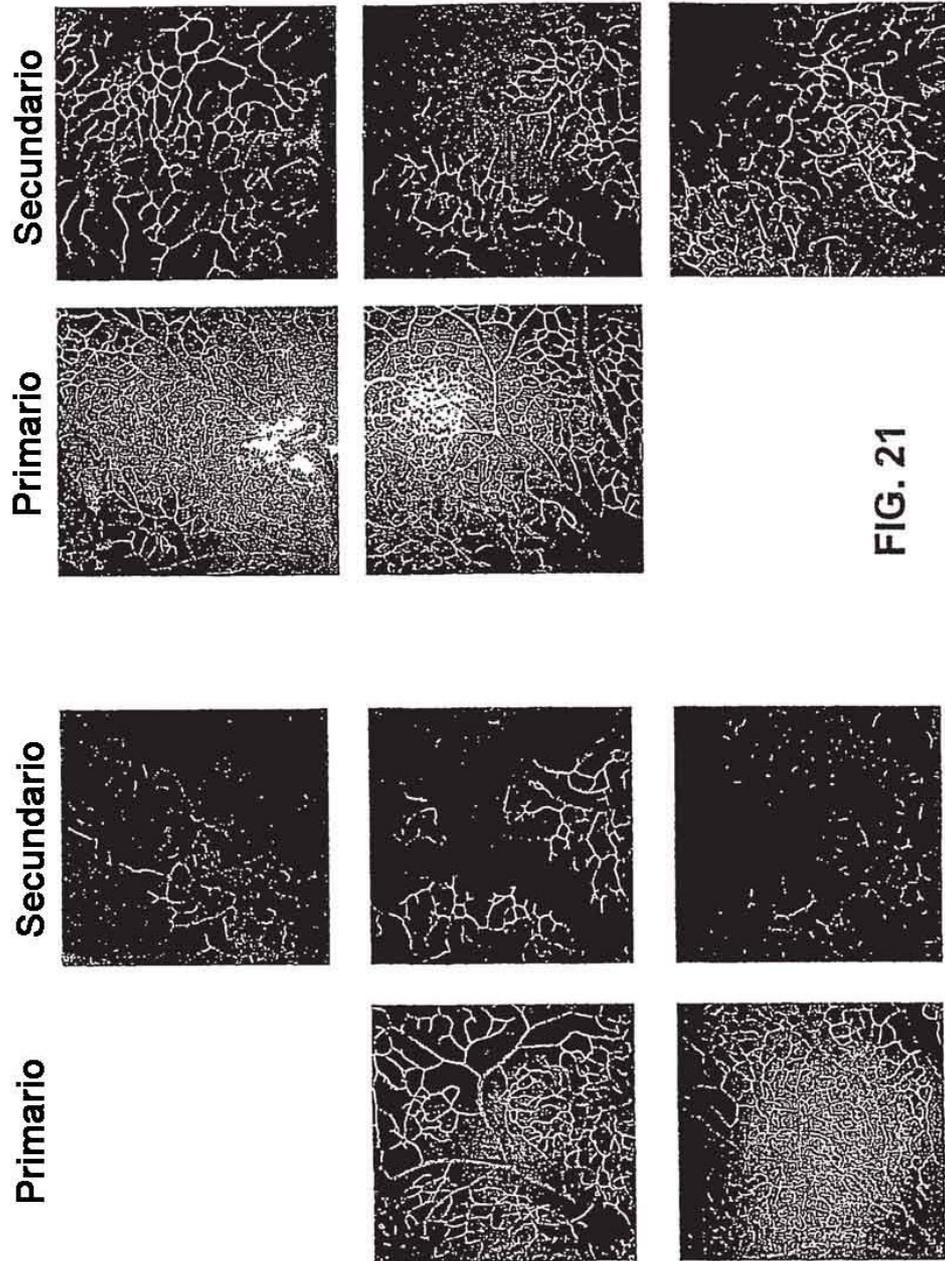


FIG. 21

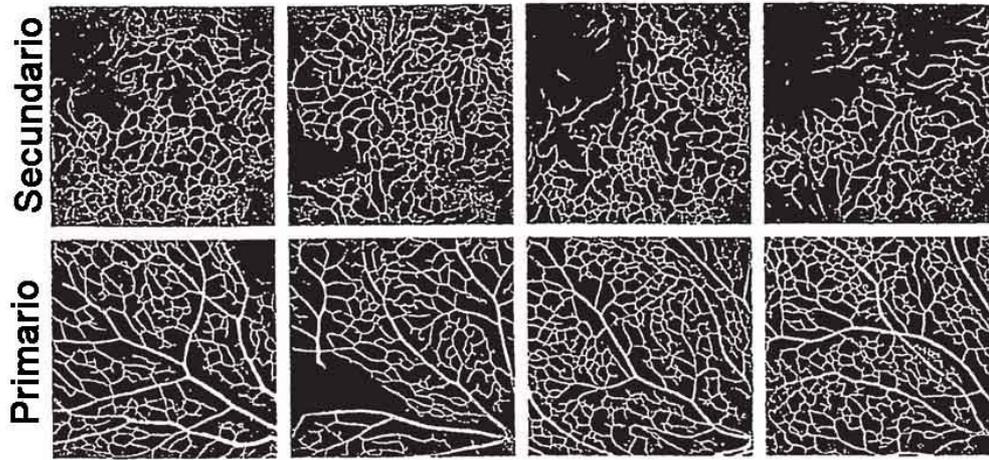
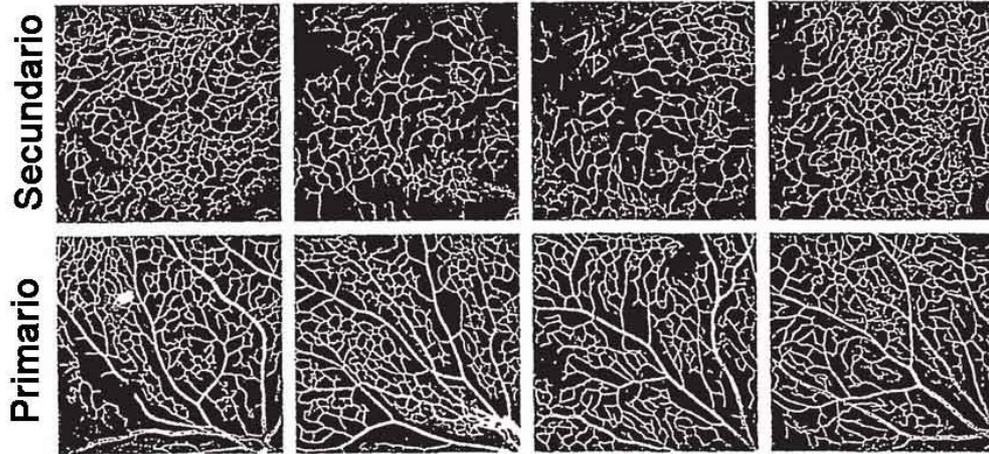


FIG. 22



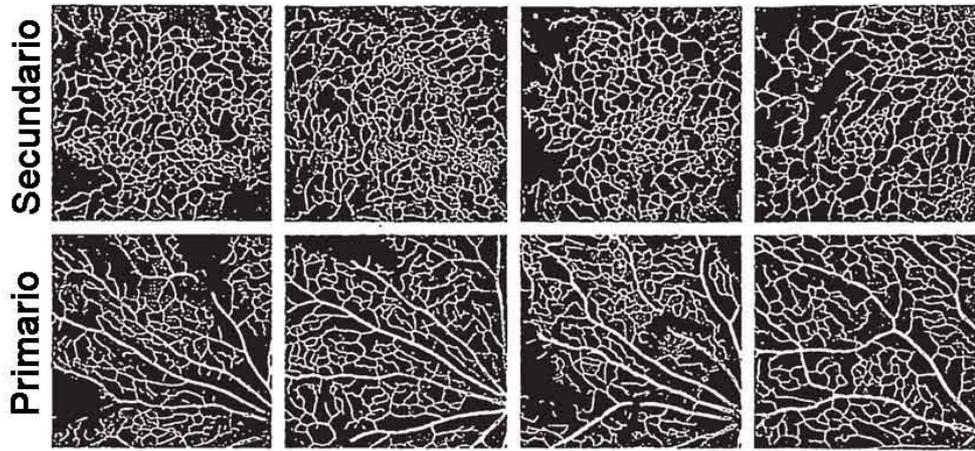
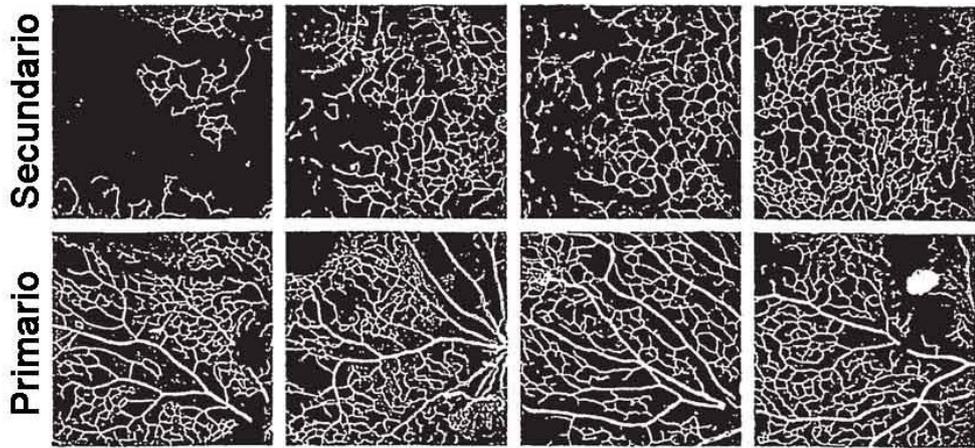


FIG. 23



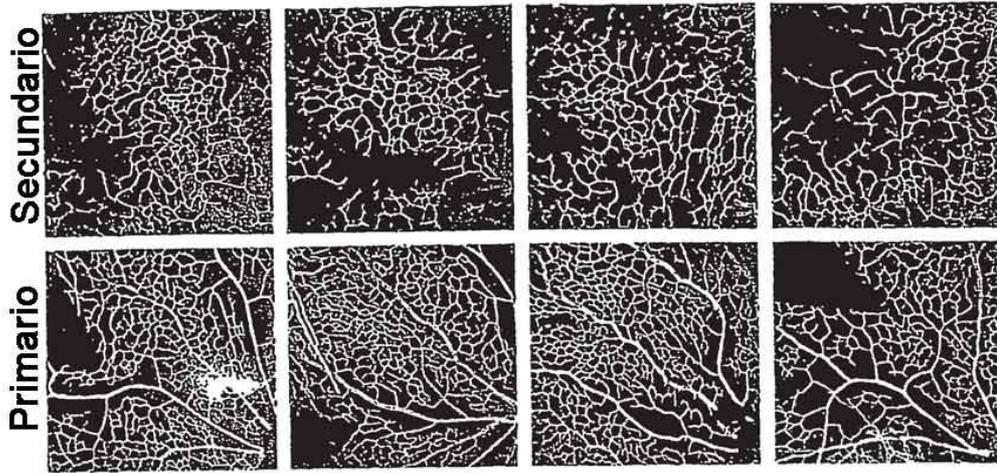
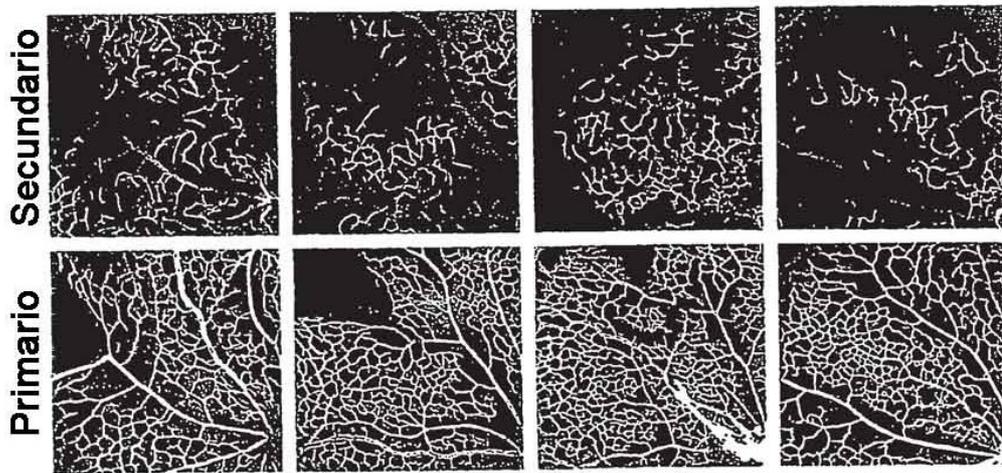


FIG. 24



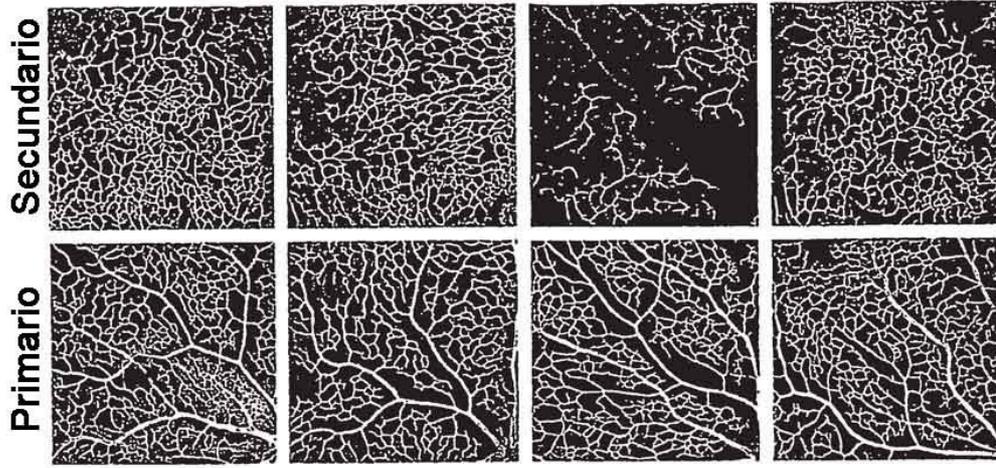
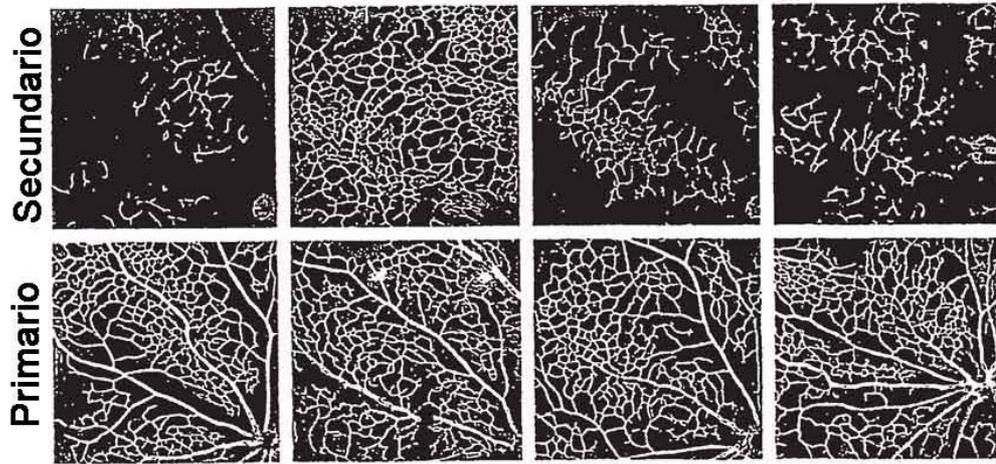


FIG. 25



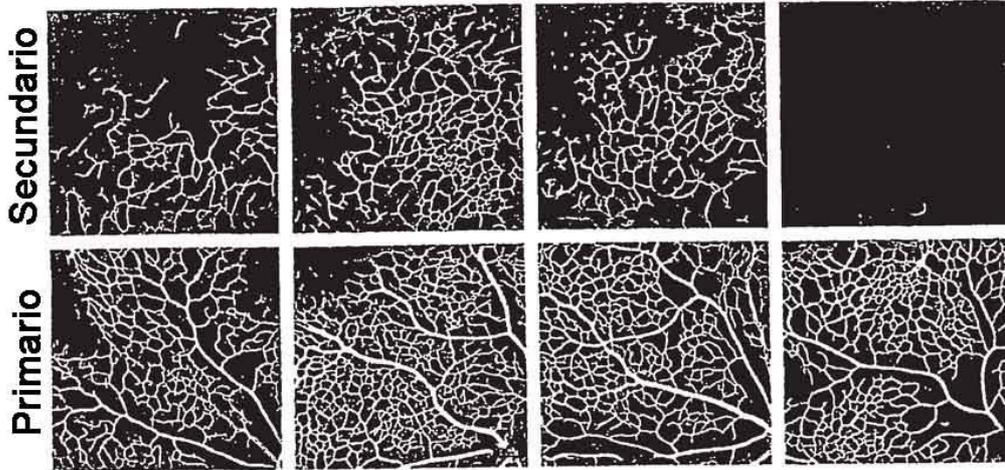
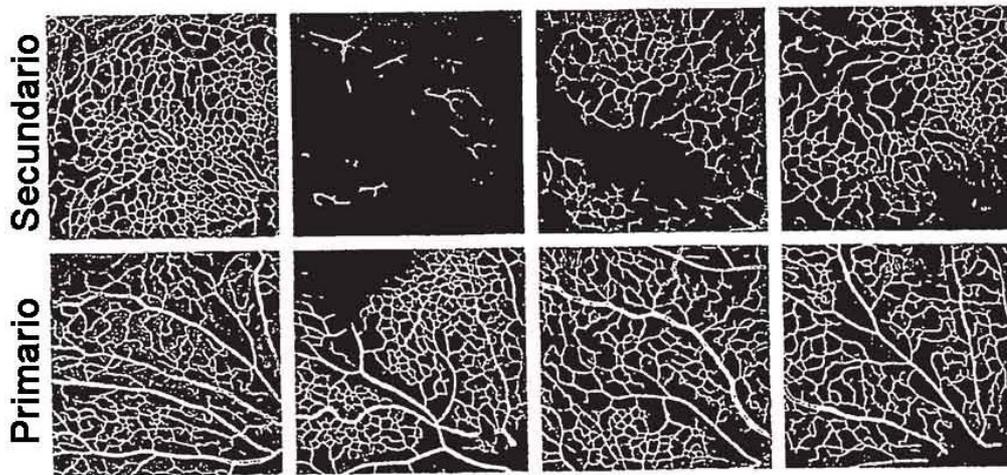


FIG. 26



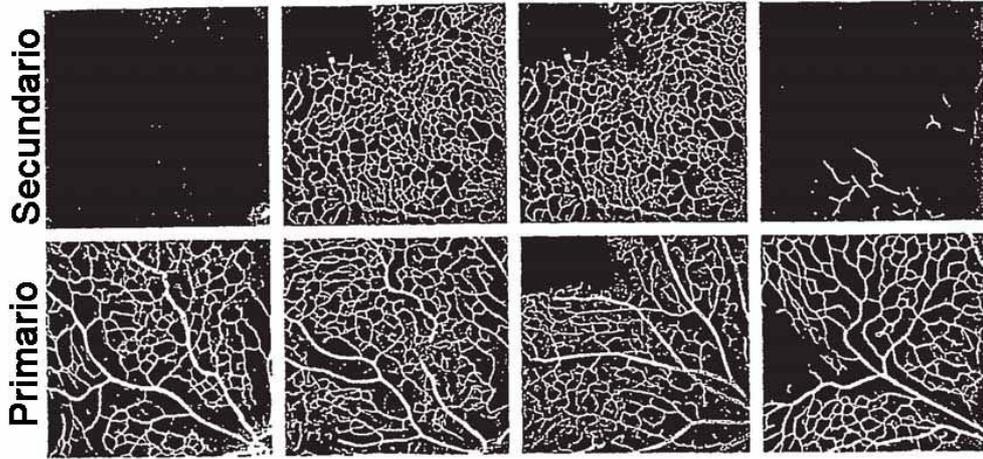
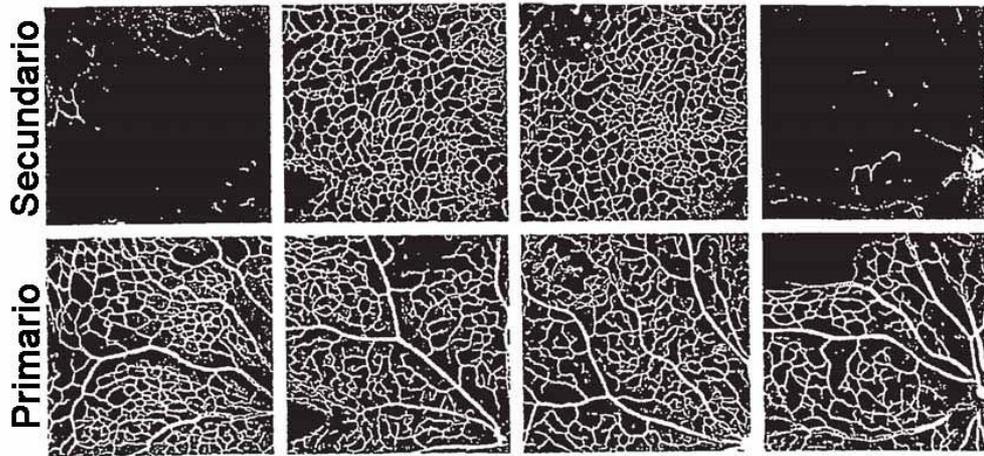


FIG. 27



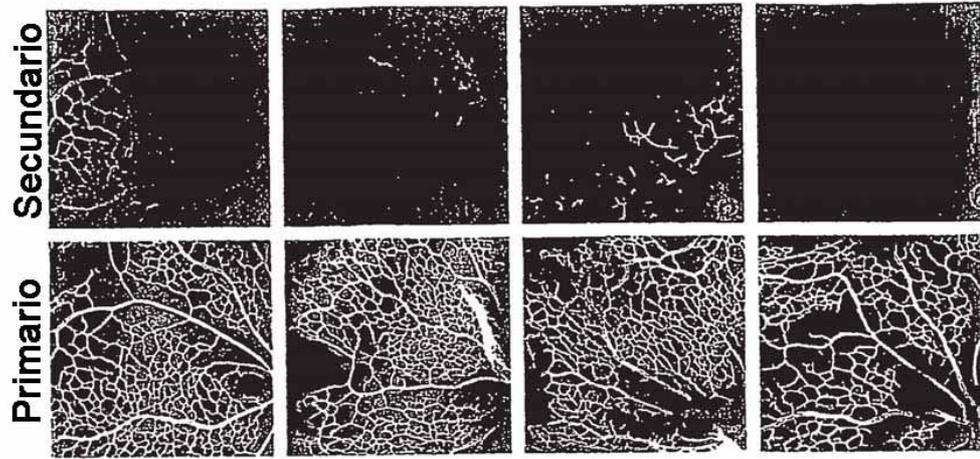
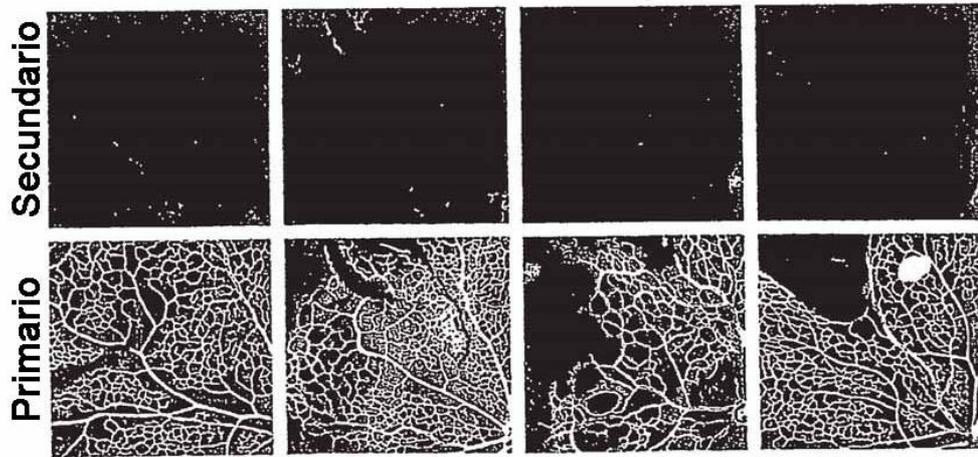


FIG. 28



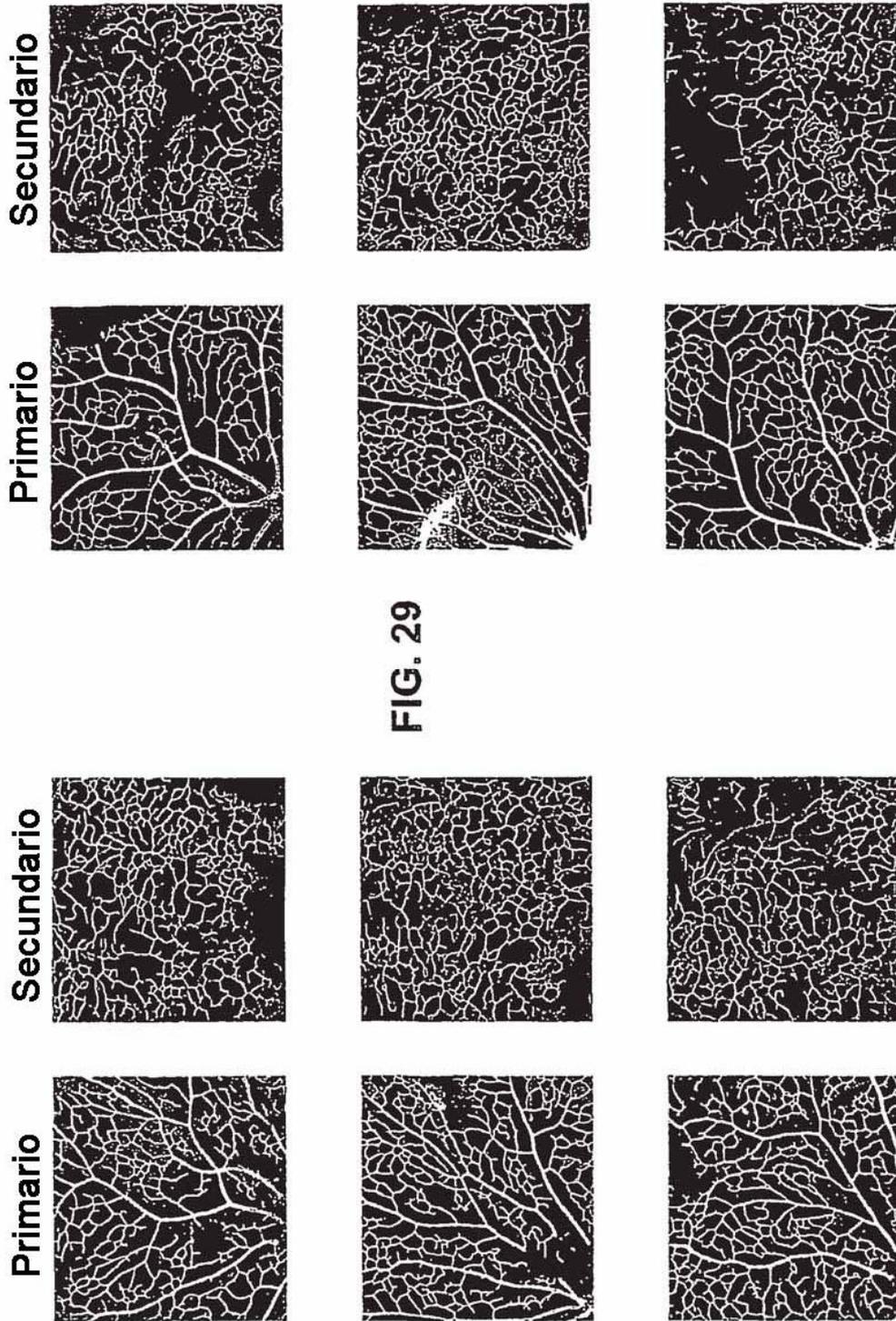
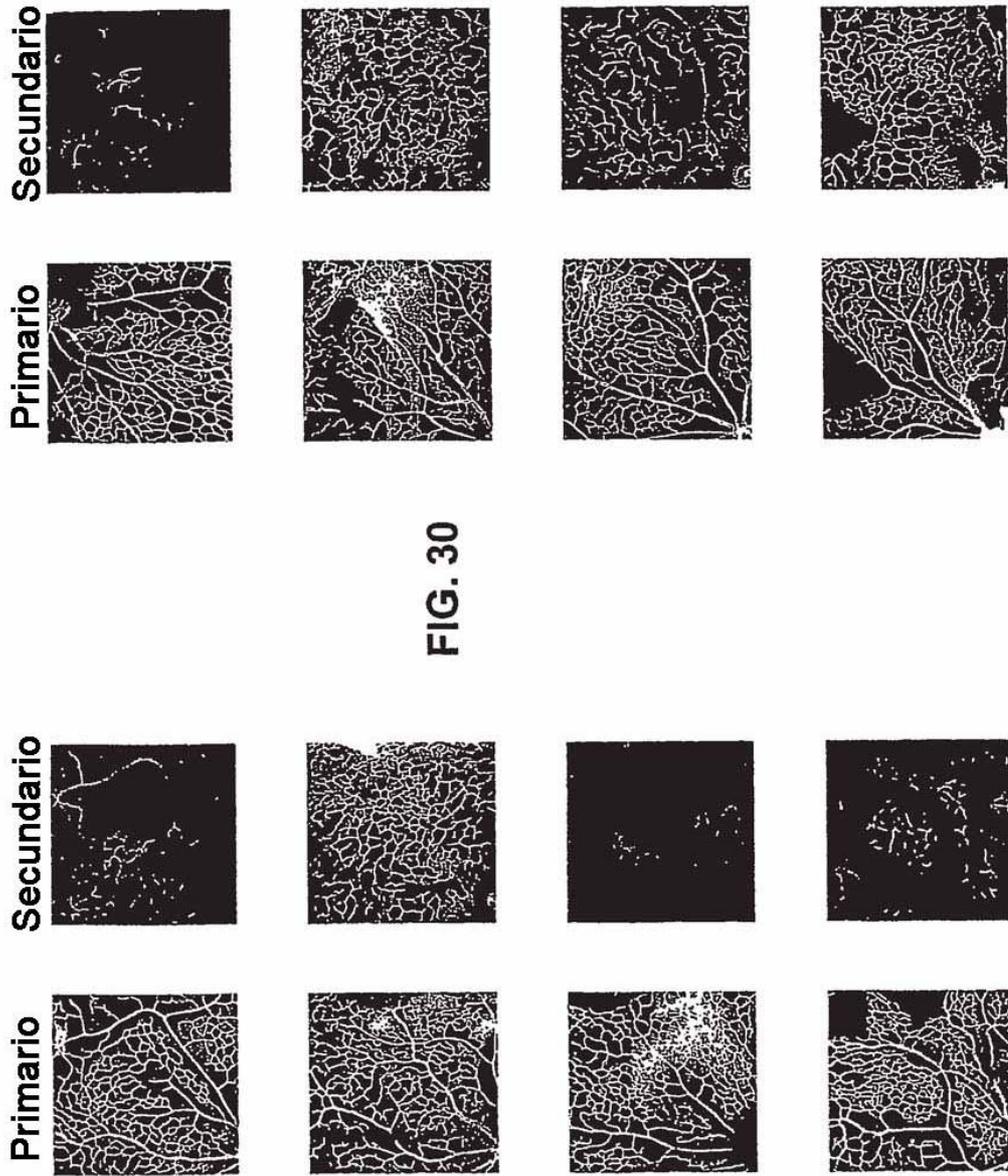
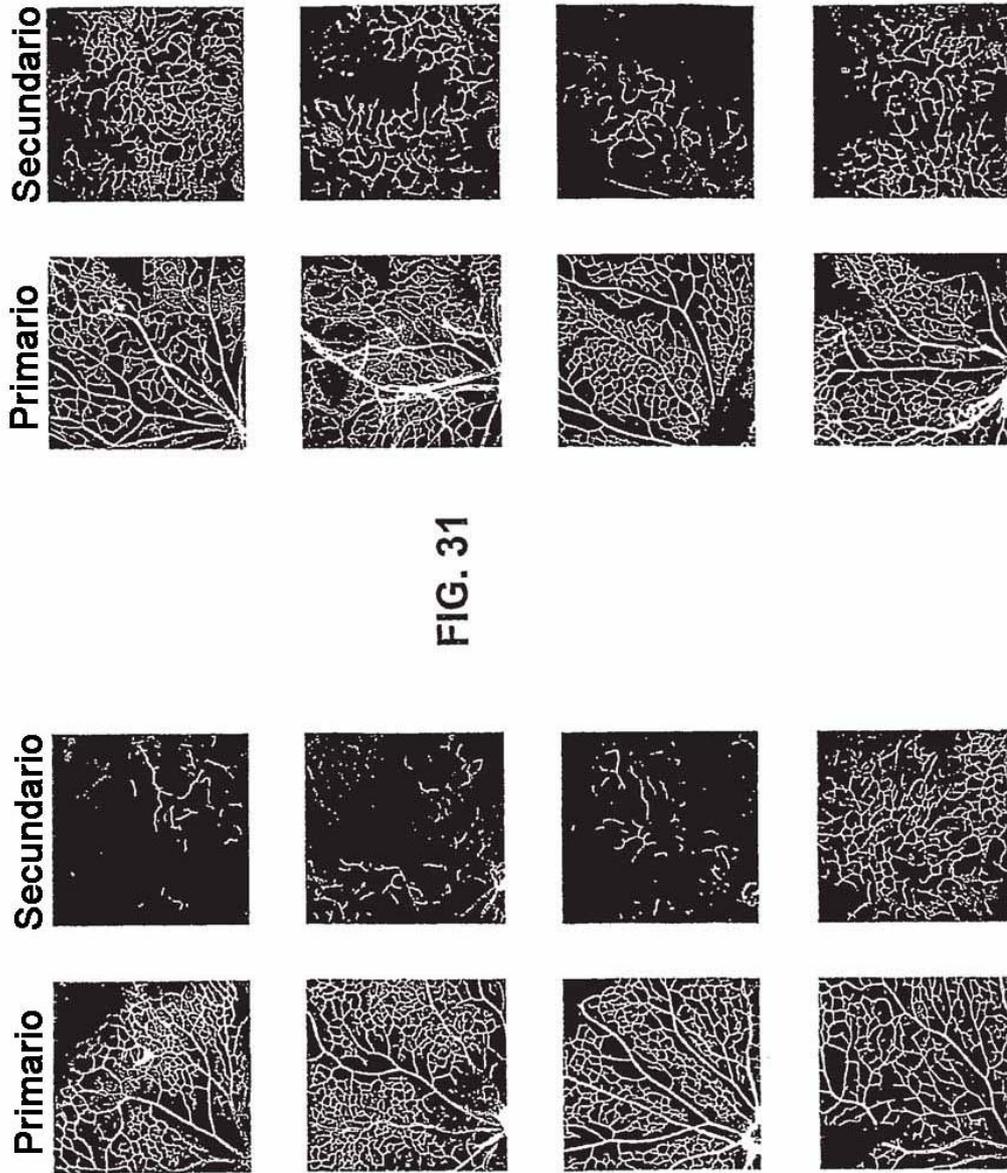


FIG. 29





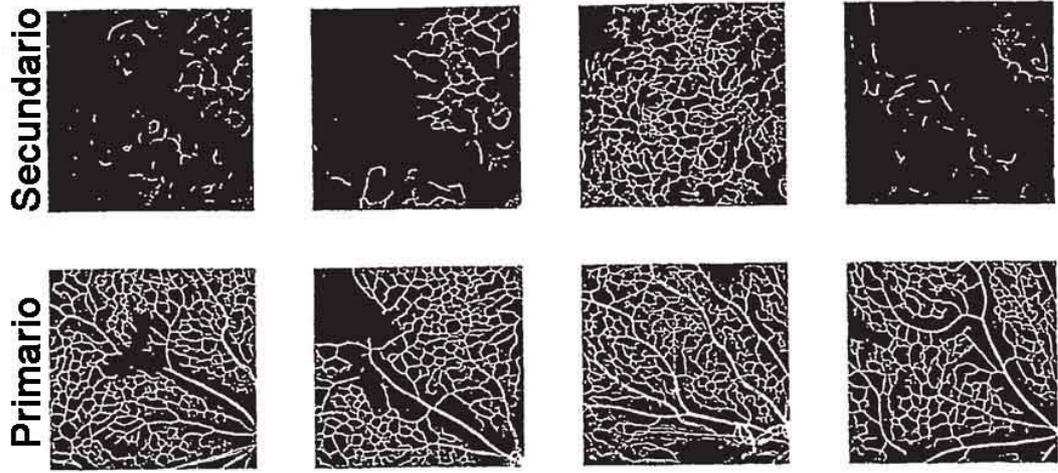
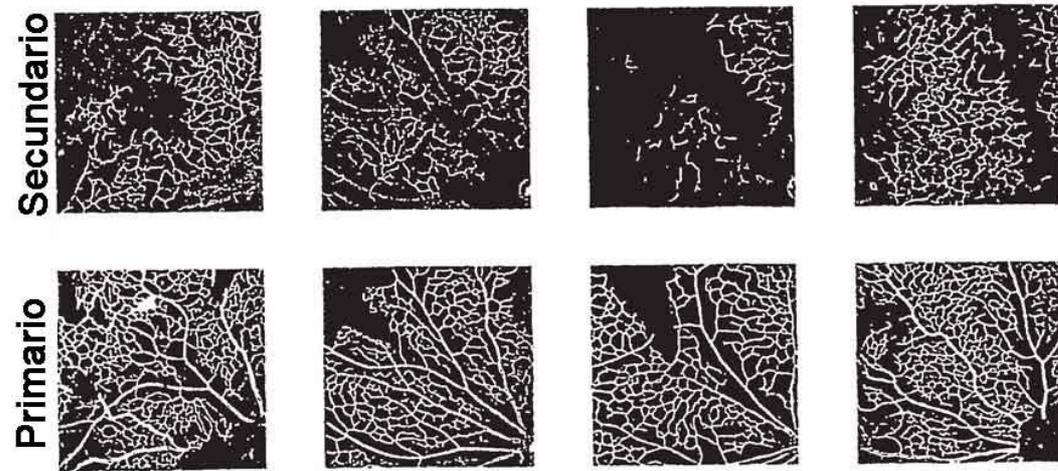
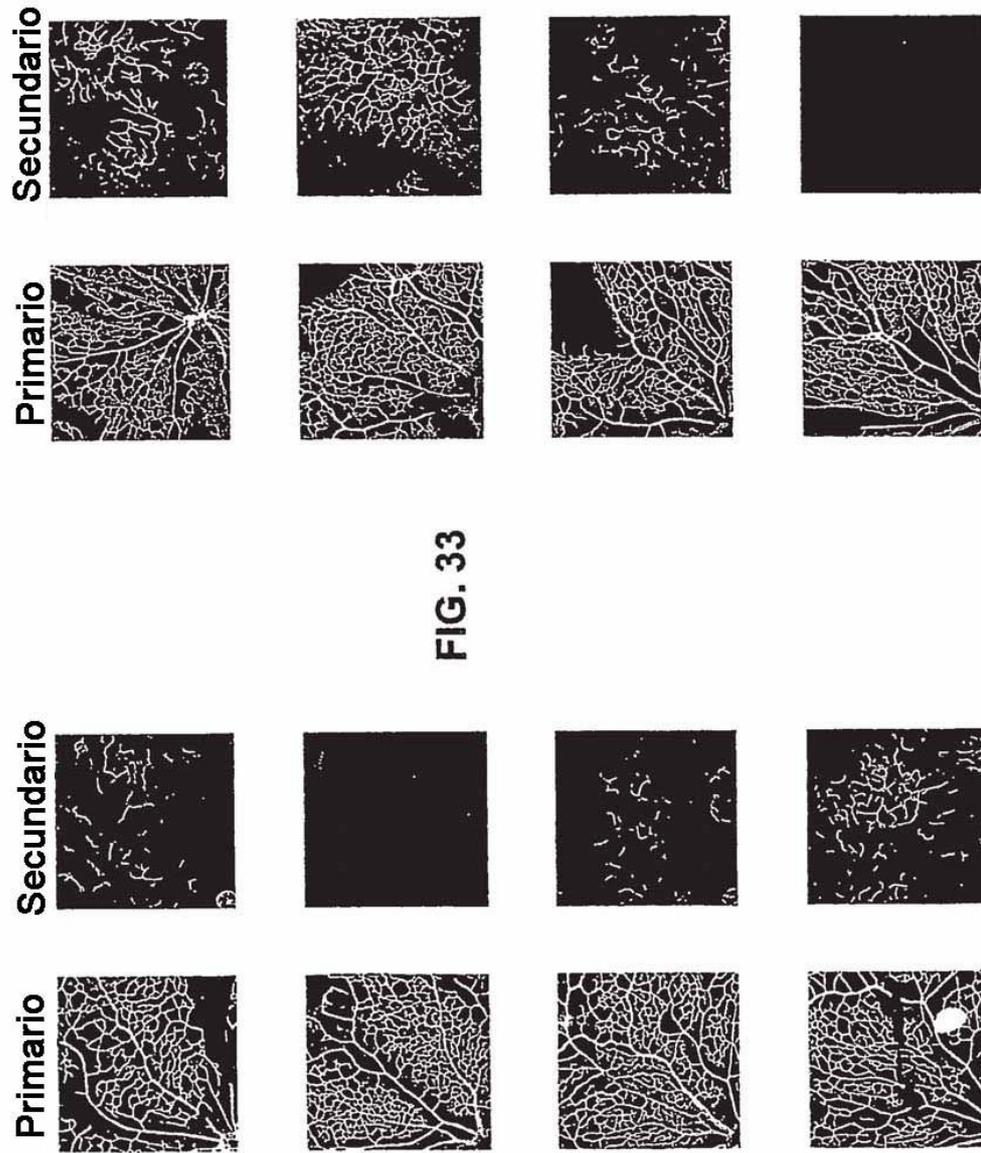


FIG. 32





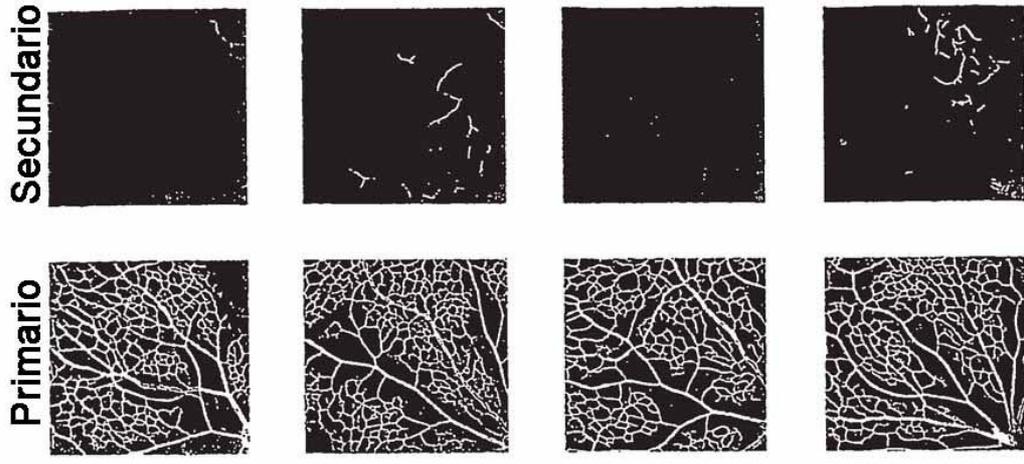
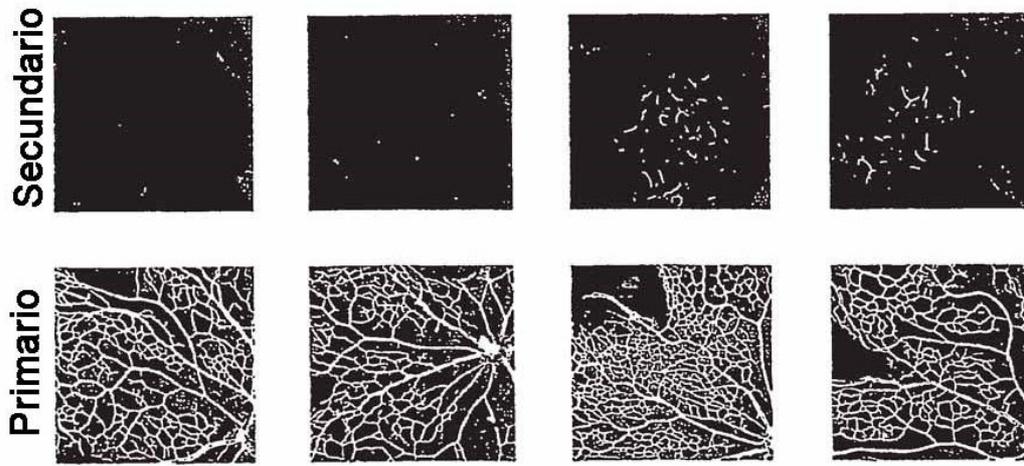


FIG. 34



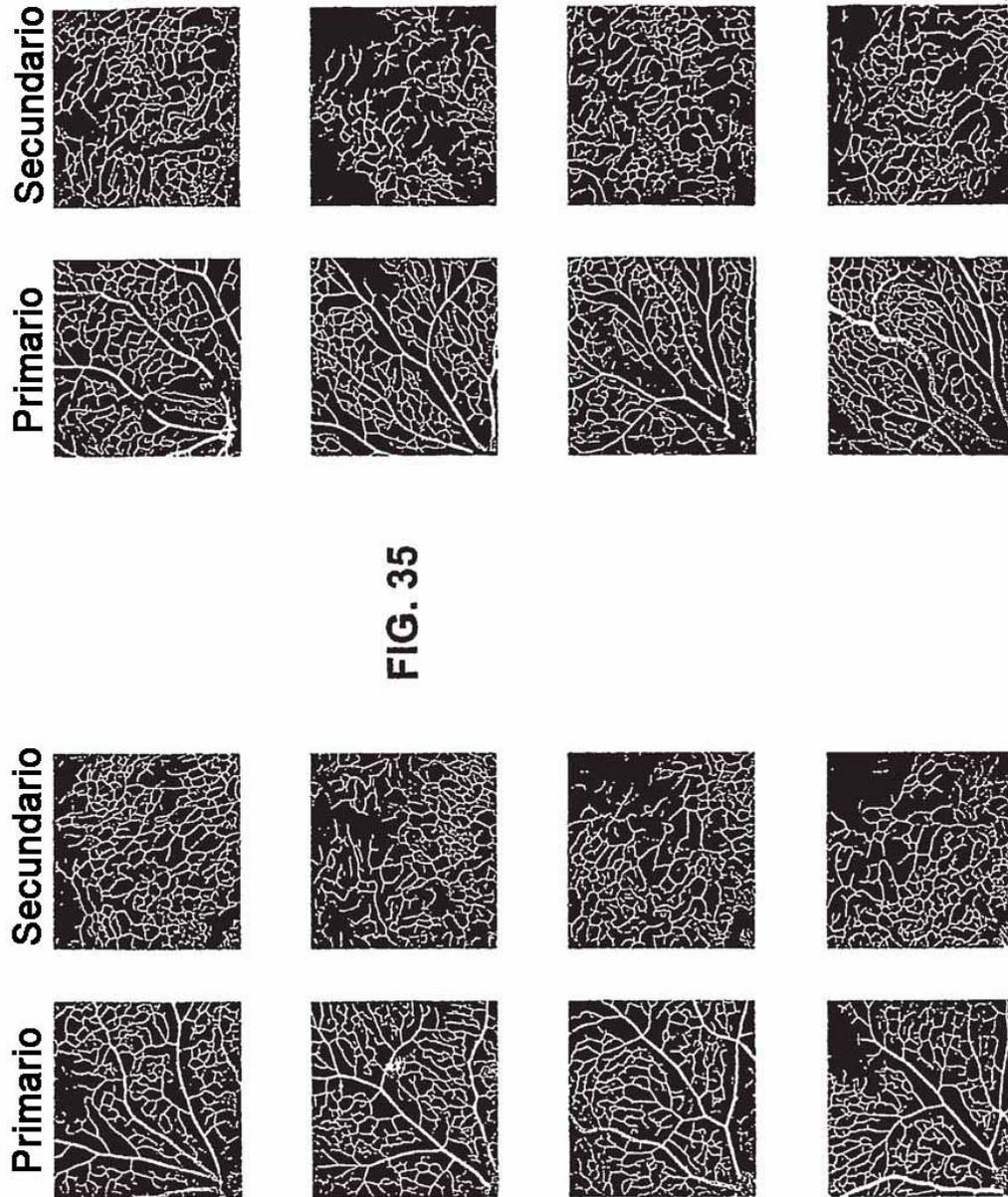
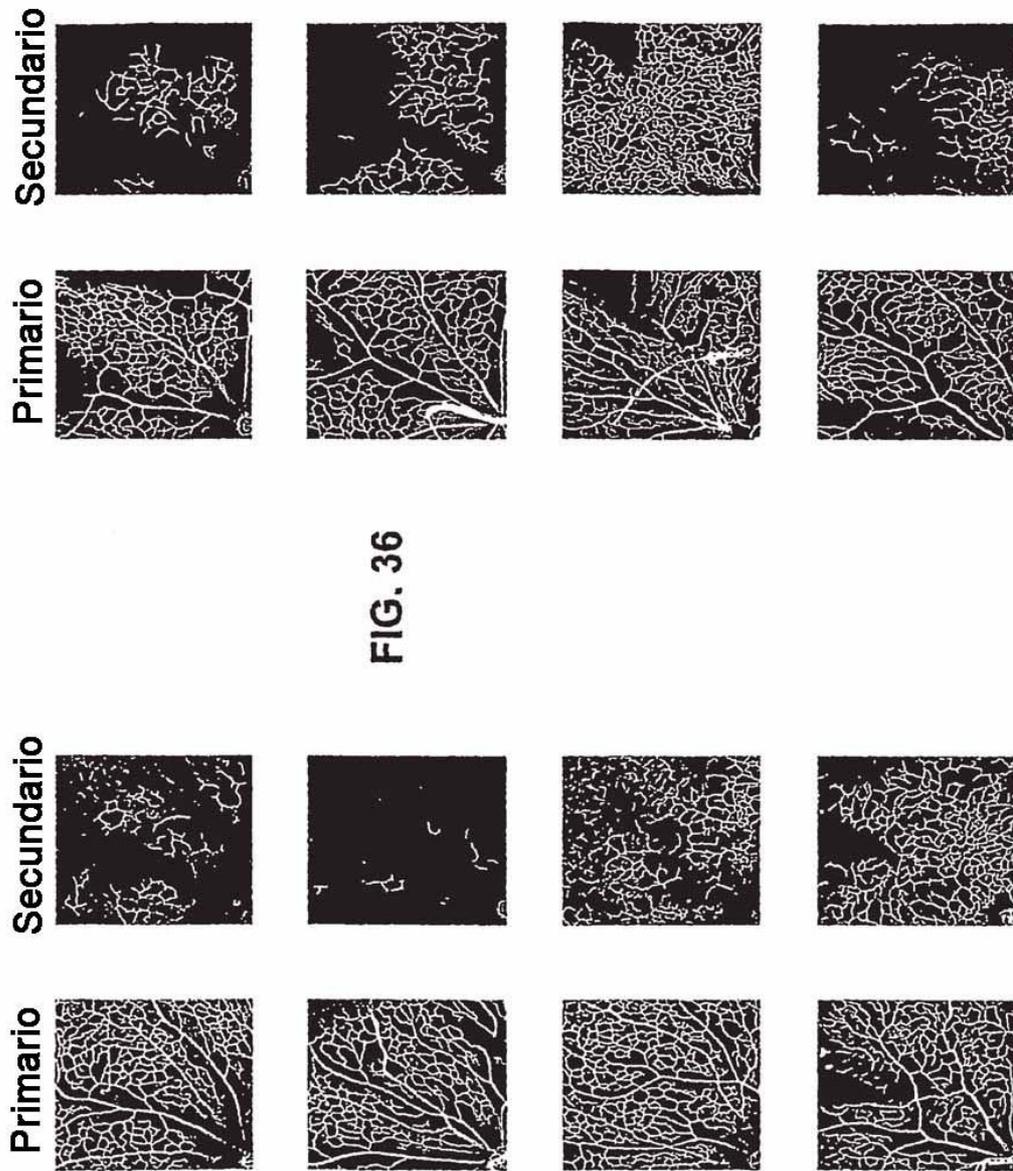
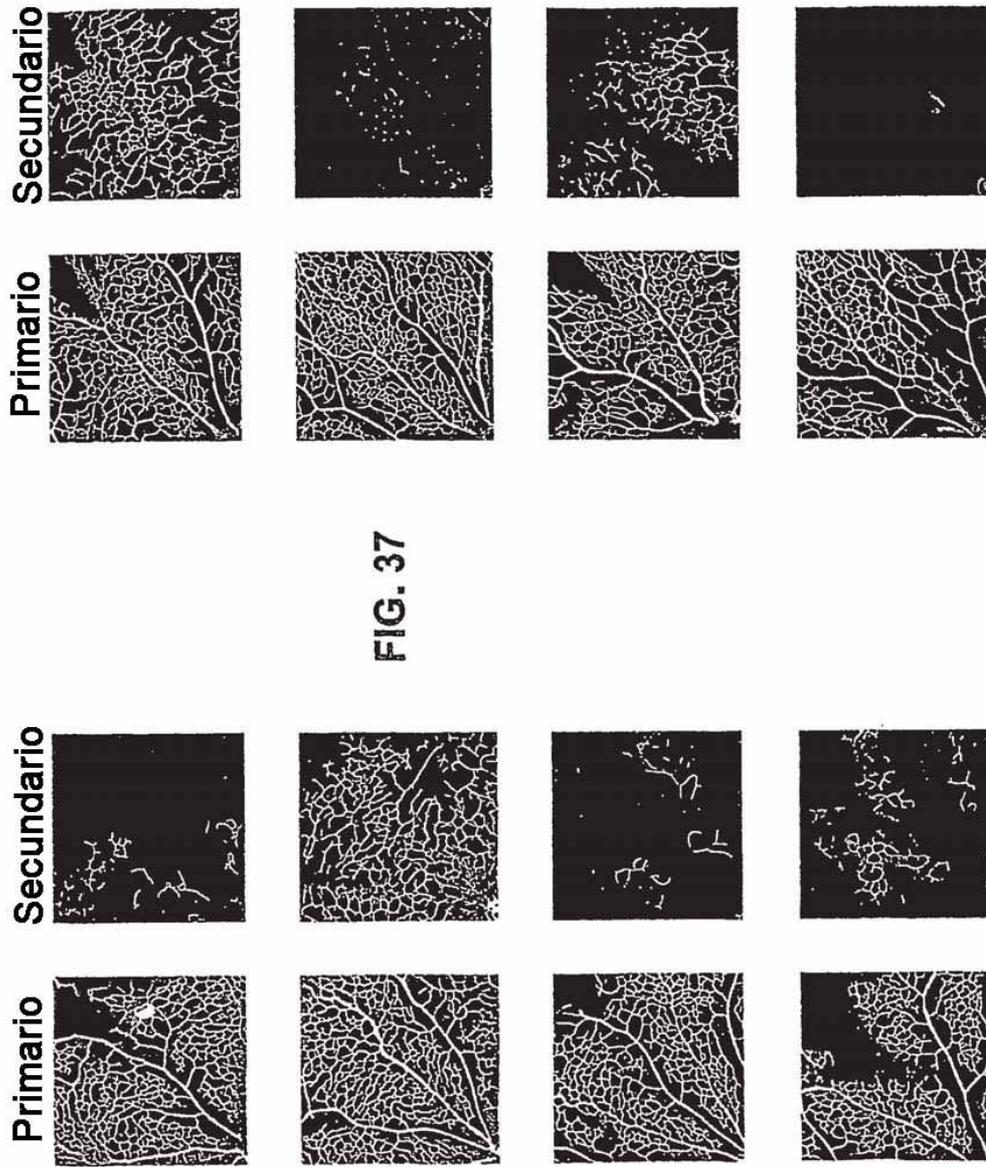


FIG. 35





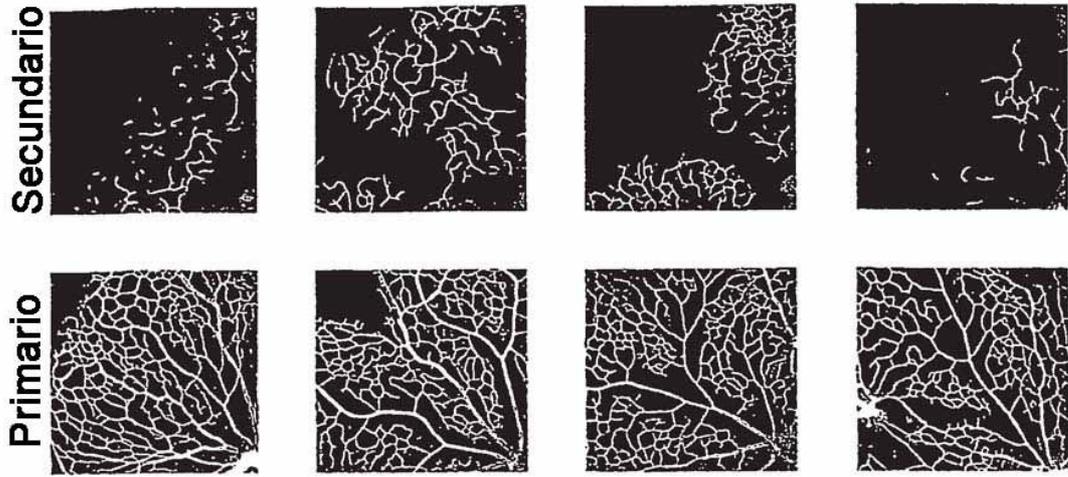
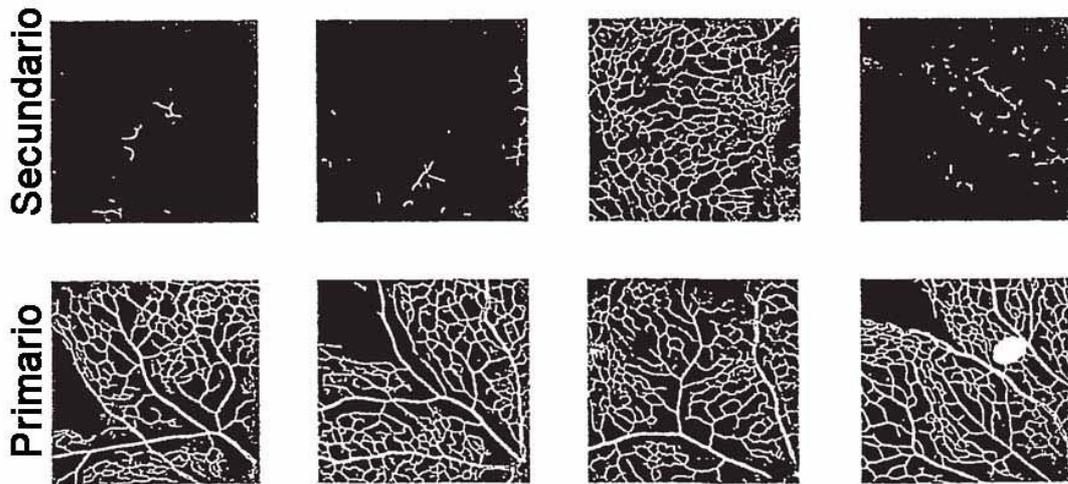


FIG. 38



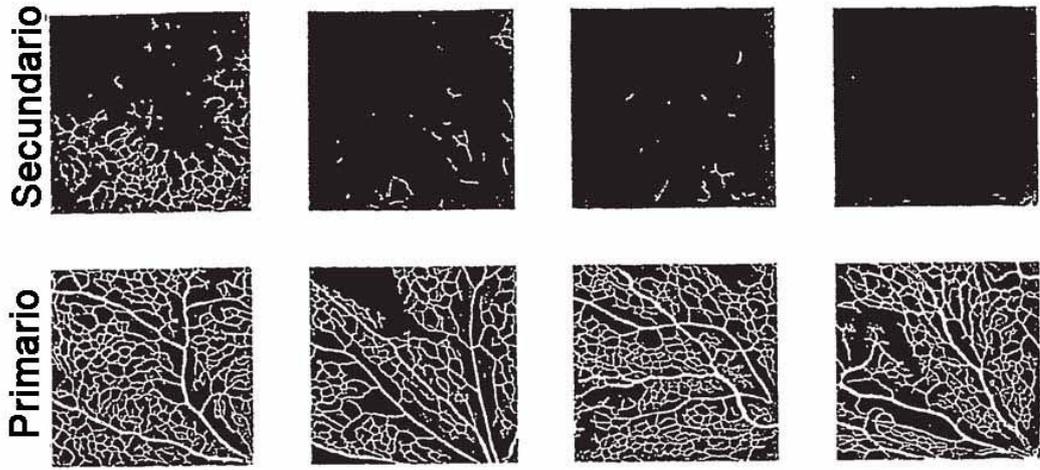
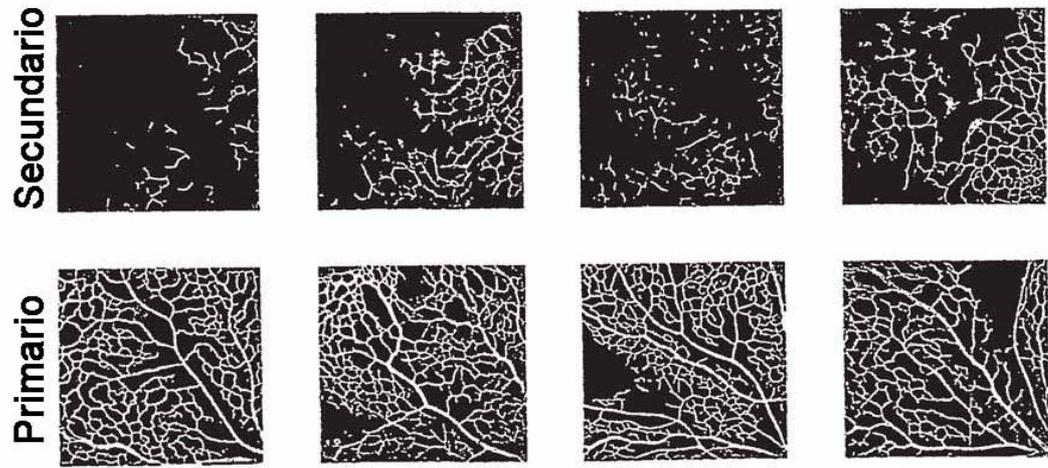
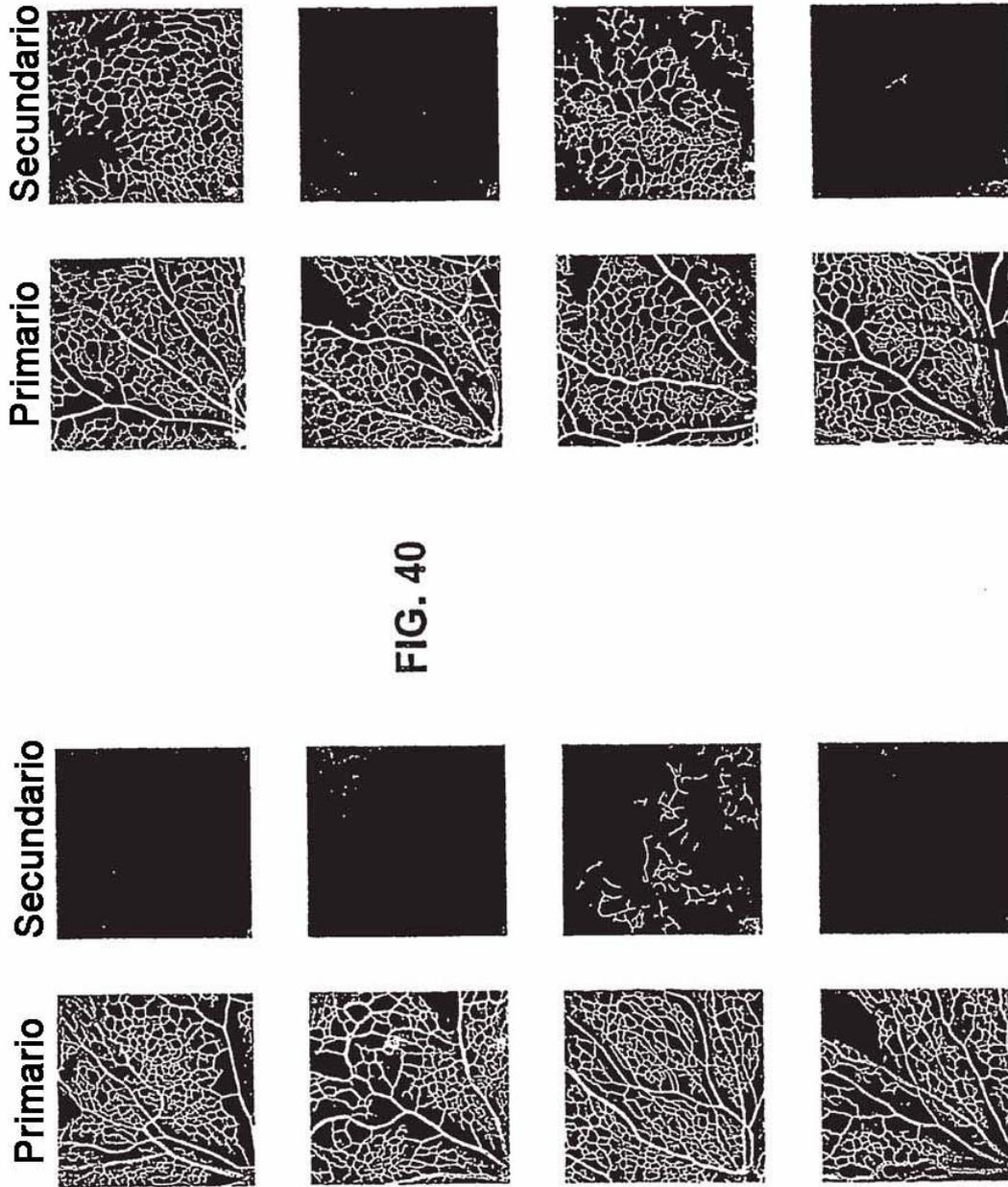


FIG. 39





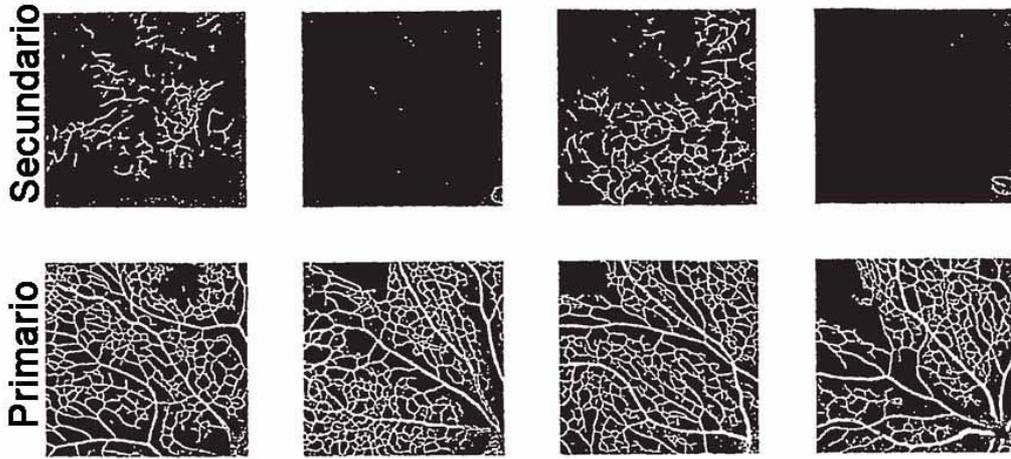
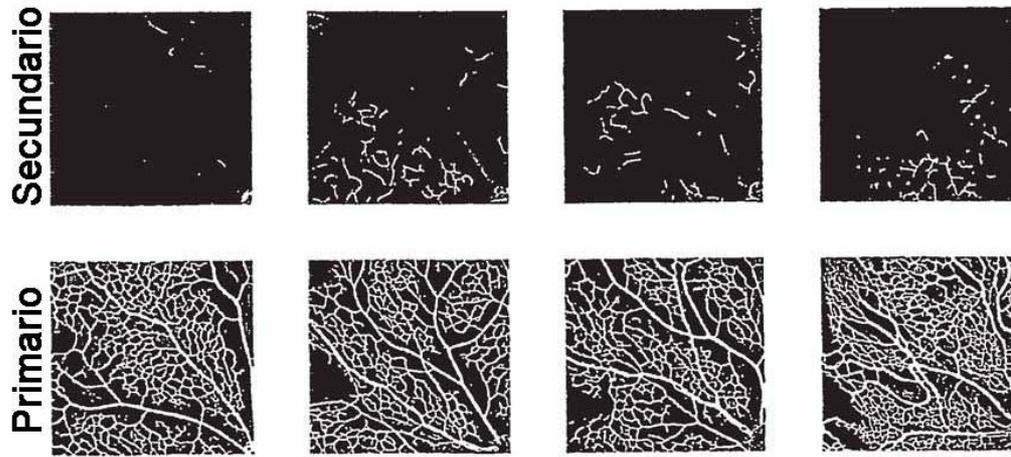


FIG. 41



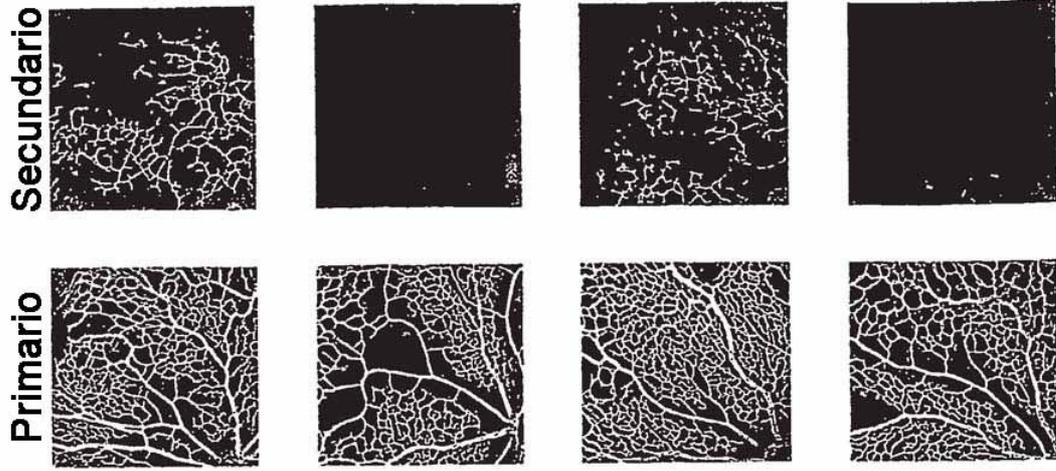
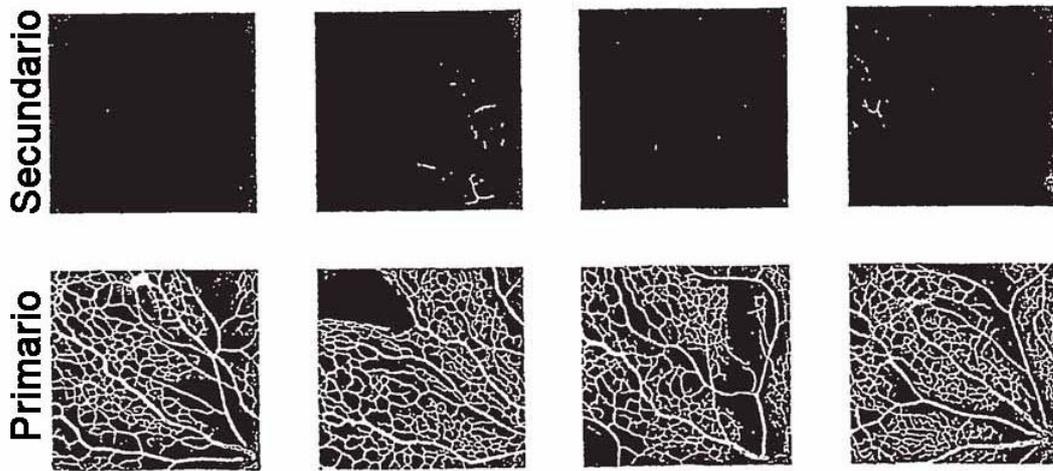


FIG. 42



Experimento de dosificación de T2

Porcentaje de retinas con más del 75% de inhibición a dosis variables de T2-TrpRS preparadas o elaboradas en laboratorio

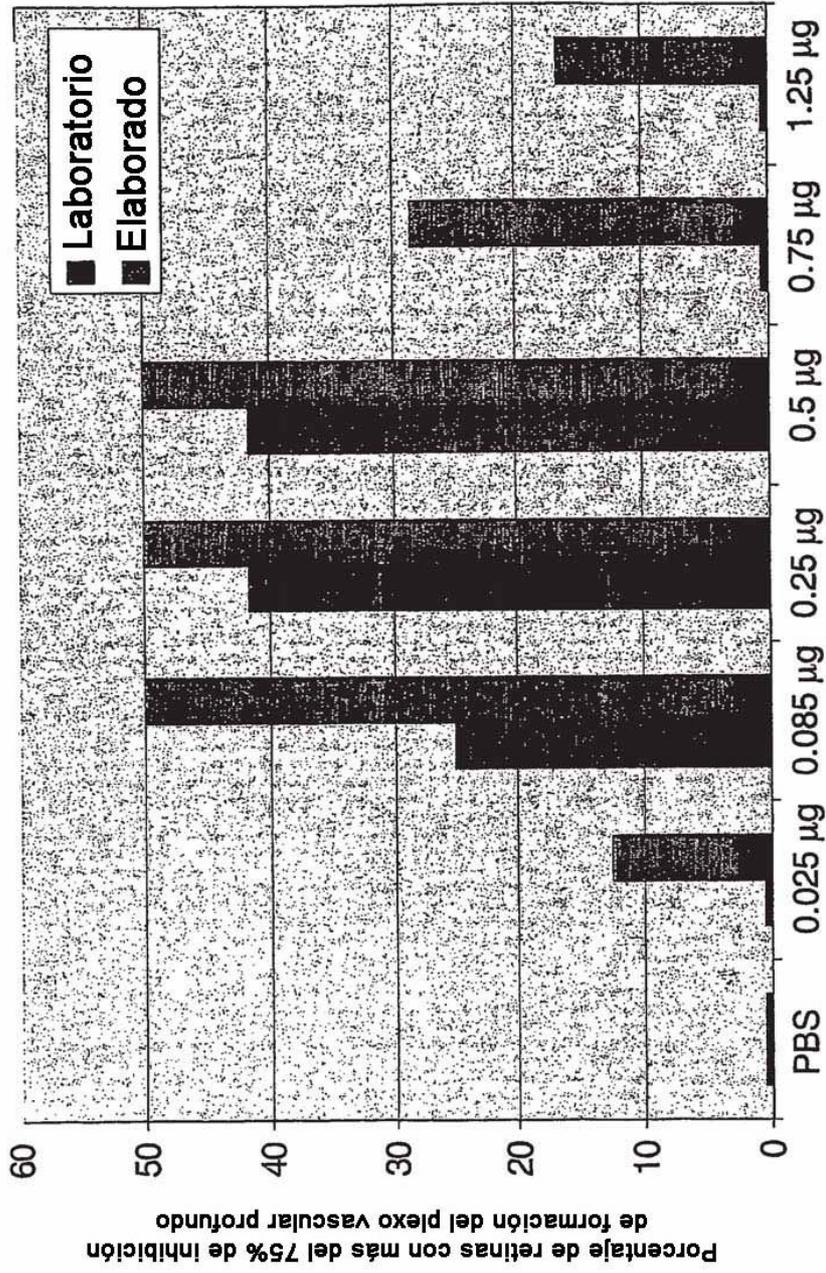


FIG. 43

Curva de dosificación para el aptámero VEGF

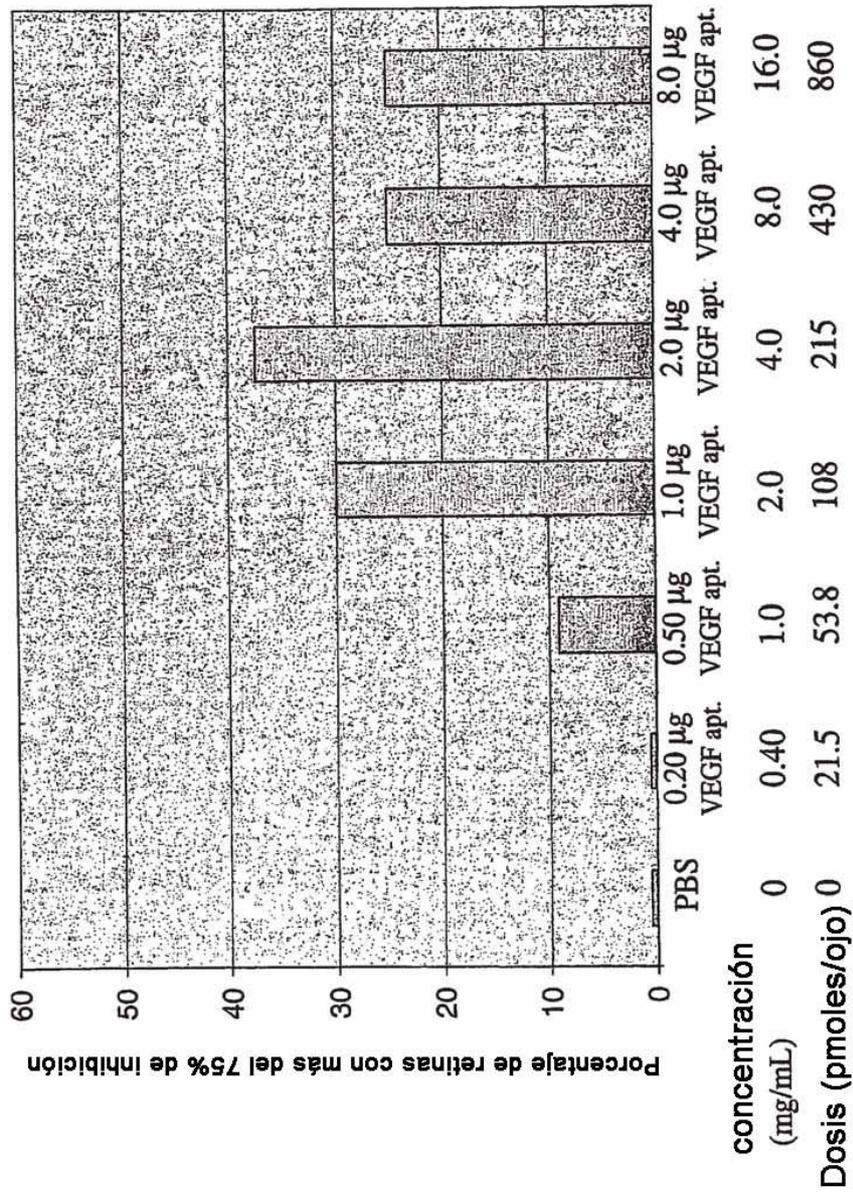


FIG. 44

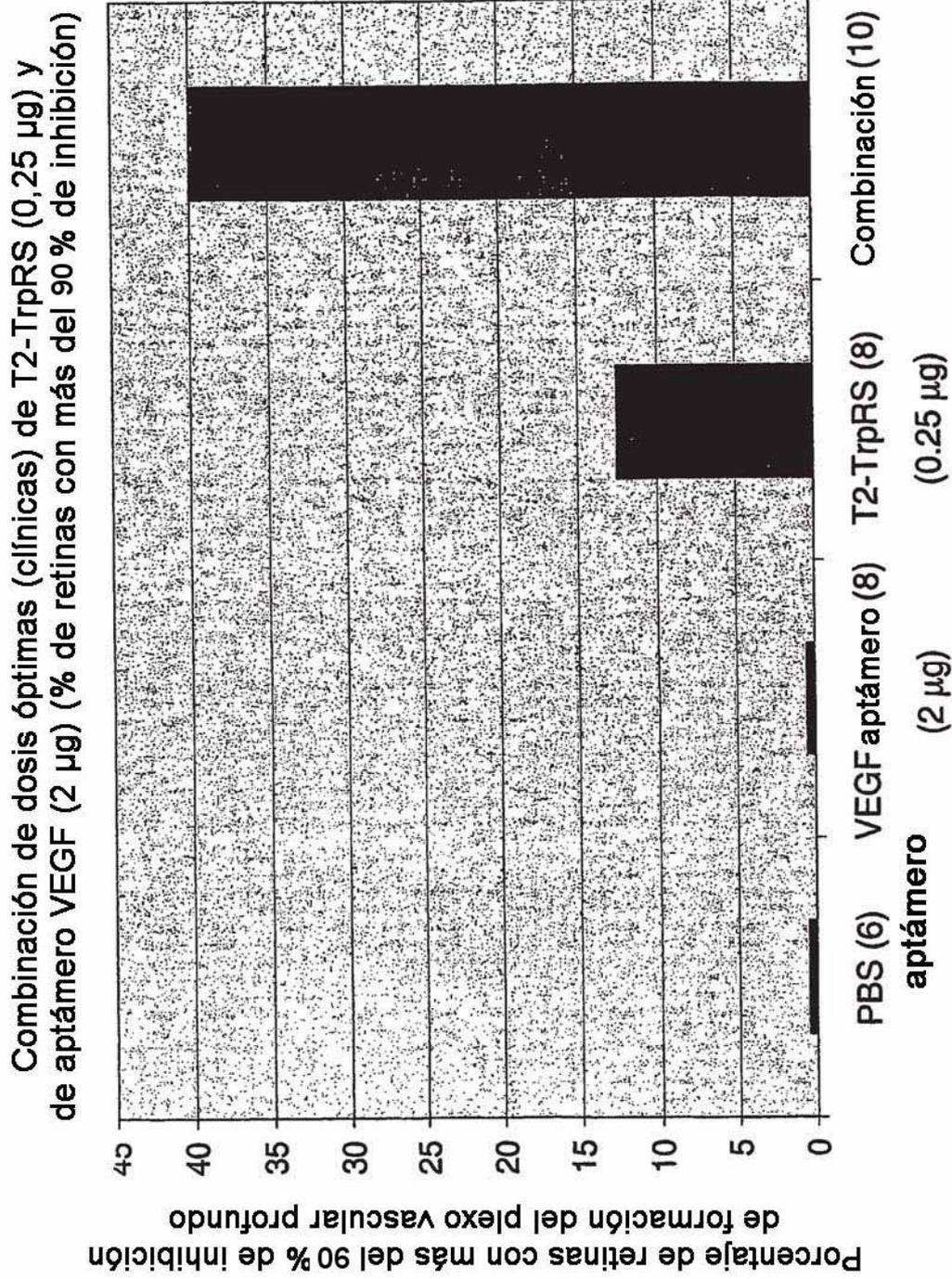


FIG. 45

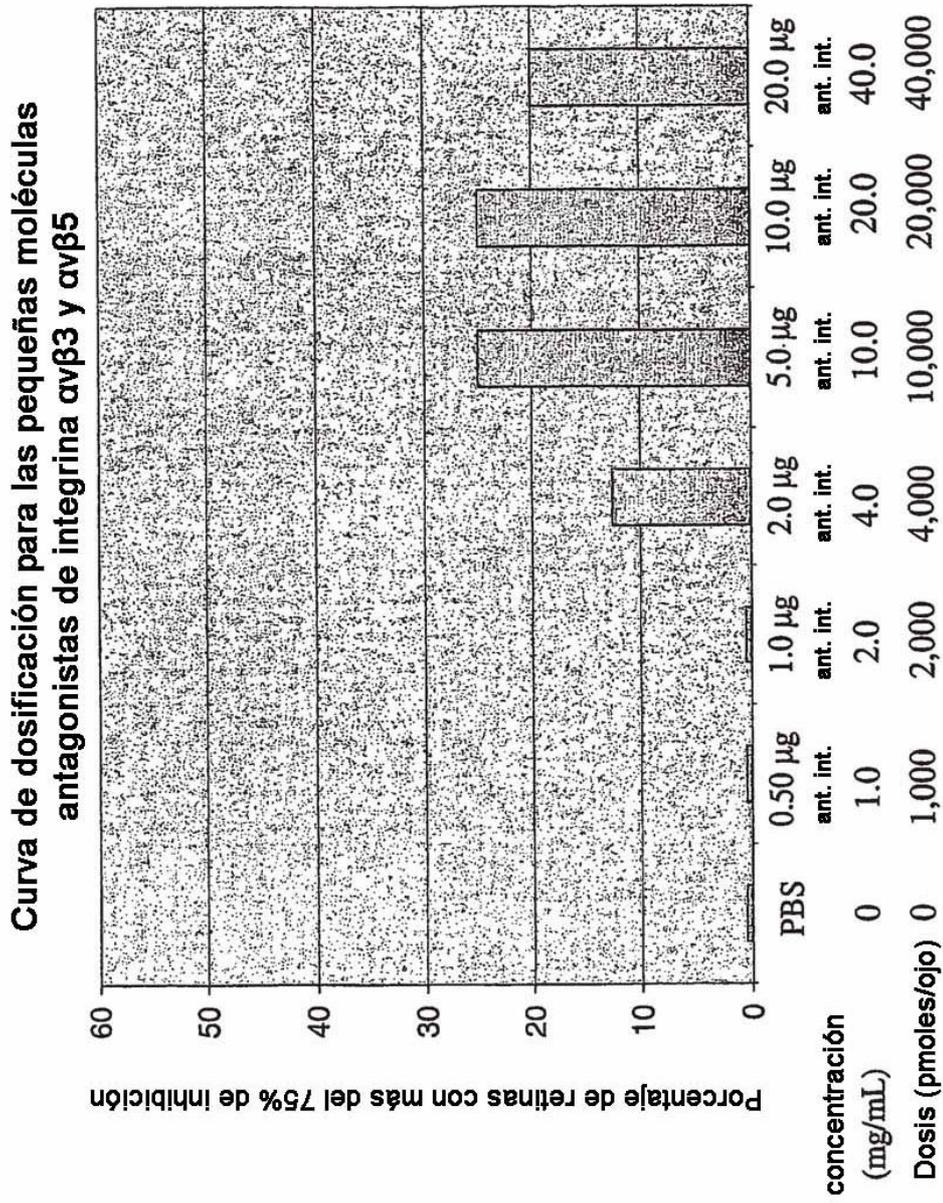


FIG. 46

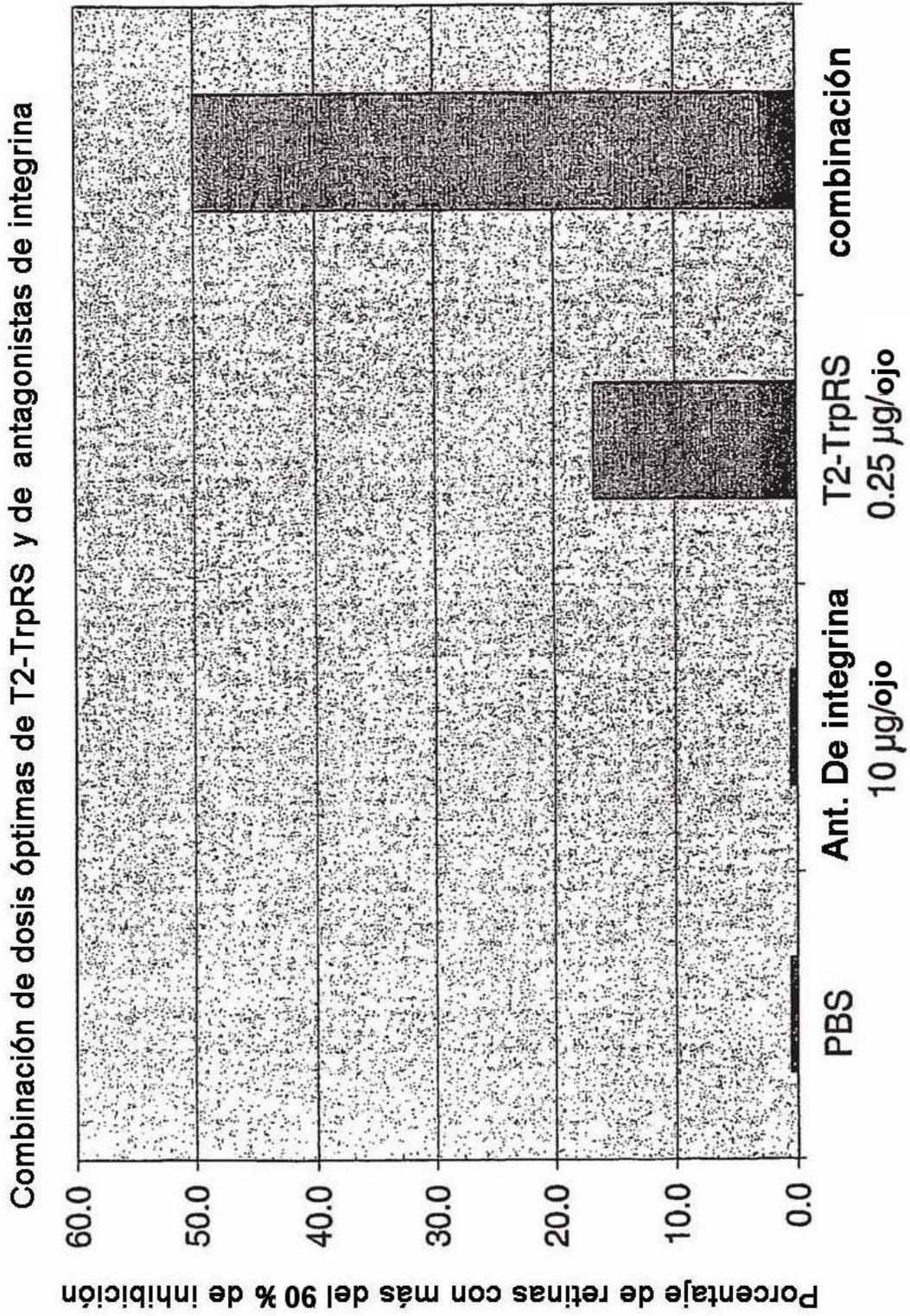


FIG. 47

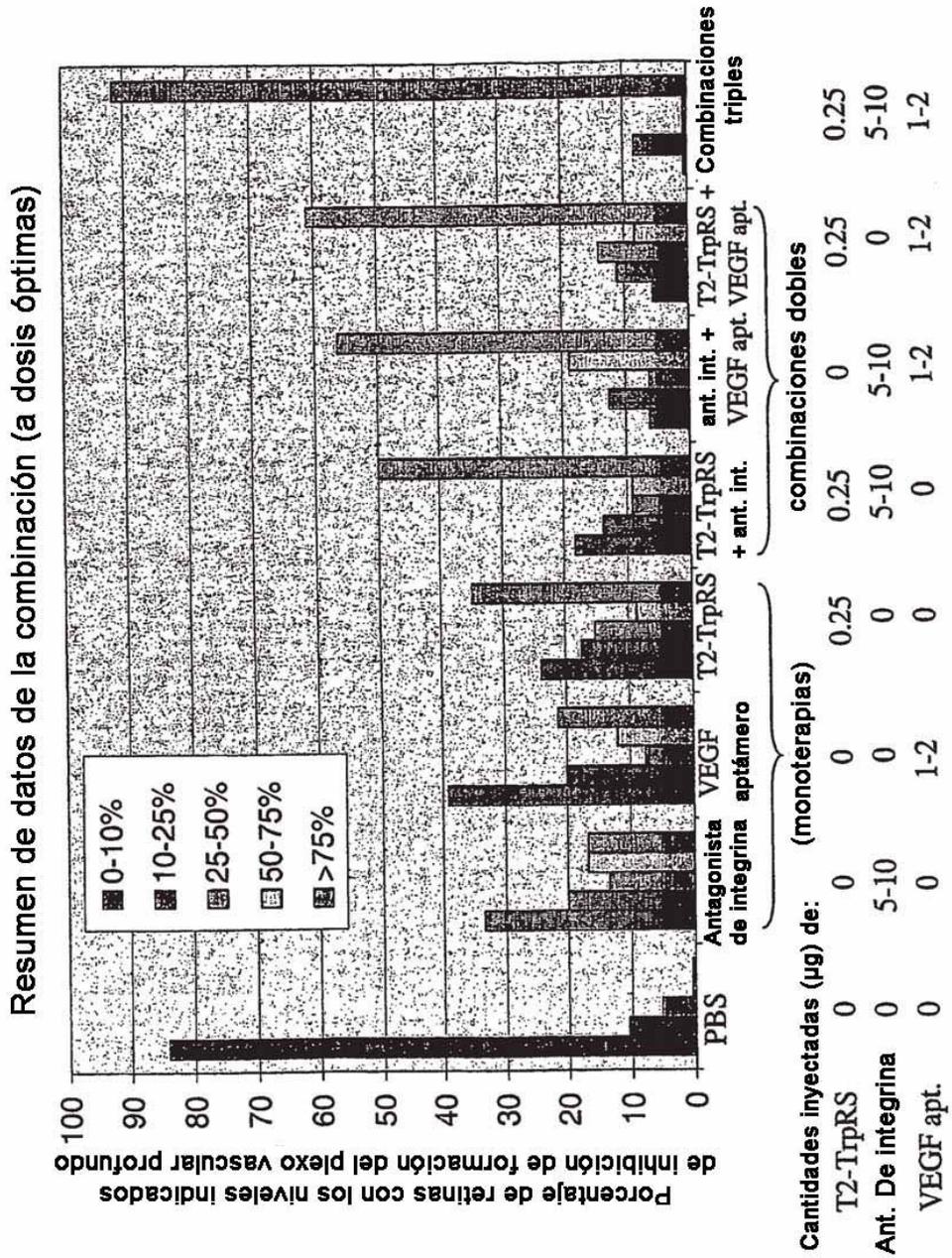


FIG. 48

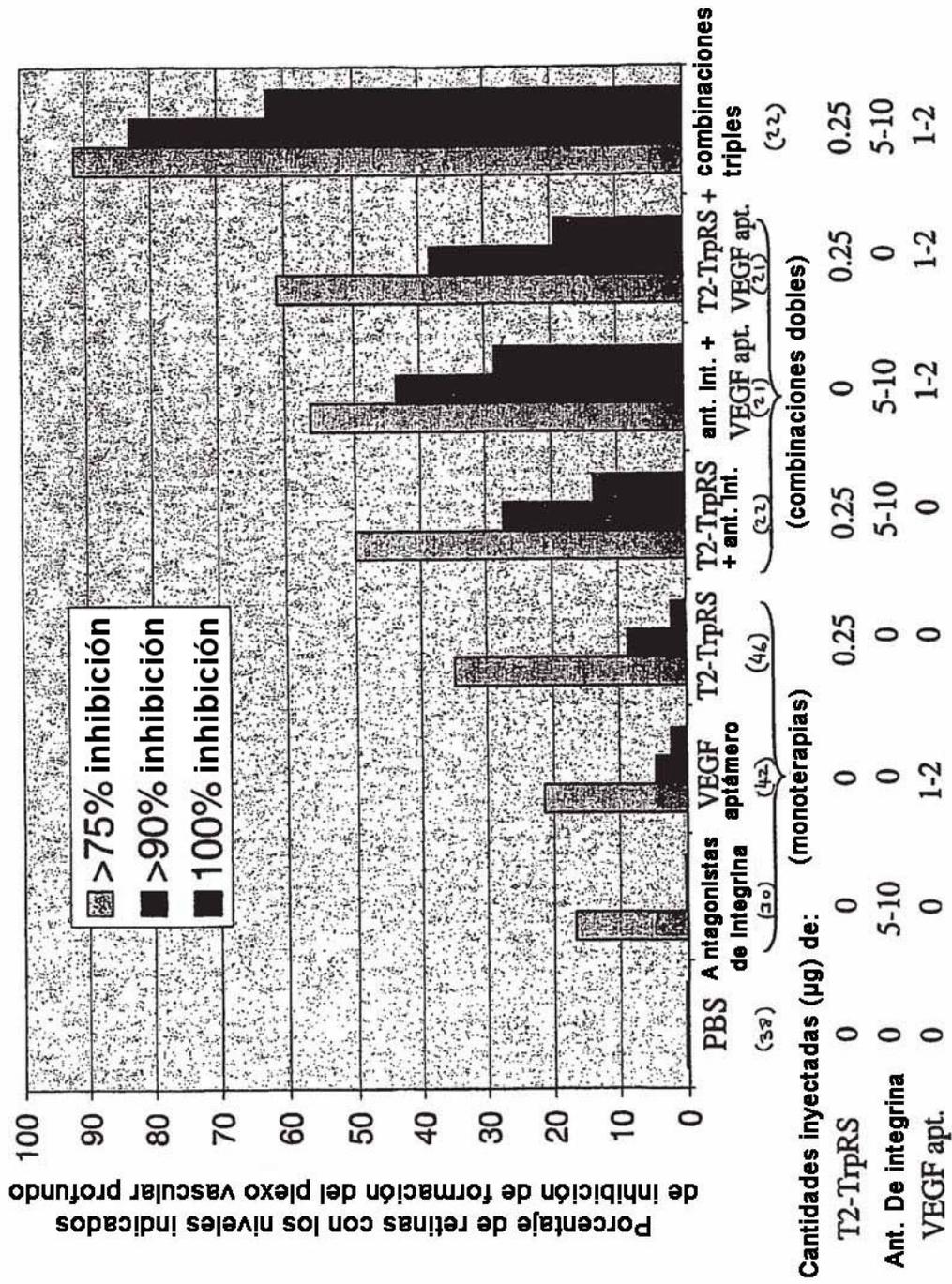


FIG. 49

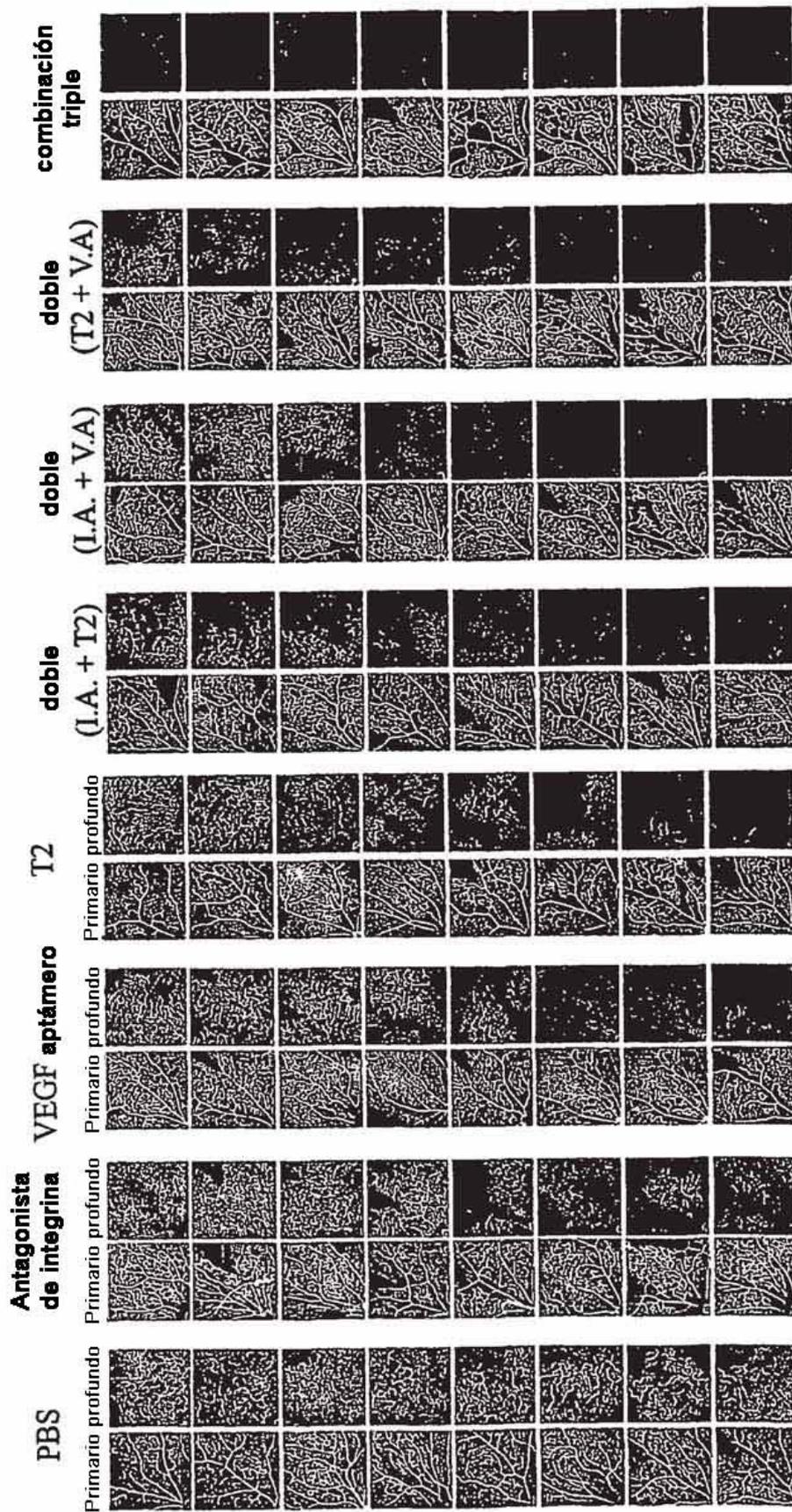


FIG. 50

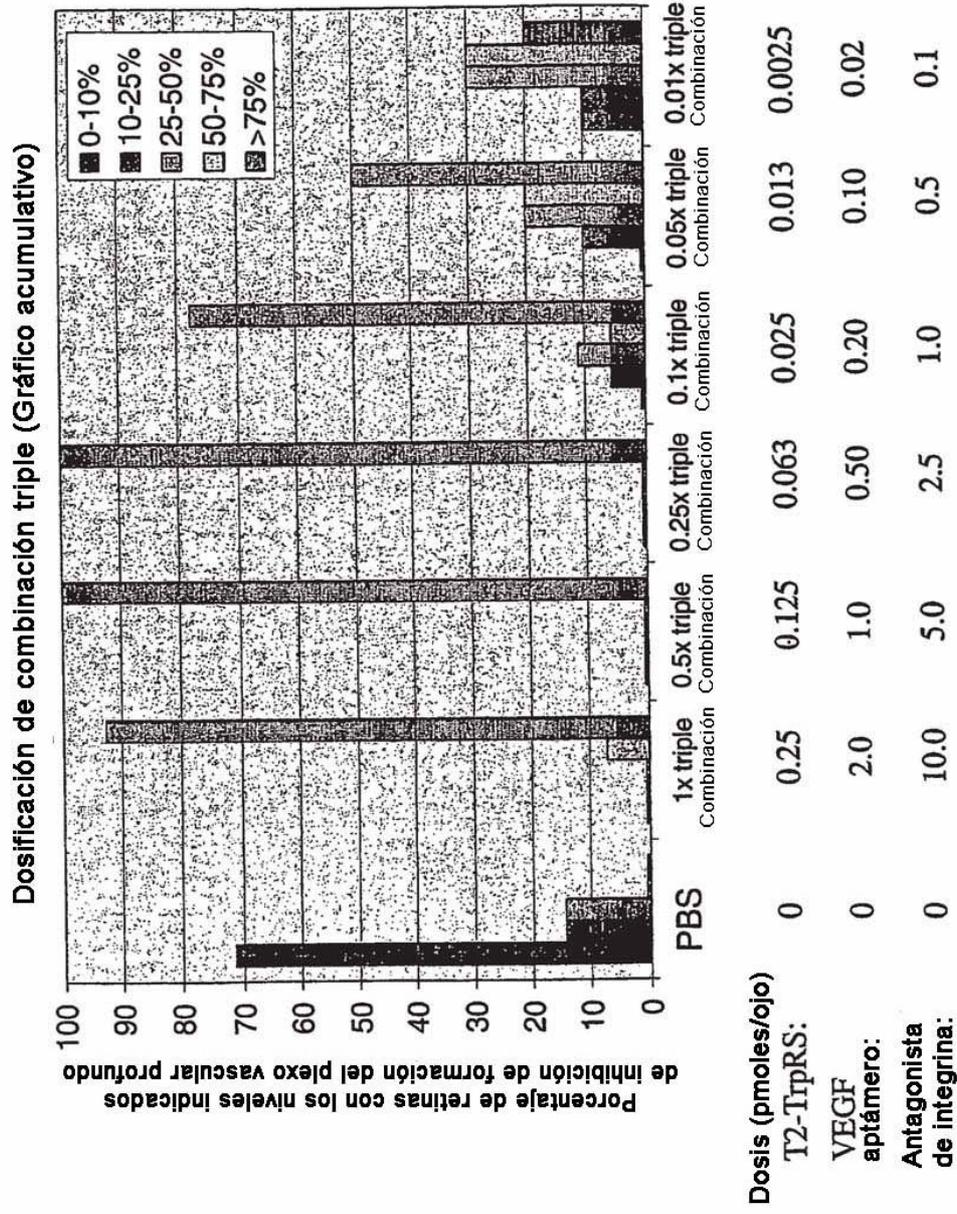


FIG. 51

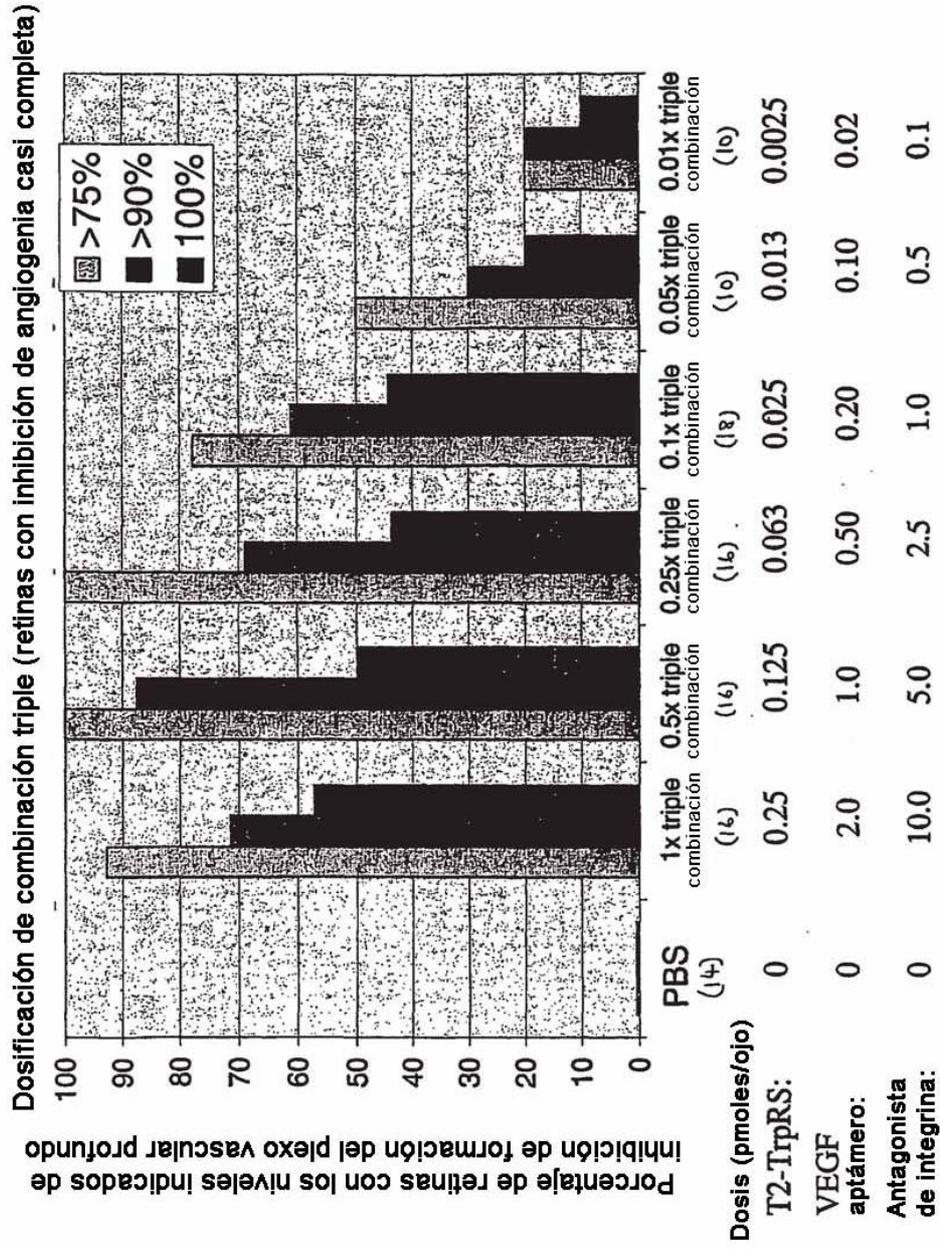


FIG. 52

Comparación a baja dosificación de monoterapias frente a politerapias

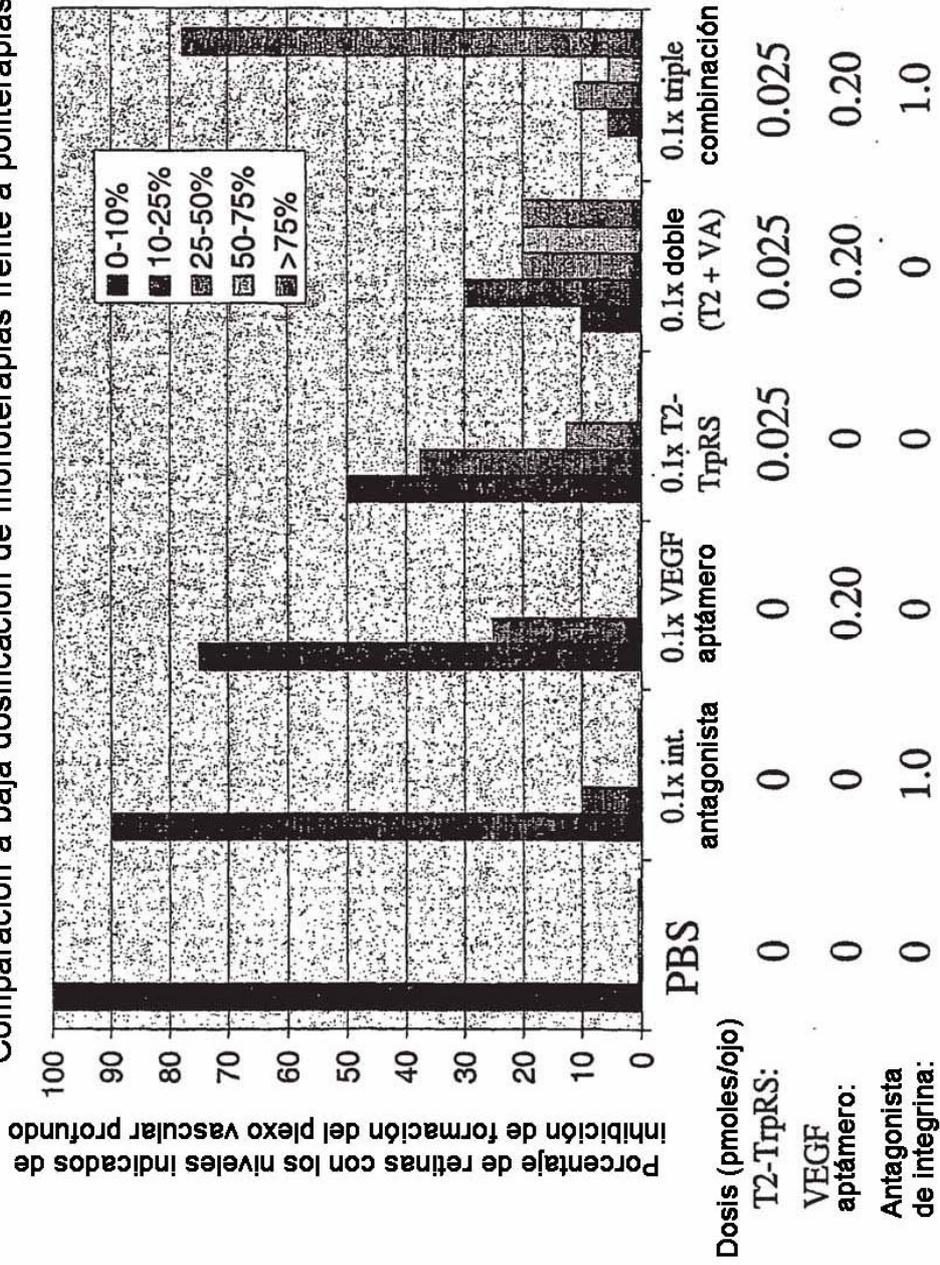


FIG.53

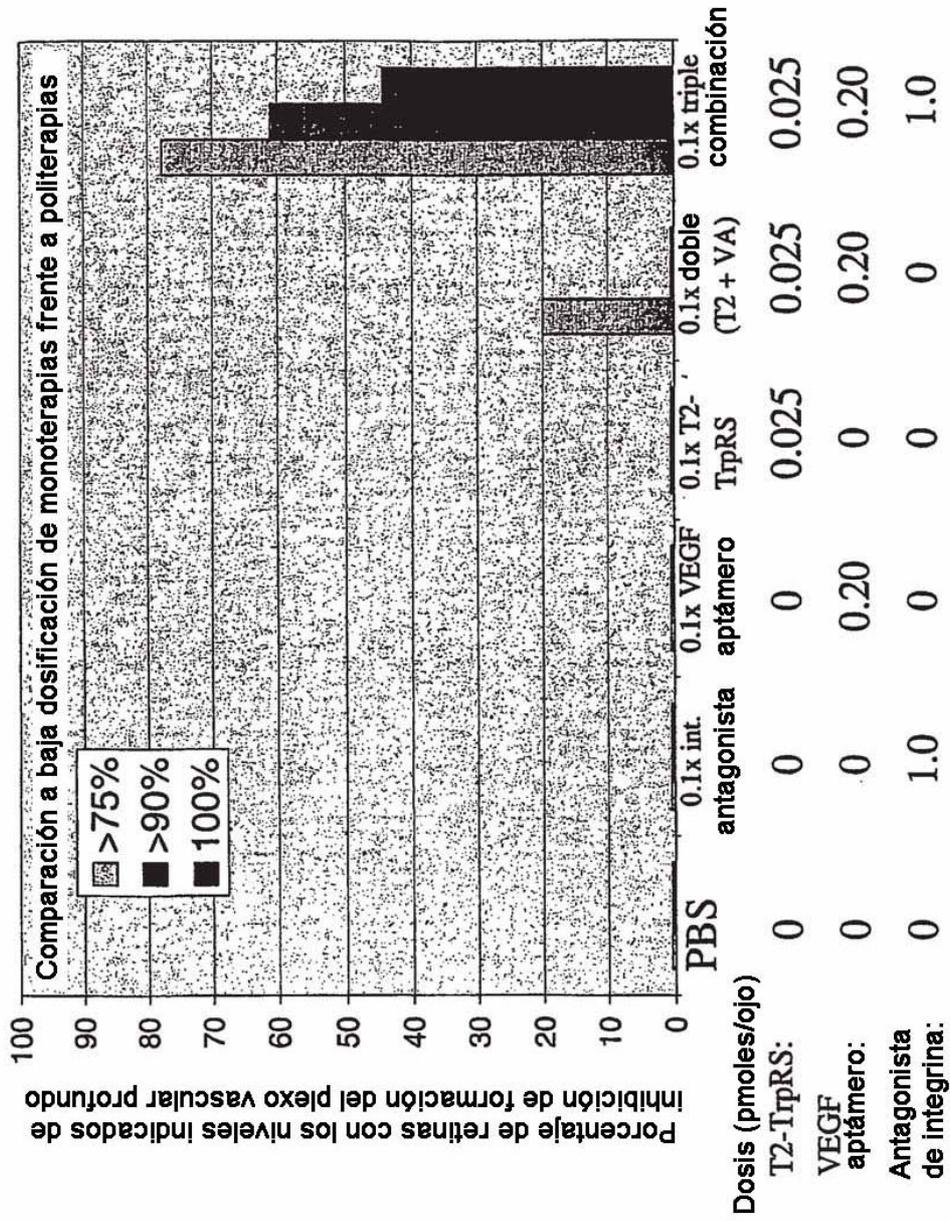


FIG. 54

Inyección única en P13, analizada en P17

Área de ovillos neovasculares

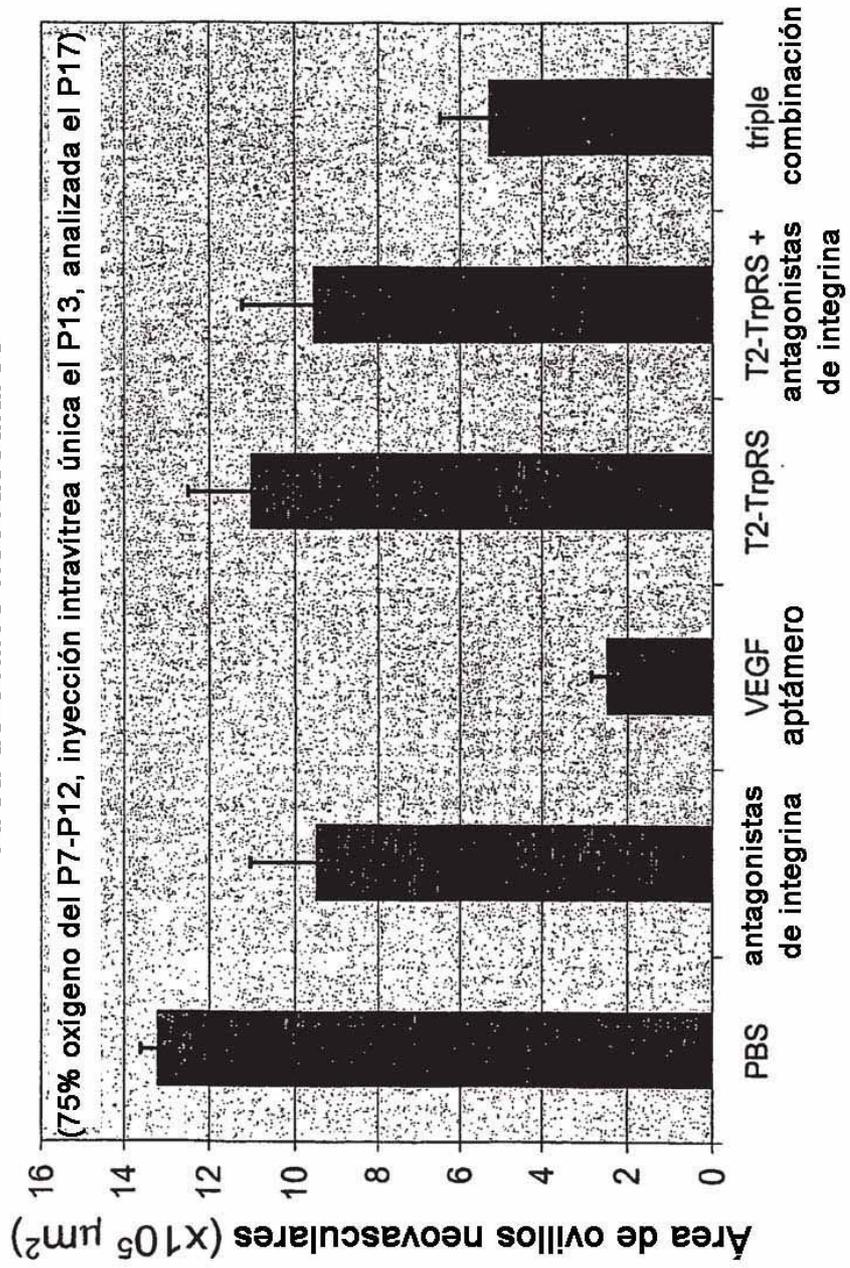


FIG. 55

Inyecciones dobles, P13 y P16. Las retinas se analizaron en P19

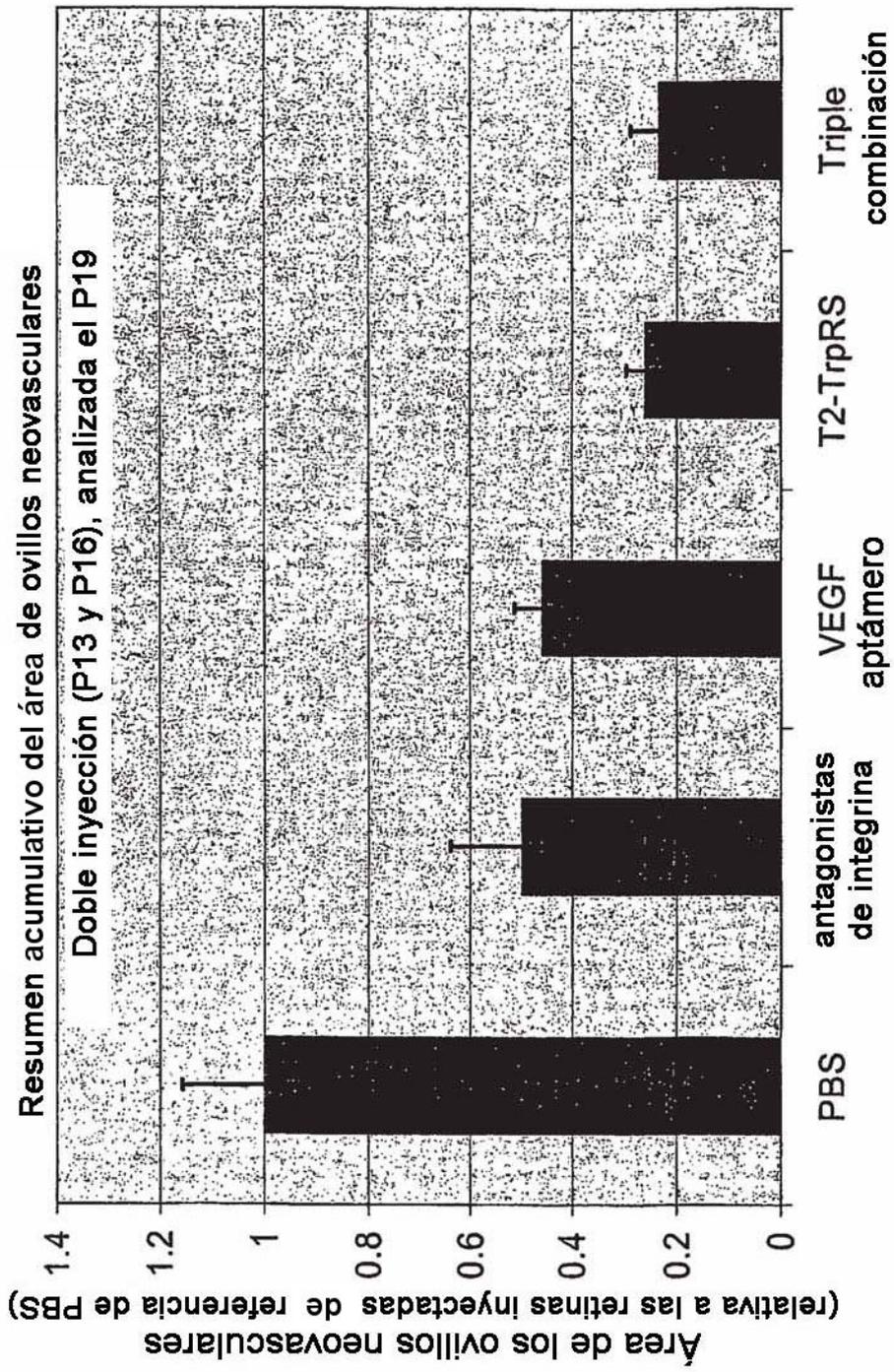


FIG. 56

Experimento de combinación con 0,1 x OIR

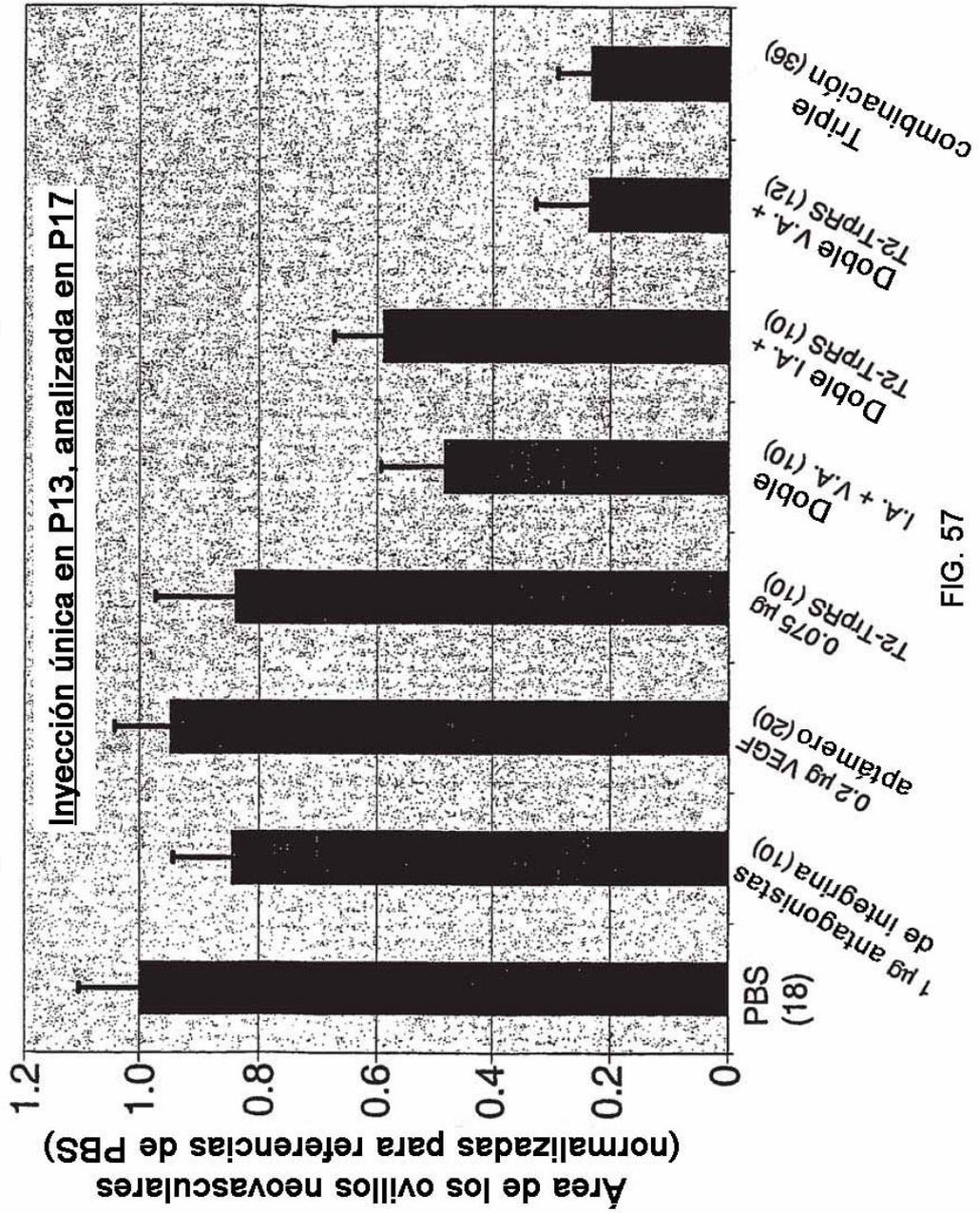


FIG. 57

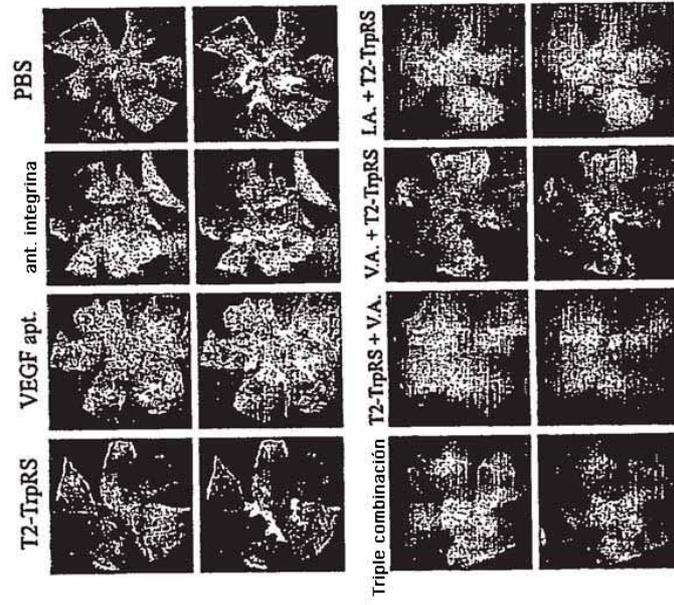


FIG. 58

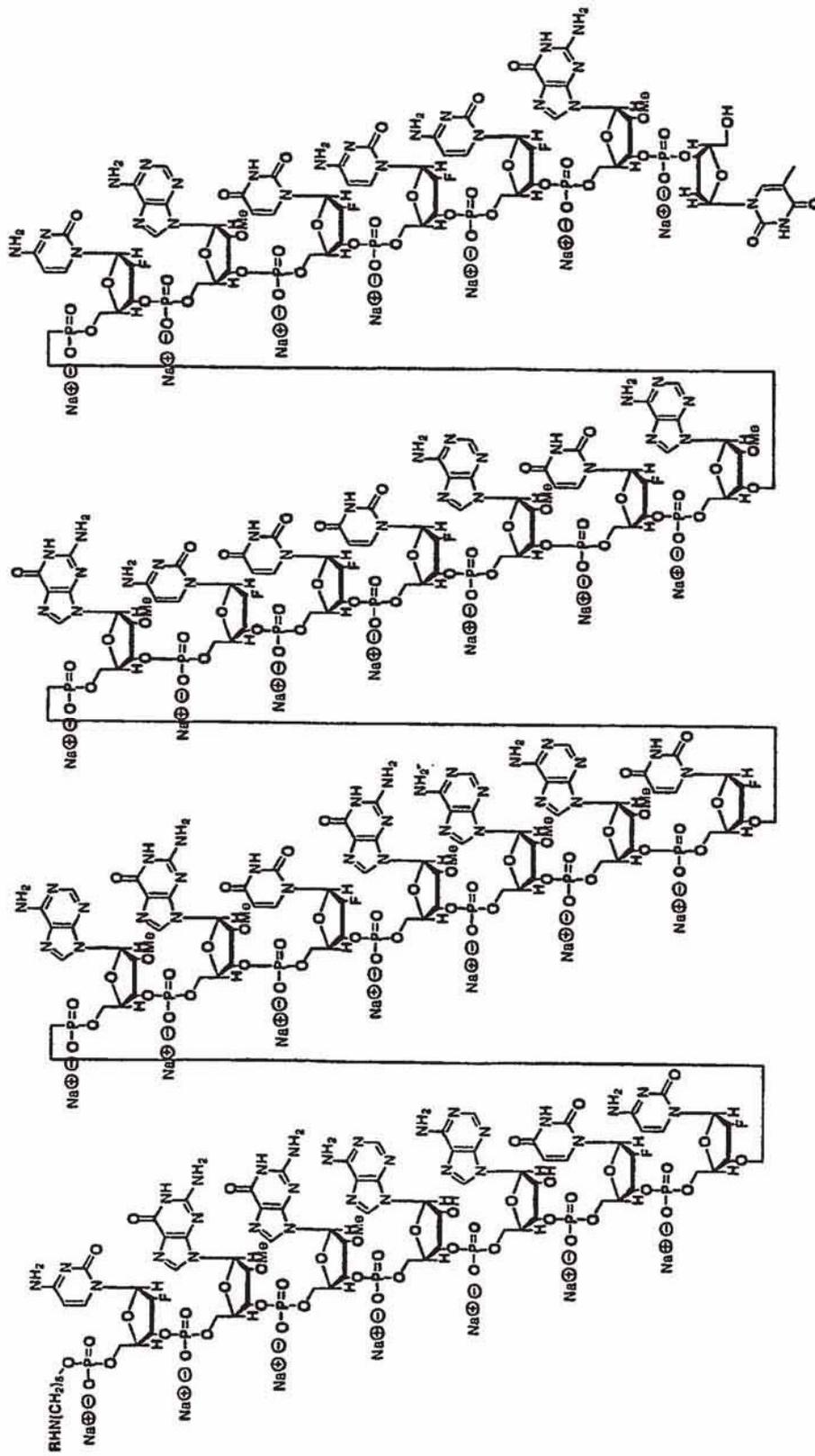


FIG. 59

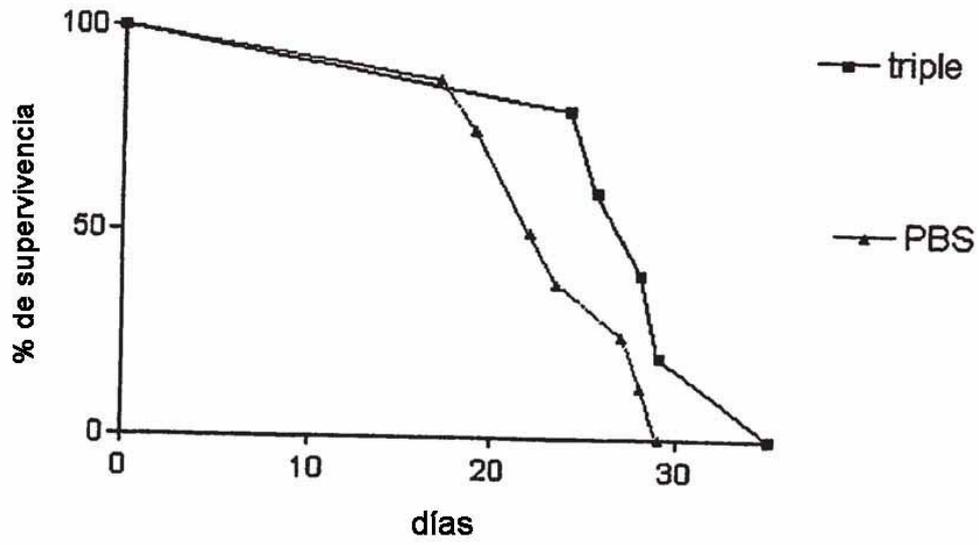


FIG. 60