

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 778**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2004 E 04710659 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1737479**

54 Título: **Administración terapéutica del péptido antiangiogénico mezclado C16Y**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2015

73 Titular/es:

**GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852-3804, US**

72 Inventor/es:

**CSAKY, KARL G.;
KLEINMAN, HYNDA y
PONCE, LOURDES**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 532 778 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

Administración terapéutica del péptido antiangiogénico mezclado C16Y.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades oculares, en particular de enfermedades asociadas con neovascularización ocular.

10 Antecedentes

15 La matriz extracelular (ECM), a menudo denominada como tejido conectivo, es la compleja estructura que rodea y da soporte a las células en tejidos de mamíferos. Se compone principalmente de tres clases de biomoléculas: proteínas estructurales (colágeno y elastina), proteínas especializadas (por ejemplo, laminina, fibronectina, fibrilina) y proteoglicanos (proteínas del núcleo enlazadas a repeticiones de disacáridos conocidas como glicosaminoglicanos o GAG) (Pepper, 2001). La ECM es vital para el mantenimiento y la diferenciación de muchos tipos de células, incluyendo el endotelio. Además, desempeña un papel en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, un proceso conocido como angiogénesis (Folkman 1995; Risau 1997).

20 La mayoría de las células normales no pueden sobrevivir a menos que estén ancladas a la ECM. Este anclaje está mediado por glicoproteínas transmembrana heterodiméricas denominadas integrinas, que actúan como receptores de adhesión celular. Las integrinas están compuestas de subunidades α y β no asociadas covalentemente. Dieciséis subunidades α y ocho subunidades β han sido identificadas, y se han encontrado más de 20 combinaciones diferentes de estas subunidades. Por ejemplo, la integrina $\alpha v \beta 3$ es un receptor en la superficie de las células endoteliales en los vasos sanguíneos en crecimiento. Se enlaza a las células endoteliales angiogénicas, lo que les permite formar nuevos vasos sanguíneos. Las células anclan las integrinas a sus alrededores por mediación de la matriz celular y de interacciones célula-célula. La porción extracelular de la integrina se enlaza al colágeno, laminina o fibronectina, mientras que la porción intracelular se enlaza a filamentos de actina o al citoesqueleto. El enlazamiento extracelular a proteínas de matriz depende en gran medida del reconocimiento de un motivo RGD en las proteínas extracelulares. La fibronectina es la proteína prototipo que contiene RGD.

35 La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. En condiciones normales, la angiogénesis está sujeta a estrecha regulación fisiológica, y la proliferación de células endoteliales es muy baja. Un aumento de angiogénesis normalmente se produce en la cicatrización de heridas, el desarrollo embrionario y el crecimiento mensual del revestimiento uterino en las hembras menstruando. Sin embargo, hay otras situaciones en las que el aumento de la angiogénesis está asociado con una condición patológica. La angiogénesis descontrolada se ha asociado con el crecimiento tumoral, metástasis tumoral, retinopatía diabética, artritis reumatoide, y enfermedad cardiovascular (Folkman 1995).

40 Las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos en general permanecen en un estado de reposo hasta que reciben una señal angiogénica de su microambiente. Estas señales pueden ser provocadas por heridas, inflamación o enfermedad. La señal angiogénica activa el endotelio y provoca una cascada de eventos que conducen a la formación de nuevos vasos: inducción de proteasas, degradación de la membrana basal, migración de células endoteliales en el espacio intersticial, proliferación de células endoteliales, formación del lumen, generación de nueva membrana basal, fusión de nuevos vasos, e inicio del flujo sanguíneo.

50 La primera etapa en la cascada angiogénica es la liberación de proteasas tales como las metaloproteinasas de matriz (MMP) por las células endoteliales. Estas proteasas degradan la membrana basal, un tipo especializado de ECM. La membrana basal es un depósito de almacenamiento para muchos factores de crecimiento angiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF). La degradación de la membrana basal libera estos factores de crecimiento angiogénico, que a su vez propaga la cascada angiogénica. La degradación de la ECM también resulta en la liberación de fragmentos de proteínas de la ECM, varios de los cuales han sido implicados en la modulación de la angiogénesis. Algunos de estos fragmentos (por ejemplo, un fragmento de trombospondina Mw 25.000) promueven la angiogénesis, mientras que otros fragmentos (por ejemplo, derivados de endostatina a partir de colágeno XVIII, angiostatina derivada de plasminógeno, los dominios no colagenosos del colágeno IV, y varios péptidos de trombospondina) la inhiben (Taraboletti 2000; O'Reilly 1997; O'Reilly 1994; Maeshima 2001; Tolsma 1993).

60 Las células endoteliales en los vasos sanguíneos están en contacto con una membrana basal que contiene laminina, una gran glicoproteína ubicua que existe en doce isoformas diferentes. La laminina se compone de tres cadenas (α , β y γ). Se han identificado cinco cadenas diferentes α , tres β , y tres γ . Diez de los doce isoformas heterotriméricas diferentes contienen la cadena $\gamma 1$ (Timpl 1994; Burgeson 1994; Miner 1997). La identidad de las isoformas de laminina presentes en la matriz endotelial celular no se ha determinado. Sin embargo, los anticuerpos policlonales para laminina 1 (compuestos por $\alpha 1$, $\beta 1$, y $\gamma 1$) reconocen la matriz, lo que sugiere la presencia de al menos una de estas tres cadenas. La laminina 1 promueve la unión de células endoteliales *in vivo*, y las células se diferencian en estructuras similares a capilares cuando se siembran sobre una membrana basal rica en laminina 1, tal como Matrigel (Kubota 1988). Se han

identificado múltiples sitios de enlazamiento para células tumorales en laminina 1 (Nomizu 1995; Nomizu 1997; Nomizu 1998).

Más de veinte péptidos de laminina 1 han sido identificados que pueden promover angiogénesis *in vivo* (Malinda 1999; Ponce 1999). Estos incluyen ocho péptidos de la cadena $\alpha 1$, cinco de la cadena $\beta 1$, y siete de la cadena $\gamma 1$. Dos de los sitios de péptidos angiogénicos más potentes, A13 y C16, son sitios angiogénicos redundantes presentes en regiones homólogas de las cadenas $\alpha 1$ y $\gamma 1$, respectivamente (Ponce 2003a; Kuratomi 2002; Kuratomi 1999). Estas secuencias de péptidos se enlazan a la integrinas de células endoteliales $\alpha v \beta 3$ y $\alpha 5 \beta 1$, y se ha demostrado que promueven adhesión, formación del tubo, y angiogénesis en el ensayo de la membrana corioalantoidea (CAM) de pollo (Ponce 2001). El mecanismo de acción de estos péptidos aún no ha sido identificado. Aunque se enlazan a integrinas, no parece que señalen a través de proteína quinasa activada por mitógeno o varias serina o treonina quinasas. Once de las trece proteínas laminina contienen cadenas $\gamma 1$, lo que significa que la secuencia C16 está presente en once lamininas (Colognato 2001). Además, la secuencia A13 está altamente conservada en las cadenas α de laminina. Esto significa que varias de las lamininas, incluyendo laminina 1 y laminina-3, contienen la secuencia A13 dos veces (Nomizu 2001).

Debido a la importancia putativa de la secuencia C16 en la angiogénesis y sus enfermedades relacionadas, ha sido importante para identificar antagonistas capaces de bloquear su actividad. Uno de tales antagonistas es la secuencia perturbada del péptido C16S, que se ha demostrado que inhibe la angiogénesis inducida por bFGF y C16 en el ensayo de la CAM (Ponce 2001). Los métodos descritos en la presente invención utilizan una secuencia modificada del péptido C16, C16Y, que es al menos cinco veces más potente que C16S. C16Y inhibe la neovascularización coroidea (CN) *in vivo*, además de inhibir la angiogénesis *in vivo* y el crecimiento tumoral en ratones (Ponce 2003b). Con base en la determinación de su secuencia activa mínima, C16Y ha demostrado que comparte homología con la fibronectina.

La angiogénesis no regulada se asocia con el cambio de los tumores desde un estado inactivo hasta un estado maligno. Los tumores requieren una extensa red capilar para crecer y producir metástasis. Normalmente, un tumor sólido no crecerá más allá aproximadamente de 2 mm sin el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis patológica o no regulada en el ojo (neovascularización ocular) es la causa más común de ceguera, y ha sido implicada en aproximadamente veinte diferentes enfermedades de los ojos. Los principales tipos de neovascularización ocular son la neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, neovascularización corneal, y neovascularización del iris.

La neovascularización de la retina es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que se originan a partir de las venas de la retina y que crecen en el vítreo. La neovascularización de la retina está asociada con retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, oclusión de la vena central, y otras enfermedades de la retina. La retinopatía diabética es responsable de 13 a 18% de los nuevos casos reportados de ceguera (Kohner 1975), y es la principal causa de ceguera legal en personas menores de 65 años. La neovascularización coroidea (CN) es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en la coroides vascular, una zona compuesta de vasos coroides grandes y la capa coriocapilar. La capa coriocapilar está situada junto al epitelio pigmentado de la retina y la membrana de Bruch, y proporciona soporte vascular para la retina externa. La CN está asociada con una variedad de enfermedades, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y alta miopía. La AMD es la causa principal de la pérdida irreversible de la visión en el mundo para las personas mayores de 50 años (Votruba 2001). La neovascularización del iris, o rubeosis, a menudo conduce al desarrollo de glaucoma neovascular. La neovascularización corneal, a menudo asociada con el uso de lentes de contacto, puede conducir a la pérdida de la visión.

Resumen de la invención

La angiogénesis juega un papel clave en varias condiciones patológicas, incluyendo el cáncer y la neovascularización ocular. Los tumores son incapaces de crecer y producir metástasis sin la formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis en el ojo (neovascularización ocular) se asocia con una variedad de enfermedades oculares, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y la retinopatía diabética. La presente invención proporciona péptidos que inhiben la angiogénesis para uso en el tratamiento de condiciones asociadas con la neovascularización ocular. Específicamente, la presente invención proporciona el péptido C16 mezclado, C16Y, para uso en el tratamiento de tales condiciones.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia de longitud completa del péptido C16Y de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento del péptido C16Y como se expone en las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5 para su uso en el tratamiento de una condición asociada con la neovascularización ocular. En una realización preferida, la condición está asociada con la neovascularización coroidea, preferiblemente la degeneración macular relacionada con la edad o alta miopía. En otra realización preferida, la condición está asociada con la neovascularización retinal, preferiblemente retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, u oclusión de la vena central. En otra realización preferida, la condición está asociada con neovascularización del iris, preferiblemente glaucoma neovascular. En ciertas realizaciones preferidas, el péptido ha sufrido varias modificaciones para mejorar sus características farmacodinámicas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con la neovascularización ocular en el que un péptido que comprende la secuencia del péptido C16Y de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento del péptido C16Y como se expone en las

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5 es el componente activo. En realizaciones preferidas, los péptidos han experimentado ciertas modificaciones para mejorar sus características farmacodinámicas.

Se puede proporcionar un kit para el tratamiento de una condición asociada con la neovascularización ocular, en el que el componente primario del kit es o bien un péptido que comprende la secuencia del péptido C16Y de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento del péptido C16Y como se expone en las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: adhesión celular endotelial por C16 y péptidos C16 mezclados. Se recubrieron placas de 96 pozos ya sea con laminina 1 (0,5 µg), péptido C16 (0-5 µg), o péptido C16 mezclados (0-5 µg). Cada pozo se enjuagó con PBS, se bloqueó con BSA, se enjuagó de nuevo con PBS, y luego se lo trató con 0,1 ml de RPMI que contienen 35.000 células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) durante 1,5 horas a 37 °C. Las células no unidas se decantaron, y las células unidas se tiñeron con cristal violeta y se cuantificaron midiendo su absorbancia a 600 nm. Las células se adhirieron a péptidos C16, C16S, y C16Y. Se adhirieron más células a C16Y que a cualquier otro péptido a todas las concentraciones ensayadas. Las barras representan ± DE.

Figura 2: Capacidad de los péptidos C16 y C16 mezclados para bloquear la adhesión de células endoteliales de laminina 1. Se recubrieron placas de 96 pozos con laminina 1 (0,5 µg) en presencia de péptidos C16 mezclados o C16 competidores (0-100 µg/ml). Cada uno de los pozos fue tratado con 0,1 ml de RPMI que contenía 35.000 células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) durante 1,5 horas a 37 °C. Se decantaron las células no unidas, y se tiñeron las células unidas con cristal violeta y se cuantificaron midiendo su absorbancia a 600 nm. C16Y exhibió la actividad inhibitoria más fuerte en todas las concentraciones probadas. Las barras representan ± DE.

Figura 3: Interrupción de la formación del tubo endotelial celular por el péptido C16Y. Se recubrieron placas de 48 pozos con 200 µl de Matrigel por pozo. Cada pozo se trató con RPMI que contenía 24.000 células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y 100 mg / L del factor de crecimiento de células endoteliales en presencia de 10-75 µg / ml de péptido C16 o C16 mezclado durante 16 horas. Los pozos de control contenían medio solamente. Se fijaron las células y se tiñeron, y se calificó la formación del tubo por un observador ciego. C16Y exhibió los mayores niveles de formación del tubo interrumpido en todas las concentraciones probadas, y se interrumpió la formación de tubos a una concentración menor que cualquiera de los otros péptidos. C16J no afectó la formación del tubo en cualquier concentración.

Figura 4: Inhibición de la angiogénesis inducida por C16 mediante C16Y. Se aplicaron 0,5 µg de estimulador angiogénico (péptido C16) y concentraciones variables ya sea de péptidos C16S o C16Y a los huevos embrionados de 10 días de edad en 5 µl de agua. Después de 3 días, se tomaron fotomicrografías de los huevos para determinar los niveles de angiogénesis. Se trataron huevos como control negativo con agua solamente (panel a), mientras que los huevos de control positivo fueron tratados con bFGF únicamente (no mostrado). Como era de esperar, el péptido C16 administrado solo estimula la angiogénesis (panel d). La angiogénesis fue fuertemente inhibida en presencia ya sea de 0,2 µg de péptido C16S (panel b) o 0,2 µg de péptido C16Y (panel e). Cuando se redujo la cantidad del péptido inhibidor a 0,05 µg, el péptido C16Y continuó inhibiendo la angiogénesis (panel f), mientras que el péptido C16S no tuvo ningún efecto (panel c).

Figura 5: Inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF mediante C16Y. Se aplicaron 50 ng de estimulador angiogénico (bFGF) y diferentes concentraciones ya sea de péptidos C16S o C16Y a huevos embrionados de 10 días de edad en 5 µl de agua, y se analizaron CAM para detectar la presencia o ausencia de angiogénesis. C16Y inhibió la angiogénesis de manera más eficaz que C16S en todas las concentraciones probadas, mostrando inhibición en cantidades tan bajas como 0,05 µg. C16S no mostró ninguna capacidad para inhibir la angiogénesis a esa concentración.

Figura 6: Inhibición del crecimiento del tumor de la CAM mediante C16Y. Se mezclaron células tumorales de mama MDA-MB 231 con péptidos C16 o C16Y (ya sea a razón de 50 o 100 µg / ml), luego se mezcló en proporción 1:1 con solución neutralizada de colágeno I. El gel de colágeno I se cubrió con la CAM de un embrión de 7 días de edad, durante 7 días, después de los cuales se fijó la membrana y se removieron y pesaron las células tumorales. En ausencia de cualquiera de los péptidos, el peso medio del tumor fue de 5,40 ± 0,59 mg. El péptido C16 no afectó significativamente el crecimiento del tumor, a ninguna concentración. El péptido C16Y inhibió el crecimiento del tumor aproximadamente en un 40% a ambas concentraciones ensayadas. Las barras representan ± DE.

Figura 7: Inhibición del crecimiento primario del tumor mediante C16Y. Se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) células cancerosas MDA-MB 231 en ratones sin pelo y se permitió que los tumores crecieran hasta alcanzar 200-300 mm³. Luego se trataron los ratones diariamente durante 7-10 días con péptidos C16 (1 mg / día) o C16Y (0,2, 0,5, o 1 mg / día) mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Se inyectaron los ratones de control sólo con agua. El tamaño del tumor se midió a los 0, 3, 6, y 9 días después de iniciar las inyecciones de péptidos. A. Los ratones fueron tratados con 1 mg / día ya sea de péptido C16 o C16Y durante 10 días. El crecimiento del tumor en los ratones tratados con el péptido C16Y se vio significativamente inhibido, mientras que el crecimiento del tumor en ratones tratados con péptido C16 fue similar a

la de los ratones de control. B. Los ratones fueron tratados con el péptido C16Y en diferentes concentraciones durante 7 días. C16Y disminuyó el tamaño del tumor en todas las concentraciones ensayadas durante los 7 días que se administró. El crecimiento del tumor se reanudó cuando se detuvo la administración del péptido C16Y, aumentando el tamaño del tumor más rápidamente en los ratones tratados con dosificaciones más bajas de C16Y. Las barras representan \pm DE.

Figura 8: Inhibición de la neovascularización coroidea por el péptido C16Y *in vivo*. La neovascularización coroidea (CN) se indujo en ratones C57/BL6 haciendo cuatro lesiones coroideas separadas por quemadura con un láser de diodos en las zonas adyacentes al nervio óptico. Los ratones fueron tratados diariamente durante 14 días con el péptido C16Y (1 mg en 100 μ l de portador) por medio de inyección intraperitoneal (i.p.). Los ratones de control fueron inyectados con un péptido irrelevante (C18) o portador solamente. Después de 14 días, los ratones fueron sacrificados y los ojos fueron enucleados y preparados para examen del polo posterior. Los coroides fueron examinados por microscopía, y se cuantificaron las áreas de lesión utilizando Adobe PhotoShop. A. Se observó un CN sustancial en los ratones de control (paneles de la izquierda), mientras que los ratones tratados con C16Y mostraron una disminución estadísticamente significativa en CN (paneles centrales). El panel derecho muestra CN en ratones no tratados inmediatamente después de la quemadura con láser. B. El área promedio de neovascularización en los ratones control fue de más de 70.000 píxeles, frente a aproximadamente 20.000 píxeles para ratones tratados con péptido C16Y. El área promedio de neovascularización inmediatamente después de la quemadura con láser (d0) fue de aproximadamente 14.000 píxeles.

Descripción detallada

Una variedad de terapias han sido empleadas o sugeridas previamente para el tratamiento de la neovascularización ocular. Para ejemplo, la neovascularización retiniana y coroidea han sido tratadas ambas mediante una técnica llamada fotocoagulación con láser, que coagula los vasos sanguíneos y evita que se propaguen. Sin embargo, esta técnica no hace nada para prevenir la recurrencia de la neovascularización, y puede dejar al paciente con un punto ciego que surge de la cicatrización. La CN ha sido tratada mediante remoción quirúrgica del complejo neovascular coroideo, pero este procedimiento es muy peligroso y también está asociado con pérdida de la visión. La terapia fotodinámica, que es esencialmente una versión más precisa de la fotocoagulación con láser, se ha empleado para tratar la CN. En este procedimiento, un colorante sensible a la luz tal como verteporfina se acumula en áreas de neovascularización, proporcionando un objetivo para la coagulación inducida por láser (TAP Study Group 1999). Otras opciones de tratamiento incluyen la exposición a una radiación de bajo nivel, que puede prevenir la formación de nuevos vasos, y la crioterapia (es decir, congelación), que pueden contraer los vasos sanguíneos anormales.

Como alternativa a los métodos terapéuticos anteriores, se pueden emplear compuestos antiangiogénicos. Se pueden usar compuestos antiangiogénicos para tratar cualquier condición asociada con la angiogénesis, incluyendo la neovascularización ocular, cáncer y artritis. Se han utilizado o sugerido una variedad de compuestos antiangiogénicos para el tratamiento de condiciones asociadas con la angiogénesis. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.932.545 describe el uso de secuencias de péptidos cortos derivadas de la región del tallo de la trombospondina-1. La patente de los Estados Unidos No. 6.028.099 describe el uso de genisteína, un inhibidor de la ruta de la proteína tirosina quinasa. La patente de los Estados Unidos No. 6.444.680 describe la administración de las sales de amina de un antagonista del receptor de la integrina para tratar la AMD. La patente de los Estados Unidos No. 6.524.581 divulga la administración de un anticuerpo que inhibe la adhesión de leucocitos para tratar la retinopatía diabética. La patente de los Estados Unidos No. 6.670.321 sugiere el uso de varios antagonistas de integrina junto con los compuestos que impiden la adhesión de leucocitos para tratar la retinopatía diabética. La patente de los Estados Unidos No. 6.509.347 describe el uso de un antagonista de integrina que comprende ácido propiónico cristalino. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el mediador de la angiogénesis ocular mejor entendido, ha sido un objetivo común para terapias de CN antiangiogénica. Se han empleado anticuerpos y oligonucleótidos que se unen al VEGF, junto con compuestos que bloquean los efectos secuencia abajo del VEGF (Ciulla 2003). Otros compuestos antiangiogénicos empleados para tratar afecciones asociadas con la angiogénesis incluyen melanina o promotores de melanina (patente de los Estados Unidos No. 6.525.019), derivados de prostaglandina (patente de los Estados Unidos No. 6.225.348), isoflavona fitoestrogénica (patente de los Estados Unidos No. 6.001.368), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (patente de los Estados Unidos No. 4.656.188), péptidos cíclicos (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.767.071, 5.780.426, 5.821.329 y 6.096.707), y una variedad de compuestos esteroideos (Ciulla 2003).

El término "péptido", como se usa aquí, se refiere a dos o más aminoácidos enlazados entre sí mediante un enlace peptídico. La aminoácidos que forman un péptido pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos estándar codificados genéticamente, otros aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, o aminoácidos sometidos a derivación química, y puede existir como isómeros de forma L o isómeros de forma D. Además, el término "péptido" puede referirse a miméticos peptídicos o péptidos que han sufrido una variedad de modificaciones químicas. La presente invención utiliza la notación estándar para secuencias de péptidos, en la que el extremo izquierdo de la molécula es el extremo amino terminal y el extremo derecho es el extremo carboxi terminal.

El término "neovascularización ocular" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier angiogénesis patológica, anormal, o no regulada en cualquiera de los componentes del ojo. El término puede referirse a la neovascularización coroidea, retinal, corneal o del iris, o cualquier otro tipo de crecimiento anormal de los vasos en el ojo.

Una "condición asociada con la neovascularización ocular" como se usa aquí, se refiere a cualquier condición que exhiba neovascularización ocular como un síntoma, o cualquier condición que sea causada por neovascularización ocular. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, la degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, alta miopía, retinopatía del prematuro, oclusión de la vena central, oclusión de la vena retiniana ramificada, presunta histoplasmosis ocular, estrías angioides, y la pérdida parcial o total de la visión.

El término "cáncer" como se usa aquí se refiere a una condición caracterizada por la formación de tumores sólidos, en donde el tumor sólido requiere el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos con el fin de crecer y hacer metástasis. "Cáncer", como se usa en este documento no abarca una condición marcada por el cáncer disperso o la formación de tumores no sólidos, tales como leucemia o linfoma. Un "tumor sólido" es un tumor formado por el crecimiento celular anormal y descontrolado en cualquier tejido corporal que no sea sangre, sistema linfático, o médula ósea. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen tumores de mama, colon o próstata.

El término "sujeto" como se usa aquí se refiere a cualquier animal, pero preferiblemente se refiere a un mamífero o más preferiblemente a un ser humano.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento significa prevenir, eliminar, o hacer más lento el avance de una condición. El término también abarca la eliminación o la reducción de un síntoma o síntomas asociados con una condición, y el retraso o la prevención de un aumento en estos síntomas.

Una "composición", como se usa aquí, se refiere al agente activo, es decir, el péptido o los péptidos de la presente invención, solos o en combinación con uno o más compuestos o composiciones. Una "composición farmacéutica" como se usa en el presente documento se refiere al agente activo combinado con uno o más diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, estabilizantes, y / o excipientes, que hacen a la composición adecuada para administración terapéutica.

Los péptidos para uso de acuerdo con la presente invención son versiones mezcladas del péptido C16, la secuencia de péptidos más activa de la cadena γ 1 de laminina 1 (Ponce 1999; Ponce 2003a; Kuratomi 2002). La laminina 1 es una glicoproteína biológicamente activa derivada de la membrana basal que actúa para aumentar la adhesión celular, la migración celular, la diferenciación celular, el crecimiento tumoral y la angiogénesis a través de múltiples sitios activos (Pupa 2002). Se han identificado muchos receptores celulares para laminina 1 (Powell 1997). Por ejemplo, el sitio activo contenido en C16 se enlaza a integrinas α 5 β 1 y α v β 3. Una versión mezclada del péptido C16, C16S, fue creada como control negativo, pero tenían actividad antagonista inesperada (Ponce 2001). El péptido C16S mezclado se enlazó a los receptores de la integrina y promovió la adhesión celular, pero impidió que las células se enlazaran al péptido progenitor C16 y a la laminina 1. C16S también bloqueó la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento de fibroblastos y el péptido en el ensayo de la CAM de pollo.

Se llevaron a cabo una variedad de sustituciones de aminoácidos utilizando la secuencia de C16S, con el objetivo de desarrollar antagonistas de C16 más potentes. Se crearon y ensayaron cinco péptidos mezclados (C16S, C16J, C16L, C16-3 y C16Y) por su capacidad para inhibir la angiogénesis.

Los ensayos de adhesión de células endoteliales se realizaron utilizando placas recubiertas ya sea con laminina o con uno de los péptidos C16 mezclados. Las células endoteliales no se unieron a C16L, y sólo se unieron débilmente a C16J. Las células adheridas a C16Y, C16, y C16S, con más células que se adhieren a C16Y que a los otros dos péptidos.

Los péptidos fueron luego probados por su capacidad para bloquear la adhesión de las células endoteliales a la laminina 1. Las placas se recubrieron con laminina 1 en presencia de diversas concentraciones de péptidos. C16J tenía poca actividad inhibitoria, y C16L tenía actividad inhibitoria sólo a concentraciones más altas. Los mejores inhibidores fueron C16Y, C16, y C16S, con C16Y mostrando sustancialmente mayor actividad inhibitoria que los otros dos.

Los ensayos de formación de tubos endoteliales se realizaron en Matrigel en presencia de diferentes concentraciones de péptidos. Se había demostrado previamente que C16, que es angiogénico, y C16S, su antagonista, eran ambos activos en el ensayo de formación de tubos celulares endoteliales con dosis superiores a 50 μ g/ml (Ponce 2001). C16J, C16-3 y C16L mostraron poca capacidad para inhibir la formación de tubos celulares endoteliales. C16Y, C16, y C16S, por otra parte, todos inhibieron la formación de tubos. C16Y fue el mejor inhibidor por un margen sustancial, con la capacidad de inhibir la formación de tubos en concentraciones cinco veces menores que C16 o C16S. Se ensayaron versiones truncadas de C16Y para determinar la secuencia activa mínima del péptido. La secuencia activa mínima fue una secuencia de ocho aminoácidos desde el extremo amino terminal del péptido. Cada péptido que contiene esta secuencia activa mínima interrumpió la formación del tubo. El extremo carboxilo del péptido no fue necesario para la actividad.

Los resultados de los ensayos de adhesión celular y de competición endotelial sugirieron que C16Y promueve la unión celular, y que compite más fuertemente con laminina 1 para enlazarse que cualquiera de los otros péptidos mezclados, incluyendo C16S. Además, C16Y interrumpe activamente la formación del tubo celular endotelial. Estos rasgos son muy sugerentes de un compuesto que o bien inhibe o promueve la angiogénesis (Ponce 1999, Ponce 2003a).

La capacidad del péptido C16Y para inhibir la angiogénesis se probó utilizando el ensayo de la CAM. Se administró péptido C16 como estímulo angiogénico en presencia de diferentes concentraciones de péptidos mezclados. C16 administrado solo indujo angiogénesis sustancial en la CAM. La administración conjunta de C16Y o C16S disminuyó notablemente este efecto angiogénico. En concentraciones más altas, el nivel de inhibición por C16Y fue aproximadamente 25% mayor que el de C16S. En concentraciones más bajas, C16S perdió su capacidad inhibitoria, mientras que C16Y continuó para inhibir sustancialmente la angiogénesis.

La capacidad del péptido C16Y para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* fue probada usando las CAM tratadas con células tumorales de mama. La administración del péptido angiogénico C16 no afectó considerablemente el crecimiento del tumor. En todas las concentraciones ensayadas, C16Y inhibió el crecimiento del tumor en aproximadamente un 40%. Para determinar si este efecto antitumoral se debió a la inhibición de la angiogénesis o se debió a una disminución en la proliferación celular, se midió el efecto de C16Y sobre la proliferación celular. C16Y fue incapaz de alterar la proliferación de células tumorales, lo que sugiere que su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral se deriva de su capacidad para inhibir la angiogénesis.

Otros experimentos para examinar la capacidad de C16Y para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* se realizaron en ratones que habían sido inyectados por vía subcutánea con células de cáncer de mama. Se administraron concentraciones variables de C16Y diariamente mediante inyección intraperitoneal después de que se establecieron los tumores. Después de una semana, los tumores tratados con C16Y mostraron sustancialmente menos crecimiento que aquellos tratados con el control o con C16. Cuando se detuvo la administración de C16Y después de una semana, los tumores comenzaron a crecer rápidamente. Este crecimiento del tumor fue mayor en los ratones que recibieron las dosificaciones más bajas de C16Y.

La capacidad de C16Y para inhibir la CN *in vivo* fue probada usando ratones C57/BL6 que habían sido sometidos a múltiples lesiones coroides inducidas por láser en el área adyacente al nervio óptico. Los ratones fueron tratados diariamente con C16Y, un péptido de control, o agua mediante inyección intraperitoneal durante 14 días. Los ratones fueron sacrificados, y sus ojos fueron perfundidos y preparados para su examen. Los coroides fueron examinados por microscopía, y se cuantificó el área de cada lesión neovasascular. Los ratones tratados con C16Y mostraron una disminución sustancial en el área de la lesión comparado con los ratones de control.

Estos resultados sugieren que C16Y tiene un enorme potencial terapéutico como medio para tratar las condiciones asociadas con la angiogénesis. Específicamente, C16Y ha demostrado la capacidad para inhibir el crecimiento de tumores de mama y la neovascularización ocular. La capacidad de C16Y para inhibir la angiogénesis es 5-10 veces mayor que la de C16S, el otro péptido C16 mezclado que muestra actividad antiangiogénica. Estos resultados no habrían sido predichos, ya que la única diferencia entre los dos péptidos es una sola sustitución de treonina por tirosina. C16Y es activo *in vivo*, y puede inhibir el crecimiento del tumor de una manera dependiente de la dosis cuando se administra diariamente como una inyección i.p. C16Y probablemente ejerce su influencia sobre el crecimiento tumoral mediante el bloqueo de la angiogénesis, porque no tiene ningún efecto sobre la proliferación de células tumorales *in vitro*.

C16Y no es tóxico, pero puede interferir con las funciones normales de la laminina 1, así como otras moléculas que utilizan los receptores $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ de integrina. Se ha demostrado que la angiogénesis requiere la actividad de la integrina $\alpha v\beta 3$ (Friedlander 1995; Brooks 1994). La laminina 1 tiene muchas actividades biológicas que promoverían el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Kleinman 2001). La laminina 1 promueve la adhesión celular, la migración, invasión, y la actividad de proteasa, y las células adherentes de laminina 1 son más malignas que las células no adherentes o las células adherentes de fibronectina. Debido a que varios péptidos de laminina 1 pueden modular el crecimiento tumoral y la angiogénesis *in vivo*, la laminina 1 endógena es probablemente fisiológicamente activa *in vivo* durante el crecimiento del tumor y la angiogénesis, aunque esto todavía no se ha demostrado directamente *in vivo*. El sitio de C16 en laminina 1 aparece ser funcionalmente importante *in vivo* tanto en el crecimiento del tumor como en la angiogénesis, y que este sitio activo en laminina 1 está bloqueado por el péptido C16Y. En cribados anteriores para identificar los sitios activos para malignidad en laminina 1, C16 y su homólogo en la cadena α , A13, se identificaron como las más potentes en sus respectivas cadenas (Malinda 1999; Ponce 1999; Kuratomi 1999; Nomizu 2001; Nomizu 1997). Además, cualquiera o ambos de estos sitios activos redundantes están presentes en todas las isoformas de laminina 1. Cuando se preparan inicialmente los péptidos de control para C16, se prepararon muchos péptidos diferentes mezclados al azar. La mayoría eran inactivos, pero algunos tenían baja actividad, y C16S tenía la mayor actividad (Kuratomi 2002). Se hizo un estudio comparativo de la secuencia de C16Y de longitud completa (SEQ ID NO: 1) para identificar homología de aminoácidos con otras secuencias cortas utilizando la búsqueda por BLAST del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de Proteínas. Estos resultados indican que C16Y comparte 66% (8 de 12) de identidad con la secuencia de fibronectina (residuos 1023 - 1033) de *C-elegans*, la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 6 (consorcio de *C-elegans* 1998). Sin embargo, un péptido que tiene esta secuencia no demostró ninguna capacidad para bloquear la formación de tubos endoteliales (resultados no mostrados), lo que ilustra adicionalmente la actividad antiangiogénica inesperada de C16Y.

Ya había sido establecido que VAYI (SEQ ID NO: 7) fue la secuencia con activa mínima para A13 y que esta secuencia está altamente conservada entre las cadenas α (Nomizu 2001). Con C16, se encontró que la secuencia de actividad

mínima era YVRL (SEQ ID NO: 8) (Nomizu 1997). Aunque con diferente secuencia, estos péptidos se localizan en sitios homólogos en la laminina 1 y reconocen los mismos receptores celulares. La secuencia de actividad mínima de C16Y es la secuencia de ocho aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Cada uno de los péptidos que contienen esta secuencia de actividad mínima (las SEQ ID NOs: 1-5) mostraron actividad antiangiogénica. Todos estos péptidos regulan la angiogénesis y reconocen la integrina promiscua $\alpha\beta 3$ (Varner 1996; Sakamoto 1991). Muchos sitios para angiogénesis han sido identificados en laminina 1, pero se ha encontrado que un solo sitio es un inhibidor de la angiogénesis, YIGSR (SEQ ID NO: 9), que se encuentra en la cadena de $\beta 1$ (residuos 929-933; Grant 1989; Iwamoto 1987). Este péptido también bloquea el crecimiento tumoral y la colonización de pulmón, pero es mucho menos activo (~ 10 veces) que el péptido C16Y descrito aquí (Fridman 1990). C16Y es el péptido más potente descrito hasta la fecha y puede funcionar como un antagonista de integrinas durante la angiogénesis.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención incluyen cantidades eficaces de los péptidos que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5, junto con uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, estabilizantes, y/o vehículos. Un experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad efectiva de los péptidos mediante la administración de la composición en diferentes dosificaciones y la observación de los resultados. La cantidad efectiva es aquella cantidad que genera la respuesta deseada en un período de tiempo razonable, y puede variar dependiendo de la edad, la salud, o el tamaño del sujeto, o de la gravedad de la condición a tratar. La respuesta deseada es la inhibición de la angiogénesis para tratar una condición asociada con la neovascularización ocular. La inhibición de la angiogénesis puede dar como resultado la prevención, desaceleración, o eliminación de la condición, la reducción o eliminación de los síntomas asociados con la condición, o el retraso o prevención de un empeoramiento de estos síntomas.

Las composiciones se pueden suministrar en forma de administraciones únicas o múltiples, en dosificaciones constantes o en diferentes dosificaciones a ser determinadas por el médico tratante. La composición puede administrarse sola, o en combinación con otros compuestos terapéuticos o no terapéuticos. Además, la composición puede administrarse junto con cualquier terapia quimioterapéutica, quirúrgica, fotodinámica o de fotocoagulación. La ruta de administración preferida para el tratamiento de una condición asociada con la neovascularización ocular es intraocular. Sin embargo, la composición también puede ser administrada por cualquier otro medio eficaz, incluyendo, pero sin limitarse a la vía oral o por inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o intramuscular. La composición se puede administrar para tratamiento terapéutico en un sujeto que exhiba neovascularización ocular, o para tratamiento profiláctico en un sujeto que aún no presente neovascularización ocular. El sujeto es preferiblemente un ser humano, pero puede ser cualquier animal que exhiba una condición asociada con la neovascularización ocular, incluyendo pero sin limitarse a mamíferos tales como perros, gatos, caballos o ganado.

Un experto en la técnica reconocerá que los péptidos para uso de acuerdo con la presente invención pueden presentar una variedad de modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Se pueden incorporar modificaciones que aumenten la estabilidad, el tiempo de circulación, y la eficacia terapéutica (véase Francis 1992 para una revisión de las modificaciones de los péptidos). Las modificaciones potenciales que se pueden realizar incluyen modificaciones químicas, que incluyen pero no se limitan a pegilación, acilación, biotilación, acetilación, formilación, ubiquitinación, amidación, marcación enzimática, o marcación radioactiva. Por ejemplo, se pueden utilizar diversos grados de pegilación para variar la vida media del péptido, con el aumento de la pegilación correspondiente a un aumento de la vida media. Cada una de estas modificaciones de péptidos es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Seifter 1990; Rattan 1992; Proteins-Structure and Molecular Properties, 2ª Ed., TE Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1993; Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects", páginas 1-12 en Posttranslational Covalent Modifications of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983. Las modificaciones puede presentarse en cualquier sitio en el péptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y los terminales amino o carboxi. En otro ejemplo, los péptidos de la invención pueden ser modificados mediante la adición del dominio Fc de un anticuerpo. El dominio Fc de un anticuerpo es una región relativamente constante que es responsable de la actividad biológica en lugar del enlazamiento al antígeno. Se han creado una variedad de polipéptidos terapéuticos usando el dominio Fc para aumentar la vida media del polipéptido o para incorporar ciertas funciones biológicas tales como la capacidad para enlazarse a un receptor particular (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,480,981; Harvill 1995; Zheng 1995; Fisher 1996). La unión de un dominio Fc a los péptidos de la presente invención es probable que aumente la vida media de los péptidos, lo que a su vez aumenta su utilidad terapéutica. El dominio Fc puede comprender porciones de un anticuerpo de origen natural digerido, o puede derivarse de un anticuerpo recombinante o humanizado.

Los peptidomiméticos con la longitud completa de C16Y y los péptidos truncados pueden ser proporcionados para uso de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con una variedad de técnicas para generar peptidomiméticos, por ejemplo aquellas técnicas descritas en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.612.132; 5.643.873; y 5.654.276. Los peptidomiméticos puede incorporar uno o más de lo siguiente: modificaciones del grupo amino N-terminal, modificaciones del grupo carboxilo C-terminal, y cambios en uno o más de los enlaces amino del péptido con enlaces no amino. Los peptidomiméticos puede incluir estructuras sintéticas, pero conservan las características funcionales y estructurales del péptido progenitor manteniendo la secuencia de aminoácidos relativa y el posicionamiento espacial del péptido progenitor. Los peptidomiméticos pueden poseer una variedad de ventajas

terapéuticas sobre el péptido progenitor, incluyendo, pero sin limitarse a, un aumento de la solubilidad, una mayor la estabilidad y de vida media, o una disminución de la susceptibilidad a la hidrólisis y a la proteólisis.

Las diferentes formas isoméricas de los péptidos C16Y truncados y de longitud completa pueden ser proporcionadas para uso de acuerdo con la presente invención. Tales péptidos pueden consistir enteramente de los aminoácidos de forma L o de forma D, o pueden consistir de una combinación de aminoácidos de forma D y L. Los métodos para sintetizar péptidos que contienen uno o más aminoácidos de forma D son bien conocidos en la técnica. Los péptidos que contienen uno o más aminoácidos de forma D se metabolizan más lentamente y son más resistentes a la proteólisis que sus contrapartes de forma L, principalmente porque los seres humanos carecen de las enzimas endógenas necesarias para degradar péptidos de forma D (Fujihara 2000). El consiguiente aumento de la estabilidad y vida media del péptido es probable que aumente la eficacia terapéutica de los métodos reivindicados.

Ejemplos

Materiales y métodos

Péptidos

Todos los péptidos fueron sintetizados por la CBER Facility for Biotechnology Resources (Food and Drug Administration, Bethesda, MD) o en la Universidad de Hokkaido como se describió previamente (Nomizu 2001), y cada uno contenía una amida NH₂-terminal. C16S (SEQ ID NO: 10), C16J (SEQ ID NO: 11), C16L (SEQ ID NO: 12) y C16-3 son péptidos mezclados de C16 (SEQ ID NO: 13). C16Y (SEQ ID NO: 1) es idéntico a C16S excepto por una sustitución de treonina por tirosina.

Se prepararon diferentes péptidos truncados de manera similar para la determinación de la secuencia de actividad mínima. A pesar de la presencia de aminoácidos hidrófobos, todos los péptidos eran solubles en agua. Se obtuvo laminina 1 a través de Collaborative Research (Bedford, MA).

Aislamiento y cultivo de células endoteliales

Las células endoteliales se aislaron mediante tratamiento con colagenasa de las células endoteliales de vena umbilical humana (las HUVEC), y se cultivaron como se describió previamente (Jaffe 1973). Sólo se utilizaron las células de las pasadas 3-5.

Ejemplo 1: adhesión de células endoteliales por péptidos C16 y C16 mezclados

Los ensayos de adhesión de células endoteliales se realizaron en placas de 96 pozos recubiertas durante la noche, ya sea con laminina 1 (0,5 µg) o con péptidos de laminina sintéticos C16, C16S, C16J, C16L, o C16Y (0-5 µg) como se describió previamente (Malinda 1999). Los pozos se enjuagaron con PBS, se bloquearon con 2 mg / ml de BSA, y se lavaron de nuevo con PBS. Se llevó a cabo la adhesión celular utilizando 0,1 ml de RPMI 1640 que contenía 35.000 HUVEC. Después de un período de incubación de 1,5 horas a 37 °C, se decantaron las células no enlazadas y se fijaron y tiñeron las células unidas con 20% de metanol / 0,2% de cristal violeta. Se enjuagaron muy bien los platillos, y se solubilizó el colorante enlazado en 2% de SDS y se cuantificó a 600 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado al menos tres veces.

Células unidas a C16, el péptido progenitor, y a C16S en cantidades > 0,1 µg (Figura 1). Aunque C16Y mostró un patrón de unión similar a aquel de C16 y C16S, se adherieron más células a él que a cualquier otro péptido en todas las cantidades probadas. Las células endoteliales no se unieron a C16L en ninguna dosis, y las células se enlazaron sólo débilmente a los pozos recubiertos con las mayores cantidades de C16J.

Ejemplo 2: Capacidad de péptidos C16 y C16 mezclados para bloquear la adhesión de laminina 1 a las células endoteliales

Los experimentos de competición se realizaron utilizando placas de 96 pozos recubiertas con laminina 1 (0,5 µg) en presencia de 0-100 µg / ml de péptido sintético laminina C16, C16S, C16J, C16L, o C16Y que compite como se especifica. Los pozos de control se recubrieron con BSA únicamente. Se pusieron en contacto los pozos con 0,1 ml de RPMI 1640 que contenía 35.000 HUVEC. Después de un 1,5 horas de incubación a 37 °C, se decantaron las células no enlazadas y las células unidas se fijaron y tiñeron con 20% de metanol / 0,2% de cristal violeta. Se enjuagaron extensivamente los platillos, y se solubilizó el colorante enlazado en 2% de SDS y se cuantificó a 600 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado al menos tres veces.

C16Y tenía la actividad inhibitoria más fuerte en todas las concentraciones ensayadas (Figura 2). Las diferencias más significativas se observaron con 50 µg/ml, donde C16Y inhibió la unión de células endoteliales a la laminina 1 en > 70%. C16 y C16S, por otro lado, inhibieron en < 40%. C16J tuvo poca actividad en todas las dosis probadas, y C16L mostró cierta inhibición con dosis > 75 µg/ml.

Ejemplo 3: Interrupción de la formación del tubo endotelial celular por C16Y:

5 Se realizaron los ensayos de formación del tubo como se describió previamente (Ponce 2001). Se recubrieron placas de 48 pozos con 200 µl/pozo de Matrigel (Gho 2001; Kubota 1988), una matriz de membrana basal. Se sembraron en placa HUVEC (24.000 células/pozo) en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero bovino de ternera, definido y suplementado (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT), junto con 100 mg/litro de factor de crecimiento celular endotelial (Collaborative Biomedical). Se añadieron péptidos C16 o C16 mezclados en concentraciones en el intervalo de 10 - 75 µg/ml. Los pozos de control contenían medio solamente. Después de 16 horas, se fijaron y tiñeron las células con fijador Diff-Quick (metanol) y la solución II (6,25% (p / v) cada uno de Azure A y azul de metileno) (Dade AG, Dudingen, Suiza), y el tubo de formación fue marcado por un observador ciego. Cada péptido se ensayó al menos por triplicado, y los ensayos se repitieron un mínimo de tres veces.

15 Como se esperaba, C16 y C16S interrumpieron la formación del tubo con 50 y 75 µg/ml, con poca o ninguna actividad observada con dosis más bajas (Figura 3). Por el contrario, C16Y interrumpió fuertemente la formación del tubo en todas las dosis probadas, incluso aquellas tan bajas como 10 µg/ml. Esta dosis es cinco veces menor que aquella a la que son activos C16 o C16S. C16J, C16-3 y C16L, por otro lado, no mostraron actividad con dosis más bajas y sólo una ligera interrupción del tubo en concentraciones más altas. La interrupción de la formación del tubo con diferentes concentraciones de péptido se resume en la siguiente tabla:

Péptido	Concentración (µg/ml)			
	10	25	50	75
C16	-	-	+	+++
C16S	-	-	+++	+++
C16J	-	-	-	-
C16L	-	-	+	++
C16-3	-	-	+	+++
C16Y	++	+++	++++	++++
+, tubos ligeramente afectados; ++, tubos moderadamente afectados; +++, tubos rotos; +++++, tubos completamente rotos; -, tubos que parecen de control				

20 Los ensayos de formación de tubo se repitieron usando versiones truncadas del péptido C16Y para determinar la secuencia activa mínima del péptido. El extremo carboxilo de C16Y no era necesario para la actividad, mientras que si se requiere el ácido aspártico amino terminal. La secuencia activa mínima para el péptido C16Y se muestra en la SEQ ID NO: 2. Cada uno de los péptidos que contenían al menos esta secuencia de 8 aminoácidos (SEQ ID NOS: 1-5) inhibió la formación de tubos. La actividad de cada péptido truncado se resume en la siguiente tabla:

Secuencia	Actividad
DFKLFVAVYIKYR	++
FKLFVAVYIKYR	-
KLFVAVYIKYR	-
LFVAVYIKYR	-
FAVYIKYR	-
AVYIKYR	-
VYIKYR	-
YIKYR	-
DFKLFVAVYIKY	++
DFKLFVAVYIK	++
DFKLFVAVYI	++
DFKLFVAVY	++
DFKLFVAV	-

Ejemplo 4: Inhibición de la angiogénesis inducida por C16 mediante C16Y:

30 El ensayo de la CAM se realizó usando huevos embrionados de 10 días de edad (CBT, Charlestown, MD) como se describió previamente (Gho 1999). En el día embrionario 3, se removieron aproximadamente 4 ml de ovoalbúmina de cada huevo. Después de la apertura de ventanas el día embrionario 10, se aplicaron el estímulo angiogénico (C16) y péptidos competidores de prueba en 5 µl de agua destilada a la CAM después de secar sobre cubreobjetos plásticos divididos en cuatro de 13 mm de diámetro (Thermanox; Nalge, Nunc International, Naperville, IL). Tres días después, se calificaron los huevos por una respuesta positiva y se fotografiaron. El control positivo fue bFGF, y el control negativo

fue el agua del vehículo. Los experimentos se repitieron dos veces utilizando un mínimo de 11 huevos para cada punto de datos.

Como se mostró anteriormente, 0,5 µg de C16 son capaces de inducir la angiogénesis en la CAM de pollo (Figura 4, panel d). Cuando se ensayó una mezcla que contenía 0,5 µg de C16 y 0,2 µg ya sea de C16S (Figura 4, panel B) o 0,2 µg de péptidos inhibidores C16Y (Figura 4, panel e) en el ensayo de CAM, se observó una fuerte inhibición de la angiogénesis. C16Y provocó un 88% de reducción de la angiogénesis, mientras que C16S causó una reducción del 63%. Cuando se redujo la cantidad de péptido inhibidor a 0,1 µg (un quinto de la cantidad de C16), C16Y causó una reducción del 75% en la angiogénesis, mientras que C16S causó una reducción del 52%. Cuando se redujo la cantidad de péptido inhibidor a 0,05 µg (una décima parte de la cantidad de C16), C16S ya no generó un efecto inhibitorio (Figura 4, panel c). C16Y, por otro lado, continuó funcionando como un inhibidor de la angiogénesis. 55% de las CAM eran débilmente angiogénicas en presencia de C16Y (Figura 4, panel f). Como se esperaba, ni C16Y (Figura 4, Panel e) ni C16S (datos no mostrados) administrados solos estimularon la angiogénesis. Estos resultados fueron similares a aquellos del vehículo de control (Figura 4, panel A).

Ejemplo 5: Inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF mediante C16Y:

Se aplicaron 50 ng de estimulador angiogénico (bFGF) y diferentes concentraciones ya sea de péptidos C16S o C16Y a huevos embrionados de 10 días de edad en 5 µl de agua, y se analizaron las CAM después de 3 días para detectar la presencia o ausencia de angiogénesis. C16Y inhibió la angiogénesis más eficazmente que C16S en todas las concentraciones ensayadas, exhibiendo inhibición en cantidades tan bajas como 0,05 µg (Figura 5). C16S no mostró capacidad para inhibir la angiogénesis a esta concentración tan baja.

Ejemplo 6: Inhibición del crecimiento del tumor de CAM por C16Y:

El efecto de C16Y sobre el crecimiento tumoral *in vivo* se analizó usando el ensayo de CAM (Gho 2001). Se mezclaron células tumorales de mama MDA-MB 231 (un obsequio de Dan Welch, de la Universidad Estatal de Pennsylvania, University Park, PA) (1×10^6 células / 0,1 ml) en RPMI 1640 con 0,50, o 100 µg/ml de C16 o C16Y, y luego se mezclaron en proporción 1: 1 con una solución neutralizada de colágeno I (4,6 mg/ml de colágeno tipo I). Este gel de colágeno I se cubrió con la CAM de un embrión de 7 días de edad. Después de 7 días de incubación, se fijó la membrana y se removieron y pesaron las células tumorales. Este experimento se repitió dos veces, con cada punto de datos a prueba en al menos seis repeticiones.

Los resultados de este ensayo se resumen en la Figura 6. En la ausencia de péptido, el tumor creció hasta un peso promedio de $5,40 \pm 0,59$ mg. La presencia ya sea de 50 o 100 µg/ml del péptido angiogénico C16 no afectó considerablemente el crecimiento del tumor ($5,45 \pm 0,84$ mg y $5,85 \pm 0,54$ mg, respectivamente). Tanto con 50 como con 100 µg/ml, C16Y inhibió el crecimiento del tumor en aproximadamente un 40% ($P < 0,05$). Se observaron más vasos en los tumores no tratados y en los tumores tratados con C16 que en los tumores tratados con C16Y ($7,5 \pm 0,45$ frente a $9,6 \pm 0,23$ frente a $5,1 \pm 0,16$; $P \leq 0,027$).

Ejemplo 7: Efecto de C16Y sobre la proliferación de células tumorales:

Se realizó un ensayo de proliferación para determinar si la inhibición del tumor discutido en el Ejemplo 6 fue el resultado de la inhibición de la angiogénesis o algún efecto sobre la proliferación celular. La proliferación de células MDA-MB 231 se cuantificó utilizando un kit de ensayo Cell Titer 96 Aqueous Cell Proliferation (Promega, Madison, WI). Las células se sembraron en cuatro placas de 96 pozos a razón de 5×10^3 células / pozo y se cultivaron en un medio libre de suero AIM-V (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Después 1 hora, se añadieron los péptidos C16 y C16Y hasta una concentración final de 100 µg/ml. Se usó una placa separada para cuantificar la proliferación a las 2, 24, 48, y 72 horas mediante la lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de Emax. Cada experimento se repitió dos veces por triplicado.

Ni C16 ni C16Y alteraron la proliferación de las células MDA-MB 231, lo que sugiere que la inhibición del crecimiento del tumor por C16Y es debida a su capacidad para inhibir la angiogénesis (ahora se muestran los datos).

Ejemplo 8: Inhibición del crecimiento del tumor primario por C16Y:

Se inyectaron células de cáncer de mama MDA-MB 231 (5×10^5 células) mezcladas con Matrigel (1:4) por vía subcutánea (s.c.) en ratones sin pelo. En un lapso de 7-9 días después de la inyección, los tumores de carcinoma de mama alcanzaron un volumen de 200-300 mm³. Se les administró luego a los ratones péptido C16 o C16Y en forma diaria mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Se inyectaron ratones de control diariamente con sólo vehículo (agua). Se hizo seguimiento al crecimiento del tumor con un calibrador, haciendo mediciones los días 0, 3, 6, y 9 después de la primera inyección del péptido. Se determinó el volumen del tumor utilizando la fórmula ancho² x largo x 0,52. Al final de los experimentos, se extirparon los tumores, se pesaron, y se fijaron con formalina. Se determinó la cantidad de vasos mediante la tinción de secciones con un anticuerpo CD-31 (Nomizu 2001) y se hizo un recuento de 6 campos por sección por ratón (n = 2 secciones / ratón; 3 ratones en total).

En un experimento, los ratones fueron tratados con 1 mg / día ya sea de péptido C16 o C16Y durante 10 días. Después de 7 días, se inhibió significativamente el crecimiento del tumor ($P < 0,028$) en ratones tratados con C16Y (Figura 7A). Por el contrario, los tumores en los ratones de control y aquellos tratados con C16 crecieron hasta 1,7 - 2,5 veces su tamaño original durante el mismo período de tiempo. Aunque se esperaba que los tumores tratados con C16 crecieran más rápidamente que los tumores de control, fue interesante observar que el tratamiento con C16 no afectó significativamente el crecimiento del tumor. Esto puede explicarse por la producción de altos niveles de factores de crecimiento que son secretados en forma endógena por el propio tumor.

En un segundo experimento, los ratones fueron tratados con diferentes concentraciones de péptido C16Y (0,2, 0,5, o 1 mg/día) durante 7 días. El tratamiento con péptido C16Y redujo el tamaño del tumor durante el período de administración de 7 días en todas las concentraciones probadas (Figura 7B). En los ratones que recibieron una dosificación de 1 mg/día, el tamaño del tumor se redujo en aproximadamente un 33%. Sin embargo, cuando se detuvo la administración diaria de péptido C16Y el día 7, los tumores comenzaron a crecer rápidamente (Figura 7B). Los tumores crecieron más rápido en aquellos ratones que habían sido tratados con la dosis más baja de C16Y (0,2 mg), asemejándose a los volúmenes de los tumores de los ratones de control en 3 días. Los tumores en los ratones que recibieron 0,5 mg/día de péptido C16Y crecieron más lentamente, mientras que a los tumores en ratones que habían recibido 1 mg/día de péptido C16Y les tomó aproximadamente 6 días para alcanzar el tamaño inicial del tumor. Estos resultados sugieren fuertemente que C16Y puede reducir el crecimiento del tumor a través de su actividad antiangiogénica.

Ejemplo 9: Inhibición de la neovascularización coroidea por C16Y *in vivo*:

El efecto de la administración de C16Y en la CN fue probada usando ratones C57/BL6. La CN fue inducida efectuando cuatro lesiones coroideas separadas por quemadura en zonas adyacentes al nervio óptico utilizando un láser de diodos. Para contener a los ratones, estos fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilosina. Los ratones fueron divididos en varios grupos de 4-6. El primer grupo fue tratado con C16Y, mientras que los dos grupos de control fueron tratados con un péptido irrelevante (C18) o solo con vehículo (agua). Los tratamientos se administraron diariamente mediante inyección intraperitoneal, en una dosificación de 1 mg de péptido en 100 μ l de portador. Después de 14 días de tratamiento, se sacrificaron los ratones y se visualizaron las lesiones por perfusión de cada ratón con 5 ml de PBS, 4% de PFA, y 1,2 ml de una solución que consiste en 10 mg/ml de 2×10^6 M_w FITC-dextrano y 4×10^6 M_w FITC-dextrano en una relación 2:1. Los ojos fueron enucleados y se prepararon montajes planos para examen del polo posterior. Se examinaron los coroides por microscopía, y se cuantificaron las áreas de las lesiones utilizando Adobe PhotoShop. Otros controles incluyeron ojos de ratones sin tratar a $d = 0$ para cuantificar el tamaño de partida de la lesión. Resultados de los ensayos de la CN se resumen en la Figura 8. En los ratones de control, se observó CN sustancial. Los ratones tratados con C16Y, por otro lado, mostraron una disminución estadísticamente significativa de la CN (Figura 8a). La superficie promedio de la neovascularización en los ratones de control fue de más de 70.000 píxeles, frente a aproximadamente 20.000 píxeles para ratones tratados con C16Y (Figura 8b). La superficie promedio de neovascularización en ratones no tratados a $d = 0$ fue de aproximadamente 14.000 píxeles.

Las abreviaturas utilizadas en este documento: ECM, matriz extracelular; CN, neovascularización coroidea; AMD, degeneración macular relacionada con la edad; CAM, membrana corioalantoidea de pollo; HUVEC, células endoteliales de la vena umbilical humana; bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básicos; VEGF, factor de crecimiento endotelial; BSA, albúmina de suero bovino; PBS, solución salina regulada de fosfato.

Referencias

1. Auerbach, R. , et al. 1985. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res* 29: 401-411.
2. Brooks, P. C., Clark, R. A., Cheresh, D. A. 1994. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science (Wash DC)* 264: 569-571.
3. Burgeson, R. E. , et al. 1994. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 14: 209-211.
4. C-elegans consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.
5. Ciulla, T. A. 2003. Recent advances in the treatment of exudative age-related macular degeneration, including transpupillary thermotherapy. *Acta Ophthalmol Scand* 81: 103-104.
6. Colognato, H., Yurchenco, P. D. 2001. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218: 213-234.
7. Fisher, C., et al. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 334: 1697-1702.
8. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Biotechnol* 1: 27-31.
9. Francis, G.E. 1992. Protein modification and fusion proteins. *Focus on Growth Factors* 3: 4-10.
10. Fridman, R., et al. 1990. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6698-6702.
11. Friedlander, M., et al. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct αv integrins. *Science (Wash DC)* 270: 1500-1502.
12. Fujihara, S.M., et al. 2000. A D-amino acid peptide inhibitor of NF- κ B nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease. *J Immunol* 165: 1004-1012.

13. Gho, Y. S., Kleinman, H. K., Sosne, G. 1999. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 59: 5128-5132.
14. Gho, Y. S., et al. 2001. Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1). *Cancer Res* 61: 4253-4257.
- 5 15. Grant, D.S., et al. 1989. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* 58: 933-943.
16. Harvill, E.T., Morrison, S.L. 1995. An IgG3-IL2 fusion protein activates complement, binds Fc gamma RI, generates LAK activity and shows enhanced binding to the high affinity IL-2R. *Immunotechnology*. 1995 Aug;1(2): 95-105.
- 10 17. Iivanainen, E., Kahari, V.M., Heino, J., Elenius, K. 2003. Endothelial cell matrix interactions. *Microsc Res Tech* 60: 13-22.
18. Iwamoto, Y., et al. 1987. YIGSR a pentapeptide from the B1 chain of laminin inhibits tumor cell metastases. *Science* 238: 1132-1134.
19. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756.
- 15 20. Kleinman, H.K., Koblinski, J., Lee, S., Engbring, J. Role of basement membrane in tumor growth and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 10: 329-338.
21. Kohner, E.M., Oakeley, N.W. 1975. Diabetic retinopathy. *Metabolism* 24: 1085-1102.
22. Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Lawley, T.J. 1988. Role of laminin and basement membrane in the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1597.
- 20 23. Kuratomi, Y., et al. 2002. Laminin γ 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. *Br J Cancer* 86: 1169-1173.
24. Kuratomi, Y., et al. 1999. Identification of metastasis-promoting sequences in the mouse laminin α -1 chain. *Exp Cell Res* 249: 386-395.
- 25 25. Lehoux, S., Tedgui, A. 2003. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech* 36: 631-643.
26. Maeshima, Y., et al. 2001. Extracellular matrix derived peptide binds to α v β 3 integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 276: 31959-31968.
27. Malinda, K. M., et al. 1999. Identification of laminin α -1 and β -1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J* 13: 53-62.
- 30 28. Miner, J.H., et al. 1997. The laminin α chains: expression, developmental transitions, and chromosomal location of α 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel α 3 isoform. *J Cell Biol* 137: 685-701.
29. Nomizu, M., et al. 1995. Identification of cell binding sites in the laminin α 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. *J Biol Chem* 270: 20583-20590.
30. Nomizu, M., et al. 1997. Identification of cell binding sequences in mouse laminin γ -1 chain by systematic peptide screening. *J Biol Chem* 272: 32198-32205.
- 35 31. Nomizu, M., et al. 1998. Cell binding sequences in mouse laminin γ 1 chain. *J Biol Chem* 273: 32491-32499.
32. Nomizu, M., et al. 2001. Identification of homologous biologically active sites on the N-terminal domain of laminin α chains. *Biochemistry* 40: 15310-15317.
33. O'Reilly, M. S., et al. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328.
- 40 34. O'Reilly, M. S., et al. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 24: 277-285.
35. Pepper, M. S. 2001. Role of matrix metalloproteinases and plasminogen activator-plasmin in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104-1117.
36. Plendl, J., et al. 1996. Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. *Anat Embrol* 194: 445-456.
- 45 37. Ponce, M. L., et al. 1999. Identification of endothelial cell binding sites on the laminin γ -1 chain. *Circ Res* 84: 688-694.
38. Ponce, M. L., Nomizu, M., Kleinman, H. K. 2001. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the α v β 3 and α 5 β 1 integrins. *FASEB J* 15: 1389-1397.
- 50 39. Ponce, M. L., Kleinman, H. K. 2003a. Redundant site in laminin α 1 and γ 1 chains are angiogenic in vivo via integrins α 5 β 1 and α v β 3. *Exp Cell Res* 285: 189-195.
40. Ponce, M.L., et al. 2003b. Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 63: 5060-5064.
41. Powell, S.K., Kleinman, H.K. 1997. Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 401-414.
- 55 42. Pupa, S.M., Menard, S., Forti, S., Tagliabue, E. 2002. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cellul Physiol* 192: 259-267.
43. Rattan, S.I., Derventzi, A., Clark, B.F. 1992. Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging. *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62.
44. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature (Lond.)* 386: 671-674.
- 60 45. Sakamoto, N., Iwahana, M., Tanaka, N.G., Osada, Y. 1991. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CD PGYIGSR-NH2. *Cancer Res* 51: 903-906.
46. Seifter, S., England, S. 1990. Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors. *Meth Enzymol* 182: 626-646.
- 65 47. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) study group. 1999. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. *Arch Ophthalmol* 117(10): 1329-1345.

<307> 2003-08-15
 <313> (1)..(8)

5 <400> 2

Asp Phe Lys Leu Phe Ala Val Tyr
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento activo de 9 AA del péptido C16Y

15 <400> 3

Asp Phe Lys Leu Phe Ala Val Tyr Ile
 1 5

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> fragmento activo de 10 AA del péptido C16Y

25 <400> 4

Asp Phe Lys Leu Phe Ala Val Tyr Ile Lys
 1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> fragmento activo de 11 AA del péptido C16Y

35 <400> 5

Asp Phe Lys Leu Phe Ala Val Tyr Ile Lys Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans

40 <300>
 <301> consorcio de C-elegans
 <302> Secuencia genómica del nemátodo c. elegans: una plataforma para biología investigativa
 <303> Science (Washington DC)
 <304> 282
 <306> 2012-2018
 <307> 1998
 <313> (1)..(10)

45 <400> 6

Asp Tyr Lys Tyr Phe Ala Val Tyr Tyr Arg
 1 5 10

50

55

60

- 5 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- <300>
 <301> Nomizu, M., Yokoyama, F., Suzuki, N., Okazaki, I., Nishi, N., Ponce, L.P., Kleinman, H.K., Yamamoto, Y., Nakagawa, S., Mayumi, T.
 10 <302> Identificación de sitios homólogos biológicamente activos sobre el dominio N-terminal de cadenas α de laminina
 <303> Biochemistry
 <304> 40
 <306> 15310-15317
 <307> 2001
 15 <313> (1)..(4)
- <400> 7
- val Ala Tyr Ile
 1
- 20 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 25 <300>
 <301> Nomizu, M., Kuratomi, Y., Song, S.Y., Ponce, M.L., Hoffman, M.P., Powell, S.K., Miyoshi, K., Otaka, A., Kleinman, H.K., Yamada, Y.
 30 <302> Identificación de secuencia de enlazamiento de células en una cadena γ -1 de laminina de ratón mediante cribado peptídico sistemático
 <303> Journal of Biological Chemistry
 <304> 272
 <306> 32198-32205
 <307> 1997
 35 <313> (1)..(4)
- <400> 8
- Tyr val Arg Leu
 1
- 40 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 45 <300>
 <301> Grant, D.S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G.R., Kleinman, H.K.
 50 <302> Dos diferentes dominios de laminina median la diferenciación de células endoteliales humanas en estructuras de tipo capilar *in vitro*
 <303> Cell
 <304> 58
 <306> 933-943
 <307> 1989
 55 <313> (1)..(5)
- <300>
 <301> Iwamoto, Y., Robey, F.A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H.K., Yamada, Y., Martin, G.R.
 60 <302> YIGSR un pentapéptido de cadena B1 de laminina que inhibe la metástasis de células tumorales
 <303> Science (Washington DC)
 <304> 238
 <306> 1132-1134
 <307> 1987
 <313> (1)..(5)

<400> 9

Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Versión mezclada del péptido C16

15

<300>
<301> Ponce, M.L., Nomizu, M., Kleinman, H.K.
<302> Un sitio angiogénico de laminina y su enlazamiento antagonista a través de las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$
<303> FASEB J

20

<304> 15
<306> 1389-1397
<307> 2001-06
<313> (1)..(12)

<400> 10

Lys Ala Phe Asp Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe
1 5 10

25

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Versión mezclada del péptido C16

35

<300>
<301> Ponce, M.L., Hibino, S., Lebioda, A.M., Mochizuki, M., Nomizu, M., Kleinman, H.K.
<302> Identificación de un potente antagonista peptídico con una secuencia activa de laminina 1 que bloquea la angiogénesis y el crecimiento del tumor
<303> Cancer Research

40

<304> 63
<306> 5060-5064
<307> 2003-08-15
<313> (1)..(12)

<400> 11

45

Ile Lys Asp Tyr Leu Thr Phe Ala Arg Val Lys Phe
1 5 10

50

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

55

<220>
<223> Versión mezclada del péptido C16

60

<300>
<301> Ponce, M.L., Hibino, S., Lebioda, A.M., Mochizuki, M., Nomizu, M., Kleinman, H.K.
<302> Identificación de un potente antagonista peptídico con una secuencia activa de laminina 1 que bloquea la angiogénesis y el crecimiento del tumor
<303> Cancer Research
<304> 63
<306> 5060-5064

ES 2 532 778 T3

<307> 2003-08-15
<313> (1)..(12)

<400> 12

5

Leu Thr Phe Arg Ala Lys Val Tyr Phe Ile Lys Asp
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 13

15

Lys Ala Phe Asp Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de una condición asociada con neovascularización ocular.
2. Un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5 para su uso en el tratamiento de una condición asociada con neovascularización ocular.
- 10 3. Un péptido para uso como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha neovascularización ocular es la neovascularización coroidea; preferiblemente en donde dicha condición es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o alta miopía.
- 15 4. Un péptido para uso como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha neovascularización ocular es neovascularización de la retina; preferiblemente en donde dicha condición es retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, u oclusión de la vena central.
- 20 5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha neovascularización ocular es neovascularización del iris; preferiblemente en donde dicha condición es glaucoma neovascular.
- 25 6. Un péptido para uso como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en donde dicho péptido comprende además una modificación; preferiblemente en donde dicha modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la adición de un dominio Fc de un anticuerpo, pegilación, acilación, biotilación, acetilación, formilación, ubiquitinación, amidación, marcación enzimática, y marcación radioactiva.
- 30 7. Un péptido para uso como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en donde dicho péptido comprende uno o más aminoácidos de forma D.
8. Un péptido para uso como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en donde dicho péptido contiene una amida N-terminal.
- 35 9. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con la neovascularización ocular que comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
10. Una composición farmacéutica para uso como se reivindica en la reivindicación 9 en donde dicho péptido es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5.

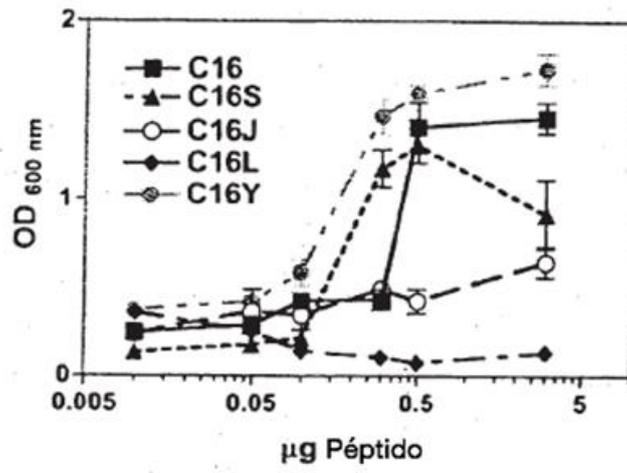


FIG 1

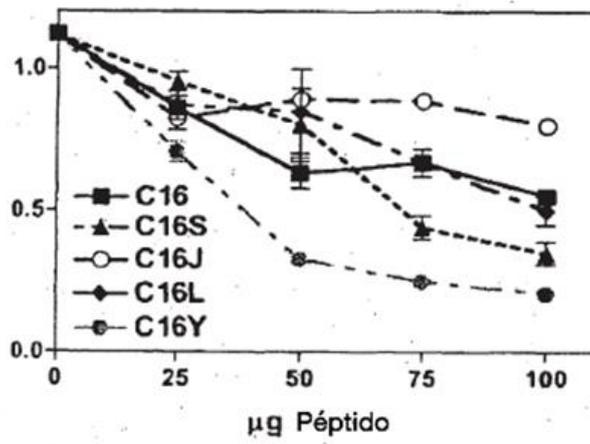


FIG 2

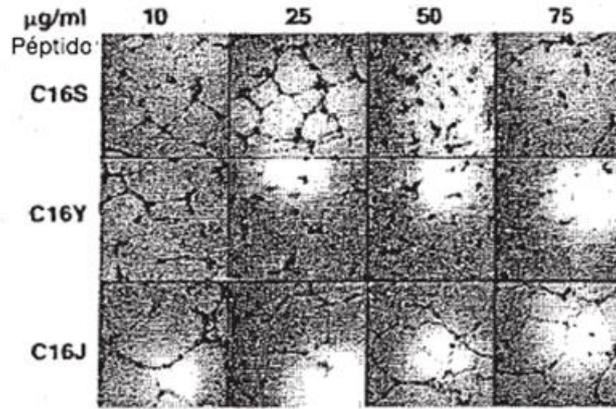


FIG 3

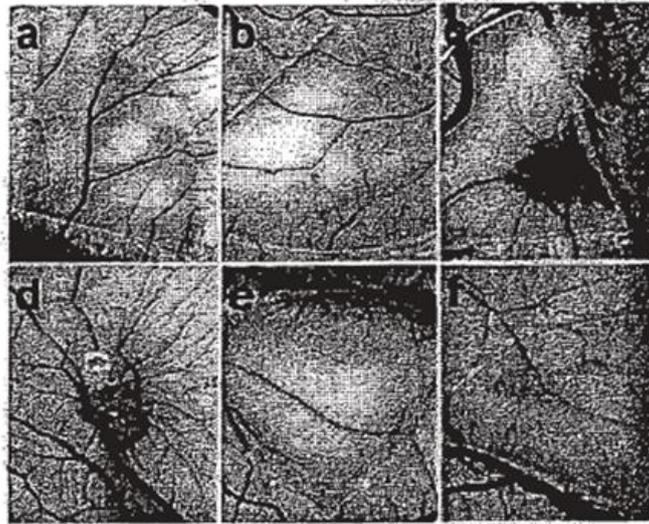


FIG 4

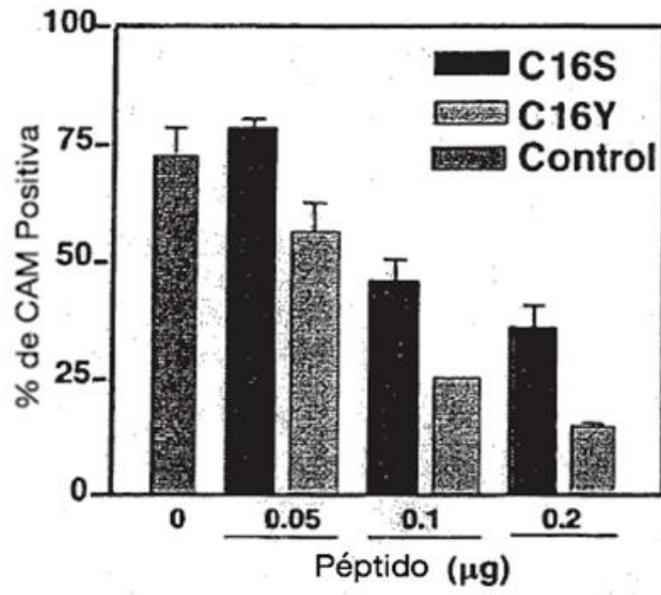


FIG 5

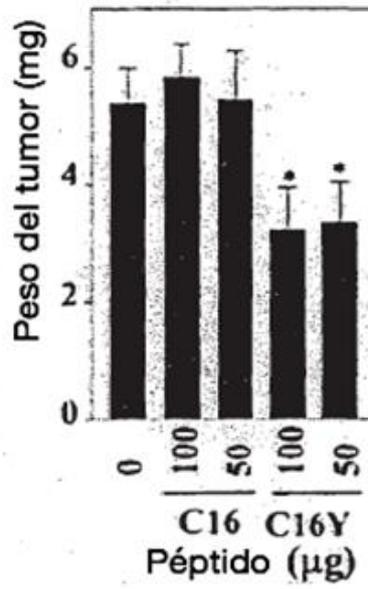


FIG 6

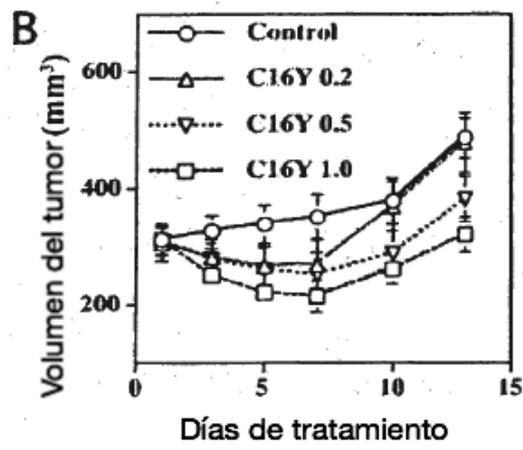
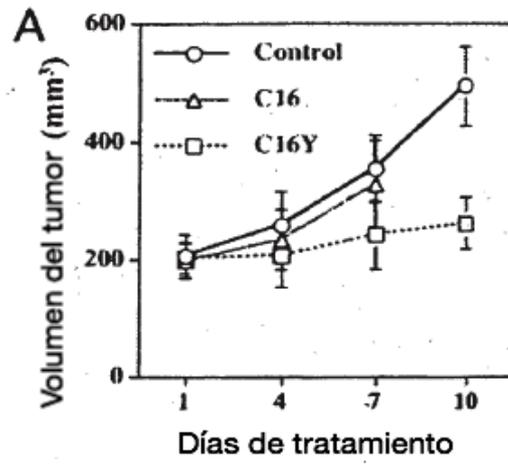


FIG 7

FIG 8

