

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 445**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2007 E 07871699 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2101804**

54 Título: **Péptidos pro-angiogénicos**

30 Prioridad:

13.12.2006 US 869862 P
12.12.2007 US 955143

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2016

73 Titular/es:

SUSAVION BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
1615 W. UNIVERSITY DRIVE, SUITE 132
TEMPE, CA 85281, US

72 Inventor/es:

EGGINK, LAURA L. y
HOOBER, J. KENNETH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 445 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

Péptidos pro-angiogénicos

Antecedentes**1. Campo de la técnica**

- 5 La presente invención se refiere en general al uso de péptidos sintéticos para tratar lesiones en seres humanos, en particular, a péptidos que estimulan la angiogénesis.

2. Estado de la técnica

10 La alteración de la circulación es un aspecto subyacente de muchos trastornos que se manifiestan clínicamente que incluyen la enfermedad arterial periférica (PAD), enfermedad cardíaca isquémica y úlceras crónicas. Más de 24 millones de pacientes están afectados por estas afecciones en los EE.UU., con 10 millones afectados solo por PAD. La PAD a menudo es resultado de la diabetes, que actualmente afecta a uno de cada tres adultos de más de 40 años y cuya incidencia se espera que aumente como resultado del aumento de la obesidad en la población general. Las úlceras crónicas afectan a más de 6,5 millones de pacientes cada año y producen una alteración significativa de la calidad de vida. Incluso con los tratamientos actuales, aproximadamente se llevan a cabo 35.000 amputaciones de extremidades cada año debido a la isquemia que pone en peligro la vida.

15 La cicatrización de las heridas tras una lesión se produce en tres estadios principales. Primero está el estadio hemostático e inflamatorio, que minimiza la pérdida de sangre y recluta células específicas en el sitio de la lesión. Las plaquetas se organizan en el tejido lesionado, inician la formación del coágulo y liberan factores de crecimiento durante este primer estadio. En el segundo estadio, las células fagocíticas reclutadas tales como macrófagos y monocitos digieren el tejido lesionado y los factores de crecimiento liberados por las plaquetas activadas, los macrófagos, y otras células se unen a los receptores en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos pre-existentes. Entonces, las células endoteliales proliferan, migran al lecho de la herida, y se diferencian en tejido vascular arterial y venoso. Finalmente, en un tercer estadio de remodelación, maduran nuevos vasos sanguíneos reclutando células de músculo liso para estabilizar la arquitectura vascular, con lo que la sangre comienza a fluir a través de los nuevos vasos sanguíneos.

20 La angiogénesis, el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, es un proceso esencial en la cicatrización de heridas y para restaurar el flujo sanguíneo a los tejidos tras una lesión. El descubrimiento de los factores de crecimiento que estimulan este proceso ha tenido una influencia importante en el tratamiento médico de afecciones incapacitantes y que ponen en peligro la vida que resultan de la pérdida de circulación sanguínea. Al menos se han identificado 20 factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis. El factor de crecimiento más ampliamente estudiado, y utilizado clínicamente, es el factor BB de crecimiento derivado de plaquetas angiogénico (PDGF-BB). El PDGF se libera a partir de muchos tipos celulares que incluyen plaquetas activadas, macrófagos activados, células endoteliales, fibroblastos y células tumorales y el PDGF se aprobó por la FDA en diciembre de 1997 para su uso clínico como agente tópico para las úlceras del pie diabético. Un segundo factor de crecimiento desarrollado para su uso clínico es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento de este tipo y los análogos biológicamente activos son típicamente proteínas de tamaño medio que se pueden producir por técnicas recombinantes (por ejemplo, en levaduras) y se consigue la activación de la angiogénesis por los factores de crecimiento, al menos en parte, por estimulación de la producción de citocinas.

30 La IL-8 es una citocina que activa los neutrófilos y tiene una potente actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos y linfocitos. El acontecimiento inflamatorio en el sitio de la infección o lesión activa los monocitos y macrófagos, que liberan IL-8. El tejido endotelial inflamado también libera IL-8, que atrae neutrófilos de la sangre al tejido durante la fase inicial del mecanismo de defensa. La consecuencia es un círculo vicioso de reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la IL-8, daño de los tejidos, y más producción de IL-8 lo que da lugar a una inflamación perjudicial como efecto secundario. Además, los neutrófilos se adhieren a los tejidos endoteliales inflamados por medio de las integrinas secretadas por las células y la ICAM-1 puede estimular la liberación de integrinas a las que se unen los neutrófilos, aumentando de esta manera el nivel de inflamación perjudicial en el sitio de la lesión incluso más. El aumento de los niveles de ciertos tipos de citocinas clínicamente perjudiciales, tales como la IL-8 y la ICAM-1, en el sitio de la infección o lesión puede por lo tanto producir efectos secundarios perjudiciales que pueden dificultar el proceso de cicatrización.

40 La cicatrización de heridas en el tejido de mamíferos puede aumentarse por la aplicación, ya sea solos o en combinación, de una citocina y/o factor de crecimiento, de ciertos neuropéptidos tales como las taquicinas, sustancia P, sustancia K y similares, así como péptidos relacionados con el gen de la calcitonina. El uso de dichos péptidos para aplicaciones clínicas, sin embargo, ha tenido dificultades por varios casos problemáticos que incluyen efectos secundarios perjudiciales. La sustancia P, por ejemplo, es un conocido mediador de los impulsos dolorosos y sus efectos sobre la cicatrización de heridas se conocen bien desde hace varios años. Sin embargo, también se ha demostrado que la sustancia P estimula a las neuronas para que liberen factores que reclutan citocinas inflamatorias y neutrófilos en el sitio de una herida, produciendo de esta manera dolor e inflamación.

Por lo tanto, el uso de péptidos o factores de crecimiento y sus análogos como agentes terapéuticos para la cicatrización de heridas puede ser problemático por varias razones, que incluyen la eficacia, coste, y efectos secundarios perjudiciales tales como la inflamación. Una información relevante de los intentos dirigidos a uno o más de estos problemas se pueden encontrar en las siguientes referencias: Patente de EE.UU. n.º 7.105.481, Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2007/0021342, Publicación de Patente de EE.UU. n.º 2005/0063937 y Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2007/0154448. Sin embargo, cada una de estas referencias tiene una o más de las siguientes desventajas:

1. la necesidad de expresar un polinucleótido que contenga la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, lo que puede complicar la producción y aumentar significativamente los costes;
2. la necesidad de purificar las proteínas expresadas de entre las otras proteínas de la célula hospedadora, que puede complicar la producción y aumentar significativamente los costes;
3. la administración de factores de crecimiento angiogénicos sin capacidad adicional de activar fagocitos y que por lo tanto aumenten la eficacia o mejoren la infección u otros trastornos concomitantes;
4. la administración de factores de crecimiento angiogénicos sin capacidad adicional para reducir la inflamación, reduciendo de esta manera los efectos secundarios perjudiciales; y
5. la administración de un péptido que pueda estimular la liberación de factores que reclutan citocinas inflamatorias y neutrófilos en el sitio de la herida, produciendo dolor e inflamación.

Por lo tanto, a la luz de los tratamientos disponibles para promover la cicatrización de heridas por estimulación de la angiogénesis, existe la necesidad de proporcionar terapias prácticas, de bajo coste que aumenten u optimicen la cicatrización de úlceras crónicas sin producir efectos secundarios perjudiciales.

Sumario

La presente invención se refiere en general a péptidos y tratamientos que facilitan la cicatrización de heridas. Más particularmente, la invención se refiere a péptidos que pueden estimular la producción de citocinas pro-angiogénicas beneficiosas, activar fagocitos, e inhibir la liberación de citocinas que sean perjudiciales para la cicatrización de heridas. Los péptidos por lo tanto pueden facilitar la cicatrización de heridas sin producir efectos secundarios perjudiciales tales como la inflamación.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan péptidos terapéuticos como se desvelan en las reivindicaciones.

Siguiendo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que contiene un péptido terapéutico de acuerdo con la invención. En una realización, la composición es una construcción peptídica.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona el uso de un péptido terapéutico de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una herida promoviendo el proceso de cicatrización de heridas.

Lo anterior y otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes por la siguiente descripción más detallada de las realizaciones particulares de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** ilustra una estructura molecular de una realización de la presente invención, una construcción peptídica multivalente que contiene cuatro péptidos de acuerdo con la invención, cada uno de los cuales está unido a una estructura de núcleo central por medio de una secuencia de engarce;

La **FIG. 2A** ilustra la estructura química de una construcción peptídica de acuerdo con una realización de la presente invención, la construcción SynGia™H1B que contiene cuatro copias de la secuencia central WNSTL (SEQ ID NO: 1) unidas a una estructura de armazón central ramificada.

La **FIG. 2B** ilustra la estructura química de una construcción peptídica de acuerdo con una realización de la presente invención, la construcción SynGia™6D que contiene cuatro copias de la secuencia central NQHTPR (SEQ ID NO: 2) unidas a una estructura central ramificada;

La **FIG. 3** ilustra la estructura de un marcador indicador que se puede añadir a un péptido de acuerdo con la presente invención, una extensión del extremo C que contiene un grupo dansilo fluorescente; y

La **FIG. 4** es un gráfico de barras de datos que ilustra la estimulación del crecimiento de un tumor como resultado de la actividad pro-angiogénica por una realización de la presente invención, la construcción peptídica SynGia™H1B que contiene la secuencia central WNSTL (SEQ ID NO: 1) como se ilustra en la **FIG. 2A**.

Descripción detallada

Para proporcionar un agente terapéutico con amplias propiedades que estimulen la angiogénesis, un proceso esencial de cicatrización de heridas y restauración de la circulación a los tejidos lesionados, el agente debería

- 5 aumentar la cicatrización sin inducir efectos secundarios clínicamente perjudiciales tales como la inflamación, y debería actuar en concierto con una actividad fagocítica con el fin de eliminar los desechos tisulares y atenuar las infecciones bacterianas. Los péptidos de la presente invención pueden alcanzar esta meta induciendo la liberación concomitante de citocinas beneficiosas, inhibiendo la liberación de citocinas perjudiciales y estimulando la actividad de las células fagocíticas. Esta última actividad también permite una respuesta de los tejidos lesionados para responder a la presencia de anticuerpos dirigidos contra agentes patógenos que puede aumentar en afecciones con lesiones crónicas. El tratamiento con los péptidos de la presente invención debería inducir el proceso de cicatrización proporcionando una elevación endógena sostenida de una matriz de citocinas beneficiosas, al contrario que la presencia de una única citocina que se da de manera exógena.
- 10 La siguiente descripción presenta realizaciones de la invención que representan varios modos que se contemplan para la práctica de la invención.
- 15 Como se utilizan en el presente documento, se pretende que los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene” o cualquier otra variación de los mismos abarquen una inclusión no excluyente. Por ejemplo, un proceso, procedimiento, artículo, o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente a solo esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a tal proceso, procedimiento, artículo o aparato. Además, a menos de que se establezca expresamente lo contrario, “o” se refiere a un o incluyente y no a un o excluyente. Por ejemplo, se satisface una condición A o B por uno cualquiera de lo siguiente: A es cierto (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es cierto (o presente), y tanto A como B son ciertos (o presentes).
- 20 También, el uso de “un” o “una” se emplean para describir elementos y componentes de la invención. Esto se hace simplemente por conveniencia y para dar un sentido general de la invención. Esta descripción debería leerse para incluir uno o al menos uno y el singular también incluye el plural a menos de que sea obvio que significa otra cosa.
- 25 A menos de que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por el experto habituado en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, los procesos y materiales adecuados se describen posteriormente. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias que se mencionan en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.
- 30 Las siguientes definiciones se refieren a las realizaciones particulares descritas en el presente documento y no se deben tomar como limitantes; la invención incluye equivalentes para otras realizaciones no descritas.
- 35 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “adyacente a” cuando se refiere a la localización de un péptido o una composición peptídica con respecto a una superficie no significa necesariamente que el péptido o composición esté inmediatamente próxima a la superficie. Puede ser o no otra capa, revestimiento, material o espacio contiguo o no contiguo entre el péptido o composición descrita y la superficie, y la superficie en sí misma puede ser otra capa o revestimiento.
- 40 Como se utiliza en el presente documento, el término “angiogénico” cuando se refiere a un factor o agente se pretende que signifique un agente que estimula el desarrollo de los vasos sanguíneos o que promueve la angiogénesis que incluye sin limitación el crecimiento celular endotelial, la estabilidad de vasos sanguíneos, y/o la vasculogénesis y similares.
- 45 Como se utiliza en el presente documento, el término “construcción” cuando se refiere a un péptido se pretende que signifique una estructura que soporte uno o más péptidos, que incluye sin limitación un armazón central de tri-lisina que soporta cuatro secuencias peptídicas idénticas en la misma estructura.
- 50 Como se utiliza en el presente documento, el término “citocina” se refiere a una molécula mensajera que controla la actividad de las células, que incluye sin limitación las células del sistema inmunitario. Las citocinas pueden controlar la actividad celular por medio de varios mecanismos que incluyen sin limitación permitir a las células comunicarse y alterar la función de unas con otras. Ejemplos no limitantes de las citocinas incluyen proteínas inmunorreguladoras tales como interleucinas e interferones, que son secretadas por las células del sistema inmunitario y pueden afectar a la respuesta inmunitaria.
- 55 Como se utiliza en el presente documento, se pretende que la expresión “citocina perjudicial” signifique una citocina capaz de producir uno o más efectos que puede ser perjudiciales con respecto al tratamiento, que incluye sin limitación la inflamación que resulta del aumento de los niveles de IL-8 o ICAM-1.
- Como se utiliza en el presente documento, se pretende que la expresión “efecto secundario perjudicial” signifique un efecto secundario que puede ser perjudicial con respecto al tratamiento, que incluye sin limitación la inflamación.
- Como se utiliza en el presente documento, la expresión cantidad “eficaz” o “terapéuticamente eficaz” se refiere a una

cantidad de agente eficaz para acelerar o de otra manera mejorar la cicatrización de heridas o la circulación sanguínea sistémica en un sujeto, o prevenir la recurrencia de una úlcera en un sujeto. Una dosis terapéutica es una dosis que muestra un efecto terapéutico en el sujeto.

5 Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término “pro-angiogénico” signifique una sustancia o agente que estimula o de otra manera aumenta la angiogénesis.

Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término “estimulante” signifique un agente que produce un aumento temporal de la actividad funcional o eficacia de un organismo o cualquiera de sus partes, incluyendo sin limitación un fármaco sintético o una sustancia de origen natural tal como la adrenalina.

10 Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término “estimular” o la expresión “que estimula” signifiquen excitar la actividad o crecimiento, o una mayor actividad.

Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término “sujeto” signifique el que reacciona durante el curso del tratamiento, que incluye sin limitación un ser humano o individuo no humano que espera o está bajo atención médica o tratamiento.

15 Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término “terapéutico”, cuando se refiere a una sustancia o tratamiento, signifique una sustancia o tratamiento que afecta a la provisión o asistencia en una cura para, o mejorar los síntomas de, una disfunción corporal tal como la causada por una enfermedad o lesión.

Como se utiliza en el presente documento, el término “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan el tratamiento incluyen los que ya tienen un trastorno así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cicatrización de heridas” se refiere a la afección que se beneficiaría del tratamiento con una o más realizaciones de la presente invención.

La presente invención se refiere en general a péptidos sintéticos que pueden inducir la liberación de agentes bioactivos que son esenciales para la estimulación de la angiogénesis. Más particularmente, la presente invención se refiere a péptidos sintéticos capaces de inducir la liberación de citocinas beneficiosas que pueden estimular terapéuticamente la cicatrización de heridas y responder a la presencia de anticuerpos dirigidos contra agentes patógenos sin inducir efectos secundarios perjudiciales. Las realizaciones de péptidos de la presente invención pueden estimular la liberación de PDGF-BB, una citocina pro-angiogénica, e inhibir la liberación de la citocina inflamatoria IL-8 que recluta neutrófilos. Debido a que los neutrófilos son responsables de la mayoría de la respuesta inflamatoria en los tejidos lesionados, la regulación negativa de la IL-8 proporcionada por la presente invención es beneficiosa para la reparación tisular. Además, los péptidos pueden inhibir la liberación de ICAM-1, que estimula la liberación de integrinas a las que se unen los neutrófilos. Estos efectos minimizan la inflamación en el sitio de la lesión mientras que estimulan el proceso de cicatrización. La regulación positiva concomitante de liberación de PDGF-BB, que es la citocina clave para la angiogénesis, con la regulación negativa de la liberación de IL-8 e ICAM-1 proporciona las condiciones favorables para el inicio de la cicatrización.

35 Además, un entrecruzamiento selectivo de receptores de superficie celular con una estructura multivalente que incorpore al menos una realización de péptido de la presente invención puede atenuar las infecciones bacterianas estimulando la actividad de células fagocíticas que se reclutan en el tejido lesionado o infectado. Las células fagocíticas responden a la presencia de células bacterianas que contienen lipopolisacáridos (LPS) en su superficie englobando las células en vacuolas fagocíticas y digiriendo las células bacterianas. Además, las células fagocíticas responden a la presencia de anticuerpos dirigidos contra (y unidos a) un agente patógeno tal como una célula bacteriana, célula fúngica o virus.

La **FIG. 1** ilustra un modelo de trabajo de la estructura molecular de una realización de una construcción peptídica inmunorreguladora multivalente **10** de acuerdo con la invención. La construcción **10** se puede sintetizar con múltiples brazos **1**, que incluyen sin limitación dos, tres, cuatro, y ocho o más brazos **1**, utilizando la misma secuencia peptídica central **2** en los cuatro brazos o con dos o más secuencias diferentes. La longitud del espaciador **3** entre el armazón central **4** de la construcción y la secuencia peptídica central **2** determina la longitud del brazo **1**. Los brazos **1** que se ilustran en la **FIG. 1**, que tienen una secuencia de cinco o seis aminoácidos, pueden tener aproximadamente $3 \pm 0,5$ nm de longitud dependiendo de la conformación (aproximadamente 7 nm a través de la molécula), por ejemplo. Los dominios de superficie celular de las proteínas receptoras conocidas son en correspondencia de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 4 nm de diámetro. Esta distancia se puede ajustar aumentando o disminuyendo la longitud del engarce. Por lo tanto el entrecruzamiento de los receptores se puede conseguir con tal realización. La naturaleza multidimensional de la estructura ilustrada en la **FIG. 1** se obtuvo utilizando técnicas convencionales de modelado molecular.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño y síntesis de péptidos

5 Una exploración de secuencias peptídicas identificó un grupo de secuencias de interés. Los péptidos correspondientes se sintetizaron por procedimientos en fase sólida utilizando protección de cadena lateral Fmoc convencional. Los péptidos ramificados se construyeron sobre un armazón central de tri-lisina que permite cuatro secuencias idénticas en la misma estructura. Se incluyó una secuencia de engarce (Gly)₃-Ser (GGGS, SEQ ID NO: 3) para distanciar la secuencia activa de el armazón central. Las distancias entre las secuencias activas se pueden ajustar disminuyendo o aumentando la longitud del engarce, que incluye sin limitación el uso de dos engarces en tándem (GGGSGGGS, SEQ ID NO: 4) o invirtiendo cualquier engarce inerte tal como polietilenglicol (PEG) de una longitud variable. La estructura ramificada se diseñó para tener una mayor actividad produciendo el agrupamiento de receptor (entrecruzamiento) sobre la superficie de las células sensibles.

15 Los péptidos se sintetizaron sobre resina de PAL-PEG-poliestireno (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) y un sintetizador de péptidos de flujo continuo Milligen Biosearch 9050+ (Millipore Corporation, Billerica, MA).

20 El extremo C de el armazón central es típicamente un resto de lisina (K). Sin embargo, el extremo C se puede modificar para incluir aminoácidos adicionales en el extremo C tal como un resto de cisteína, al que pueden añadirse marcadores tales como grupos fluorescentes, o un resto de ϵ -biotinil-N-lisina (biotinil-K) útil para los procesos posteriores de purificación. Además, se puede insertar un aminoácido tal como β -alanina (β A) o triptófano (W) entre el aminoácido añadido en el extremo C y el resto de lisina del extremo C de el armazón central con el fin de proporcionar un espaciador o un medio para determinar la concentración por la absorbancia. Ejemplos no limitantes de tales restos de lisina del extremo C en el armazón central incluyen K- β A-C y K-W-biotinil-K, respectivamente. Además, se pueden añadir restos de lisina adicionales a uno o ambos de los grupos amino α - y ϵ - de una lisina modificada del extremo C de el armazón central para producir, por ejemplo (K)₂K, (K)₂K- β A-C o (K)₂K-W-biotinil-K, formando de esta manera estructuras ramificadas en las que los grupos amino α - y ϵ - están disponibles para la expansión.

30 Los restos de lisina que se utilizan en los puntos de ramificación se incorporan protegidos con Fmoc en ambos grupos amino α - y ϵ -, de forma que ambos están disponibles para la formación de enlaces amida tras la reacción de desprotección convencional con piperidina. Se puede incorporar un grupo dansilo (u otro marcador fluorescente) por reacción del grupo tiol del resto cisteína del extremo C utilizando ácido 5-(((2 yodoacetil) amino) etil) amino) naftaleno-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) seguido por el protocolo convencional para las sondas sensibles al tiol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Se une una biotina a la lisina por medio de un enlace amida a la cadena lateral del grupo amino que, debido a su alta afinidad por la estreptavidina, proporciona un medio para recuperar el péptido con proteínas asociadas de las mezclas de reacción con el fin de estudiar la interacción del péptido con los componentes celulares.

35 Los péptidos se construyeron unidos a una resina en fase sólida, que se escogió tal que cuando el péptido se escinde de la resina, el grupo carboxilo del extremo C del péptido se libera como la amida. Cada uno de los cuatro grupos amino de el armazón central tri-lisina se extendieron con la adición de la secuencia de engarce GGGS (SEQ ID NO:3), seguido por la secuencia peptídica central activa.

40 Tras la escisión del lecho de resina, el producto se puede purificar sustancial o completamente por HPLC en una columna preparatoria Jupiter Proteo C12 (21,2 mm x 250 mm) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA) utilizando un gradiente del 8% al 18% de acetonitrilo en agua que contenga 10 mM de ácido trifluoroacético (TFA). La pureza del producto peptídico final se confirmó por espectroscopia de masas utilizando un espectrómetro de masas Voyager DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA). El péptido purificado por HPLC se secó al vacío, se disolvió en solución salina fosfato tamponada, pH 7.2 (PBS) y se pasó a través de una columna de filtración en gel de Sefadex G 15 o G 25 (1 x 48 cm para muestras pequeñas) para separar el TFA del péptido. La columna se eluyó entonces con PBS estéril.

45 De manera alternativa, el producto se purifica por el uso de un cartucho de fase inversa C18, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de filtración en gel para retirar los productos secundarios de la síntesis. La concentración se puede determinar por la absorbancia del fluoróforo (por ejemplo, el grupo dansilo, coeficiente de extinción, $\epsilon_{mM}=5,7 \text{ cm}^{-1}$ a 336 nm), absorbancia del enlace peptídico a 210 nm ($\epsilon \text{ mg/ml} \approx 31 \text{ cm}^{-1}$), absorbancia de aminoácidos aromáticos (por ejemplo, triptófano, $\epsilon_{mM}=5,6 \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm) en el péptido (cuando están presentes) y/o la absorbancia del reactivo ácido bicinonínico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Las soluciones de péptido se pueden ajustar a la concentración deseada y filtrarse en esterilidad antes de su uso.

55 Ejemplo 2

Péptidos centrales WNSTL (SEQ ID NO: 1) y NQHTPR (SEQ ID NO: 2)

Se identificaron los péptidos triptófano-asparagina-serina-treonina-leucina (WNSTL, SEQ ID NO: 1) y asparagina-glutamina-histidina-treonina-prolina-arginina (NQHTPR, SEQ ID NO:2) a través de una exploración de secuencias peptídicas potencialmente de interés. Las secuencias se sintetizaron sobre un centro tri-lisina de acuerdo con Posnett y col., J. Biol. Chem., 263: 1719-25, 1988, con un engarce (glicina)₃-serina (GGGS, SEQ ID NO: 2) incluido con la secuencia para extender el péptido activo lejos del centro.

Las **FIG. 2A-2B** ilustran la estructura química de estas dos realizaciones de la invención. En estas realizaciones, R = H o puede ser un aducto que contiene un marcador fluorescente como el grupo dansilo que se muestra en la **FIG. 3**. Las construcciones peptídicas que se ilustran contienen cuatro secuencias idénticas, cada una de las cuales está conectada a un armazón de tri-lisina ramificada central por medio de una secuencia engarce (Gly)₃Ser (GGGS, SEQ ID NO: 3). La **FIG. 2A** es una construcción peptídica ramificada de acuerdo con una realización de la invención, denominada SynGia™H1B, que contiene cuatro copias de la secuencia central que contiene el péptido WNSTL (SEQ ID NO: 1). El péptido de la realización que contiene R = H tiene una masa molecular de 3.841,16 Dalton.

La **FIG. 2B** ilustra la estructura de la construcción que contiene la secuencia del extremo N, NQHTPR (SEQ ID NO: 2), denominada SynGia™6D. El péptido de la realización que contiene R = H tiene una masa molecular de 4.543,89. En otra realización, una extensión del extremo C que contiene β-alanina, cisteína y un marcador dansilo, como se muestra en la **FIG. 3**, está unida covalentemente a la construcción que se ilustra en la **FIG. 2B**, que da como resultado un péptido que tiene una masa molecular de 4.850,23 Dalton.

Ejemplo 3

Regulación de la liberación de citocinas

Para determinar si los péptidos regulan la inducción o inhibición de la liberación de citocinas, se trataron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cultivadas, con un péptido de una realización de la invención y, tras una incubación de 4 horas, se recolectó el medio y se ensayó en cuanto a los cambios en las cantidades de 40 citocinas diferentes. Se añadió la construcción peptídica WNSTL (SEQ ID NO: 1) SynGia™H1B, que se ilustra en la **FIG. 2A**, con una concentración de 100 nM en cada uno de los ensayos. Los cultivos de PBMC establecidas con células de Cellular Technologies, Ltd. (Shaker Heights, OH). Se descongelaron aproximadamente 3 millones de células PBMC humanas congeladas a 37 °C y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml en el que se añadieron lentamente 8 ml de medio de lavado. Luego, se añadieron 8 ml adicionales y se le dio vueltas para mezclarlo. Las células se centrifugaron entonces a 330 g durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el aglomerado se resuspendió en 10 ml de medio de lavado y se centrifugó como anteriormente. Las células lavadas se resuspendieron entonces en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS a aproximadamente 6 millones de células por ml y se añadieron 100 µl de la suspensión en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 37 °C en un 5% CO₂ humidificado. Después de 24 horas, el medio se sustituyó con 200 µl de medio RPMI 1640 recién preparado que contenía un 10% de FBS y se incubó a 37 °C en un 5% de CO₂ humidificado durante 2 días. Para los datos que se muestran en la **Tabla 1**, se añadió una alícuota de la construcción peptídica a muestras por duplicado con una concentración final de 5 nM o 100 nM y se incubaron a 37 °C en un 5% de CO₂ humidificado durante 4 horas. Para los otros experimentos (datos no incluidos), se continuó la incubación durante 24 h. El medio se retiró entonces y se almacenó a -80 °C. Las muestras se analizaron en cuanto a producción de citocinas. Un grupo de células de control no se trató con un agente experimental. Un segundo grupo de células de control se trató con LPS, el agente que se utiliza comúnmente para inducir la producción de una variedad de citocinas inflamatorias. El control positivo de inflamación proporcionado por este segundo grupo de células de control es esencial para asegurar que los péptidos no producen una respuesta inflamatoria no regulada.

Los ensayos de los niveles de citocinas en las muestras de medios de cultivo se llevaron a cabo utilizando procedimientos desarrollados por RayBiotech, Inc. (Norcross, GA). En esta tecnología, la membrana de matrices de anticuerpos se incuba con muestras de medios. Tras el lavado, la matriz se incuba con un cóctel de todos los anticuerpos marcados con biotina. La membrana se lava entonces para liberar los anticuerpos no unidos y se incuba con estreptavidina marcada con un colorante fluorescente. Tras un lavado final, la membrana de matrices se lee en un detector de fluorescencia y se cuantifican las intensidades de las manchas para obtener valores relativos.

Las **TABLAS 1-2** enumeran varias citocinas cuyas concentraciones en un medio de cultivo de PBMC se pueden alterar como resultado del tratamiento de las células con realizaciones de péptidos de la presente invención. Las citocinas que se afectan de esta manera incluyen sin limitación:

- Eotaxina (quimioatrayente, induce la acumulación sustancial de eosinófilos);
- Eotaxina-2 (induce la quimiotaxis de eosinófilos y basófilos, libera histamina);
- GCSF (factor estimulante de colonias de granulocitos, factor de crecimiento);
- ICAM-1 (molécula -1 de adhesión intercelular, se une a las integrinas, receptor de rinovirus humano);
- IL-1β (Interleucina 1β, un mediador de reacciones inflamatorias);
- IL-4 (promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B e inhibe la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6 y TNF-α);
- IL-6SR (receptor soluble para la IL-6);
- IL-7 (estimula la proliferación del precursor de linfocitos B y T);

- 5 IL-8 (quimioatrayente y activador de neutrófilos);
- IL-10 (inhibe la síntesis de citoquinas inflamatorias tales como el INF- γ , IL-2 y TNF- β);
- IL-11 (induce respuestas inflamatorias, promueve las respuestas inmunitarias);
- IL-12 (contiene las subunidades de 40 y 70 kDa, activa los linfocitos-NK y estimula la proliferación de linfoblastos);
- IL-15 (tiene muchas de las mismas propiedades de IL-2, puede contribuir a las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T);
- IL-16 (quimioatrayente y activador de células que expresan CD4);
- 10 IL-17 (funciona como mediador de la angiogénesis que estimula la migración de células endoteliales vasculares y formación de nervios y regula la producción de una variedad de factores de crecimiento que promueven la angiogénesis);
- INF- γ (Interferón-gamma, tiene propiedades antivíricas, inmunorreguladoras y anti-tumorales);
- MCP-1,2 (proteínas quimiotácticas de monocitos);
- M-CSF (induce la proliferación y estimula los monocitos y macrófagos);
- 15 MIG (quimioatrayente para linfocitos T estimulados pero no activo sobre neutrófilos o monocitos);
- MIP-1b (proteína inflamatoria de macrófagos, que está implicada en la activación de granulocitos y linfocitos citolíticos);
- PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas, homodímero BB);
- 20 RANTES (regulado en activación, expresado, y segregado en linfocitos T normales; quimiotáctico para linfocitos T);
- sTNF RI, RII (formas solubles del receptor RI o RII para el factor de necrosis tumoral (TNF));
- TIMP-2 (inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz extracelular); y
- TNF- β (promueve la proliferación de fibroblastos y está implicado en la cicatrización de heridas).

25 La **Tabla 1** contiene datos que muestran las citoquinas que se liberan con una tasa significativamente más alta o más baja (en comparación con los controles sin tratar) durante una incubación de 4 horas de PBMC con la construcción peptídica ramificada SynGia™H1B en presencia de suero. Un grupo de las muestras de control no se trató con péptido y un segundo grupo de muestras de control se trató con lipopolisacáridos (LPS) en ausencia de péptido. El SynGia™H1B, cuya estructura se ilustra en la **FIG. 2A**, contiene la secuencia peptídica central WNSTL (SEQ ID NO: 1). Entre las citoquinas que se inducen a concentraciones de más de dos veces como resultado de la incubación con SynGia™H1B están PDGF-BB, IL-1 β , IL-4, IL-11, IL-12 y RANTES. Por el contrario, varias citoquinas muestran una disminución de la concentración de más de dos veces en comparación con las muestras de control sin tratar con este péptido. La disminución de la concentración de IL-8 en la muestra tratada con péptido, en comparación con la cantidad de IL-8 en la muestra tratada con el agente inflamatorio prototípico LPS, es particularmente notable. Además, cuando se comparaba con las muestras de control sin tratar, los péptidos no inducían un cambio en la cantidad de la citocina inflamatoria IL-6. Sin embargo, los niveles de IL-6 estaban significativamente elevados en las muestras tratadas con LPS en ausencia de péptido. En un experimento, por ejemplo, la muestra tratada con péptido tenía una concentración relativa de IL-6 de 93, la muestra de control sin tratar de 98, y la muestra tratada con LPS (en ausencia del péptido), 5.879. Debido a que la concentración de IL-6 en la muestra tratada con péptido no era significativamente diferente de la muestra de control sin tratar, los datos para la IL-6 no se incluyen en las Tablas 1 o 2. El aumento del PDGF-BB pro-angiogénico y el descenso de la IL-8 inflamatoria, sin la estimulación concomitante de la inflamación, tienen una importancia particular con respecto a la cicatrización de heridas.

TABLA 1

<u>Concentración relativa de citoquinas tras la incubación de PBMC en suero con la construcción peptídica SynGia™H1B que contiene la secuencia central WNSTL (SEQ ID NO:1).</u>			
Citoquinas*	WNSTL (SEQ ID NO:1)	Sin tratar (control)	LPS (control)
<u>Aumentada:</u>			
PDGF-BB	159	43	56
IL-1p	120	44	48
IL-4	97	30	49
IL-11	49	17	27
IL-12p40	228	50	46
IL-12p70	131	90	89
RANTES	145	60	114
S TNF RI	78	42	58
<u>Disminuida:</u>			
IL-7	93	154	178
IL-8	144	417	840
IL-10	43	101	218
Eotaxina-2	109	194	470

GCSF	50	108	120
ICAM-1	44	58	53
INF-γ	103	134	158
IL-6SR	32	52	52
TIMP-2	25	58	92
MCP-1	968	1464	1844

Los datos de concentración relativa para la construcción peptídica SynGia™6D se destacan de manera similar en la **Tabla 2**. La SynGia™6D, cuya estructura se ilustra en la **FIG. 2B**, contiene la secuencia peptídica central NQHTPR (SEQ ID NO: 2). Las citocinas se observaron de nuevo a concentraciones significativamente mayores o menores (con respecto a los controles) tras una incubación de 4 horas con la construcción ramificada SynGia™6D. Los datos de la **Tabla 2** muestran que, aunque el patrón total de la respuesta de citocinas a este péptido es de alguna manera diferente que el de la SynGia™H1B que se muestra en la **Tabla 1**, induce de manera similar una mayor cantidad de PDGF y una menor cantidad de IL-8.

La toxicidad del péptido *in vivo* se puede ensayar mediante inyección de un péptido en sujetos animales, que incluyen sin limitación a los ratones. Los péptidos se pueden administrar de varias maneras, que incluyen sin limitación, por inyección (vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal), por vía tópica (vía transmucosa, transbucal, o transdérmica) y/o por vía oral (en líquido, comprimidos o cápsulas). En los estudios preliminares sobre ratones, no se han observado efectos secundarios del péptido sobre la tasa de crecimiento de los animales tras la inyección de una dosis eficaz en días alternos durante 1 mes (datos no mostrados).

TABLA 2

Concentración relativa de citocinas tras la incubación de PBMC en suero con la construcción peptídica SynGia™6D que contiene la secuencia central NQHTPR (SEQ ID NO:2)		
Citocina	NQHTPR (SEQ ID NO:2)	Sin tratar (control)
Aumentada:		
PDGF-BB	84	43
Eotaxina	57	32
Eotaxina-2	310	193
IL-15	146	97
IL-16	8	1
IL-17	14	5
MCP-2	90	56
M-CSF	116	44
MIG	100	54
TNF-p	84	38
sTNF RII	26	8
TIMP-2	110	58
Disminuida:		
IL-8	261	417
MIP-1b	777	1172

Ejemplo 4

Actividad pro-angiogénica de los péptidos

Los tumores necesitan vascularización para obtener los nutrientes que soportan el crecimiento. Por lo tanto, la estimulación del crecimiento de un tumor en respuesta a la administración de una construcción de la presente invención es un indicio de angiogénesis. Para este ejemplo, se utilizó un sistema de modelo de xenoinjerto con ratones desnudos (*nu/nu*) para determinar el efecto del péptido sobre el crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma de células renales 786-O inyectada en el costado de un ratón de forma que se inducía un tumor. Después de que se estableciera el tumor, se inyectó el péptido por vía subcutánea en días alternos. Se estimó el peso del tumor calculando el volumen.

La **FIG. 4** ilustra los datos que resultan de los ensayos de la actividad pro-angiogénica de una realización de la invención. El gráfico de barras en la **FIG. 4** muestra el peso medio del tumor en ratones tratados con la construcción peptídica SynGia™H1B que contiene cuatro copias del péptido central WNSTL (SEQ ID NO: 1) con una dosis de 0,05 nmol/g en comparación con un grupo de control. El péptido también se ensayó en combinación con Sorafenib, un fármaco anti-angiogénico. Los resultados que se muestran en la **FIG. 4** indican que el crecimiento del tumor

había aumentado significativamente, con un factor de 1,7, sobre el control, en ratones a los que se había administrado la construcción SynGia™H1B. El fármaco Sorafenib, un inhibidor de la angiogénesis, inhibía fuertemente (pero no completamente) el efecto del péptido.

Ejemplo 5

5 Dispositivos o materiales que contienen péptidos centrales

Los péptidos de la presente invención también pueden depositarse para proporcionar un revestimiento apropiado a una superficie, que incluyen sin limitación una superficie bioactiva o superficies inertes no biológicas de un dispositivo o materiales diseñados para el implante. Los péptidos pueden por lo tanto promover la cicatrización alrededor de los materiales implantados con el fin de conseguir vascularización sin formación de cicatriz. Se podrían utilizar de manera similar en otras aplicaciones *in vitro* o *in vivo*, que incluyen sin limitación con sensores embebidos.

Referencias sobre antecedentes

- Arici A (2002) Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. Ann NY Acad Sci 955: 101-109.
- 15 Baggiolini M, Loetscher P, Moser B (1995) Interleukin-8 and the chemokine family. Int J Immunopharmacol 17: 103-108.
- Barja-Fidalgo C, Coelho ALJ, Saldanha-Gama R, Helal-Neto E, Mariano-Oliveira A, de Freitas MS (2005) Disintegrins: integrin selective ligands with activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions. Braz J Med Biol Res 38: 1513-1520.
- 20 Delgado AV, McManus AT, Chambers JP (2005) Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. Exptl Biol Med 230: 271-280.
- Etzioni A (1999) Integrins: the glue of life. Lancet 353: 341-343.
- Li WW and Li VW (2003a) The biology of PDGF and other growth factors in wound neovascularization. Contemporary Surgery, Supplement, noviembre, 12-18.
- 25 Li WW and Li VW (2003b) Therapeutic angiogenesis: using growth factors to restore circulation in damaged tissues. Contemporary Surgery, Supplement, noviembre, 19-25.
- Li VW and Li WW (2003c) Angiogenic therapy for chronic wounds: the clinical experience with Becaplermin. Contemporary Surgery, Supplement, noviembre, 26-32.
- Li WW, Tsakayannis D and Li VW (2003) Angiogenesis: a control point for normal and delayed wound healing. Contemporary Surgery, Supplement, noviembre, 5-11.
- 30 O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P (2002) Cytokines and autoimmunity. Nature Rev Immunol 2: 37-45.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Susavion Biosciences, Inc.
- 35 <120> PÉPTIDOS PRO-ANGIOGÉNICOS
- <130> EGGI-12034
- 40 <140> Sin asignar
- <141> 12-12-2007
- <150> 60/869.862
- <151> 13-12-2006
- 45 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>

<223> Secuencia sintética

<400> 1

5

Trp Asn Ser Thr Leu
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

15

<400> 2

Asn Gln His Thr Pro Arg
1 5

<210> 3

20

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> secuencia de engarce

<400> 3

Gly Gly Gly Ser
1

30

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de engarce

<400> 4

40

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 5

45

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Secuencia sintética

<400> 5

Trp Asn Ser Thr Tyr
1 5

55

<210> 6

ES 2 567 445 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 6

10
Tyr Asn Ser Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

20 <400> 7

Tyr Gln Pro Ser Leu
1 5

<210> 8
25 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Secuencia sintética

<400> 8

35
Val Gln Ala Thr Gln Ser
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido terapéutico que consiste en una construcción y al menos dos o más brazos, teniendo la construcción un armazón central y consistiendo cada brazo en una secuencia unida al armazón central por medio de una secuencia de engarce, en el que cada secuencia es la misma o diferente y se selecciona de entre el grupo que consiste en WNSTL (SEQ ID NO: 1), NQHTPR (SEQ ID NO: 2), WNSTY (SEQ ID NO: 5), YNSTL (SEQ ID NO: 6), YQPSL (SEQ ID NO: 7), y VQATQS (SEQ ID NO: 8).
2. Un péptido terapéutico que se selecciona de entre el grupo que consiste en WNSTL (SEQ ID NO: 1), NQHTPR (SEQ ID NO: 2), WNSTY (SEQ ID NO: 5), YNSTL (SEQ ID NO: 6), YQPSL (SEQ ID NO: 7), y VQATQS (SEQ ID NO: 8).
- 10 3. El péptido terapéutico de la reivindicación 1, en el que el armazón central es un armazón de tri-lisina y la secuencia de engarce es GGGS (SEQ ID NO: 3) o GGGSGGGS (SEQ ID NO: 4).
4. El péptido terapéutico de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende tres o cuatro brazos, consistiendo los brazos en la misma secuencia unida al armazón central por medio de la secuencia de engarce, estando el péptido ramificado.
- 15 5. El péptido terapéutico de la reivindicación 1, 3 o 4, en el que el péptido está ramificado teniendo cuatro secuencias, siendo cada una WNSTL (SEQ ID NO: 1).
6. El péptido terapéutico de la reivindicación 1, 3 o 4, en el que el péptido está ramificado teniendo cuatro secuencias, siendo cada una NQHTPR (SEQ ID NO: 2).
- 20 7. Una composición pro-angiogénica que comprende al menos un péptido terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El uso del péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 o 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una herida para inducir la cicatrización de heridas por medio de angiogénesis.
9. Un péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 o 6 para su uso en el tratamiento de una herida para promover el proceso de cicatrización de heridas.
- 25 10. El péptido terapéutico de la reivindicación 2, 3, 4 o 5 en el que la secuencia se selecciona de entre el grupo que consiste en: WNSTL (SEQ ID NO: 1) y NQHTPR (SEQ ID NO: 2).

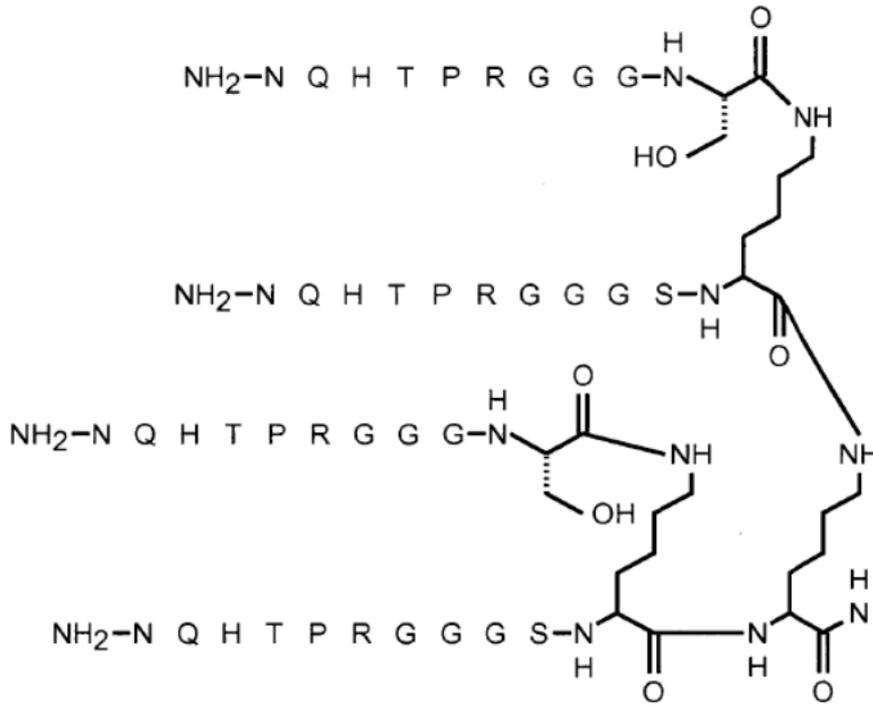


FIG. 2B

FIG. 4

