

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 258**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61L 27/60	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)
A61P 39/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
G01N 33/577	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
C12Q 1/48	(2006.01)
G01N 33/94	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2007 PCT/CA2007/001903**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2008 WO08049227**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007 E 07816053 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2076290**

54 Título: **Agonistas multiméricos de Tie 2 y usos de los mismos en la estimulación de la angiogénesis**

30 Prioridad:

27.10.2006 US 854950 P

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

16.05.2017

73 Titular/es:

**SUNNYBROOK HEALTH SCIENCES CENTER
(100.0%)
2075 BAYVIEW AVENUE, S-133
TORONTO, ONTARIO M4N 3M5, CA**

72 Inventor/es:

**VAN SLYKE, PAUL y
DUMONT, DANIEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 612 258 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

Agonistas multiméricos de Tie 2 y usos de los mismos en la estimulación de la angiogénesis

5 Antecedentes de la invención

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos. Muchas de las rutas de señalización que impulsan la respuesta angiogénica se originan en la membrana plasmática y surgen de la activación de tirosina cinasas receptoras de células endoteliales, incluyendo Tie2/Tek (Jones, N. *et al.* (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 257-267; Olsson, A. *et al.* (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 359-371). Los miembros 1-4 de las angiopoyetinas (Ang) constituyen una familia de factores de crecimiento proteicos, todos los cuales se ha mostrado que activan la actividad del receptor Tie 2 en diferentes grados.

Todas las Ang se caracterizan estructuralmente por un dominio de superagrupamiento (SCD) N-terminal seguido de un dominio de hélice superenrollada (CCD) y un dominio de tipo fibrinógeno C-terminal (FLD) (Ward, N. y Dumont, D. (2002) *Semin. Cell. Dev. Biol.* 1: 19-27) y (Tsigkos, K. *et al.* (2003) *Expert Opin. Investig. Drugs* 6: 933-941). Estudios funcionales han destacado el papel de SCD y CCD en la formación de multímeros de Ang homotópicos de alto orden (Procopio, W. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 42: 30196-30201). La naturaleza específica de estos multímeros es variable y parece ser única para cada miembro de la familia de las Ang. La especificidad de unión de las Ang por el receptor Tie 2 se ha atribuido al FLD. Tomados en conjunto, los atributos estructurales únicos de cada miembro de la familia de las Ang promueven la unión y agrupación diferencial de Tie 2. Se cree que los efectos fisiológicos pleiotrópicos de Ang 1-4 están al menos en parte mediados por el agrupamiento apropiado y específico del receptor (Davis, S. *et al.* (2003) *Nat. Struct. Biol.* 1: 38-44; Procopio, W. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 42: 30196-30201; Cho, C. *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15: 5547-5552; Ward, D. *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 937-946; Kim, K-T. *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280: 20126-20131). Los enfoques de eliminación génica y transgénico en ratones han destacado un papel indispensable de Ang 1 y Ang 2 en el desarrollo y el mantenimiento de los sistemas vasculares sanguíneo y linfático, así como del sistema hematopoyético. Los estudios no genéticos de las Ang se han dificultado por la dificultad inherente asociada a su purificación, estabilidad y solubilidad.

Las heridas crónicas representan un problema médico significativo. Por ejemplo, estimaciones globales reseñan que 12,5 millones de pacientes en el mundo padecen heridas crónicas y un número significativo de estos individuos padecen úlceras de decúbito y úlceras del pie diabético. La curación de heridas implica una serie bien coreografiada de actividades moleculares que conducen en última instancia al cierre de la herida. Estos eventos están impulsados por tres procesos interrelacionados: inflamación, proliferación celular y angiogénesis. La angiogénesis alterada es uno de los varios defectos primarios reseñados en pacientes diabéticos. Estos pacientes padecen a menudo una curación de heridas alterada y como tales padecen una morbilidad significativa asociada al compromiso vascular (Dinh, T. y Veves, A. (2005) *Curr. Pharm. Des.* 18:145- 153).

Se han reseñado defectos primarios en la secreción de factor de crecimiento y/o la escisión proteolítica de factores de crecimiento en heridas diabéticas, sugiriendo que la aplicación terapéutica de estos factores puede ser beneficiosa (Wiemann, T. *et al.* (1998) *Diabetes Care* 5: 822-827; Tsang, M. *et al.* (2003) *Diabetes Care* 6: 1856-1861). Sin embargo, hasta la fecha, faltan todavía medios efectivos para estimular la angiogénesis, tales como para uso en el tratamiento de heridas crónicas. Por consiguiente, existe la necesidad de agentes que sean efectivos en la estimulación de la angiogénesis.

Resumen de la invención

Esta invención proporciona agonistas de Tie 2 multiméricos que tienen actividad angiogénica y que pueden usarse para promover la curación de heridas. Es un agonista de Tie 2 de la invención un mimético de angiopoyetina que comprende una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2. Se ha demostrado que los agonistas de Tie 2 de la invención se unen específicamente y activan Tie 2, como se evidencia por la fosforilación de Tie 2, y activan rutas de señalización que se ha demostrado anteriormente que son posteriores a Tie 2, incluyendo las rutas de MAPK, AKT y eNOS. Los agonistas de Tie 2 de la invención han demostrado también estimular la angiogénesis, dando como resultado vasos bien arborizados. Además, cuando se usan para estimular la angiogénesis en combinación con VEGF, se ha mostrado que los agonistas de Tie 2 mitigan la sinuosidad observada cuando se estimula la angiogénesis por VEGF solo. Usando un modelo *in vivo* de curación de heridas, los agonistas de Tie 2 de la invención han demostrado mejorar el tiempo de cierre de heridas, principalmente mediante un tejido de granulación aumentado y la neovascularización de la herida.

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Por consiguiente, un aspecto de la invención atañe a una composición que comprende una forma multimérica de los monómeros peptídicos de unión a Tie 2, donde la forma multimérica tiene actividad agonista de Tie 2, donde cada monómero peptídico es de no más de 100 aminoácidos de longitud y donde cada monómero peptídico comprende:

- (a) un péptido T7 (SEQ ID NO: 1) o un péptido T7 modificado (SEQ ID NO:2);
- (b) un péptido GA3 (SEQ ID NO: 3) o un péptido GA3 modificado (SEQ ID NO:4);
- 10 (c) un péptido T4 (SEQ ID NO: 9) o un péptido T4 modificado (SEQ ID NO: 10);
- (d) un péptido T6 (SEQ ID NO: 7) o un péptido T6 modificado (SEQ ID NO:8); o
- (e) un péptido T8 (SEQ ID NO: 5) o un péptido T8 modificado (SEQ ID NO:6).

En una realización preferida, la forma multimérica es un tetrámero. Como alternativa, la forma multimérica puede ser, por ejemplo, una forma dimérica o multimérica que comprende seis, ocho, diez o doce unidades del monómero peptídico de unión a Tie 2. En aún otras realizaciones, la forma multimérica comprende un número impar de unidades de monómero peptídico de unión a Tie 2, tal como tres, cinco, siete, nueve u once unidades.

En una realización preferida, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende una estructura A-B-C, donde A comprende un péptido de unión a Tie 2, B comprende un espaciador y C comprende un grupo multimerizante, donde C tiene afinidad por D, un agente multimérico que comprende múltiples sitios de unión a C. Por ejemplo, el agente multimérico D puede tener cuatro sitios de unión al grupo multimerizante C, de tal modo que se forme un tetrámero cuando cuatro monómeros peptídicos de unión a Tie 2, A-B-C, interaccionen con el agente multimérico D. En una realización preferida, C comprende un grupo biotina y D comprende un agente seleccionado de entre el grupo consistente en avidina, estreptavidina y neutravidina. En otra realización preferida, el espaciador B comprende polietilenglicol (PEG).

En otra realización, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende una estructura A-B, donde A comprende un péptido de unión a Tie 2 y B comprende un espaciador, donde se crea la forma multimérica mediante ligamiento covalente de múltiples monómeros peptídicos de unión a Tie 2 a través del espaciador B. En una realización preferida, el espaciador B comprende polietilenglicol (PEG).

En otra realización, la forma multimérica comprende un dímero peptídico que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica y (c) un resto de ligamiento que conecta dichas primera y segunda cadenas peptídicas, donde dicho dímero peptídico se une a y activa el receptor Tie 2. Preferiblemente, la primera cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2). Preferiblemente, la segunda cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2). Más preferiblemente, tanto la primera como la segunda cadenas peptídicas son péptidos T7 (SEQ ID NO: 1 o 2). Preferiblemente, el resto de ligamiento comprende uno o más polímeros hidrosolubles unidos covalentemente a la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica. Más preferiblemente, el uno o más polímeros hidrosolubles son polímeros lineales. En una realización preferida, el polímero hidrosoluble es un polietilenglicol (PEG) (p.ej., una molécula de PEG lineal). Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 20.000 Da. Más preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 Da a aproximadamente 10.000 Da. En diversas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 3.400 Da, aproximadamente 5.000 Da o aproximadamente 10.000 Da.

En otra realización, la forma multimérica comprende un tetrámero peptídico que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; (c) una tercera cadena peptídica; (d) una cuarta cadena peptídica y (e) un resto de ligamiento que conecta dichas primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas, donde dicho tetrámero peptídico se une a y activa el receptor Tie 2. Preferiblemente, la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas son péptidos T7 (SEQ ID NO: 1 o 2). Preferiblemente, el resto de ligamiento comprende uno o más polímeros hidrosolubles unidos covalentemente a la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas. Más preferiblemente, el uno o más polímeros hidrosolubles son polímeros de cadena ramificada. En una realización preferida, el polímero hidrosoluble es un polietilenglicol (PEG) (p.ej., una molécula de PEG de cadena ramificada). Preferiblemente, el PEG ramificado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 Da a aproximadamente 20.000 Da. En diversas realizaciones, el PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 3.400 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 10.000 Da o aproximadamente 20.000 Da.

Las formas multiméricas de la invención exhiben actividad agonista de Tie 2. Por ejemplo, en una realización, la forma multimérica estimula la fosforilación de Tie 2. En otra realización, la forma multimérica estimula la fosforilación de MAPK, AKT y eNOS. Preferiblemente, una forma multimérica de la invención tiene al menos un efecto sobre las células endoteliales seleccionado de entre el grupo consistente en: estimulación de la migración de células endoteliales, estimulación de la liberación de MMP2 de células endoteliales y protección de células endoteliales de la apoptosis inducida por la retirada de suero y, aún más preferiblemente, tiene los tres efectos sobre las células endoteliales. Preferiblemente, la forma multimérica estimula una respuesta angiogénica *in vivo* en un ensayo de Matrigel. Preferiblemente, la forma multimérica estimula la curación de heridas en un sujeto cuando se aplica por vía tópica a una herida del sujeto.

10

En una realización particularmente preferida, la invención proporciona una composición que comprende una forma tetramérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2, donde el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende una estructura A-B-C donde:

15 A comprende un péptido de unión a Tie 2 seleccionado de un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2) y un péptido GA3 (SEQ ID NO: 3 o 4);

B comprende un espaciador de polietilenglicol y

C comprende un grupo biotina,

donde cuatro copias de A-B-C se asocian con un agente tetramérico D creando la forma tetramérica, estando seleccionado el agente tetramérico D de entre el grupo consistente en avidina, estreptavidina y neutravidina.

20

Se proporcionan también composiciones farmacéuticas que comprenden la forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración tópica. En otra realización, el portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración sistémica.

25

Se describen también procedimientos para elaborar las formas multiméricas de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento de elaboración de un monómero peptídico de unión a Tie 2 que comprende una estructura A-B-C, donde:

30 A comprende un péptido de unión a Tie 2,

B comprende un espaciador de polietilenglicol y

C comprende un grupo biotina;

comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un péptido de unión a Tie 2 que comprende un residuo aminoácido aminoterminal que comprende un primer grupo reactivo con un reactivo que comprende la estructura:

35 segundo grupo reactivo-B-C, donde el primer grupo reactivo reacciona con el segundo grupo reactivo formando A-B-C. Aún más, la invención proporciona un procedimiento de elaboración de una forma tetramérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 A-B-C, comprendiendo el procedimiento combinar el monómero peptídico de unión a Tie 2 A-B-C con un agente tetramérico a una relación 4:1, estando seleccionado el agente tetramérico D de entre el grupo consistente en avidina, estreptavidina y neutravidina.

40

Se describe también un procedimiento de detección de una forma multimérica de la invención, donde el procedimiento de detección comprende poner en contacto una composición de la invención con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un péptido de unión a Tie 2 contenido en la composición, por ejemplo una composición de la invención que comprende un péptido T7 puede detectarse usando un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al péptido T7. Las composiciones de anticuerpo monoclonal que se unen específicamente al péptido T7 están también englobadas por la invención.

45

Aún otro aspecto de la invención atañe a un procedimiento de activación de un receptor Tie 2 que comprende poner en contacto el receptor Tie 2 con la forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que se active el receptor Tie 2. La activación del receptor Tie 2 puede probarse, por ejemplo, por la fosforilación del residuo de tirosina 992 (Y992) del receptor Tie 2 o por la fosforilación de MAPK, AKT o eNOS.

50

Aún otro aspecto de la invención atañe a una composición como se proporciona para uso en un procedimiento de estimulación de la angiogénesis en un sitio del sujeto, que comprende poner en contacto el sitio con la forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que se estimule la angiogénesis en el sitio del sujeto. La forma multimérica puede ponerse en contacto con el sitio, por ejemplo, por administración tópica de la forma multimérica o administración sistémica de la forma multimérica. Preferiblemente, la angiogénesis estimulada por la forma multimérica se caracteriza por al menos una de las siguientes propiedades:

55

- (a) reclutamiento de células de soporte perivasculares;
- (b) no filtración de los vasos; y
- (c) arborización bien definida

5 En una realización del procedimiento de estimulación de la angiogénesis, el procedimiento comprende además poner en contacto el sitio del sujeto con un segundo agente angiogénico, tal como VEGF, PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF y factor de crecimiento placentario (PLGF). El procedimiento de estimulación de la angiogénesis puede usarse en situaciones clínicas tales como la vascularización de tejidos regenerativos, enfermedad isquémica de los miembros, isquemia cerebral, afecciones de inflamación vascular, arteriosclerosis, necrosis avascular, estimulación del crecimiento del cabello y disfunción eréctil.

Otro aspecto de la invención atañe a un procedimiento de disminución de la permeabilidad vascular en un sitio de vasos filtrantes. El procedimiento comprende poner en contacto el sitio de vasos filtrantes con una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que disminuya la permeabilidad vascular. El procedimiento de disminución de la permeabilidad vascular puede usarse en situaciones clínicas tales como apoplejía, degeneración macular, edema macular, edema linfático, degradación de la barrera hematorretiniana y normalización de los vasos tumorales.

Otro aspecto de la invención atañe a un procedimiento de protección de células endoteliales. El procedimiento comprende poner en contacto las células endoteliales con una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que se protejan las células endoteliales. El procedimiento de protección de células endoteliales puede usarse en situaciones clínicas tales como fibrosis renal, apoplejía, degeneración macular y complicaciones diabéticas.

Aún otro aspecto de la invención atañe a un procedimiento de estimulación de la curación de una herida en un sujeto, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la herida con la forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que se estimule la curación de la herida en el sujeto. La forma multimérica puede ponerse en contacto con la herida, por ejemplo, mediante administración tópica de la forma multimérica o administración sistémica de la forma multimérica. En una realización preferida, la herida es una úlcera diabética. En otras realizaciones, la herida es, por ejemplo, una úlcera de decúbito, una úlcera de presión, una incisión quirúrgica, una lesión traumática de tejido, una quemadura o un injerto cutáneo.

La invención proporciona también diversos biomateriales a los que se incorpora una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención. El biomaterial puede ser, por ejemplo, Matrigel, un sustituto de la piel o un hidrogel de glicosaminoglicano reticulado. En una realización del biomaterial, se incorpora también un segundo agente al biomaterial. Dicho segundo agente puede ser, por ejemplo, VEGF, PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF o factor de crecimiento placentario (PLGF).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un diagrama esquemático de vasculotida no agrupada, preparada mediante ligamiento del péptido T7 con un reactivo de marcaje de biotina que contiene un espaciador de PEG (maleimida-PEO2-biotina).

La Figura 1B es una inmunotransferencia de un ensayo de interacción y precipitación (pull down) *in vitro*, que muestra que la vasculotida no agrupada, pero no un péptido biotinilado irrelevante, se une específicamente a Tie 2 en este ensayo.

La Figura 1C es un análisis de inmunotransferencia de lisados de HUVEC estimuladas con Ang 1, avidina, vasculotida no agrupada o vasculotida agrupada a diversas dosis, mostrando que el tratamiento con vasculotida agrupada da como resultado la activación de Tie 2 (Tek) y las proteínas de señalización posteriores eNOS, MAPK y AKT.

La Figura 1D es una inmunotransferencia de análisis de dosis de lisados de Eahy926 EC estimuladas con vasculotida no agrupada o vasculotida agrupada, que muestra que la vasculotida agrupada activa la fosforilación del receptor Tie 2 a concentraciones en el intervalo de 200 μ M a 750 pM.

La Figura 1E es un análisis de inmunotransferencia de la cinética de activación de la activación de Tie 2 en HUVEC estimuladas con Ang 1 o vasculotida agrupada durante diversos tiempos, mostrando que la vasculotida agrupada activa Tie 2, AKT y MAPK, pero no FAK, en HUVEC, con una cinética de activación que imita estrechamente la de

Ang 1 recombinante.

La Figure 1F es un análisis de inmunotransferencia de lisados de células C166 (izquierda) o células Cos1 (derecha), que son fenotípicamente nulas de expresión de Tie 2. Se infectaron las células con adenovirus recombinante que codifica EGFP (carriles Ad-EGFP) o Tie 2 (carril Ad-Tek; control positivo). Se estimularon las células infectadas con Ad-EGFP con vasculotida agrupada o no agrupada, ninguna de las cuales fue capaz de estimular la fosforilación de AKT o MAPK por encima de los niveles basales no estimulados.

La Figura 2A es una gráfica de barras de los resultados de un experimento ELISA de muerte celular, que muestra que la vasculotida agrupada reduce la muerte celular inducida por la retirada de suero de las células HUVEC.

La Figura 2B es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de migración de cámara de Boyden modificada, que muestran que la vasculotida agrupada promueve una migración celular quimiotáctica que es indistinguible estadísticamente de la migración inducida por VEGF (100 ng/ml) o Ang 1 (500 ng/ml).

La Figura 2C es un análisis zimográfico en gelatina de medio acondicionado de células HUVEC estimuladas con VEGF, vasculotida no agrupada o vasculotida agrupada, indicando un papel para la vasculotida agrupada en la promoción de la liberación de MMP2.

La Figura 3A es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de Matrigel que cuantifica el número de vasos en cada grupo de tratamiento, mostrando que la vasculotida agrupada, sola o en combinación con VEGF, aumenta el número de vasos.

La Figura 3B es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de Matrigel que cuantifica la longitud de vaso en cada grupo de tratamiento, mostrando que la vasculotida agrupada, sola o en combinación con VEGF, aumenta la longitud de vaso.

La Figura 3C es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de Matrigel que cuantifica el número de nodos en cada grupo de tratamiento, mostrando que la vasculotida agrupada, sola o en combinación con VEGF, aumenta el número de nodos.

La Figura 4A es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de cierre de herida que cuantifica los recuentos de píxeles totales de los trazados digitales de los márgenes de herida con el tiempo, mostrando que el tratamiento con vasculotida agrupada conducía a disminuciones del margen de herida tan pronto como el día 2 de tratamiento.

4B es una microfotografía representativa de secciones de piel teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) y tricrómica de Masson (MT) de heridas tratadas con PBS, bFGF (10 µg/ml) o vasculotida agrupada (5 nM).

La Figura 4C es una gráfica de barras de los resultados de puntuación histológica de un ensayo de cierre de herida que cuantifica la reepitelización, tejido de granulación y neovascularización e inflamación usando una escala de 0-4, mostrando que el tratamiento con vasculotida agrupada daba como resultado una reepitelización retardada, pero promovía grandes aumentos en la regranulación y neovascularización.

La Figura 5A es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de migración de cámara de Boyden modificada, que muestra que el compuesto que contiene péptido GA3 multimérico promueve la migración celular quimiotáctica.

La Figura 5B es un análisis zimográfico en gelatina de medios acondicionados de células HUVEC estimuladas con un compuesto que contiene péptido GA3 multimérico que demuestra que el compuesto puede promover la liberación de MMP2.

La Figura 6 es una ilustración esquemática de agonistas de Tie 2 que contienen péptido T7 ligados a PEG, a los que se hace referencia en la presente memoria como PEG-vasculotida.

La Figura 7 es un análisis de inmunotransferencia de lisados de células endoteliales vasculares bovinas (bVEC) estimuladas con PTE200-T7 (T7 ligado a PEG tetramérico, 20.000 Da de PM) a 5 µg/ml, mostrando que el tratamiento con PTE200-T7 da como resultado la activación de Tie 2.

La Figura 8 es un análisis de inmunotransferencia de lisados de células endoteliales vasculares bovinas (bVEC) estimuladas con DE100-T7 (T7 ligado a PEG dimérico, 10.000 Da de PM) a 250 ng/ml o 500 ng/ml, mostrando que el tratamiento con DE100-T7 da como resultado la activación de Tie 2.

5 La Figura 9 es un análisis de inmunoprecipitación/inmunotransferencia de lisados de tejido pulmonar de ratones CD1 estimulados *in vivo* con DE100-T7 (T7 ligado a PEG dimérico, 10.000 Da de PM) a 5 µg o 100 µg, DE200-T7 (T7 ligado a PEG dimérico, 20.000 Da de PM) a 10 µg o 50 µg), PTE200-T7 (T7 ligado a PEG tetramérico) a 5 µg o 75 µg, o PBS, que examina la fosforilación de Tie 2 y de los marcadores de ruta posteriores MAPK y AKT.

10 La Figura 10 es un análisis de transferencia de puntos para valorar la especificidad de anticuerpos monoclonales de ratón genomanipulados para detectar el péptido T7 usando PTE200-T7 como antígeno.

La Figura 11 es un análisis de inmunotransferencia para valorar la especificidad de anticuerpos monoclonales de ratón genomanipulados para detectar el péptido T7 usando T7-BSA como antígeno.

15

Descripción detallada de la invención

Esta invención atañe a formas multiméricas de un monómero peptídico de unión a Tie 2 y a composiciones y usos de las mismas. Como se demuestra en la presente memoria, cuando se multimerizaba un péptido conocido por unirse a Tie 2, se mostraba que era capaz de activar Tie 2 y sus rutas de señalización asociadas. Además, esta activación se ha demostrado que da como resultado la producción de respuestas angiogénicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Es más, se ha demostrado que la activación del eje de señalización de Tie 2 pleiotrópico por el compuesto multimérico de la invención puede producir vasos sanguíneos que están altamente organizados y bien soportados por células de soporte miogénicas. La estimulación de la curación de heridas por la forma multimérica de la invención se ha demostrado también. Por consiguiente, las formas multiméricas de la invención pueden aplicarse a una amplia variedad de situaciones en que sea deseable la estimulación de la angiogénesis y/o la curación de heridas.

20 Antes de describir adicionalmente la invención, puede ser de ayuda para entender la misma exponer las definiciones de ciertos términos que se usan en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término "Tie 2" hace referencia a una proteína tirosina cinasa receptora que se expresa casi exclusivamente en células endoteliales y que es también conocida en la materia como TEK, p140 TEK, CD202B y VMCM. El término "Tie 2" pretende englobar el receptor de cualquier especie que exprese este receptor, aunque se prefiere Tie 2 humano. Las secuencias de ARNm y proteína de Tie 2 humano se exponen en los números de acceso a GenBank NM_000459 y NP_000450, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término "angiopoyetina" pretende hacer referencia a una cualquiera de una familia de factores de crecimiento proteicos conocidos por ser ligandos de Tie 2, incluyendo angiopoyetina 1 (o Ang 1), angiopoyetina 2 (o Ang 2), angiopoyetina 3 (o Ang 3) y angiopoyetina 4 (o Ang 4). El término "angiopoyetina" pretende englobar el factor de crecimiento de cualquier especie que exprese el factor de crecimiento, aunque se prefieren los miembros de la familia de angiopoyetina humana. Las secuencias de ARNm y proteína de Ang 1 humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_001146 y NP_001137, respectivamente. Las secuencias de ARNm y proteína de Ang 2 humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_001147 y NP_001138, respectivamente. Las secuencias de ARNm y proteína de Ang 4 humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_015985 y NP_057069, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término "MAPK" pretende hacer referencia a la proteína cinasa activada por mitógeno, también conocida como ERK o cinasa regulada por señal extracelular, una cinasa intracelular que se fosforila tras la activación de Tie 2. El término "MAPK" pretende englobar la cinasa de cualquier especie que exprese la cinasa, aunque se prefiere MAPK humana. Las secuencias de ARNm y proteína de MAPK humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_002736 y NP_002745, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término "AKT" pretende hacer referencia a una proteína cinasa también conocida como homólogo de oncogén vírico de timoma de murino v-akt, una cinasa intracelular que se fosforila tras la activación de Tie 2. El término "AKT" pretende englobar la cinasa de cualquier especie que exprese la cinasa, aunque se prefiere AKT humana. Las secuencias de ARNm y proteína de AKT humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_001014431 y NP_001014431, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término “eNOS” pretende hacer referencia a una óxido nítrico sintetasa de célula endotelial, también conocida como NOS 3, NOS III o ECNOS, una enzima intracelular que se fosforila tras la activación de Tie 2. El término “eNOS” pretende englobar la enzima de cualquier especie que exprese la enzima, aunque se prefiere eNOS humana. Las secuencias de ARNm y proteína de eNOS humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_000603 y NP_000594, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término “MMP2” pretende hacer referencia a la metaloproteínasa de matriz 2, una proteína secretada por células endoteliales que está implicada en la degradación de la matriz extracelular. El término “MMP2” pretende englobar la proteína de cualquier especie que exprese la proteína, aunque se prefiere MMP2 humana. Las secuencias de ARNm y proteína de MMP2 humana se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_004530 y NP_004521, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término “VEGF” pretende hacer referencia a factor de crecimiento endotelial vascular, también conocido como VPF o factor de permeabilidad vascular, un factor de crecimiento implicado en el crecimiento y angiogénesis de células endoteliales. El término “VEGF” pretende englobar el factor de crecimiento de cualquier especie que exprese el factor de crecimiento, aunque se prefiere VEGF humano. Las secuencias de ARNm y proteína de VEGF humano (variante 1) se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_001025366 y NP_001020537, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término “PDGF” pretende hacer referencia al factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor mitogénico para células de origen mesenquimático. El término “PDGF” pretende englobar el factor de crecimiento de cualquier especie que exprese en factor de crecimiento, aunque se prefiere PDGF humano. La proteína tiene una cadena alfa y una cadena beta y puede existir como homodímero o heterodímero. Las secuencias de ARNm y proteína de PDGF alfa humana (isoforma 1) se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_002607 y NP_002598, respectivamente. Las secuencias de ARNm y proteína de PDGF beta humana (isoforma 1) se exponen en los n.^{os} de acceso a GenBank NM_002608 y NP_002599, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término “péptido de unión a Tie 2” pretende englobar péptidos de al menos dos aminoácidos de longitud y preferiblemente no más de 100 aminoácidos de longitud que tienen afinidad de unión por Tie 2. El término “péptido de unión a Tie 2” no pretende englobar ligandos de origen natural de Tie 2, tales como proteínas de angiopoyetina completas nativas. Además, el término “péptido de unión a Tie 2” pretende englobar péptidos compuestos total o parcialmente por L-aminoácidos, péptidos compuestos total o parcialmente por D-aminoácidos y péptidos compuestos por tanto L- como D-aminoácidos. Es más, el término “péptido de unión a Tie 2”, pretende englobar péptidos compuestos total o parcialmente por los 20 residuos aminoácidos de origen natural, péptidos compuestos total o parcialmente por residuos aminoácidos de origen no natural y péptidos compuestos por residuos aminoácidos tanto de origen natural como de origen no natural.

Como se usa en la presente memoria, el término “monómero peptídico de unión a Tie 2” pretende hacer referencia a una única unidad de compuesto peptídico de unión a Tie 2. El compuesto peptídico de unión a Tie 2, o monómero, comprende el péptido de unión a Tie 2 y puede comprender otros restos químicos (p.ej., espaciadores, grupos multimerizadores y similares), pero el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende solo una copia (o unidad) del péptido de unión a Tie 2 y por tanto tiene una única valencia para el receptor Tie 2.

Como se usa en la presente memoria, el término “forma multimérica” de un monómero peptídico de unión a Tie 2 pretende hacer referencia a formas que contienen más de una unidad de monómero peptídico de unión a Tie 2, de tal modo que la forma multimérica (p.ej. dímero, tetrámero y similar) comprenda más de una copia (o unidad) del péptido de unión a Tie 2 y por tanto tenga multivalencia para el receptor Tie 2.

Como se usa en la presente memoria, el término “alta afinidad”, como se usa con respecto a la unión de un péptido de unión al receptor Tie 2, pretende significar unión del péptido al receptor con una K_d de aproximadamente 10^{-3} M o menos, más preferiblemente 10^{-4} M o menos, aún más preferiblemente 10^{-5} M o menos.

Como se usa en la presente memoria, “no inhibe sustancialmente la unión de una angiopoyetina a Tie 2”, como se usa con respecto a un péptido de unión a Tie 2, pretende significar que la capacidad del péptido de unión a Tie 2 de inhibir la unión de una angiopoyetina (p.ej., Ang 1) a Tie 2 es esencialmente no mayor que la capacidad de un péptido de control no relacionado (p.ej., un péptido que no tiene afinidad mensurable por Tie 2) de inhibir la unión de una angiopoyetina (p.ej., Ang 1) a Tie 2.

Como se usa en la presente memoria, el término “actividad agonista de Tie 2” pretende hacer referencia a estimular,

potenciar, aumentar o regular positivamente la actividad del receptor Tie 2, como se mide de acuerdo con cualquier procedimiento, técnica, señal, detector o indicador que sea conocido en la materia por ser indicativo de actividad del receptor Tie 2. Los ejemplos no limitantes de dichos indicadores de la actividad de Tie 2 incluyen la fosforilación de Tie 2 humano en el residuo aminoacídico Y992 o la fosforilación de una o más de MAPK, AKT y eNOS.

5

La invención se describe con más detalle en las siguientes subsecciones, presentándose dichas subsecciones solo con fines de claridad y no debiendo en modo alguno considerarse como limitaciones. La invención se define por las reivindicaciones.

10 I. Formas multiméricas de monómeros peptídicos de unión a Tie 2

Esta invención proporciona una composición que comprende una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2, donde la forma multimérica tiene actividad agonista de Tie 2. Por tanto, la composición tiene dos aspectos que considerar: la estructura del monómero peptídico de unión a Tie 2 mismo y los medios mediante los cuales se multimeriza el monómero creando la forma multimérica que tiene actividad agonista de Tie 2, discutiéndose ambos de dichos aspectos adicionalmente en la presente memoria. En una realización, la forma multimérica comprende un número par de unidades de monómero. En una realización preferida, la forma multimérica es un tetrámero. En otra realización preferida, la forma multimérica es un dímero. En aún otras realizaciones, la forma multimérica comprende 6, 8, 10 o 12 unidades del monómero peptídico de unión a Tie 2. En otra realización, la forma multimérica comprende un número impar de unidades de monómero. Por ejemplo, la forma multimérica puede ser un trímero o la forma multimérica puede comprender 5, 7, 9 u 11 unidades de monómero peptídico de unión a Tie 2.

El monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende un péptido que tiene actividad de unión a Tie 2. Además, el monómero puede comprender otros restos químicos, que se discuten con más detalle a continuación.

El péptido de unión a Tie 2 contenido en el monómero es de al menos 2 aminoácidos de longitud, más preferiblemente es de al menos 5 aminoácidos de longitud y aún más preferiblemente es de al menos 7 aminoácidos de longitud. Es un intervalo de tamaño preferido del péptido 7-25 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 7-15 aminoácidos de longitud. Otros intervalos de tamaño incluyen 5-30 aminoácidos de longitud, 5-40 aminoácidos de longitud, 5-50 aminoácidos de longitud, 5-60 aminoácidos de longitud, 5-70 aminoácidos de longitud, 5-80 aminoácidos de longitud, 5-90 aminoácidos de longitud o 5-100 aminoácidos de longitud. El péptido es de no más de 100 aminoácidos de longitud.

En una realización, el péptido de unión a Tie 2 en el monómero comprende una secuencia aminoacídica que está presente en un ligando de Tie 2 nativo (p.ej. una angiopoyetina, tal como Ang 1 o Ang 2). Por ejemplo, puede usarse un fragmento de una angiopoyetina que retiene la capacidad de unirse a Tie 2 como péptido de unión a Tie 2. Como alternativa, en otra realización, el péptido de unión a Tie 2 en el monómero comprende una secuencia aminoacídica que no está presente en un ligando de Tie 2 nativo. Se ha mostrado que pueden seleccionarse péptidos que tienen secuencias aminoacídicas que difieren de la secuencia primaria de angiopoyetinas que tienen afinidad por Tie 2 (véase, p.ej., Tournaire, R, *et al.* (2004) *EMBO Reports* 5: 262-267). Dichos péptidos pueden identificarse, por ejemplo, cribando en una colección de péptidos exhibida en fago (p.ej., una colección aleatoria de 7 unidades) los péptidos que se unen a Tie 2 (p.ej., una proteína de fusión Tie 2-Fc), con confirmación de la unión peptídica a Tie 2 mediante cribado en el péptido seleccionado de la unión a Tie 2 usando un ensayo ELISA (p.ej., como se describe en Tournaire, R. *et al.* (2004) *supra*).

Es preferible que el péptido de unión a Tie 2 usado en el monómero se una a Tie 2 con alta afinidad, pero que no inhiba sustancialmente la unión de una angiopoyetina a Tie 2. Esta realización es preferible, de modo que la forma multimérica no compita con las angiopoyetinas nativas por la unión a Tie 2. Por ejemplo, preferiblemente el péptido de unión a Tie 2 se une a Tie 2 con alta afinidad, pero no inhibe sustancialmente la unión de Ang 1 a Tie 2. Adicionalmente, o como alternativa, preferiblemente el péptido de unión a Tie 2 se une a Tie 2 con alta afinidad, pero no inhibe sustancialmente la unión de, por ejemplo, Ang 2 o Ang 4 a Tie 2.

En una realización preferida, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende un péptido T7, comprendiendo dicho péptido T7 una secuencia aminoacídica: His-His-His-Arg-His-Ser-Phe (SEQ ID NO: 1). En una realización, el péptido T7 tiene un residuo de cisteína aminoterminal añadido al mismo y, por tanto, el péptido T7 comprende una secuencia aminoacídica: Cys-His-His-His-Arg-His-Ser-Phe (SEQ ID NO: 2).

En otra realización preferida, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende un péptido GA3, comprendiendo

dicho péptido GA3 una secuencia aminoacídica: Trp-Thr-Ile-Ile-Gln-Arg-Arg-Glu-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Phe-Gln-Arg-Thr-Trp-Lys-Glu-Tyr-Lys (SEQ ID NO: 3). En una realización, el péptido GA3 tiene un residuo de cisteína aminoterminal añadido al mismo y, por tanto, en esta realización el péptido FA3 comprende una secuencia aminoacídica: Cys-Trp-Thr-Ile-Ile-Gln-Arg-Arg-Glu-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Phe-Gln-Arg-Thr-Trp-Lys-Glu-Tyr-Lys (SEQ ID NO: 4).

En aún otra realización, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende un péptido T8, comprendiendo dicho péptido T8 una secuencia aminoacídica: His-Pro-Trp-Leu-Thr-Arg-His (SEQ ID NO: 5). En una realización, el péptido T8 tiene un residuo de cisteína aminoterminal añadido al mismo y, por tanto, en esta realización el péptido T8 comprende una secuencia aminoacídica: Cys-His-Pro-Trp-Leu-Thr-Arg-His (SEQ ID NO: 6).

En aún otra realización, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende un péptido T6, comprendiendo dicho péptido T6 una secuencia aminoacídica: Lys-Leu-Trp-Val-Ile-Pro-Lys (SEQ ID NO: 7). En una realización, el péptido T6 tiene un residuo de cisteína aminoterminal añadido al mismo y, por tanto, en esta realización el péptido T6 comprende una secuencia aminoacídica: Cys-Lys-Leu-Trp-Val-Ile-Pro-Lys (SEQ ID NO: 8).

En una realización alternativa, el péptido de unión a Tie 2 usado en el monómero puede comprender un péptido que compite con una angiopoyetina (p.ej., Ang 1) por la unión a Tie 2. Es un ejemplo no limitante de dicho péptido un péptido T4, comprendiendo dicho péptido T4 una secuencia aminoacídica: Asn-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Ser (SEQ ID NO: 9). En una realización, el péptido T4 tiene un residuo de cisteína aminoterminal añadido al mismo y, por tanto, en esta realización el péptido T4 comprende una secuencia aminoacídica: Cys-Asn-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Ser (SEQ ID NO: 10).

Los péptidos de unión Tie 2 T4, T6, T7 y T8 se describen también en Tournaire, R. *et al.* (2004) *EMBO Reports* 5: 262-267. El péptido de unión a Tie 2 GA3 se describe también en Wu, X. *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 1004-1010.

Además del péptido de unión a Tie 2, el monómero peptídico de unión a Tie 2 puede comprender otros restos o grupos químicos tales como espaciadores y/o grupos multimerizadores. Por ejemplo, el péptido de unión a Tie 2 puede ligarse a un espaciador, que puede servir para una o más funcionalidades. El espaciador puede funcionar, por ejemplo, aumentando la distancia entre los monómeros cuando se multimerizan, facilitando la interacción de la forma multimérica con el receptor Tie 2 (p.ej. reduciendo el impedimento estérico). Adicionalmente, o como alternativa, el espaciador puede servir, por ejemplo, como grupo químico mediante el cual pueden multimerizarse los monómeros. Además, el monómero peptídico de unión a Tie 2 puede comprender uno o más grupos multimerizantes, restos químicos que funcionan facilitando la multimerización de los monómeros. Es un grupo multimerizante preferido un grupo biotina, que tiene afinidad por avidina, estreptavidina y neutravidina, de tal modo que puede usarse cualquier de los tres últimos compuestos para la multimerización de monómeros que comprenden un grupo biotina. Es otro ejemplo de un grupo multimerizador un dominio de hélice superenrollada, que puede ligarse con el extremo amino del péptido mediante técnicas de genomanipulación de ADN recombinante y que se autoensambla en estructuras oligoméricas (véanse, p.ej., las publicaciones de patente de EE.UU. 20030220476 y 20060074230 para una descripción adicional del uso de dominios de hélice superenrollada para multimerización). Los ejemplos no limitantes de dominios de hélice superenrollada adecuados para uso son los dominios de hélice superenrollada del factor de transcripción de levadura GCN4, de la proteína de matriz de cartilago (CMP) o de la proteína de matriz oligomérica de cartilago (COMP).

Es un espaciador preferido un espaciador de polietilenglicol (PEG), que es una molécula polimérica que puede contener diferentes números de unidades, tales como 2, 4, 6, 8, 10, 11 o 12 unidades. Los polímeros de PEG son también conocidos en la materia como polímeros de poli(óxido de etileno) (PEO) y por tanto los términos PEG y PEO como se usan en la presente memoria se pretende que sean equivalentes. Son bien conocidos en la materia numerosos otros espaciadores adecuados (también conocidos como ligadores), cuyos ejemplos no limitantes incluyen otros polialquilenglicoles, poliésteres y polialquilenaminas. Además, están comercialmente disponibles una amplia variedad de espaciadores ligados por un extremo con un resto reactivo y por el otro extremo con un grupo biotina (reactivos EZ-Link Biotina disponibles en Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EE.UU.) y pueden usarse en la preparación de los monómeros peptídicos de unión a Tie 2 de la invención. Los ejemplos no limitantes de reactivos comercialmente disponibles de estructura: resto reactivo-espaciador-biotina incluyen:

Reactivos que reaccionan con sulfhidrilo:

EZ-Link biotina-BMCC (1-biotinamido-4-(4'-[maleimidoetil-ciclohexano]-carboxamido)butano)

EZ-Link biotina-HPDP (*N*-(6-(biotinamido)hexil)-3'-(2'-piridilditio)-propionamida
 EZ-Link yodoacetil-LC-biotina (*N*-yodoacetil-*N*-biotinilhexilendiamina)
 EZ-Link yodoacetil-PEO₂ biotina ((+)-biotinil-yodoacetamidil-3,6-dioxaoctanodiamina)
 EZ-Link maleimida PEO_n-biotina (n= 2 u 11)

5

Reactivos que reaccionan con amina:

EZ-Link NHS-PEO_n-biotina (n= 4 o 12)

EZ-Link NHS-SS-biotina (2-(biotinamido)-etil-1,3'-ditiopropionato) de succinimidilo)

EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotina (6-(biotinamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo)

10 EZ-Link TFP-PEO₃-biotina (éster tetrafluorofenílico de PEO₃-biotina

Reactivos que reaccionan con carboxilo:

EZ-Link 5-(biotinamido)pentilamina

EZ-Link amino-PEO₂-biotina reactivo de marcaje ((+)-biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina)

15 EZ-Link amino-PEO₃-biotina reactivo de marcaje ((+)-biotinil-3,6,9-trioxaundecanodiamina)

EZ-Link biotina PEO-amina ((+)-biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina)

EZ-Link biotina-PEO-LC-amina ((+)-biotinil-3,6,9-trioxaundecanodiamina)

20 Además, puede ligarse un espaciador de brazo ramificado con múltiples copias del péptido de unión Tie 2 como medio de multimerizar el péptido. Los ejemplos no limitantes incluyen espaciadores de PEG ramificados activados de 2 a 4 brazos, aunque pueden usarse también espaciadores con más brazos, tales como espaciadores de PEG ramificados activados de 8 a 12 brazos. Están comercialmente disponibles espaciadores de PEG activados ramificados (p.ej., activados con maleimida) (p.ej., NOF Corporation, Tokio, Japón).

25 En una realización preferida, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende la estructura: A-B-C, donde A comprende un péptido de unión a Tie 2, B comprende un espaciador y C comprende un grupo multimerizador, donde C tiene afinidad por D, un agente multimérico que comprende múltiples sitios de unión para C. En una realización particularmente preferida, el agente multimérico D tiene cuatro sitios de unión para el grupo multimerizante C, de tal modo que se forma un tetrámero cuando interaccionan cuatro monómeros peptídicos de unión a Tie 2, A-B-C, con el agente multimérico D. Es un agente multimerizante preferido C para uso en la creación de tetrámeros, un grupo biotina. Son agentes multiméricos preferidos D para uso en la creación de tetrámeros avidina, estreptavidina y neutravidina. Es bien conocido en la materia que avidina, estreptavidina y neutravidina tienen cuatro sitios de unión para biotina y que la biotina se une con alta afinidad con cada una de avidina, estreptavidina y neutravidina. Es un espaciador preferido B, para uso en un monómero de estructura A-B-C, un espaciador de polietilenglicol (PEG).

35

En otra realización, el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende la estructura: A-B, donde A comprende un péptido de unión a Tie 2 y B comprende un espaciador, donde la forma multimérica se crea mediante ligamiento covalente de múltiples monómeros peptídicos de unión a Tie 2 a través del espaciador B. Es un espaciador preferido B, para uso en un monómero de estructura A-B, un espaciador de polietilenglicol (PEG).

40

En una realización particularmente preferida, la invención proporciona una composición que comprende una forma tetramérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2, donde el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende la estructura: A-B-C, donde:

45 A comprende un péptido de unión a Tie 2 seleccionado de entre un péptido T7 y un péptido GA3;

B comprende un espaciador de polietilenglicol; y

C comprende un grupo biotina,

50 donde se asocian cuatro copias de A-B-C con un agente tetramérico D, creando la forma tetramérica, estando seleccionado el agente tetramérico D de entre el grupo consistente en avidina, estreptavidina y neutravidina. Es un ejemplo específico de esta realización el compuesto vasculotida (descrito con detalle en el Ejemplo), en que A comprende un péptido T7, B comprende un espaciador de polietilenglicol y C comprende un grupo biotina, y donde la vasculotida multimérica comprende avidina como agente tetramérico D.

55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un monómero peptídico de unión a Tie 2, comprendiendo el monómero peptídico de unión a Tie 2 una estructura A-B-C, donde:

A comprende un péptido de unión a Tie 2;

B comprende un espaciador; y

C comprende un grupo multimerizante.

Preferiblemente, el péptido de unión a Tie 2 A comprende un péptido T7 o un péptido GA3. Como alternativa, el péptido de unión a Tie 2 puede comprender, por ejemplo, un péptido T8, un péptido T6 o un péptido T4.

5 Preferiblemente, el espaciador B comprende un espaciador de polietilenglicol. Preferiblemente, el grupo multimerizante C comprende un grupo biotina.

En una realización preferida, la forma multimérica de la invención comprende un dímero peptídico que comprende:

(a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica y (c) un resto de ligamiento que conecta dichas primera y segunda cadenas peptídicas, donde dicho dímero peptídico se une a y activa el receptor Tie 2. Preferiblemente, la primera cadena peptídica es un péptido T7. Preferiblemente, la segunda cadena peptídica es un péptido T7. Más preferiblemente, tanto la primera cadena como la segunda cadena peptídicas son péptidos T7. Como alternativa, la primera y la segunda cadenas peptídicas pueden seleccionarse independientemente de entre el grupo consistente en un péptido T7, un péptido GA3, un péptido T4, un péptido T6 y un péptido T8, aunque preferiblemente la primera y segunda cadenas peptídicas son ambas del mismo tipo de cadena peptídica. Se describen con más detalle a continuación péptidos de unión a Tie 2 adicionales que pueden usarse.

Preferiblemente, el resto de ligamiento comprende uno o más polímeros hidrosolubles unidos covalentemente a la primera cadena peptídica y a la segunda cadena peptídica. Más preferiblemente, el uno o más polímeros hidrosolubles son polímeros lineales. En una realización preferida, el polímero hidrosoluble es un polietilenglicol (PEG) (p.ej., una molécula de PEG lineal). Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 20.000 Da. Más preferiblemente, el PEG lineal tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 Da a aproximadamente 10.000 Da. En diversas realizaciones, el PEG lineal tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 3.400 Da, aproximadamente 5.000 Da o aproximadamente 10.000 Da. Se entiende que, en una preparación dada de PEG, los pesos moleculares variarán típicamente entre las moléculas individuales. Algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular expresado. Dicha variación se refleja generalmente por el uso de la palabra "aproximadamente" para describir los pesos moleculares de las moléculas de PEG.

30 Como se demuestra en el Ejemplo 11, los dímeros T7-PEG que comprenden PEG que tiene un peso molecular de 10.000 Da exhibían una activación efectiva de Tie 2 y de las rutas posteriores (p.ej., MAPK, AKT) *in vivo*, mientras que los dímeros T7-PEG que comprenden PEG que tiene un peso molecular de 20.000 Da no activaban efectivamente Tie 2 ni las rutas posteriores, indicando que el ligador de PEG más largo daba como resultado un dímero en que las dos cadenas peptídicas estaban espaciadas demasiado separadas para una activación óptima de Tie 2 y, por tanto, los ligadores más cortos pueden ser preferibles para resultados óptimos. Por consiguiente, se prefieren dímeros que utilizan un ligador de PEG lineal que tiene un peso molecular menor de aproximadamente 20.000 Da, más preferiblemente que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 Da a aproximadamente 10.000 Da.

40 En otra realización, la forma multimérica de la invención comprende un tetrámero peptídico que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; (c) una tercera cadena peptídica; (d) una cuarta cadena peptídica y (e) un resto de ligamiento que conecta dichas primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas, donde dicho tetrámero peptídico se une a e inactiva el receptor Tie 2. Preferiblemente, la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas son péptidos T7. Como alternativa, la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas pueden seleccionarse independientemente de entre el grupo consistente en un péptido T7, un péptido GA3, un péptido T4, un péptido T6 y un péptido T8, aunque preferiblemente la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas son todas del mismo tipo de cadena peptídica. Se describen con más detalle anteriormente péptidos de unión a Tie 2 adicionales que pueden usarse.

50 Preferiblemente, el resto de ligamiento comprende uno o más polímeros hidrosolubles unidos covalentemente a la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas. Más preferiblemente, el uno más polímeros hidrosolubles son polímeros de cadena ramificada. En una realización preferida, el polímero hidrosoluble es un polietilenglicol (PEG) (p.ej. una molécula de PEG de cadena ramificada). Como se demuestra en el Ejemplo 11, un tetrámero T7-PEG que utiliza un ligador de PEG tetramérico de cadena ramificada que tiene un peso molecular de 20.000 Da era efectivo para activar Tie 2 y las rutas posteriores (p.ej., MAPK, AKT) *in vivo*. Preferiblemente, el PEG ramificado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 Da a aproximadamente 20.000 Da. En diversas realizaciones, el PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 3.400 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 10.000 Da o aproximadamente 20.000 Da. Se entiende que, en una preparación dada de PEG, los pesos moleculares variarán típicamente entre las moléculas individuales. Algunas

moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular expresado. Dicha variación se refleja generalmente por el uso de la palabra "aproximadamente" para describir los pesos moleculares de las moléculas de PEG.

En los dímeros que contienen PEG, se enlaza simultáneamente un resto de PEG único, preferiblemente lineal, con los extremos (p.ej. los extremos N) de ambas cadenas peptídicas del dímero peptídico. En los tetrámeros que contienen PEG, se enlaza simultáneamente un único resto de PEG de cadena ramificada con los extremos (p.ej., los extremos N) de las cuatro cadenas peptídicas del tetrámero peptídico. Dichos dímeros y tetrámeros peptídicos se ilustran esquemáticamente en la Figura 6. Para preparar los compuestos diméricos y tetraméricos que contienen PEG descritos anteriormente, pueden hacerse reaccionar péptidos de unión a Tie 2 con ligadores de PEG activados (p.ej., PEG-dimaleimida para la preparación de dímeros, PEG-tetramaleimida para la preparación de tetrámeros) como se describe con detalle en el Ejemplo 9. Dichos ligadores de PEG activados (de cadena lineal o ramificada) están comercialmente disponibles (p.ej., de NOF America Corporation).

Además de los dímeros y tetrámeros descritos anteriormente, la invención engloba otras formas multiméricas que comprenden dos o más péptidos de unión a Tie 2 ligados por un resto de ligamiento, tales como aquellos que contienen 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 péptidos de unión a Tie 2 ligados covalentemente con un resto de ligamiento, preferiblemente un resto de ligamiento ramificado tal como una molécula de PEG de cadena ramificada. Dichas formas multiméricas alternativas pueden prepararse como se describe para dímeros y tetrámeros, usando restos de ligamiento que tienen el número apropiado de extremos reactivos (p.ej., seis extremos reactivos para un multímero que contiene seis cadenas peptídicas) y la relación apropiada de péptido a ligador (p.ej., 6:1 para un multímero que contiene seis cadenas peptídicas).

Aunque los ligadores de PEG son ligadores poliméricos hidrosolubles preferidos de la invención, los ligadores poliméricos hidrosolubles alternativos incluyen, pero sin limitación, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno y polioles polioxietilados. Para dímeros peptídicos, preferiblemente el ligador polimérico tiene un peso molecular de menos de 20.000 Da y más preferiblemente tiene un peso molecular de 10.000 Da. Para tetrámeros peptídicos, preferiblemente el ligador polimérico tiene un peso molecular de 20.000 Da.

Además de polímeros hidrosolubles, pueden usarse otros tipos de restos de ligamiento conocidos en la materia para unir las cadenas peptídicas en los multímeros (p.ej., dos cadenas peptídicas en el dímero, cuatro cadenas peptídicas en el tetrámero). Los ejemplos no limitantes de restos de ligamiento adecuados adicionales que pueden usarse para unir múltiples cadenas peptídicas formando multímeros incluyen aquellos descritos en la publicación de EE.UU. 20070104704 y la publicación de EE.UU. 20070027074, cuyos contenidos completos de ambas se incorporan expresamente a la presente memoria como referencia.

Se describe también una composición que comprende un monómero peptídico de unión a Tie 2 que comprende una estructura A-B, donde:

A comprende un péptido de unión a Tie 2 y
B comprende un espaciador.

Preferiblemente, el péptido de unión a Tie 2 A comprende un péptido T7 o un péptido GA3. Como alternativa, el péptido de unión a Tie 2 puede comprender, por ejemplo, un péptido T8, un péptido T6 o un péptido T4. Preferiblemente, el espaciador B comprende un espaciador de polietilenglicol.

La divulgación proporciona también kits que comprenden una o más composiciones de la invención, preferiblemente envasadas con instrucciones para el uso del kit. Por ejemplo, en una realización preferida, la invención proporciona un kit que comprende un monómero peptídico de unión a Tie 2 que comprende la estructura A-B-C, donde

A comprende un péptido de unión a Tie 2,
B comprende un espaciador y
C comprende un grupo multimerizante;

envasados junto con un agente multimérico D, donde C tiene afinidad por D, y donde D comprende múltiples sitios de unión para C. Los ejemplos preferidos de A, B, C y D son como se describen anteriormente en la presente memoria. Preferiblemente, el kit se envasa con instrucciones para crear una forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 combinando la composición monomérica con los agentes multiméricos de tal modo que se produzca una forma multimérica del monómero.

La divulgación proporciona un kit que comprende un monómero peptídico de unión a Tie 2 que comprende la estructura A-B, donde

A comprende un péptido de unión a Tie 2 y

5 B comprende un espaciador;

envasados junto con instrucciones para crear una forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 mediante multimerización a través del espaciador B. Opcionalmente, el kit puede contener uno o más reactivos que facilitan la multimerización a través de B. Los ejemplos preferidos de A y B son como se describen anteriormente en la presente memoria.

10

II. Propiedades características de las formas multiméricas de monómeros peptídicos de unión a Tie 2

Las formas multiméricas de monómeros peptídicos de unión a Tie 2 proporcionadas por la invención exhiben actividad agonista de Tie 2. Esta actividad agonista de Tie 2 puede detectarse usando indicadores de la activación de Tie 2 que están bien establecidos en la materia y que se describen con detalle en los Ejemplos. Por ejemplo, una forma multimérica de la invención puede estimular la fosforilación de Tie 2 (p.ej., fosforilación en el residuo aminoacídico Y992 de Tie 2 humano). Además, una forma multimérica de la invención puede estimular la fosforilación de una molécula en una ruta de señalización posterior a Tie 2, tal como la fosforilación de MAPK, AKT (p.ej., fosforilación en el residuo aminoacídico S473 de AKT humana) y/o eNOS (p.ej., fosforilación en el residuo aminoacídico S1177 de eNOS). En realizaciones particulares, una forma multimérica de la invención no estimula la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) (p.ej., la fosforilación en el residuo aminoacídico Y397 de FAK humana), lo que diferencia la forma multimérica de la Ang 1 nativa, que se ha mostrado que activa FAK de manera independiente de Tie 2. La capacidad de una forma multimérica de estimular la fosforilación de proteínas particulares puede determinarse usando técnicas estándares bien conocidas en la materia, tales como ensayos de inmunotransferencia de lisados celulares tratados con la forma multimérica, como se describe con detalle en el Ejemplo 3.

En realizaciones preferidas, una forma multimérica de la invención tiene efectos demostrables sobre células endoteliales. Por ejemplo, una forma multimérica de la invención tiene preferiblemente al menos un efecto sobre células endoteliales seleccionado de entre el grupo consistente en: estimulación de la migración de células endoteliales, estimulación de la liberación de MMP2 de células endoteliales y protección de las células endoteliales de la apoptosis inducida por la retirada de suero. Más preferiblemente, una forma multimérica de la invención tiene al menos dos de estos efectos sobre células endoteliales, y aún más preferiblemente tiene los tres de estos efectos sobre células endoteliales. La capacidad de una forma multimérica de tener cualquiera de estos efectos sobre células endoteliales puede determinarse usando ensayos conocidos en la materia, tales como un ensayo de cámara de Boyden para valorar la migración celular, un ensayo de zimografía para valorar la liberación de MMP2 o un ensayo de ELISA de muerte celular para valorar la apoptosis inducida por la retirada de suero. Dichos ensayos se describen con detalle en el Ejemplo 4.

En realizaciones preferidas, una forma multimérica de la invención tiene efectos demostrables sobre la angiogénesis, como se mide en un ensayo de angiogénesis *in vitro* o *in vivo*. Es un ensayo preferido un ensayo de Matrigel *in vivo* (descrito con detalle en el Ejemplo 5), en que se impregna Matrigel reducido con factor de crecimiento con la forma multimérica y se inyecta por vía subcutánea en un animal de prueba. Después de un periodo de tiempo (p.ej., 14 días), el animal de prueba puede tratarse con un agente que facilite la identificación y cuantificación de vasos (p.ej., FITC-lectina) y el tapón de Matrigel puede retirarse y examinarse la respuesta angiogénica. Como se demuestra en el Ejemplo 5, una forma multimérica de la invención es capaz de inducir una respuesta angiogénica robusta, como se prueba por grandes vasos bien ramificados que contienen un espectro continuo de arteriolas pequeñas y grandes y vénulas y que se tiñe positivamente con el marcador de células de soporte miogénico Sma I. De forma significativa, las formas multiméricas de la invención pueden estimular una respuesta angiogénica en un ensayo *in vivo* (p.ej., ensayo de Matrigel) que exhibe patrones de ramificación más organizados y menos sinuosidad que la respuesta angiogénica estimulada por VEGF. Es más, las formas multiméricas preferidas de la invención, cuando se usan en combinación con VEGF, pueden disminuir el nivel de sinuosidad de vasos que se observa con el tratamiento con VEGF solo.

En realizaciones preferidas, una forma multimérica de la invención puede estimular la curación de heridas en un sujeto cuando se aplica por vía tópica a una herida del sujeto. La capacidad de la forma multimérica de estimular la curación de heridas puede valorarse en un modelo animal, tal como la cepa B6.Cg-m(+/+)Lepr(db)/J (db/db) de ratón, una cepa diabética de ratón que presenta una curación de heridas alterada. Puede hacerse una herida por escisión en el ratón, la forma multimérica, incorporada a una formulación tópica, puede aplicarse a la herida y puede

valorarse la curación de herida como se describe en el Ejemplo 6. Las formas multiméricas preferidas de la invención pueden acelerar los tiempos de cierre de herida y/o pueden promover aumentos de la deposición de colágeno y neovascularización.

5 III. Preparación de formas multiméricas de monómeros peptídicos de unión a Tie 2

La preparación de una forma multimérica de la invención implica típicamente al menos dos etapas: primero, la preparación del monómero peptídico de unión a Tie 2 y, segundo, la multimerización del monómero para crear la forma multimérica.

10

El péptido de unión a Tie 2 contenido en el monómero puede prepararse mediante uno de los muchos procedimientos conocidos en la materia para síntesis peptídica, incluyendo pero sin limitación la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) y la síntesis peptídica en fase líquida (LPPS). Las dos químicas más comunes usadas en la síntesis peptídica son Fmoc y Boc; cada química tiene sus propias características de protección de cadena lateral que permiten una desprotección selectiva de las cadenas laterales para modificaciones después de la síntesis. Para SPPS, puede encontrarse un resumen de muchas técnicas en J.M. Stewart y J.D. Young, *"Solid Phase Peptide Synthesis"*. W.F.I. Freeman Co. (San Francisco) 1963 y J. Meienhofer, *"Hormonal Proteins and Peptides"*, vol. 2, pág. 46, Academic Press (Nueva York), 1973. Es un procedimiento de síntesis peptídica preferido el Fmoc-SPPS, cuyo resumen reciente puede encontrarse en W. Chan, *"Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach"*. Oxford University Press (Reino Unido) 1999. Los péptidos pueden sintetizarse usando un sintetizador peptídico automático, tal como el sintetizador peptídico ABI433A de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.).

15

20

Además de contener la secuencia aminoacídica que interacciona con el receptor Tie 2, el péptido de unión a Tie 2 puede modificarse para contener uno o más residuos aminoacídicos adicionales que funcionan facilitando la modificación adicional del péptido. Por ejemplo, puede añadirse un residuo de cisteína aminoterminal durante la síntesis a la secuencia del péptido de unión a Tie 2, proporcionando un grupo sulfhidrilo reactivo que permita el enlazamiento de uno o más restos químicos adicionales a través del grupo sulfhidrilo. Resultará evidente para el especialista en la materia que pueden efectuarse diversas otras modificaciones químicas del péptido para crear un grupo reactivo que pueda usarse para ligar restos químicos al péptido. Por ejemplo, el péptido puede modificarse durante la síntesis para contener un residuo de lisina aminoterminal que proporcione un grupo amino primario reactivo que permita el enlazamiento de uno o más restos químicos adicionales a través del grupo amina primario. Como alternativa, el péptido puede modificarse durante la síntesis para contener un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico aminoterminal que proporcione un grupo carboxilo reactivo que permita el enlazamiento de uno o más restos químicos adicionales a través del grupo carboxilo. Preferiblemente, la modificación química del péptido se lleva a cabo en el extremo aminoterminal o carboxiterminal del péptido para minimizar cualquier posible interferencia con la porción de unión a Tie 2 del péptido.

25

30

35

Como se discute anteriormente, el monómero peptídico de unión a Tie 2 puede incluir otros restos químicos además del péptido de unión a Tie 2, tales como un resto espaciador y/o un grupo multimerizante, pudiendo enlazarse dichos restos químicos adicionales usando reacciones químicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, un péptido de unión a Tie 2 que contiene un grupo sulfhidrilo reactivo (p.ej., un residuo de cisteína aminoterminal) puede hacerse reaccionar con un grupo maleimida que está ligado a uno o más restos químicos adicionales de interés, ligando así los restos químicos adicionales al péptido de unión a Tie 2. Los ejemplos no limitantes de reactivos comercialmente disponibles que pueden usarse para ligar un grupo espaciador y un grupo multimerizante con un péptido que tiene un grupo sulfhidrilo reactivo incluyen maleimida-PEO₂-biotina y maleimida-PEO₁₁-biotina (Pierce Chemical, Rockford, IL, EE.UU.). Los ejemplos no limitantes de reactivos comercialmente disponibles que pueden usarse para ligar un grupo espaciador y un grupo multimerizante con un péptido que tiene un grupo amina primario reactivo incluyen NHS-PEO₄-biotina, NHS-PEO₁₂-biotina y NHS-SS-biotina (Pierce Chemical, Rockford, IL, EE.UU.). Los ejemplos no limitantes de reactivos comercialmente disponibles que pueden usarse para ligar un grupo espaciador y un grupo multimerizante con un péptido que tiene un grupo carboxilo reactivo incluyen amina-PEO₂-biotina y biotina-PEO-LC- amina (Pierce Chemical, Rockford, IL, EE.UU.). Otros ejemplos de reactivos adecuados para ligar un reactivo espaciador-biotina con un péptido de unión a Tie 2 a través de un grupo sulfhidrilo reactivo, grupo amina primario o grupo carboxilo se exponen en la subsección I anterior.

45

50

55

La divulgación proporciona un procedimiento de elaboración de un monómero peptídico de unión a Tie 2 que comprende la estructura: A-B-C, donde:

A comprende un péptido de unión a Tie 2,

B comprende un espaciador de polietilenglicol y

C comprende un grupo biotina;

comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un péptido de unión a Tie 2 que comprende un residuo aminoacídico aminoterminal que comprende un primer grupo reactivo con un reactivo que comprende la estructura: segundo grupo reactivo-B-C, donde el primer grupo reactivo reacciona con el segundo grupo reactivo formando A-B-

5 C. Por ejemplo, el primer grupo reactivo puede ser un grupo sulfhidrilo (p.ej., el residuo aminoacídico aminoterminal del péptido puede ser un residuo de cisteína) y el segundo grupo reactivo puede ser un grupo maleimida. Otros ejemplos adecuados de primer y segundo grupos reactivos se describen anteriormente con respecto a los reactivos espaciadores comercialmente disponibles adecuados.

10 La divulgación proporciona también un procedimiento de elaboración de un monómero peptídico de unión a Tie 2 que comprende la estructura A-B, donde:

A comprende un péptido de unión a Tie 2 y

B comprende un espaciador de polietilenglicol;

15 comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un péptido de unión a Tie 2 que comprende un residuo aminoacídico aminoterminal que comprende un primer grupo reactivo con un reactivo que comprende la estructura: segundo grupo reactivo-B, formando A-B. Por ejemplo, el primer grupo reactivo puede ser un grupo sulfhidrilo (p.ej., el residuo aminoacídico aminoterminal del péptido puede ser un residuo de cisteína) y el segundo grupo reactivo puede ser un grupo maleimida. Otros ejemplos adecuados de primer y segundo grupos reactivos se describen

20 anteriormente con respecto a los reactivos espaciadores comercialmente disponibles adecuados.

Para crear las formas multiméricas de los monómeros peptídicos de unión a Tie 2 de la invención, se ligan conjuntamente múltiples copias de los monómeros para multimerizar así los monómeros. La multimerización puede lograrse mediante uno de los varios procedimientos posibles. Por ejemplo, para monómeros que comprenden un

25 grupo multimerizante (p.ej., monómeros de estructura A-B-C), los monómeros pueden combinarse con un agente multimérico que tiene afinidad por el grupo multimerizante y que tiene múltiples sitios de unión para el grupo multimerizante. Dependiendo del número de sitios de unión que tenga el agente multimérico, la relación de monómero a agente multimérico puede ajustarse en consecuencia. Por ejemplo, cuando el grupo multimerizante es

30 biotina y el agente multimérico es avidina, estreptavidina o neutravidina (cada una de las cuales tiene cuatro sitios de unión para biotina), la relación de monómero a agente multimérico puede seleccionarse como 4:1. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento preferido de elaboración de una forma tetramérica de un monómero

35 peptídico de unión a Tie 2 de estructura A-B-C, donde A es un péptido de unión a Tie 2, B es un espaciador y C es biotina, comprendiendo el procedimiento combinar el monómero peptídico de unión a Tie 2 A-B-C con un agente tetramérico D a una relación 4:1; estando seleccionado el agente tetramérico D de entre el grupo consistente en

avidina, estreptavidina y neutravidina.

En una realización alternativa, pueden combinarse relaciones diferentes de monómero (p.ej., A-B-C) y agentes multiméricos (p.ej. D) para crear multímeros que tengan diferentes números de unidades monoméricas. Por tanto, cuando el agente multimérico es un tetrámero, puede usarse una relación 4:1 de monómero a agente multimérico

40 para conseguir multímeros tetraméricos, pero pueden usarse también relaciones menores para conseguir trímeros o dímeros. Más específicamente, puede usarse una relación 3:1 de monómeros a agente multimérico para conseguir trímeros y puede usarse una relación 2:1 de monómeros a agente multimérico para conseguir dímeros. Preferiblemente, después de combinar monómeros y agente multimérico, se llevan a cabo una o más etapas de

45 purificación para purificar la forma multimérica deseada y/o para retirar los monómeros no unidos. Los ejemplos no limitantes de técnicas de purificación que pueden usarse para aislar la especie multimérica deseada incluyen HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de avidina en agarosa (para retirar los monómeros no unidos

ligados a un grupo multimerizante de biotina).

Para monómeros que tienen la estructura A-B, donde A es un péptido de unión a Tie 2 y B es un espaciador, puede lograrse la multimerización mediante ligamiento covalente o asociación no covalente de múltiples copias del

50 monómero a través del espaciador B. Por ejemplo, pueden hacerse reaccionar espaciadores de PEG activados ramificados (comercialmente disponibles en NOF Corporation, Tokio, Japón) con múltiples copias del monómero, creando la estructura multimérica. Están disponibles numerosos grupos reactivos adecuados con los que pueden activarse el espaciador de brazo ramificado incluyendo, pero sin limitación, maleimida, amina, glutaril-NHS,

55 carboximetil-NHS, carbonato y aldehído. Después de la reacción del monómero con el espaciador de brazo ramificado, preferiblemente se llevan a cabo una o más etapas de purificación para purificar la forma multimérica deseada y/o para retirar los monómeros no unidos, como se describe anteriormente.

IV. Procedimientos de detección de una composición que comprende un péptido de unión a Tie 2

- Se describe también un procedimiento de detección de las composiciones de la invención que comprenden una forma multimérica del péptido de unión a Tie 2. En el procedimiento de detección, se pone en contacto una composición de la invención con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente con el péptido de unión a Tie 2 contenido en la forma multimérica, de tal modo que se detecte el péptido de unión a Tie 2. Los formatos específicos de ensayo de detección conocidos en la materia que son aplicables a la detección del péptido de unión a Tie 2 incluyen, por ejemplo, ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA). Los anticuerpos monoclonales preferidos para uso en los ensayos son aquellos que se unen específicamente al péptido T7 contenido en formas multiméricas del péptido T7, tales como aquellos descritos en el Ejemplo 12. Los anticuerpos monoclonales que se unen al péptido de unión a Tie 2 (p.ej., T7) pueden prepararse mediante técnicas estándares. La valoración de la unión del anticuerpo monoclonal al péptido de unión a Tie 2 puede efectuarse también mediante técnicas estándares, tales como ELISA, RIA, análisis de transferencia de puntos, análisis de inmunotransferencia, inmunoprecipitación y similares, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 12.
- 15 También se describen composiciones de anticuerpo monoclonal que se unen específicamente al péptido T7. Los ejemplos no limitantes de dichos anticuerpos monoclonales incluyen los anticuerpos secretados por los clones de hibridoma 2C11, 13D4, 3E4 y 4H6 descritos adicionalmente en el Ejemplo 12.

V. Composiciones farmacéuticas y administración de las mismas

- 20 Otro aspecto de la invención atañe a composiciones farmacéuticas que comprenden formas multiméricas de los monómeros peptídicos de unión a Tie 2 de la invención. Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente la forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse para ser adecuados para la vía de administración deseada. Por ejemplo, en una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración tópica. Es un ejemplo no limitante de un portador adecuado para administración tópica IntraSite Gel (comercialmente disponible en Smith & Nephew). En otra realización, el portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración sistémica. Es un ejemplo no limitante de un portador adecuado para administración sistémica (p.ej., intravenosa) la solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- 30 Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración tópica o para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p.ej., por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, concretamente la forma multimérica del monómero de unión a Tie 2, puede recubrirse con un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y que no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase, p.ej., Berge, S. M. *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**: 1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base.

- Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

- 50 Una composición farmacéutica de la invención puede incluir también un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares y (3) agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y

similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

5

Estas composiciones pueden contener también, por ejemplo, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y/o agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser también deseable incluir agentes

10

isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, puede producirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

25

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, en porcentaje, esta cantidad oscilará de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 99 % de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 70 %, lo más preferiblemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 % de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

30

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p.ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo intravenoso único, puede administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria, como se usa en la presente memoria, hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos para tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitaria de la invención está dictada por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular para conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la mezcla farmacéutica tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

45

Para la administración sistémica de la forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2, la dosificación oscilará típicamente de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,001 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 µg/kg, 5 µg/kg, 50 µg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,01-1 mg/kg. Para administración tópica, los intervalos de dosificación ejemplares son de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 5 mg/kg, más preferiblemente de 50 µg/kg a 2 mg/kg, tal como 1 mg/kg.

50

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad de ingrediente activo que sea efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida

55

de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se esté tratando y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Una “dosificación terapéuticamente efectiva” de la forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención da preferiblemente como resultado una angiogénesis aumentada, la estimulación de la curación de heridas o ambas. Un especialista en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

10

Una composición de la presente invención puede administrarse por una o varias vías de administración usando uno o una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Como se apreciará por el especialista en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías preferidas de administración para las formas multiméricas de la invención incluyen vías no parenterales, incluyendo vías de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. Como alternativa, otras vías de administración preferidas incluyen las vías parenterales, incluyendo intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

20

En ciertas realizaciones, las formas multiméricas de los monómeros peptídicos de unión a Tie 2 de la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes que promuevan la angiogénesis y/o estimulen la curación de heridas. Los ejemplos no limitantes de otros agentes con los que pueden combinarse las formas multiméricas de la invención incluyen VEGF, PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF y factor de crecimiento placentario (PLGF).

25

VI. Procedimientos de uso de formas multiméricas de monómeros peptídicos de unión a Tie 2

Se proporcionan composiciones para uso en procedimientos de uso de las formas multiméricas de los monómeros peptídicos de unión a Tie 2 de la invención. Como se discute en la presente memoria, las formas multiméricas tienen actividad agonista de Tie 2. Por consiguiente, las formas multiméricas pueden usarse para activar el receptor Tie 2, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, en una realización, la invención proporciona un procedimiento de activación de un receptor Tie 2 que comprende poner en contacto el receptor Tie 2 con la forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 de tal modo que se active el receptor Tie 2. La activación del receptor Tie 2 puede probarse por cualquiera de numerosos posibles indicadores de la activación de Tie 2 bien establecidos en la materia, incluyendo pero sin limitación, los diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos con detalle en los Ejemplos. En una realización, por ejemplo, la activación del receptor Tie 2 se prueba por la fosforilación del residuo tirosina 992 (Y992) del receptor Tie 2. En otra realización, por ejemplo, la activación del receptor Tie 2 se prueba por la fosforilación de MAPK, AKT o eNOS.

40

Puesto que las formas multiméricas de la invención tienen actividad angiogénica, la invención permite también un procedimiento de estimulación de la angiogénesis en un sitio de un sujeto, donde el procedimiento comprende poner en contacto el sitio con la forma multimérica del monómero peptídico de unión a Tie 2 de tal modo que se estimule la angiogénesis en el sitio del sujeto. En una realización, se pone en contacto la forma multimérica con el sitio por administración tópica de la forma multimérica. En otra realización, se pone en contacto la forma multimérica con el sitio por administración sistémica de la forma multimérica. La angiogénesis puede confirmarse mediante la presencia de una o más características bien establecidas de la angiogénesis. En una realización preferida, la angiogénesis estimulada por la forma multimérica se caracteriza por al menos una de las siguientes propiedades:

45

- 50 a) reclutamiento de células de soporte perivasculares;
b) no filtración de los vasos; y
c) arborización bien definida.

El reclutamiento de células de soporte perivasculares puede demostrarse mediante la detección de un marcador de células de músculo liso, por ejemplo mediante inmunotinción con un anticuerpo contra actina 1 de músculo liso (Sma 1). La no filtración de los vasos puede valorarse usando ensayos de permeabilidad de vasos establecidos en la materia, incluyendo ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. Es un ejemplo no limitante de un ensayo de permeabilidad de vasos *in vivo* el ensayo de Miles, que usa azul de Evan o FITC-albúmina. Como se usa en la presente memoria, los vasos se van a considerar “sin filtración” si el grado de permeabilidad de los vasos es menor que el grado de

55

permeabilidad de los vasos cuyo crecimiento se estimulaba por el tratamiento con VEGF. La arborización bien definida puede demostrarse, por ejemplo, mediante la formación de imágenes de los vasos recién formados y la cuantificación del número de vasos y del número de nodos en un campo de imagen particular (véase el Ejemplo 5 para una descripción más detallada). Se indica una arborización bien definida, por ejemplo, por una ramificación significativa y organizada de los vasos, tal como una angiogénesis en que la relación del número de vasos al número de nodos sea de 1,0:0,5, más preferiblemente de 1,0:0,7 o aún más preferiblemente de 1,0:1,0. Además, la dinámica de flujo de los neovasos puede valorarse usando ultrasonido microDoppler.

En el procedimiento para estimular la angiogénesis, el sitio puede ponerse en contacto con la forma multimérica sola o, como alternativa, el sitio puede ponerse en contacto con uno o más agentes angiogénicos adicionales. Por tanto, en otra realización, el procedimiento de angiogénesis comprende además poner en contacto el sitio en el sujeto con un segundo agente angiogénico. Los ejemplos no limitantes de agentes angiogénicos adicionales que pueden usarse en combinación con las formas multiméricas de la invención incluyen VEGF, PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF y factor de crecimiento placentario (PLGF). Como se demuestra en la presente memoria, se ha mostrado que una forma multimérica de la invención, cuando se usa en combinación con VEGF, reduce la sinuosidad de vasos y la permeabilidad vascular observadas cuando se usa VEGF solo para estimular la angiogénesis. Por tanto, en un procedimiento de angiogénesis preferido de la invención, se usa una forma multimérica de la invención en combinación con VEGF.

Dada la capacidad de las formas multiméricas de la invención de estimular la angiogénesis, las formas multiméricas pueden usarse en una variedad de situaciones clínicas en que sea deseable la promoción de la angiogénesis. Los ejemplos no limitantes de dichas indicaciones incluyen vascularización de tejidos regenerativos, enfermedad isquémica de los miembros, isquemia cerebral, afecciones de inflamación vascular incluyendo arteriosclerosis, necrosis avascular, estimulación del crecimiento capilar y disfunción eréctil.

Además, dada la capacidad de las formas multiméricas de reducir la permeabilidad vascular inducida por otros agentes tales como VEGF, las formas multiméricas pueden usarse clínicamente para contrarrestar la permeabilidad vascular inducida, por ejemplo, por VEGF, radiación, un patógeno u otro evento clínico relevante (p.ej. apoplejía). Se ha reseñado la capacidad de Ang 1 de proteger los vasos frente a la filtración y/o de contrarrestar la permeabilidad endotelial inducida por otros agentes (véanse, p.ej., Thurston, G *et al.* (1999) *Science* 286: 2511-2514; Thurston, G, *et al.* (2000) *Nat. Med.* 6: 460-463; Pizurki, L. *et al.* (2003) *Br. J. Pharmacol.* 139: 329-336; Jho, D. *et al.* (2005) *Circ. Res.* 96: 1282-1290). Además, se ha reseñado que Ang 1 reduce la filtración de vasos sanguíneos cerebrales y promueve la estabilización de vasos angiogénicos en modelos experimentales de apoplejía (Zhang, Z.G. *et al.* (2002) *Neurosci.* 113: 683-687; Zacharek, A. *et al.* (2006) *Neurosci. Lett.* 404: 28-32) para inhibir la degradación de la barrera hematorretiniana (Nambu, H. *et al.* (2004) *Gene Therap.* 11: 865-873) y para inhibir el desprendimiento de retina en un modelo de retinopatía proliferativa (Nambu, H. *et al.* (2005) *J. Cell. Physiol.* 204: 227-235). En vista de los efectos demostrados de las formas multiméricas de la invención sobre la disminución de la permeabilidad vascular, otro aspecto de la invención atañe a un procedimiento de disminución de la permeabilidad vascular en un sitio de vasos filtrantes, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el sitio de vasos filtrantes con una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que disminuya la permeabilidad vascular. Dicho procedimiento puede usarse en una variedad de situaciones clínicas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen apoplejía, degeneración macular, edema macular, edema linfático, degradación de la barrera hematorretiniana, degradación de la barrera hematoencefálica (p.ej., durante tratamiento quimioterapéutico) y normalización de los vasos tumorales para facilitar el suministro de fármacos y aumentar la sensibilidad a la radiación.

Las formas multiméricas de la invención han mostrado también tener un efecto protector sobre las células endoteliales, p.ej. al inhibir la apoptosis de células endoteliales. Se ha reseñado que la capacidad de un agonista de Tie 2 de proteger células endoteliales de los vasos renales mejora la fibrosis renal en un modelo experimental (Kim, W. *et al.* (2006) *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 2474-2483). En vista de los efectos demostrados de las formas multiméricas de la invención en la protección de células endoteliales, otro aspecto de la invención atañe a un procedimiento de protección de células endoteliales, comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células endoteliales con una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que se protejan las células endoteliales. Dicho procedimiento puede usarse en una variedad de situaciones clínicas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen fibrosis renal, apoplejía, degeneración macular y complicaciones diabéticas (p.ej., en riñón, ojo, piel y/o miembros).

Las formas multiméricas de la invención han mostrado también ser efectivas en la estimulación de la curación de heridas. Por consiguiente, en aún otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de estimulación de la

- curación de una herida en un sujeto, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la herida con una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la invención de tal modo que se estimule la curación de la herida en el sujeto. En una realización, se pone en contacto la forma multimérica con la herida por administración tópica de la forma multimérica. En otra realización, se pone en contacto la forma multimérica con la herida por administración sistémica de la forma multimérica. La estimulación de la curación de heridas puede probarse, por ejemplo, por un tiempo de cierre de herida acelerado en comparación con la curación de heridas en ausencia de la forma multimérica, un tejido de granulación aumentado en el sitio de herida en comparación con ningún tratamiento con la forma multimérica y/o una neovascularización potenciada de la herida en comparación con ningún tratamiento con la forma multimérica.
- 10 En una realización preferida, se usa el procedimiento de estimulación de la curación de heridas en el tratamiento de una úlcera diabética. Actualmente, hay 16 millones de personas con diabetes en los EE.UU., con 798.000 nuevos casos reseñados anualmente y una prevalencia de aproximadamente un 6 % de la población. Las estimaciones reseñan que un 10-15 % de los diabéticos desarrollarán úlceras del pie, de los cuales un 14-20 % requerirán
- 15 amputación. La ulceración del pie es precursora de aproximadamente un 85 % de las amputaciones de extremidades inferiores. Como se demuestra en la presente memoria, una forma multimérica de la invención puede estimular la curación de heridas en un modelo animal de úlceras diabéticas cuando se aplica por vía tópica la forma multimérica a la herida (véase el Ejemplo 6).
- 20 En otras realizaciones, la estimulación de la curación de una herida puede usarse en una variedad de situaciones clínicas que implican heridas, incluyendo pero sin limitación, úlceras de decúbito, úlceras de presión, incisiones quirúrgicas, lesiones traumáticas de tejido, quemaduras e injertos cutáneos.

- Las formas multiméricas de la invención pueden incorporarse también a un biomaterial que puede implantarse en un sitio de un sujeto para proporcionar así los efectos de la forma multimérica en ese sitio. Son adecuados para uso biomateriales que proporcionan una matriz o andamiaje. La forma multimérica puede incorporarse sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, tales como VEGF, PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF y factor de crecimiento placentario (PLGF). Los ejemplos no limitantes de biomateriales adecuados incluyen Matrigel, sustitutos cutáneos e hidrogeles de glicosaminoglicanos reticulados (p.ej., como se describe en Riley, C.M. *et al.* (2006) *J. Biomaterials* 27: 5935-5943). Por consiguiente, se describe también una composición de biomaterial en que se incorpora una forma multimérica de la invención, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales. Un material envasado que comprende el biomaterial está también englobado por la invención. El material envasado puede marcarse para uso del biomaterial.
- 30 Se describen además diversos aspectos y realizaciones de la presente invención mediante los siguientes Ejemplos. Los Ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

40 **Ejemplo 1: Preparación de un péptido de unión a Tie 2 tetramérico, vasculotida**

- En este ejemplo, se preparó una forma tetramérica de un péptido de 7 unidades conocido por unirse a Tie 2 usando un sistema de biotina-avidina para agrupar el péptido en forma de tetrámero. El péptido, al que se hace referencia como T7, se ha descrito anteriormente en Toumaire R. *et al.* (2004) *EMBO Reports* 5: 262-267 y tiene una secuencia aminoacídica His-His-His-Arg-His-Ser-Phe (SEQ ID NO: 1).

- El péptido se sintetizó usando síntesis peptídica en fase sólida de Fmoc, un resumen de cuyo procedimiento de síntesis puede encontrarse en W. Chan, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press (RU), 1999. El péptido se sintetizó usando el sintetizador peptídico ABI433A de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.) usando las instrucciones del fabricante con unas pocas modificaciones. Las modificaciones son: 1) se alargó el tiempo de acoplamiento a 17,5 minutos y 2) se sustituyó HBTU por HATU. La resina usada era resina de Wang. Para crear un grupo sulfhidrilo libre en el péptido para modificación adicional, se añadió un residuo de cisteína aminoterminal al péptido de tal modo que la secuencia final del péptido fuera Cys-His-His-Arg-His-Ser-Phe (SEQ ID NO: 2). Los grupos de protección para el residuo de cadena lateral eran: Cys-(tBu), His-(Trt), Arg-(Pbf) y Ser-(tBu). Los derivados aminoacídicos usados aquí eran de forma L para imitar la conformación de plegamiento natural en células de mamífero. El cóctel de escisión usado para escindir el péptido T7 del soporte de resina en fase sólida contenía: 90 % de ácido trifluoroacético (TFA), 8 % de TIPS y 2 % de EDT. Se efectuó la escisión en atmósfera de gas nitrógeno durante 3 horas. Se separaron el cóctel de escisión y la mezcla de resina mediante un embudo Kimax Fritted. Se precipitó entonces el péptido T7 con éter frío y se centrifugó a 2700 x

g durante 5 minutos a 4 °C. Se lavó el sedimento durante un total de 4 veces con éter frío. Se llevó a cabo cada lavado con 30 s de agitación con vórtex y 5 min de centrifugación a 2700 x g a 4 °C. Finalmente, se secó el sedimento de péptido T7 en atmósfera de gas nitrógeno.

- 5 Para crear el tetrámero, se modificó en primer lugar el péptido T7 mediante la adición de un resto de polietilenglicol (PEG) biotinilado-maleimida de 29 angstrom, que se ilustra esquemáticamente en la Figura 1A. Se conjugó la biotina con el péptido T7 usando EZ-link-PEO-maleimida-biotina (número de catálogo de Pierce 21901) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se disolvieron 20 mg de péptido T7 en 5 ml de tampón de conjugación (EDTA 0,001 M, tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4) en un tubo de 15 ml. Se disolvieron 10 mg de EZ-link-PEO-maleimida-biotina en 1 ml de tampón de conjugación, se añadieron entonces a la solución del péptido T7 y se mezclaron mediante 5 segundos de agitación con vórtex. Se envolvió la mezcla en papel de aluminio y se incubó a entre 20-25 °C durante 4 horas, y se almacenó entonces a -20 °C hasta purificación por HPLC.

Se purificó el producto T7-biotina de la mezcla de reacción anterior usando HPLC en fase inversa en las siguientes 15 condiciones:

Columna: Agilent Zorbax Extended-C18 (n.^{os} de cat. 770450-902), 4,6 mm (diámetro interno) x 250 mm (longitud), partículas de 5 micrómetros, tamaño de poro de 80 Å

20 Fase móvil:

A: hidróxido de amonio 20 mM (0,701 g/l) en agua destilada.

B: hidróxido de amonio 20 mM (0,701 g/l) en 90 % de metanol, 10 % de agua destilada.

25 Detección: UV 215 y 280 nm

Se equilibró la columna con 90 % de fase móvil A durante 15 minutos a un caudal de 1 ml por minuto. Se inyectaron 200 microlitros de la mezcla de reacción de conjugación péptido-biotina anterior a tiempo cero de acuerdo con el siguiente esquema de flujo:

30

Tiempo	Caudal	Porcentaje de B (todas las etapas eran isocráticas)
0 minutos	0,2 ml/min	10 %
5 minutos	0,5 ml/min	10 %
10 minutos	1 ml/min	33,1 %
30 minutos	1 ml/min	33,2 %
45 minutos	1 ml/min	33,3 %
60 minutos	1 ml/min	33,4 %
70 minutos	1 ml/min	0 %

Se recogieron los eluyentes en un tubo cada minuto. Se consiguió la elución isocrática de T7-biotina a un 33,3 % de fase móvil B a un tiempo de retención de 49 minutos. Se verificó por espectrometría de masas (EM) que esta fracción contiene un ion original de m/z= 1585,69 (pico monoisotópico protonado una vez). La m/z teórica del 35 producto esperado es de 1585.6894.

El agrupamiento después de la síntesis de este péptido biotinilado-PEG, al que se hace referencia de aquí en adelante como vasculotida, con avidina a una relación 4:1 (vasculotida:avidina) daba lugar a un compuesto tetramérico obligado.

40

Ejemplo 2: Caracterización de la unión de Tie 2 a vasculotida

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de la vasculotida de unirse al receptor Tie 2, a pesar de las modificaciones genomanipuladas, en un ensayo de interacción y precipitación *in vitro*. En el ensayo de interacción y precipitación, se preparó un lisado celular de células endoteliales EaHy926 (que expresan altos niveles de Tie 2) en tampón de lisis Phospho Lipase C_γ (tampón Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 10 % de glicerol, 1 % de Triton X-100, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1,0 mM, NaPPi 10 mM, NaF 100 nM, Na₃VO₄ 2 mM, 1x aprotinina, 1x leupeptina y 1x PMSF). Se mezcló el lisado celular completo con vasculotida biotinilada no agrupada o péptido irrelevante biotinilado. Se aislaron entonces los péptidos biotinilados con avidina-agarosa y se ensayó posteriormente su capacidad de precipitar Tie 2

mediante análisis de inmunotransferencia estándar usando anticuerpo anti-Tie 2.

Se muestran los resultados de la inmunotransferencia en la Figura 1B. Los resultados demostraban que, cuando se purifica usando resina de agarosa con avidina, la vasculotida, pero no un péptido biotinilado irrelevante, era capaz de precipitar Tie 2. La adición de un exceso de 10 veces de vasculotida preagrupada con avidina soluble era capaz de competir por el Tie 2 disponible y era capaz de anular esta interacción (Figura 1B, carril final).

Ejemplo 3: Caracterización de la activación de Tie 2 por vasculotida

10 Habiendo establecido que la vasculotida era capaz de unirse a Tie 2 (véase el Ejemplo 2), se ensayó la capacidad de la vasculotida, cuando se agrupa con avidina a una relación 4:1 (vasculotida:avidina) de activar el receptor Tie 2 examinando varias rutas de señalización posteriores bien establecidas en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Cambrex, Nueva Jersey). Dichas rutas de señalización se describen, por ejemplo, en Kim, I. *et al.* (2000) *Circ. Res.* **9**: 952-959; Fujikawa, K. *et al.* (1999) *Exp. Cell. Res.* **2**: 663-672; Babaei, S. *et al.* (2003) *Am. J. Pathol.* **6**: 1927-1936.

Se hicieron crecer HUVEC en placas de 6 pocillos o 10 cm (Nunc) recubiertas con gelatina (Sigma). Se cultivaron HUVEC en medio de crecimiento F12 que contiene 10 % de suero fetal bovino (FBS), sulfato de heparina 0,1 mg/ml, 1x penicilina, 1x estreptomycin, 1x glutamina, VEGF 10 ng/ml, EGF 10 ng/ml, bFGF 5 ng/ml. Se usaron todas las HUVEC entre las pasadas 3-9.

Se estimularon HUVEC con uno cualquiera de Ang 1 (R&D Systems), vasculotida, avidina o vasculotida agrupada (preagrupada con una relación molar 4:1 de péptido:avidina en PBS durante 2 horas a 4 °C) a diversas dosis. Se efectuaron las estimulaciones con vasculotida en medio de crecimiento que contiene suero completo durante 15 minutos a menos que se indique otra cosa. Se efectuaron las preparaciones de lisado celular y análisis de inmunotransferencia mediante procedimientos estándares. Los anticuerpos usados para inmunotransferencia (en este y/o ejemplos posteriores) eran monoclonal anti-Tie 2 (Pharminogen), policlonal anti-pY992 Tie 2, (Cell Signaling Technology), policlonal anti-MAPK (Cell Signaling Technology), monoclonal anti-fosfoMAPK (Cell Signaling Technology), policlonal anti-AKT (Cell Signaling Technology), policlonal anti-pS473 AKT (Cell Signaling Technology), monoclonal anti-pS1177 eNOS (BD Biosciences), policlonal anti-pY397 FAK (Biosource), policlonal anti-FAK (Santa Cruz), policlonal anticongugado directo de actina de músculo liso-Cy3 (Dako), policlonal anti-PECAM (Pharminogen) y policlonal anti-actina de músculo liso (Sigma).

Se muestran los resultados del análisis de inmunotransferencia en la Figura 1C. El análisis de inmunotransferencia de lisados celulares completos reveló que la vasculotida agrupada activa Tie 2 (pY992 Tie 2) a concentraciones en el intervalo de 20 nM a 750 pM, pareciendo óptimas 5-10 nM. Significativamente, solo cuando se preagrupaba con avidina, era la vasculotida capaz de estimular la fosforilación de Tie 2 (véanse avidina sola y vasculotida no agrupada). Coincidentemente con la activación del receptor, se observó la fosforilación de varias proteínas sensibles a Tie 2 conocidas, incluyendo MAPK, AKT y eNOS.

Paradójicamente, las altas concentraciones de vasculotida agrupada no eran capaces de activar la actividad del receptor Tie 2 en HUVEC (véase vasculotida agrupada 50 nM). Se teorizó que esto era debido al hecho de que las altas relaciones de vasculotida agrupada:Tie 2 disminuirían el agrupamiento de receptor. Para ensayar esta hipótesis, se utilizaron Eahy926 EC, que expresan niveles mucho más altos de Tie 2. Para análisis de inmunotransferencia, se inmunoprecipitó Tie 2 de las células Eahy926 con anticuerpos monoclonales anti-Tie 2 (Pharminogen, clon 33.1) y proteína G-Sepharose (Amersham) y monoclonales anti-pY (Upstate Biotechnology, clon 4G10), de acuerdo con técnicas estándares. Los resultados de esta inmunotransferencia se muestran en la Figura 1D. Usando esta línea celular, se demostró la activación específica del receptor Tie 2 a concentraciones en el intervalo de 200 pM a 750 pM, sugiriendo que la relación de vasculotida agrupada:Tie 2 es crítica para la activación.

Para examinar la cinética de activación de Tie 2, se estimularon HUVEC con Ang 1 nativa o vasculotida agrupada durante diversos tiempos. Se efectuó la estimulación en FBS al 10 %. Se muestran los resultados en la Figura 1E. La vasculotida agrupada a baja concentración (2 nM) se comparaba favorablemente con la estimulación con Ang 1 (400 ng/ml) en su capacidad de activar la fosforilación de Tie 2. Globalmente, la activación del receptor por cualquiera de Ang 1 o vasculotida agrupada seguía un curso temporal muy similar, volviendo la fosforilación a niveles casi basales a veces después de 2 horas. De nuevo, se observaron aumentos notables de pMAPK y pAKT.

Previamente, se ha mostrado que Ang 1 activa la cinasa de adhesión focal (FAK) de manera independiente de Tie 2 mediante implicación directa de la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ (Hu, B. *et al.* (2006) *Cancer. Res.* **2**: 775-783; Kim, I *et al.*

(2000) *Circ. Res.* 9: 952-959; Dallabrida, S. *et al.* (2005) *Circ. Res.* 4: 8-24). Para ensayar si la vasculotida agrupada era capaz de activar este brazo de la cascada de señalización de Ang 1, se examinó la activación de FAK, cuyos resultados se muestran también en la Figura 1E (panel inferior). Como se reseña anteriormente, Ang 1 activaba FAK dependientemente del tiempo, mientras que la vasculotida agrupada no tenía un efecto significativo. Estos resultados sugieren un papel más directo de la vasculotida en el desencadenamiento de la señalización específica de Tie 2.

Para dirigirse más formalmente a la especificidad de la vasculotida agrupada por el receptor Tie 2, se efectuaron experimentos de reconstitución en células de fibroblasto Cos 1 y C166 EC, ambas de las cuales eran fenotípicamente nulas de Tie 2. Se mantuvieron las células Cos 1 y C166 (ATCC) en placas de 10 cm de diámetro (Nunc) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con FBS al 10 %, 1x penicilina, 1x estreptomycinina y L-glutamina 200 mM (todos de Gibco BRL) en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 °C. Se infectaron células Cos1 o C166 (MOI 30) durante una noche con adenovirus que codifican uno cualquiera de proteína fluorescente verde (EGFP) o Tie 2. Se confirmó la eficiencia de la infección por epifluorescencia (EGFP) o por inmunotransferencia (Tie 2).

Las células infectadas con adenovirus recombinante que codifica EGFP o Tie 2 se dejaron sin estimular o se estimularon con vasculotida, vasculotida agrupada o avidina durante 16 horas, después de lo cual se aplicó reactivo MTS a todas las muestras durante 4 horas. Se midió la absorbancia a 492 usando un lector de placas multipocillo (Power Wave X340, Biotek Instruments Inc). Para examinar ampliamente la posibilidad de que la vasculotida agrupada estuviera activando las rutas de señalización posteriores independientemente de Tie 2, se examinó la activación de MAPK y AKT en las células infectadas con EGFP. Se muestran los resultados en la Figura 1F. Ni la vasculotida ni la vasculotida agrupada inducían significativamente la fosforilación de MAPK o AKT en las células infectadas con EGFP anteriores como se apuntaba en muestras no estimuladas. Como se esperaba, la sobreexpresión de Tie 2 en cualquiera de los tipos celulares daba como resultado su activación constitutiva (véase pY992 Tie 2) así como la activación de MAPK y AKT. Este hecho descartaba estimular estas células adicionalmente con vasculotida o vasculotida agrupada. Debido a que MAPK y AKT se activan en gran medida posteriormente en un hospedador de receptores de superficie celular, se razona que estos resultados sugieren en gran medida un papel específico y dependiente de Tie 2 para la vasculotida agrupada en estos eventos.

Ejemplo 4: Efectos de vasculotida sobre la apoptosis y migración de células endoteliales

Ang 1, y en menor medida Ang 2, han mostrado proteger las células endoteliales (EC) de diversas condiciones diferentes inductoras de la apoptosis incluyendo la retirada de suero (Kwak, H *et al.* (1999) *FEBS Lett.* 2-3: 249-253; Harfouche, R. y Hussain, R. (2006) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H1635-1645). Basándose en el hecho de que la vasculotida agrupada activa fuertemente la proteína antiapoptótica AKT (véase el Ejemplo 3), se examinó la capacidad de la vasculotida de proteger EC de la muerte celular inducida por la retirada de suero. Para hacer eso, se mantuvieron HUVEC en medio F12 más 0,1 % de FBS durante 16 horas en presencia de diversas concentraciones de vasculotida no agrupada o agrupada, seguido de análisis de la apoptosis celular mediante ELISA de muerte celular. Se efectuó el análisis de la apoptosis usando Cell Death ELISA Plus (Roche) de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Se muestran los resultados en la Figura 2A, en que se normalizaron los valores a los niveles basales de muerte celular para HUVEC mantenidas en medio F12 completo suplementado con factor de crecimiento con 10 % de FBS. Los resultados mostrados representan la media de tres repeticiones más o menos 1 DE. Se usó la prueba de t de Student para análisis estadístico con el valor de P indicado. Los resultados revelaron una disminución estadísticamente significativa de la apoptosis cuando se trataron EC con vasculotida agrupada a 500 pM ($p=0,002$) en comparación con células no tratadas. La vasculotida no agrupada y la avidina sola no tenían efecto sobre la supervivencia, ilustrando adicionalmente que la vasculotida está solo activa cuando se preagrupa con avidina.

La migración de EC es un evento considerado crítico para la revascularización tras lesión. La migración debe tener lugar de forma coordinada, con las EC respondiendo a señales quimiotácticas del estroma y secretando a su vez las proteasas necesarias para abrir camino a su migración direccional. Estudios anteriores subrayan el papel de Ang 1 en la promoción de la migración de EC y la liberación de la enzima degradante de matriz MMP2 (Kim, I. *et al.* (2000) *Circ. Res.* 9: 952-959; Witzienbichler, B. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 18514-18521). Para ensayar si la vasculotida, como Ang 1, era capaz de promover estos procesos, se ensayó el efecto de la vasculotida sobre la migración de EC usando un ensayo de cámara de Boyden modificado. Se sembraron HUVEC a una densidad de $8,4 \times 10^4$ células en 500 μ l de medio de crecimiento F12 más 0,1 % de FBS en la cámara superior de una cámara de Boyden modificada de tamaño de poro de 8 μ m (Falcon). Se dispusieron en la cámara inferior 500 μ l de medio F12 más 0,1 % de FBS más diversos factores de crecimiento (Ang 1 (R& D Systems), vasculotida agrupada o no

agrupada, VEGF (R&D Systems) o vasculotida agrupada en combinación con VEGF) o controles. Se dejaron migrar las células durante 4 horas en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂. Se rasparon las células no migrantes y se fijaron los filtros con 100 % de metanol durante 5 minutos, se tiñeron con hematoxilina de Harris (BDH) durante 10 minutos y se lavaron dos veces con agua corriente durante 3 minutos cada vez. Se montaron entonces los filtros usando el medio de montaje Aquapolymount. Se puntuaron como positivas de migración las células que habían migrado más de un 50 % del camino a través del poro.

Se muestran los resultados en la Figura 2B. Se usó la prueba de t de Student para ensayar la significancia estadística con un intervalo de confianza del 95 %. Se efectuaron estimulaciones por triplicado y se contaron las células migrantes en 6 campos microscópicos por repetición. Las barras de error mostradas en la Figura 2B representan media +/- DE. Los resultados mostraban que la vasculotida agrupada, a las dos dosis examinadas (2 nM y 10 nM), promovía aumentos significativos en la migración celular quimiotáctica cuando se comparaban con sin tratamiento. La migración apuntada no era significativamente diferente de la observada en muestras tratadas con VEGF o Ang 1. La vasculotida no agrupada no promovía la migración por encima de la observada en la muestra no tratada y la combinación de VEGF y vasculotida tratada no ofrecía ningún efecto adicional más allá del observado para cualquiera de VEGF o vasculotida agrupada solo.

In vivo, las EC no pueden migrar hasta que secretan las enzimas necesarias para degradar los componentes de la matriz extracelular. Se empleó zimografía en gelatina para determinar si la vasculotida agrupada promovía la secreción de MMP2. Para efectuar la zimografía, se cultivaron HUVEC en medio F12 más 0,1 % de FBS y se estimularon durante 16 h con VEGF, vasculotida no agrupada o vasculotida agrupada a diversas concentraciones. Se centrifugó el medio acondicionado para retirar los desechos celulares y se preparó para electroforesis en gel usando condiciones no reductoras. Se lavaron los geles dos veces durante 30 minutos con Triton X-100 al 2,5 % para retirar el dodecilsulfato de sodio y se incubaron entonces en tampón de sustrato (Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8,8, CaCl₂ 5 mmol/l) durante 16 horas a 37 °C. Se tiñeron entonces los geles con 0,5 % de azul de Coomassie en 30 % de metanol/10 % de ácido acético durante 2 horas a temperatura ambiente, y se destiñeron con 50 % de metanol/10 % de ácido acético. Se indicó la presencia de metaloproteinasas mediante zonas proteolíticas no teñidas en el gel. Se muestran los resultados en la Figura 2C. El análisis del medio acondicionado reveló que la gelatina se degradaba dependientemente de la dosis de vasculotida agrupada a un peso molecular que era consistente con las formas pro y activa de MMP2. Tomado en conjunto con los resultados del análisis de migración, este dato indica que la aplicación de vasculotida agrupada puede ofrecer distintas ventajas *in vivo* a las células endoteliales migrantes.

Ejemplo 5: Promoción de la angiogénesis por vasculotida en el ensayo de Matrigel

Para examinar adicionalmente el potencial angiogénico *in vivo* de la vasculotida, se efectuó un ensayo de Matrigel. Más específicamente, se impregnó Matrigel (BD Biosciences) reducido con factor de crecimiento con cualquiera de vasculotida agrupada o uno de varios factores de control diferentes. Se inyectaron estas muestras de Matrigel por vía subcutánea en la región del flanco de ratones CD1 de 3 meses de edad. 14 días después de la implantación e inmediatamente antes del sacrificio, se inyectó IV FITC-lectina (100 µg) y se dejó circular durante 10 minutos para facilitar la identificación y cuantificación de vasos. Se extirparon quirúrgicamente los tapones y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 16 h. Se tomaron imágenes de la topología vascular usando un microscopio de disección Zeiss a 4x aumentos. Tras la fijación, se tiñeron todos los tapones enteros montados con anti-Sma1-Cy3. Se analizaron los tapones con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100 M (Carl Zeiss) para reconstrucción de imagen tridimensional y se procesaron las fotos usando LSM Image Browser y Adobe Photoshop 7.0. Se efectuó la cuantificación morfométrica de las características del vaso esqueletizando proyecciones de imágenes confocales con el kit Image Processing Tool Kit 5.0 (IPTK 5.0). Se usó la prueba de t de Student para ensayar la significancia estadística con un intervalo de confianza del 95 %. Se efectuaron todos los experimentos con tres repeticiones cada uno, con al menos 5 pilas de imágenes aleatorias.

Tras la retirada quirúrgica de los tapones, se observó una respuesta angiogénica nítida y robusta en la cápsula membranosa que rodeaba los tapones impregnados con vasculotida agrupada, VEGF o vasculotida agrupada más VEGF. En el caso de las muestras de vasculotida agrupada, estaban presentes en la superficie vasos claros, grandes y bien arborizados. Estos vasos estaban bien ramificados y contenían un espectro continuo de arteriolas pequeñas y grandes y vénulas. Consistentemente con los informes de la bibliografía (Connolly, D. *et al.* (1989) *J. Clin. Invest.* 5:1470-1478), el crecimiento de vasos promovido por la adición de VEGF solo era evidente, aunque la naturaleza de estos vasos era altamente sinuosa. Los vasos localizados en el tejido proximal circundante de estos tapones parecían también agrandados e inflamados tras el examen. La aplicación de vasculotida agrupada en combinación con VEGF no parecía aumentar la densidad microvascular global, sino que en lugar de ello contribuía a disminuciones en el nivel de sinuosidad observado con VEGF solo.

Para dirigirse más completamente y asignar parámetros de vaso cuantitativos a los diferentes grupos de tratamiento, se fijaron los tapones y se examinaron con análisis de microscopía confocal láser combinado con análisis de imagen postprocesamiento (kit Image Processing Tool Kit 5.0, Reindeer Graphics, NC). Se cuantificaron los parámetros de vaso, incluyendo longitud, número y puntos de ramificación (nodos) en al menos 6 campos representativos. Se efectuó el análisis estadístico mediante la prueba de t de Student no pareada. Se muestran gráficas de barras del número de vasos, longitud de vaso y número de nodos, para cada grupo de tratamiento, en las Figuras 3A, 3B y 3C, respectivamente. Se apunta que la mala perfusión de FITC-lectina en ratones que albergan vasculotida agrupada 20 nM más VEGF evitaba el análisis estadístico, por lo tanto las barras son la media de dos campos separados. Todas las demás barras mostradas representan media +/- DE. Los resultados muestran que no se apuntaba un crecimiento de vaso significativo en tapones que contienen Matrigel o Matrigel impregnado con vasculotida no agrupada. Los tapones que contenían VEGF, vasculotida agrupada o vasculotida agrupada más VEGF exhibían una inducción robusta de la angiogénesis. Estadísticamente, VEGF, vasculotida, o combinación de los mismos no diferían en el número total de vasos, longitud o puntos de ramificación. Como se apuntaba en la cápsula membranosa, las muestras que contenían vasculotida exhibían patrones de ramificación más organizados y menos sinuosidad que los tapones que contenían VEGF solo (sin embargo, estos eran parámetros que no podían cuantificarse específicamente mediante asignación de un valor numérico).

Se ha reseñado que Ang 1 potencia el reclutamiento de células de soporte miogénicas (Suri, C. *et al.* (1996) *Cell* **87**: 1171-1180) e inhibe la permeabilidad vascular inducida por VEGF mediante mecanismos que no son bien entendidos (Thurston, G. *et al.* (2000) *Nat. Med.* **6**: 460-463). Para determinar si la vasculotida, como Ang 1, era capaz de iniciar el reclutamiento de pericitos, se efectuó una inmunofluorescencia de montaje completo frente a actina 1 de músculo liso (Sma1). Los análisis de angiogénesis impulsada por VEGF en tapón de Matrigel revelaron una ausencia relativa de células de tinción positiva con Sma1. Las muestras que contenían vasculotida agrupada sola o en combinación con VEGF exhibían un aumento significativo de la tinción global con Sma 1. La tinción con Sma 1 estaba asociada estrechamente al exterior de los vasos y estaba enriquecida en los vasos mayores. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran potentes efectos angiogénicos *in vivo* de la vasculotida agrupada e indican que, cuando se combina con VEGF, la vasculotida agrupada es capaz de contrarrestar la permeabilidad inducida por VEGF y la formación aberrante de vasos.

30

Ejemplo 6: Curación de heridas por vasculotida administrada por vía tópica

Las heridas crónicas, tales como úlceras del pie neuropáticas o neuroisquémicas, son prevalentes en pacientes diabéticos. Estas heridas pueden surgir por la incapacidad del paciente de sentir la lesión (neuropática) o debido a defectos microvasculares (neuroisquémica). Existen modelos animales de diabetes de tipo II que recuerdan estrechamente los defectos de curación de heridas observados en diabéticos humanos. Aquí, se usaron ratones B6.Cg-m(+/+)Lepr(db)/J (db/db), una cepa de ratones diabéticos que presenta una curación de heridas alterada, para ensayar si la vasculotida agrupada podía mejorar los tiempos de cierre de herida.

Se adquirieron ratones B6.Cg-m(+/+)Lepr(db)/J (db/db) de 9 semanas de edad libres de patógenos en Jackson Laboratories. Se hicieron heridas circulares totalmente excisionales de 6 mm de diámetro, de acuerdo con las directrices de aprobación del comité de experimentación animal, separadas a igual distancia del lado dorsal de los ratones. Se suspendieron varios factores en gel Intrasite Topical estéril (Smith and Nephew) a las concentraciones apuntadas. Los tratamientos fueron como sigue: vehículo n= 8, bFGF (10 µg/ml) n= 8, vasculotida agrupada (20 nM) n= 4, vasculotida agrupada (5 nM) n= 4. Se aplicaron las preparaciones el día 0 (momento de la herida), los días 2, 4 y 6. Se tomaron imágenes estandarizadas los días 0, 2, 4, 6 y 7 usando una cámara Canon EOS digital Rebel. Se usó la imagen J (NIH) para trazar manualmente el perímetro de herida del que se determinaron los recuentos de píxeles totales (área de herida). Se sacrificaron los ratones el día 7, se extirparon los lechos de herida completos, incluyendo el margen, y se fijaron con PFA al 4 %. Se cortaron las heridas a la mitad en el punto más ancho y se preparó cada mitad para secciones de parafina o congeladas. Se procesaron las secciones de cera de acuerdo con los protocolos estándares de tinción H&E y tricrómica de Masson. Se capturaron imágenes usando un microscopio de luz compuesta Leica DMLS y una cámara Pixel Link a 5X y 20X. Se usó la prueba de t de Student para ensayar la significancia estadística.

Se resumen los datos de cierre de herida en la gráfica de barras de la Figura 4A, en que se presentan los datos como recuentos de píxeles de los trazados digitales de los márgenes de la herida con el tiempo. Todas las barras mostradas representan media +/- DE. Se apuntaron disminuciones significativas del margen de herida en las muestras de vasculotida agrupada (20 nM, p=0,05, n=4) tan pronto como el día 2. Coincidentemente con un cierre de herida mejorado, hubo un cambio en la apariencia de las heridas tratadas con vasculotida agrupada. Estas

heridas presentaban una costra de apariencia ligeramente más mucosa. El cierre de margen en las heridas tratadas con vasculotida agrupada continuaba a un ritmo acelerado durante la duración del ensayo. Como era el caso *in vitro*, la vasculotida agrupada aplicada a menor concentración parecía ofrecer más beneficios. Aunque esto parece ser insólito, se apuntaron también resultados similares con la aplicación tópica de Regranex, una preparación tópica de PDGF modificado (Mustoe, T. *et al.* (1994) *Arch. Surg.* 129: 213-219). Además, estos resultados destacan adicionalmente la necesidad de optimizar la relación de vasculotida: Tie 2 para facilitar el agrupamiento apropiado del receptor. Aunque la vasculotida proporcionaba la curación más rápida en puntos temporales tempranos, el día 7 de tratamiento el cierre de herida promovido por bFGF a 10 µg/ml era estadísticamente indistinguible de la vasculotida agrupada a 20 nM o 5 nM.

10

Se examinaron las secciones transversales embebidas en parafina de todas las heridas teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) y tricrómica de Masson por un patólogo para análisis con anonimato independiente. Se muestra en la Figura 4B una microfotografía representativa de las secciones cutáneas teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) y tricrómica de Masson (MT) de heridas tratadas con PBS, bFGF (10 µg/ml) o vasculotida agrupada (5 nM). La tinción con H&E y MT mostraba drásticos aumentos en la producción de tejido de granulación en todas las heridas tratadas con vasculotida. Adicionalmente, la tinción MT revelaba una deposición de colágeno marcada en las muestras tratadas con vasculotida.

15

Para la puntuación histológica, se fijaron las secciones con paraformaldehído al 4 %, se embebieron en parafina y se seccionaron y tiñeron con H&E y tricrómica de Masson. Se evaluaron en las secciones por un patólogo reepitelización, formación de tejido de granulación e inflamación, con criterios usados para puntuar la piel como sigue:

20

Reepitelialización

25

- 0 - ninguna
- 1- mínima (0-20 % de recrecimiento de los márgenes de herida)
- 2- leve (25 a 50 % de recrecimiento)
- 3- moderada (> 50 % de recrecimiento hasta 100 %, pero no > 2 células de grosor en toda la longitud)
- 30 4- recrecimiento completo (epitelio > 1 célula de grosor en toda la longitud, queratinizado)

Tejido de granulación (GT) y neovascularización:

0 – ninguno

35

- 1- mínimo (1-3 islas pequeñas aisladas de GT en los márgenes del defecto)
- 2- leve (islas irregulares multifocales de GT por debajo del defecto de tejido, < 10 nuevos vasos sanguíneos)
- 3- moderado (bandas localmente extensas de GT por debajo de la longitud del defecto)
- 4 – marcado (bandas densas de GT en los márgenes y por debajo de la longitud del defecto con fibrillas de colágeno y numerosos vasos sanguíneos)

40

Inflamación (sin defecto):

0 – ninguna

45

- 1- mínima (unos pocos neutrófilos dispersos en los márgenes del defecto)
- 2- leve (agregados multifocales de hasta 5 neutrófilos por debajo del defecto)
- 3- moderada (agregados multifocales de hasta 10 neutrófilos y macrófagos ocasionales, edema mínimo a leve)
- 4- marcada (infiltrados neutrofilicos densos localmente extensos con números menores de macrófagos, edema leve-moderado)

50

Los resultados de la puntuación histológica se ilustran en la Figura 4C. Las diferencias entre vehículo y bFGF, aunque evidentes en los tiempos de cierre de herida, existían solo al nivel de inflamación (p= 0,0486). La aplicación de vasculotida agrupada daba como resultado una reepitelización retardada (20 nM, p= 0,0004 y 5 nM, p= 0,029) pero promovía profundos aumentos de regeneración y neovascularización (20 nM y 5 nM p= 0,0006). La inflamación apuntada en las muestras de vasculotida agrupada aumentaba solo ligeramente a 20 nM (p= 0,034) y no era significativamente diferente del vehículo a la dosis de 5 nM (p= 0,0979).

55

Los análisis inmunohistoquímicos de las heridas con anticuerpos dirigidos contra PECAM1, ICAM 1, Pan EC, podoplanina y actina de músculo liso demostraban claras diferencias entre las muestras tratadas con vasculotida agrupada y no tratadas. En primer lugar, se apunta que el examen histopatológico de los tejidos teñidos de

tratamientos con vasculotida agrupada 5 nM y 20 nM no revelaba diferencias estadísticamente significativas en los resultados para las dosis de vasculotida usadas. A ambas dosis de vasculotida, se observaban aumentos de las células endoteliales totales (tinción de PECAM), activación de las células endoteliales (tinción de ICAM1) y activación de fibroblastos (tinción de Sma 1) en todas las heridas tratadas con vasculotida. Además, las heridas tratadas con vasculotida agrupada exhibían aumentos drásticos del número de vasos positivos de PECAM 1 y Pan EC en el tejido de granulación. De forma importante, muchos de los nuevos vasos en el tejido de granulación estaban acompañados de células de soporte positivas de SMA. Además, estos vasos eran también positivos de ICAM 1, un marcador de células endoteliales activadas, demostrando que estaba ocurriendo un proceso de curación de herida activo. El aumento de la densidad de vasos no estaba sorprendentemente acompañado de un aumento de la linfangiogénesis, como se detalla por los números similares de vasos positivos de podoplanina. La deposición global de colágeno, como se valora por tinción tricrómica de Masson, aumentaba drásticamente a ambas concentraciones de vasculotida agrupada en comparación con las muestras de vehículo y bFGF. La deposición de colágeno, mediada principalmente por fibroblastos activados, desempeña un papel necesario en la contracción de los márgenes de herida, ofrece resistencia a la tracción, proporciona un andamiaje para la neovascularización y facilita la señalización celular para las células migrantes a través de la implicación de integrina. Basándose en análisis patológicos e inmunohistoquímicos, se concluye que los tiempos de cierre de herida mejorados apuntados en las muestras de vasculotida agrupada son una consecuencia probable de los fuertes efectos de contracción causados por los aumentos en la deposición de colágeno y neovascularización.

20 **Ejemplo 7: Administración sistémica de vasculotida**

En este ejemplo, se examinó el efecto de la vasculotida administrada por vía sistémica sobre las células endoteliales en circulación. Se inyectaron en ratones CD1 de tres meses de edad por vía intravenosa PBS (vehículo) o 50 µg de vasculotida agrupada. 24 horas después de la inyección, se recogió sangre periférica con heparina mediante punción cardíaca y se clasificaron las células endoteliales en circulación (CEC) no hematopoyéticas usando un enfoque FACS de cuatro canales. Se definieron las CEC como CD13⁺/VEGFR-2⁺/CD45⁻ viables (yoduro de propidio). Los números de células reseñados son números de células viables/µl de sangre periférica. Se determinó también el recuento de glóbulos blancos totales usando un hemocitómetro.

Los resultados demostraban que el suministro sistémico de vasculotida estaba bien tolerado y daba como resultado una disminución del número de células endoteliales en circulación. Esto se ha descrito también para Ang 1 suministrada por infección adenovírica, sugiriendo que la vasculotida tiene propiedades similares en el nicho de citoblastos que Ang 1.

35 **Ejemplo 8: Agonista de Tie 2 multimérico que comprende un péptido GA3**

En este ejemplo, se preparó una forma alternativa de molécula de vasculotida en que se usó un péptido GA3 en lugar de un péptido T7. La secuencia aminoacídica del péptido GA3 era como sigue: Trp-Thr-Ile-Ile-Gln-Arg-Arg-Glu-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Phe-Gln-Arg-Thr-Trp-Lys-Glu-Tyr-Lys (SEQ ID NO: 3). Para facilitar la modificación adicional del péptido, se sintetizó como se describe en el Ejemplo 1, con un residuo de cisteína aminoterminal adicional de tal modo que la secuencia aminoacídica del péptido usado en la forma multimérica fuera como sigue: Cys-Trp-Thr-Ile-Ile-Gln-Arg-Arg-Glu-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Phe-Gln-Arg-Thr-Trp-Lys-Glu-Tyr-Lys (SEQ ID NO: 4). Se conjugó el péptido que contiene cisteína con biotina usando EZ-link-PEO-maleimida-biotina (número de catálogo de Pierce 21901) como se describe en el Ejemplo 1. El agrupamiento después de la síntesis de este péptido biotinilado-PEG con avidina a relación 4:1 daba lugar a un compuesto tetramérico obligado

El compuesto que contiene GA3 tetramérico se ensayó en el ensayo de migración de células endoteliales como se describe con detalle en el Ejemplo 4. Se muestran los resultados en la Figura 5A, que demuestran que el compuesto que contiene GA3 tetramérico era efectivo en la promoción de la migración de células endoteliales.

El compuesto que contiene GA3 tetramérico se ensayó también en el ensayo de zimografía como se describe con detalle en el Ejemplo 4. Se muestran los resultados en la Figura 5B, que demuestran que el compuesto que contiene GA3 tetramérico era efectivo en la promoción de la liberación de MMP2.

Estos resultados demuestran la actividad agonista de un compuesto que contiene un segundo péptido de unión a Tie 2 multimérico, donde el compuesto contiene un péptido GA3 en lugar de un péptido T7.

Ejemplo 9: Preparación de agonistas de Tie 2 multiméricos ligados a PEG

En este ejemplo, se prepararon agonistas de Tie 2 multiméricos usando ligadores de polietilenglicol (PEG) para unir covalentemente los componentes peptídicos de los agonistas. Se prepararon tres agonistas de Tie 2 ligados a PEG diferentes: (i) un agonista en que se unieron dos péptidos T7 usando un ligador de PEG de 10.000 Da de PM; (ii) un agonista en que se unieron dos péptidos T7 usando un ligador de PEG de 20.000 Da de PM y (iii) un agonista en que se unieron cuatro péptidos T7 usando un ligador de PEG tetramérico de 20.000 Da de PM. Para preparar estas moléculas, se adquirieron PEG de brazo ramificado activado en NOF America. Los PEG usados en este ejemplo fueron Sunbright DE-100MA (PEG-dimaleimida de PM 10.000 Da, actividad terminal 79 %), Sunbright DE-200MA (PEG-dimaleimida de PM 20.000 Da, actividad terminal 85,1 %) y Sunbright PTE-200MA (PEG-tetramaleimida de PM 20.000 Da, actividad terminal 94 %). Se hizo reaccionar el péptido T7 con PEG activados como sigue: en el caso de los dos dimaleimida-PEG, se disolvieron exactamente dos equivalentes molares de péptido T7 y 1 equivalente molar de dimaleimida-PEG en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,2. En el caso de tetramaleimida-PEG, se disolvieron exactamente cuatro equivalentes molares de péptido T7 y 1 equivalente molar de tetramaleimida-PEG en PBS a pH 7,2. Se dejaron proseguir las reacciones a 21 °C durante 16 horas. Se ilustran esquemáticamente en la Figura 6 las estructuras de los agonistas de Tie 2 multiméricos resultantes. Se hace referencia en la presente memoria a estos agonistas de Tie 2 multiméricos que contienen péptido T7 ligados a PEG como PEG-T7 vasculotida.

Ejemplo 10: Caracterización de la activación de Tie 2 por PEG-vasculotida

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los compuestos de PEG-T7 vasculotida, preparados como se describe en el Ejemplo 9, de activar el receptor Tie 2 en un ensayo de activación de Tie 2 *in vitro*. Se usaron compuestos de PEG-T7 vasculotida en estimulaciones de células endoteliales como sigue. Se hicieron crecer células endoteliales vasculares bovinas purificadas (bVEC) en placas de 6 pocillos (Nunc) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de FBS, 1x penicilina, 1x estreptomina y L-glutamina 200 mM (todos de Gibco BRL) en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 °C. Se estimularon las bVEC con cualquiera de PBS, PEG T7 vasculotida tetramérica de PM 20.000 Da (PTE200-T7; 5 µg/ml) o PEG-T7 vasculotida dimérica de PM 10.000 Da (DE100-T7; 250 ng/ml o 500 ng/ml) durante 10 minutos. Se prepararon lisados celulares en tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1 % de Igepal, 0,5 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de dodecilsulfato de sodio, 1x aprotinina, 1x leupeptina y 1x PMSF). Se resolvieron electroforéticamente cantidades iguales de proteína celular y se transfirieron a membrana de PVDF para análisis de inmunotransferencia. Se efectuó el análisis de inmunotransferencia de acuerdo con las prácticas estándares, usando anticuerpo monoclonal anti-Tie 2 (Pharminogen) y anticuerpo policlonal anti-pY992 Tie 2 (Cell Signaling Technology), y empleando procedimientos de detección con peroxidasa de rábano picante.

Se muestran en la Figura 7 los resultados de estimulación con 5 µg/ml de PTE200-T7 y se muestran en la Figura 8 los resultados de estimulación con cualquiera de 250 ng/ml o 500 ng/ml de DE100-T7. Los resultados muestran que aparecían niveles aumentados de activación de Tie 2, como se detectan por fosforilación en Y992, en las muestras tratadas con PTE200-T7 o DE100-T7, pero no en las muestras tratadas con PBS, demostrando que ambos compuestos de PEG-T7 vasculotida son capaces de activar el receptor Tie 2 *in vitro*.

Ejemplo 11: Activación de Tie 2 *in vivo* por PEG-vasculotida

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los compuestos de PEG-T7 vasculotida, preparados como se describe en el Ejemplo 9, de activar el receptor Tie 2 *in vivo* mediante la administración de los compuestos a ratones, seguido del examen en el tejido celular pulmonar de la activación de Tie 2 y las rutas posteriores, puesto que el tejido de pulmón contiene una densidad vascular muy alta y por tanto sirve como órgano ideal para examinar la activación de Tie 2.

Se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones CD1 de tipo silvestre de 12 semanas de edad PTE200-T7 vasculotida (5 µg o 75 µg), DE200-T7 vasculotida (10 µg o 50 µg) o DE100-T7 vasculotida (5 µg o 100 µg) suspendidos en PBS estéril o PBS solo. Después de 20 minutos, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical, se retiraron los pulmones y se congelaron a -80 °C para análisis. Se lisó tejido pulmonar descongelado en tampón de lisis RIPA (descrito adicionalmente en el Ejemplo 10). Se determinaron las concentraciones de proteína para cada muestra y se inmunoprecipitaron iguales cantidades de proteína para Tie 2 (Pharminogen, anti-Tie 2 clon 33.1 y proteína G-Sepharose, Amersham). Se resolvieron electroforéticamente los inmunoprecipitados y se transfirieron a membrana de PVDF para análisis de inmunotransferencia. Se determinó la fosforilación total de Tie 2 usando un anticuerpo anti-pY (Upstate Biotechnology, clon 4G10). Adicionalmente, se separaron electroforéticamente cantidades iguales de lisado celular completo y se transfirieron a membrana de PVDF para análisis de inmunotransferencia con anticuerpos anti-panMapk, anti-fosfoMapk, anti-panAkt y anti-pS473-

Akt como se describe anteriormente en el Ejemplo 3.

Se muestran los resultados en la Figura 9. Se apuntaron aumentos en la activación de Tie 2 total en ratones que recibieron PEG-T7 dimérico de PM 10.000 Da (DE100-T7) y PEG-T7 tetramérico de PM 20.000 Da (PTE200-T7).
 5 También se activaron las rutas posteriores a Tie 2, incluyendo Mapk y Akt, tras tratamiento con PEG-T7 dimérico de PM 10.000 Da y PEG-T7 tetramérico de PM 20.000 Da, pero no PEG-T7 dimérico de PM 20.000 (DE200-T7), sugiriendo que el espaciamiento del péptido T7 apropiado es crítico para una activación óptima de Tie 2/Mapk/Akt (véanse pMapk y pS473Akt en comparación con el control de PBS). Además, consistentemente con los datos generados usando la vasculotida tetramérica con avidina-biotina, se observó que las dosis menores de PEG-T7
 10 vasculotida promovían una activación más robusta de Tie 2 y los eventos de señalización posteriores.

Ejemplo 12: Preparación y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos del péptido T7

En este ejemplo, se prepararon anticuerpos monoclonales específicos del péptido T7 y se caracterizaron. Se conjugó covalentemente el péptido T7 con BSA o KLH usando el kit de Pierce Chemical Company "Imject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit with mcKLH and BSA" de acuerdo con las instrucciones del kit. Se efectuaron la inyección del inmunógeno en ratones BALB/c hembra de 4 semanas de edad, la recogida de suero, la preparación de hibridomas y el cribado de anticuerpos todos de acuerdo con las instrucciones del kit y según con las directrices de cuidado animal del Sunnybrook Research Institute (Toronto, Ontario, Canadá).
 15
 20

Se cribaron inicialmente los sobrenadantes de hibridoma por ELISA estándar usando T7- BSA como antígeno, cuyos resultados se muestran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1: Resultados de cribado de ELISA para sobrenadantes de hibridoma

Hibridoma de T7	Clon monocelular	Resultado de ELISA	Fondo
F11.4F2		0,258	0,037
F11.4H6	Sí	0,641	0,039
F11.2C11	Sí	0,307	0,043
F11.9G8		0,379	0,033
F11.15F3		0,374	0,033
F11.3E4	Sí	0,249	0,047
F11.7G4		0,182	0,4
F11.7E7		0,339	0,035
F11.7B12		0,186	0,035
F11.7D6		0,168	0,036
F11.13G12		0,117	0,034
F11.12B7		0,278	0,037
F11.13D4	Sí	0,955	0,04
F11.14A4		195	0,036
F11.9B11		0,105	0,034
F11.2G6		0,208	0,051

Todos los clones que se probaron positivos durante el cribado inicial se presentan en la Tabla 1. Todos los clones monocelulares se ensayaron adicionalmente para valorar la especificidad.

30 Se efectuó el análisis de transferencia de puntos para valorar la especificidad de hibridomas monoclonales de ratón genomanipulados para detectar el péptido T7. Se punteó PEG-T7 tetramérico (PTE200-T7) sobre membrana de PVDF a 17 ng, 83 ng y 333 ng (estas cantidades representan el contenido de T7 global aplicado a la membrana y no dan cuenta del peso del PEG). Se dejó secar la membrana, en cuyo punto se bloqueó con leche desnatada sin grasa al 5 % y se sondeó con los sobrenadantes de hibridoma 2C11, 13D4, 7E7, 3E4 y 4H6 a dilución 1:500. Se efectuó la
 35 dilución de acuerdo con prácticas estándares usando un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón con peroxidasa de rábano picante a dilución 1:10.000. Se muestran los resultados en la Figura 10. Todos los clones, excepto 7E7,

fueron capaces de detectar PEG-T7 tetramérico a las concentraciones ensayadas. Se incluyó lisado de células enteras de tejido (WCL, 70 µg) como control de especificidad y los resultados indican que el anticuerpo secundario usado en la detección interacciona no específicamente con algún componente del lisado de célula completa.

- 5 Para valorar adicionalmente la unión de anticuerpos monoclonales anti-T7 de ratón de 2C11, 13D4, 3E4 y 4H6, se efectuó un análisis de inmunotransferencia con T7-BSA como antígeno. Para preparar el antígeno T7-BSA, se conjugó covalentemente el péptido T7 con seroalbúmina bovina usando el kit "Imject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit with mCKLM and BSA" suministrado por Pierce de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se resolvió electroforéticamente el T7-BSA resultante, solo o adicionado con 100 µg de lisado de células
- 10 completas de pulmón de ratón (en condiciones no reductoras) y se transfirió a membrana de PVDF para análisis de inmunotransferencia. Se sondearon las membranas de PVDF con el sobrenadante de hibridoma 2C11, 13D4, 3E4 y 4H6 de acuerdo con la práctica de inmunotransferencia estándar. Se muestran los resultados en la Figura 11. Todos los clones ensayados eran capaces de detectar T7-BSA (la cantidad total de T7 era igual a 75 ng) en grados variables. Las inmunotransferencias mostraban distintas bandas a aproximadamente 70 kDa, 140 kDa y 210 kDa
- 15 que se cree que representan agregados no reducidos de BSA-T7. Los clones ensayados detectaban también una sola proteína en el lisado de células completas pulmonares de aproximadamente 200 kDa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> SUNNYBROOK HEALTH SCIENCES CENTER
Van Slyke, Paul
Dumont, Daniel
- 25 <120> AGONISTAS DE TIE 2 MULTIMÉRICOS Y USOS DE LOS MISMOS EN LA ESTIMULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS
- <130> 9627-3
- 30 <150> 60/854.950
<151> 27-10-2006
- <160> 10
- 35 <170> PatentIn Ver. 3.3
- <210> 1
<211> 7
<212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 45 <400> 1
His His His Arg His Ser Phe
1 5
- <210> 2
<211> 8
<212> PRT
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 55 <400> 2

Cys His His His Arg His Ser Phe
 1 5

- <210> 3
- <211> 22
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 10 <400> 3

Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg
 1 5 10 15

Thr Trp Lys Glu Tyr Lys
 20

- 15 <210> 4
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 4

Cys Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
 1 5 10 15

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys
 20

- 25 <210> 5
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 5

His Pro Trp Leu Thr Arg His
 1 5

- <210> 6
- <211> 8
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 45 <400> 6

Cys His Pro Trp Leu Thr Arg His
 1 5

<210> 7
 <211> 7

5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10

<400> 7

Lys Leu Trp Val Ile Pro Lys
 1 5

<210> 8

15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 8

Cys Lys Leu Trp Val Ile Pro Lys
 1 5

25 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 9

Asn Leu Leu Met Ala Ala Ser
 1 5

35 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10

Cys Asn Leu Leu Met Ala Ala Ser
 1 5

45

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una forma multimérica de monómeros peptídicos de unión a Tie 2, donde la forma multimérica tiene actividad agonista de Tie 2, donde cada monómero peptídico es de no más de 100 aminoácidos de longitud y donde cada monómero peptídico comprende:
- un péptido T7 representado por la SEQ ID NO: 1 o un péptido T7 modificado representado por la SEQ ID NO: 2;
 - un péptido GA3 representado por la SEQ ID NO: 3 o un péptido GA3 modificado representado por la SEQ ID NO: 4;
 - un péptido T4 representado por la SEQ ID NO: 9 o un péptido T4 modificado representado por la SEQ ID NO: 10;
 - un péptido T6 representado por la SEQ ID NO: 7 o un péptido T6 modificado representado por la SEQ ID NO: 8; o
 - un péptido T8 representado por la SEQ ID NO: 5 o un péptido T8 modificado representado por la SEQ ID NO: 6.
2. La composición de la reivindicación 1, donde la forma multimérica es un tetrámero o un dímero o comprende 6, 8, 10 o 12 unidades de monómero peptídico de unión a Tie 2.
3. La composición de la reivindicación 1, donde el monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende una estructura A-B-C, donde A comprende un péptido de unión a Tie 2, B comprende un espaciador y C comprende un grupo multimerizante, donde C tiene afinidad por D, un agente multimérico que comprende múltiples sitios de unión para C, donde opcionalmente el agente multimérico D tiene cuatro sitios de unión para el grupo multimerizante C, de tal modo que se forma un tetrámero cuando interaccionan cuatro monómeros peptídicos de unión a Tie 2, A-B-C, con el agente multimérico D.
4. La composición de la reivindicación 1, que comprende una estructura: A-B, donde A comprende un péptido de unión a Tie 2 y B comprende un espaciador, donde los múltiples péptidos de unión a Tie 2 están ligados covalentemente con el espaciador B.
5. La composición de la reivindicación 1, donde la forma multimérica es una forma tetramérica de monómeros peptídicos de unión a Tie 2, donde cada monómero peptídico de unión a Tie 2 comprende una estructura: A-B-C, donde
- A comprende un péptido de unión a Tie 2 seleccionado de entre un péptido T7 representado por la SEQ ID NO: 1, un péptido T7 modificado representado por la SEQ ID NO: 2, un péptido GA3 representado por la SEQ ID NO: 3 y un péptido GA3 modificado representado por la SEQ ID NO: 4;
- B comprende un espaciador de polietilenglicol (PEG), donde el espaciador contiene 2-12 unidades de PEG y C comprende un grupo biotina;
- donde se asocian cuatro estructuras A-B-C con un agente tetramérico D creando la forma tetramérica, estando seleccionado el agente tetramérico D de entre el grupo consistente en avidina, estreptavidina y neutravidina.
6. La composición de la reivindicación 1, donde la forma multimérica es un dímero peptídico que comprende: (a) un primer monómero peptídico; (b) un segundo monómero peptídico y (c) un resto de ligamiento que conecta dichos primer y segundo monómeros peptídicos, donde el resto de ligamiento comprende un polietilenglicol (PEG) de 3.000 Da a 10.000 Da.
7. La composición de la reivindicación 6, donde el primer monómero peptídico y el segundo monómero peptídico son péptidos T7 representados por la SEQ ID NO: 1, péptidos T7 modificados representados por la SEQ ID NO: 2 o combinaciones de los mismos.
8. La composición de la reivindicación 1, donde la forma multimérica es un tetrámero peptídico que comprende: (a) un primer monómero peptídico; (b) un segundo monómero peptídico; (c) un tercer monómero peptídico; (d) un cuarto monómero peptídico y (e) un resto de ligamiento que conecta dichos primer, segundo, tercer y cuarto monómeros peptídicos, donde el resto de ligamiento comprende uno o más polímeros solubles unidos covalentemente al primer, segundo, tercero y cuarto monómeros peptídicos.
9. La composición de la reivindicación 8, donde el primer, segundo, tercer y cuarto monómeros peptídicos son péptidos T7 representados por la SEQ ID NO: 1, péptidos T7 modificados representados por la SEQ ID NO: 2, péptidos GA3 representados por la SEQ ID NO: 3 o péptidos GA3 modificados representados por la SEQ

ID NO: 4 o combinaciones de los mismos.

10. La composición de la reivindicación 9, donde el primer, segundo, tercer y cuarto monómeros peptídicos son péptidos T7 representados por la SEQ ID NO: 1 o péptidos T7 modificados representados por la SEQ ID NO: 2 o combinaciones de los mismos.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el polímero hidrosoluble es un polímero hidrosoluble de cadena ramificada tal como un polietilenglicol (PEG) de cadena ramificada.

10 12. La composición de la reivindicación 11, donde el PEG de cadena ramificada es de 3.000 a 20.000 Da.

13. Un procedimiento de activación de un receptor Tie 2 que comprende poner en contacto el receptor Tie 2 con la forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie 2 de la reivindicación 1 de tal modo que se active el receptor Tie 2, donde la activación del receptor Tie 2 se prueba por la fosforilación del residuo de tirosina 15 992 (Y992) del receptor Tie 2.

14. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso en la estimulación de la angiogénesis en un sitio de un sujeto, donde opcionalmente la angiogénesis estimulada por la forma multimérica se caracteriza por al menos una de las siguientes propiedades:

20

- a) reclutamiento de células de soporte perivasculares;
- b) sin filtración de vasos; y
- c) arborización bien definida.

25 15. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además un segundo agente angiogénico, donde el segundo agente angiogénico se selecciona opcionalmente de entre el grupo consistente en PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF, VEGF y factor de crecimiento placentario (PLGF).

30 16. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde se estimula la angiogénesis en una situación clínica seleccionada de entre el grupo consistente en vascularización de tejidos regenerativos, enfermedad isquémica de los miembros, isquemia cerebral, afecciones de inflamación vascular, arterioesclerosis, necrosis avascular, estimulación del crecimiento capilar y disfunción eréctil.

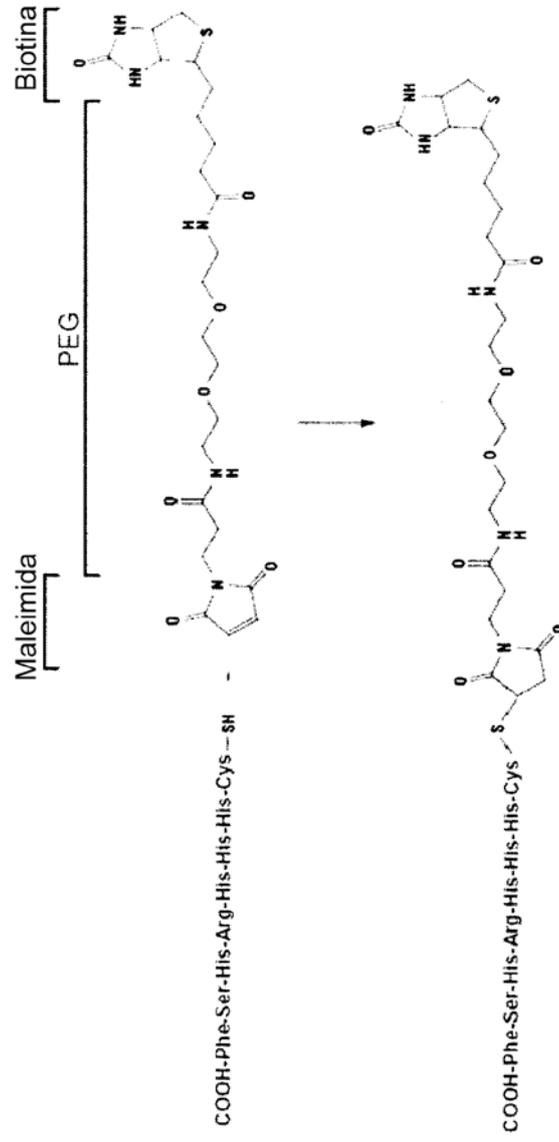
35 17. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso (i) para disminuir la permeabilidad vascular en un sitio de vasos filtrantes; (ii) para proteger células endoteliales o (iii) para estimular la curación de una herida en un sujeto.

18. Un biomaterial en que se ha incorporado la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 12.

19. El biomaterial de la reivindicación 18, en que se incorpora un segundo agente seleccionado de entre el grupo consistente en VEGF, PDGF, G-CSF, eritropoyetina humana recombinante, bFGF y factor de crecimiento placentario (PLGF).

45

Estructura del reactivo de marcaje de biotina que contiene espaciador de PEG, maleimida-PEO2-biotina



Vasculotida

Fig. 1A

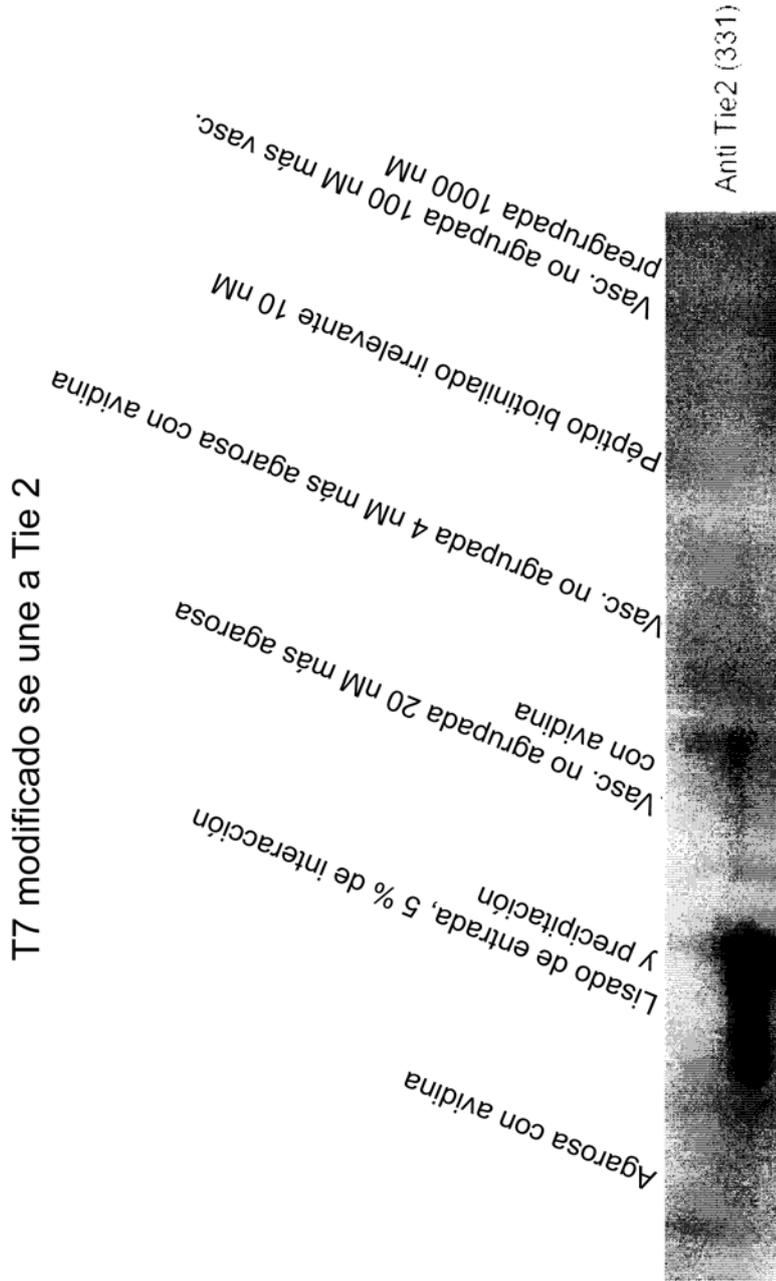


Fig. 1B

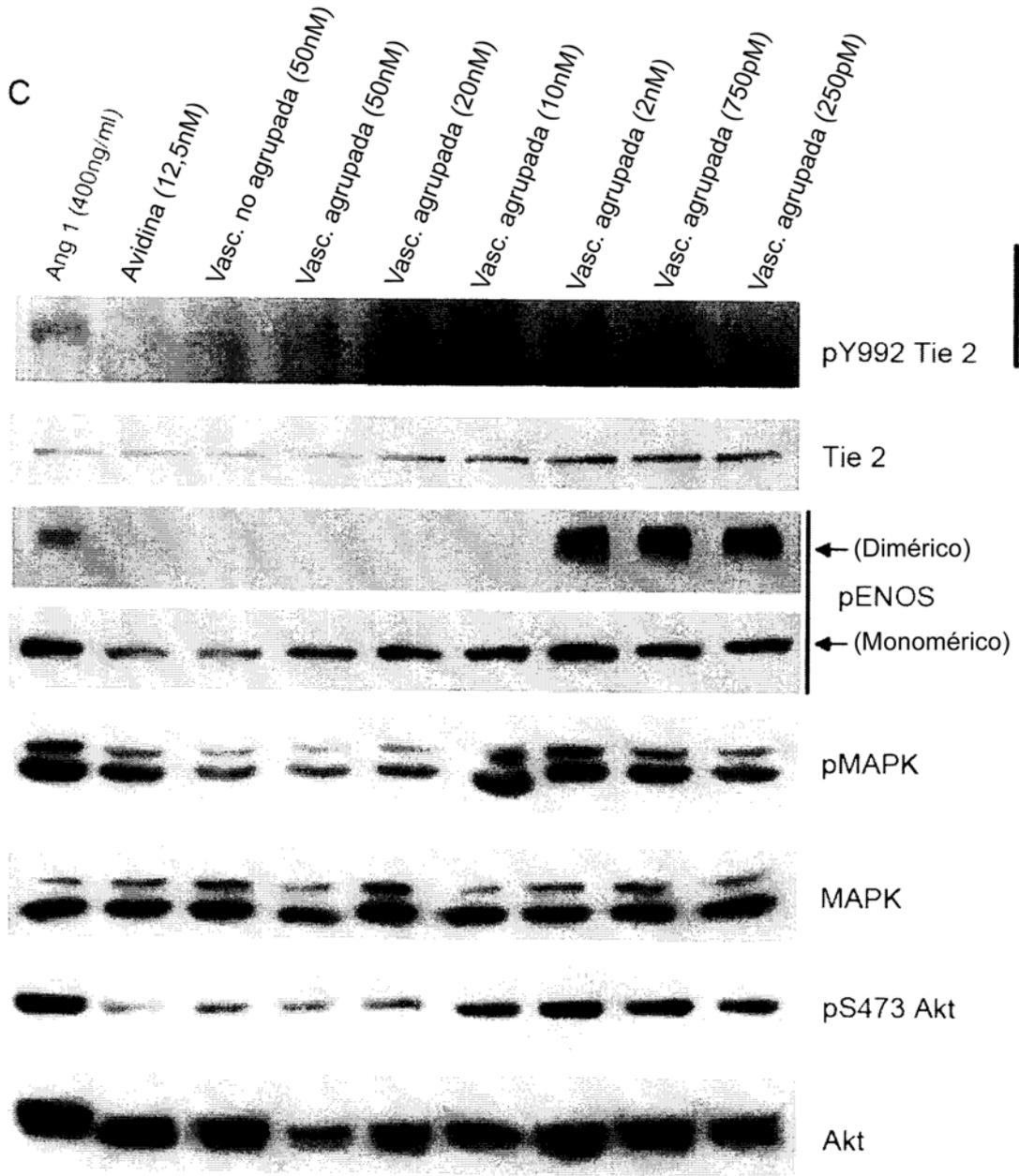
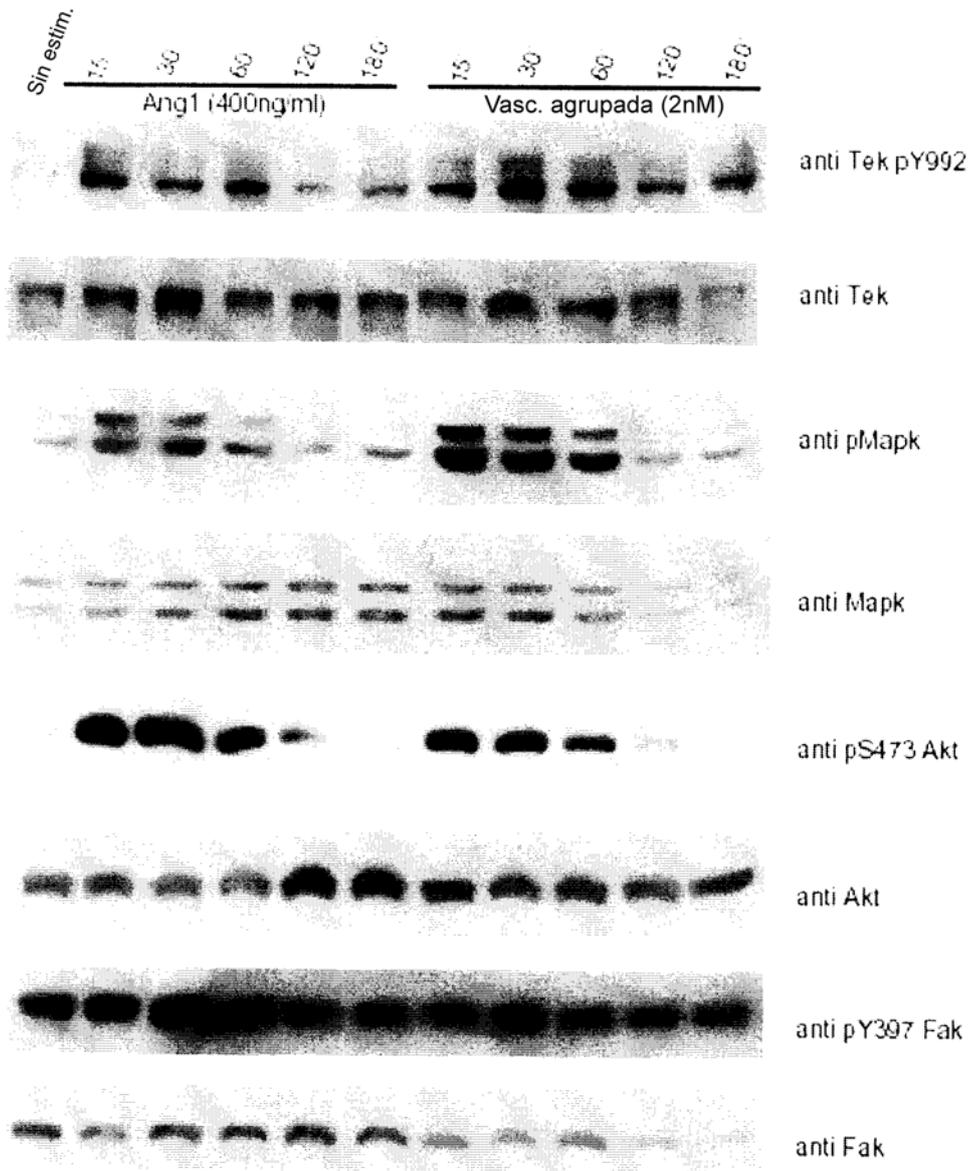


Fig. 1C



Estimulación de HUVEC
efectuada en FBS al 10 %

Fig. 1E

Especificidad de la vasculotida agrupada por Tek

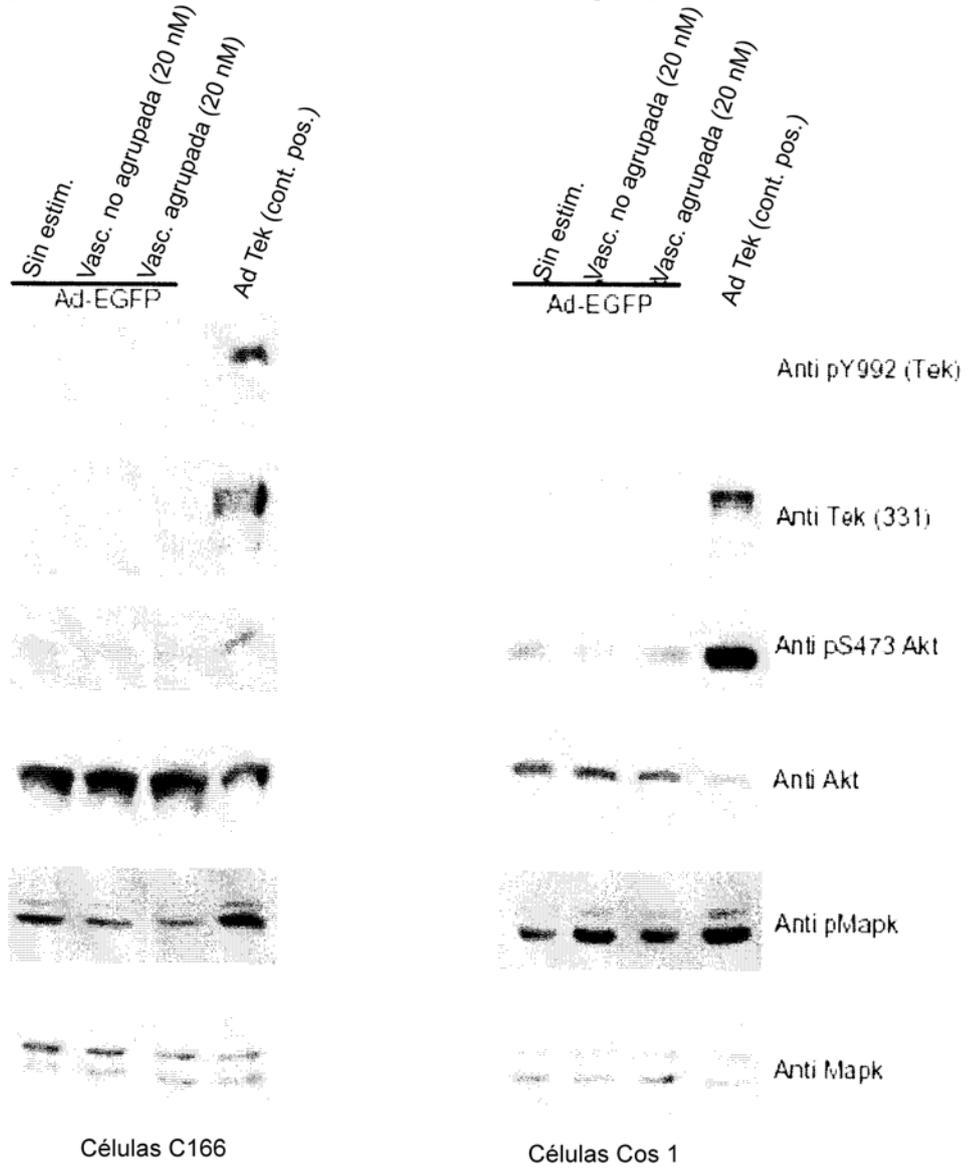
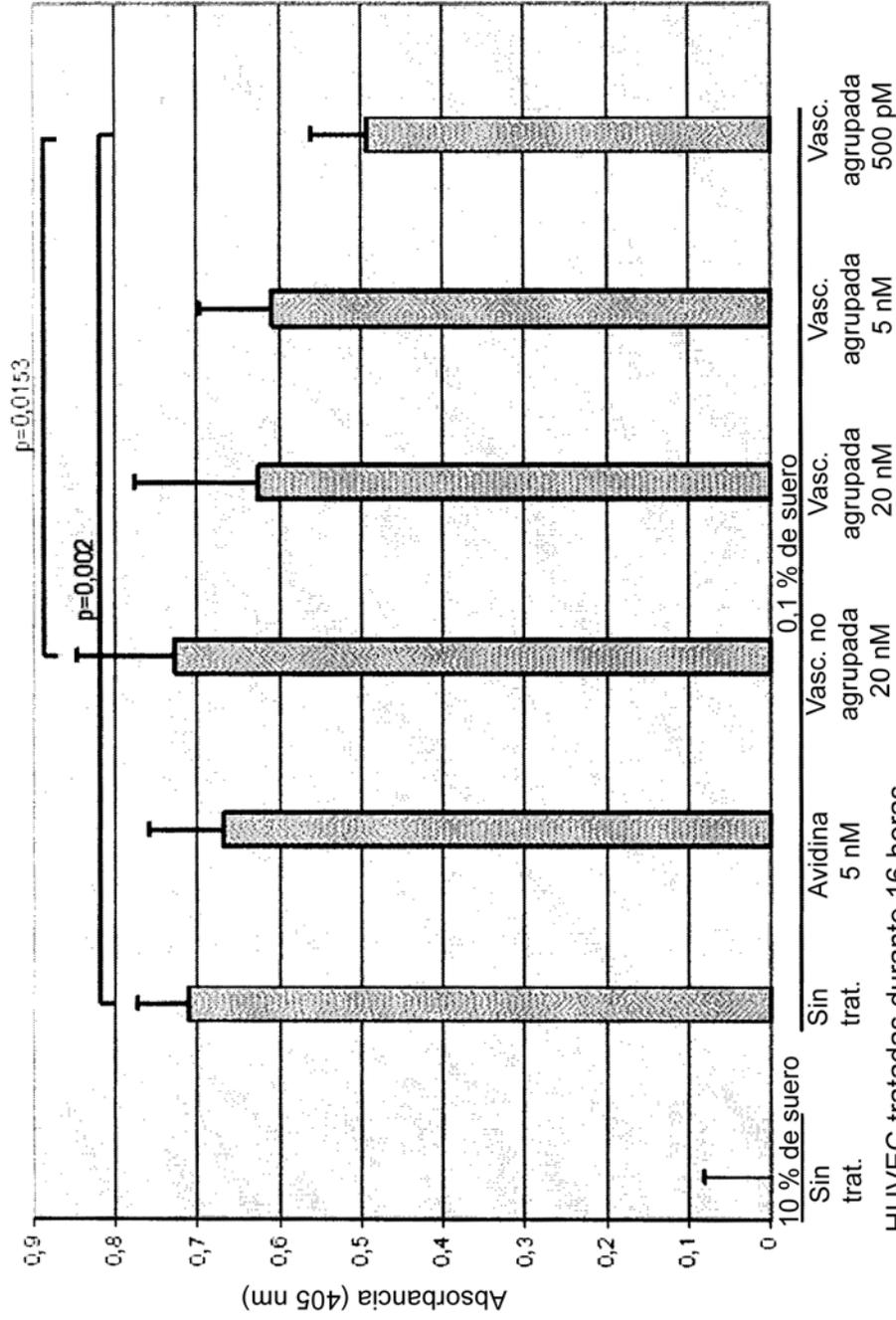


Fig. 1F

Elisa de muerte celular



HUVEC tratadas durante 16 horas
 Prueba de t de Student (no pareada) * = valores normalizados a la apoptosis celular basal a 10 % de suero

Fig. 2A

Ensayo de migración en cámara de Boyden (HUVEC, 4 h)

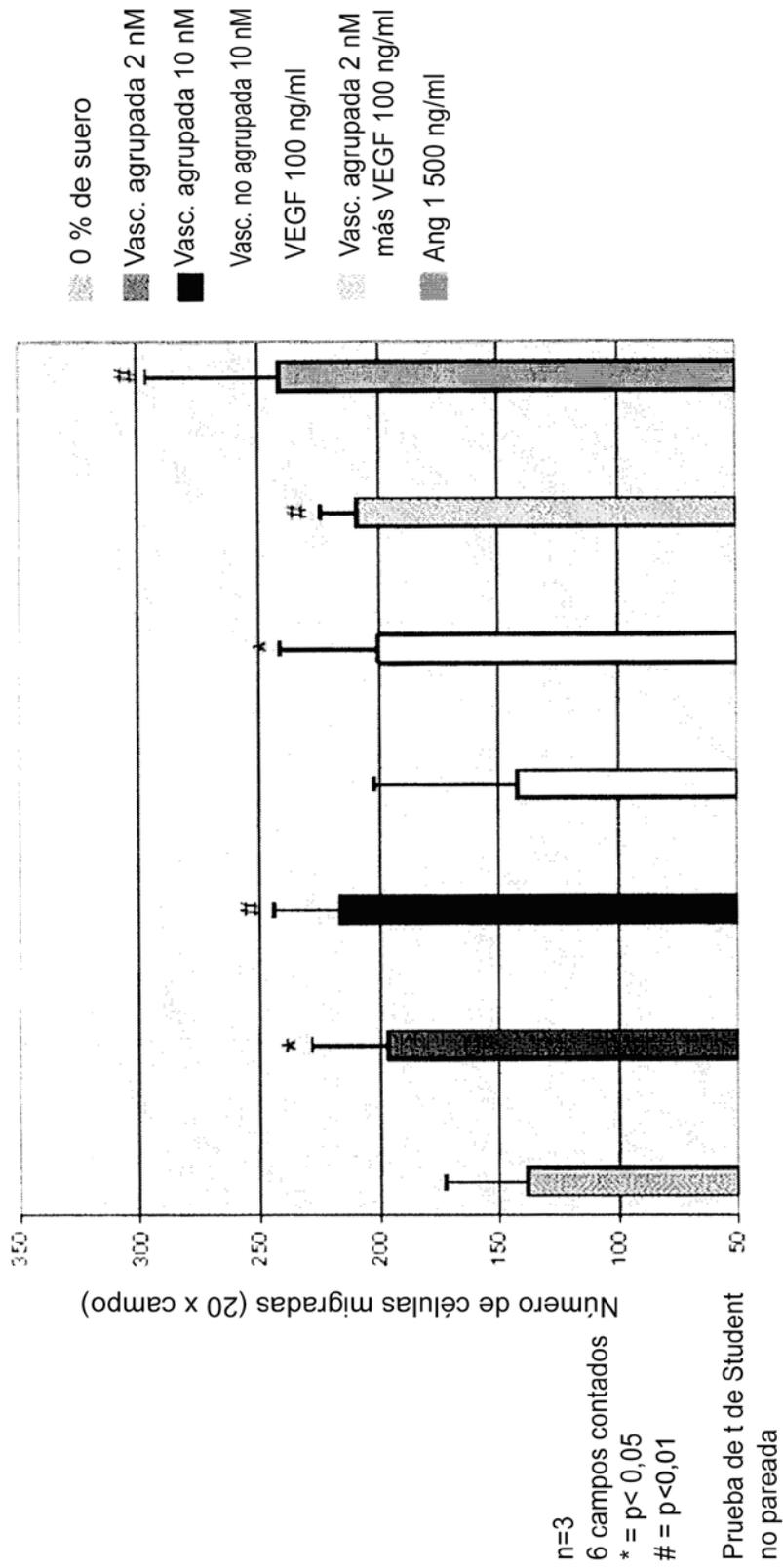
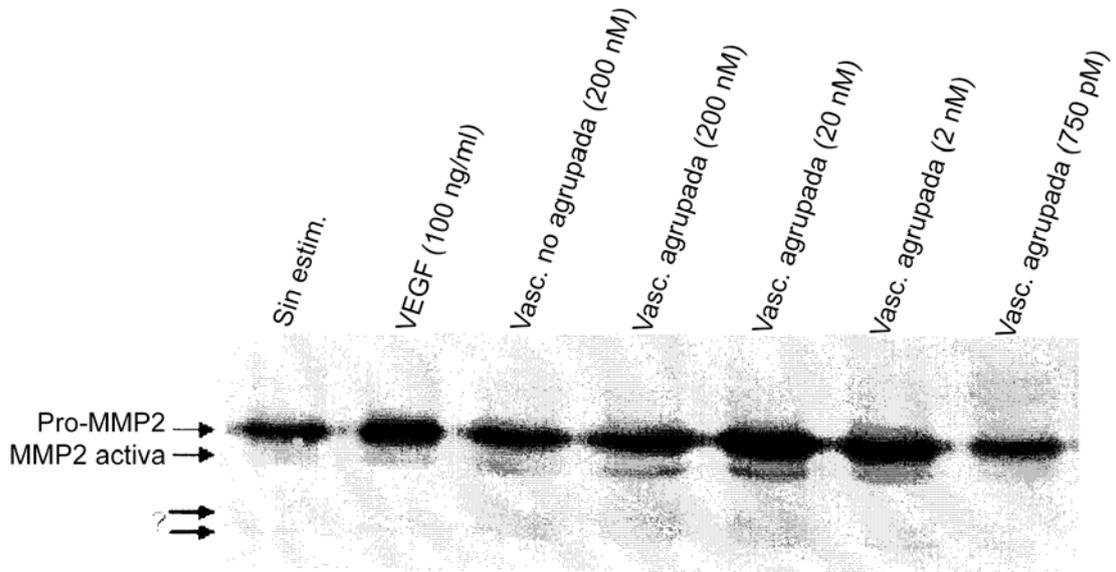


Fig. 2B



Zimograma en gelatina: HUVEC 16 horas libres de suero

Fig. 2C

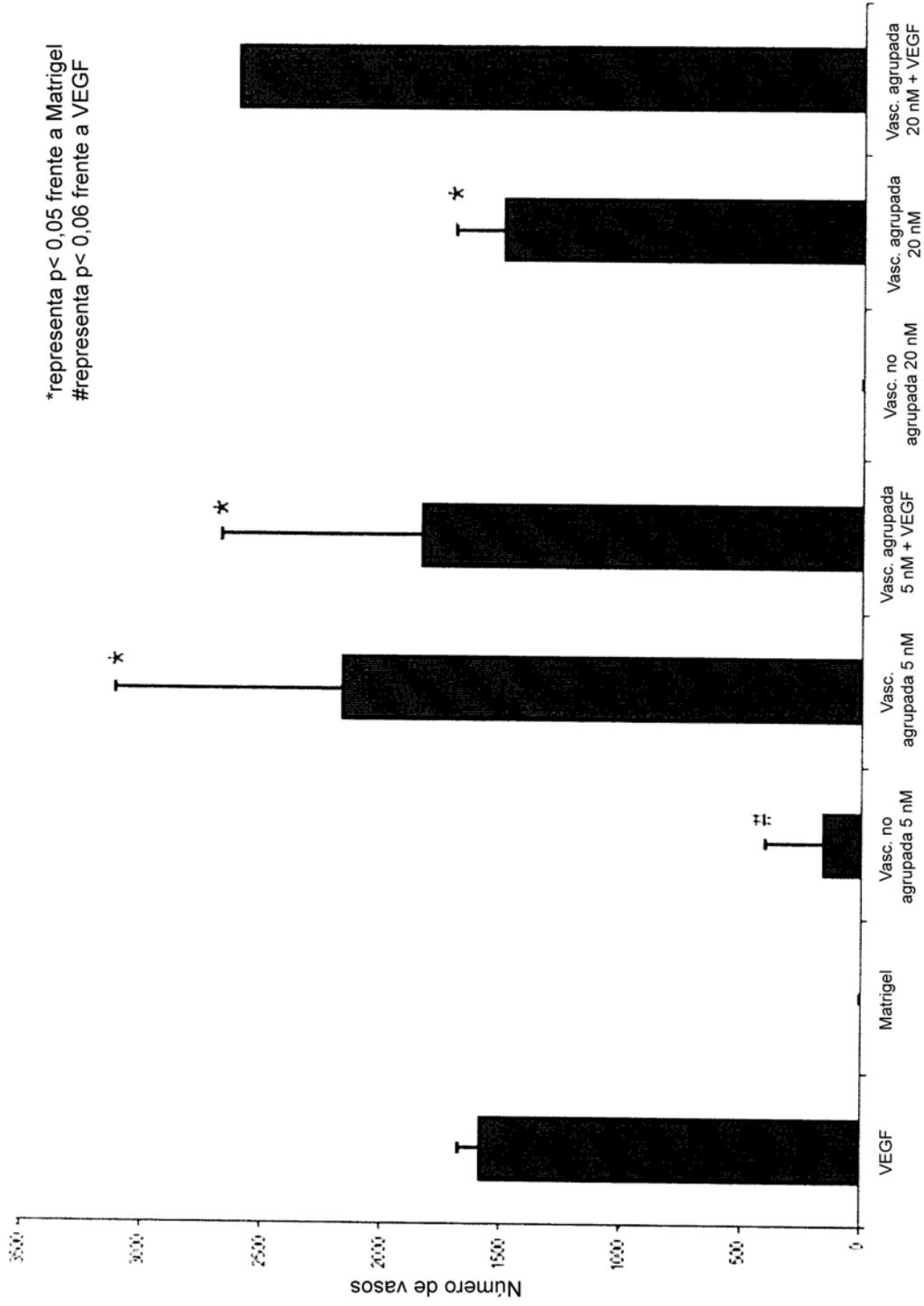


Fig. 3A

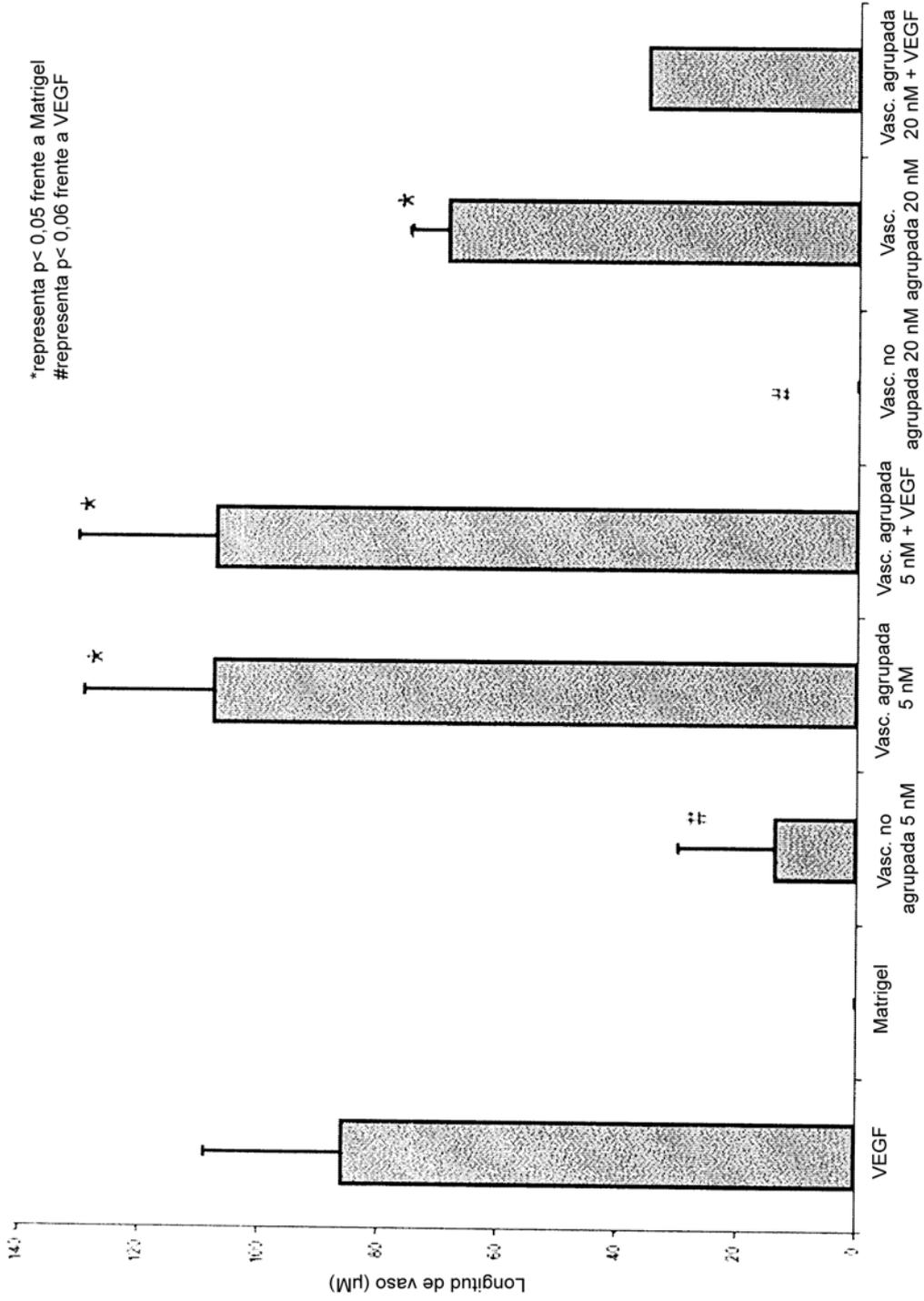


Fig. 3B

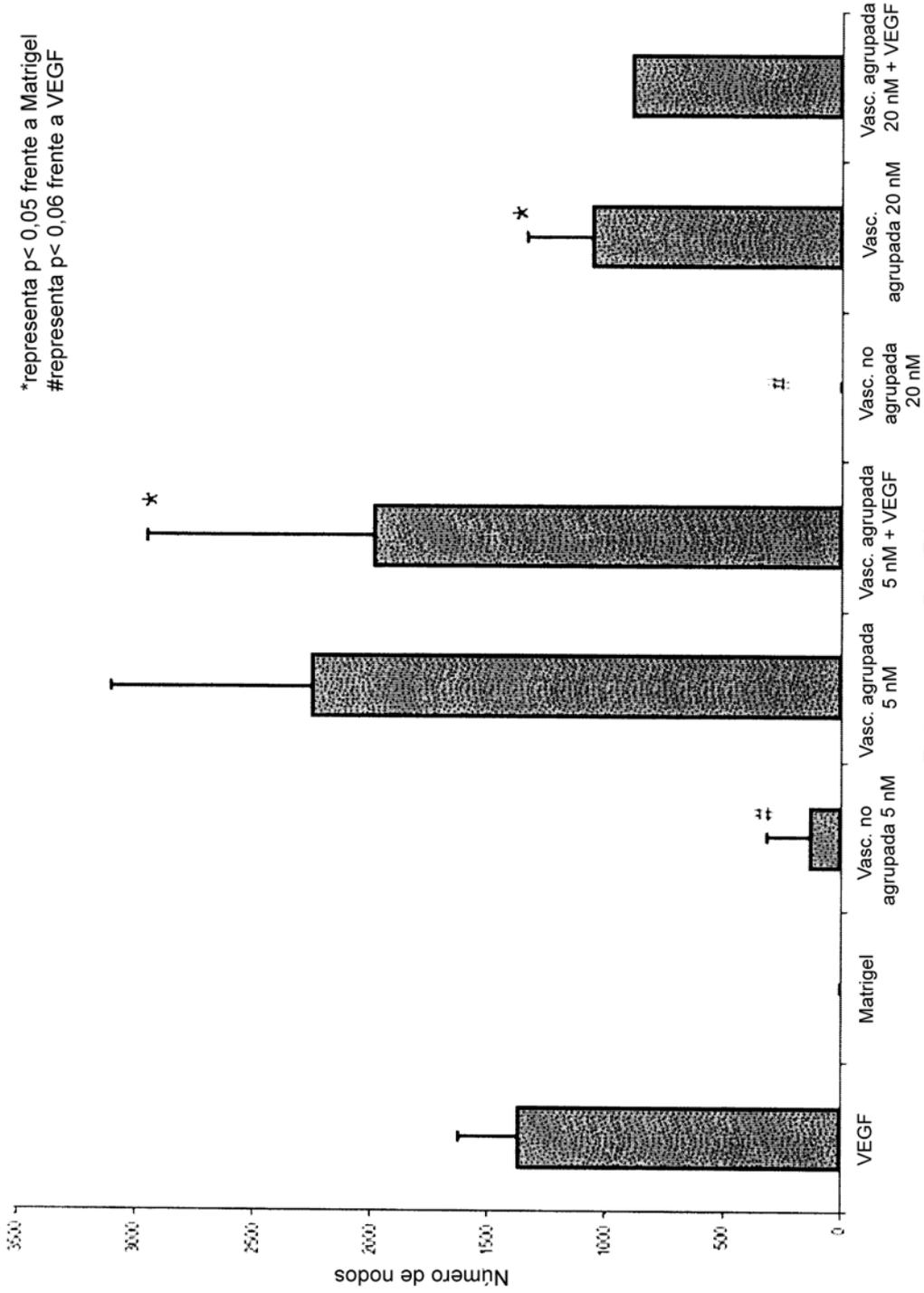
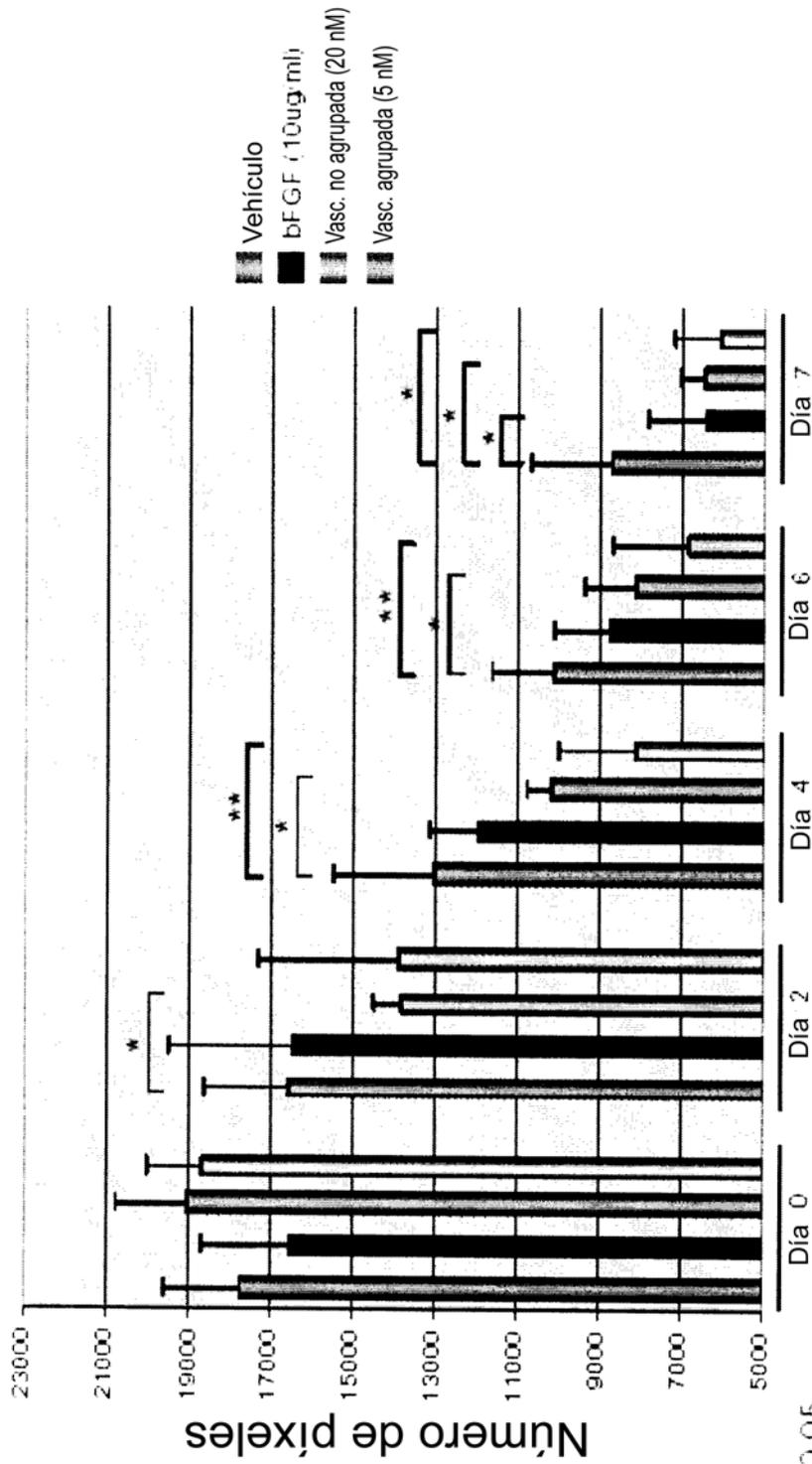


Fig. 3C

Cierre de heridas (ratones db/db)



* = p<0,05
 ** = p<0,01

Fig. 4A

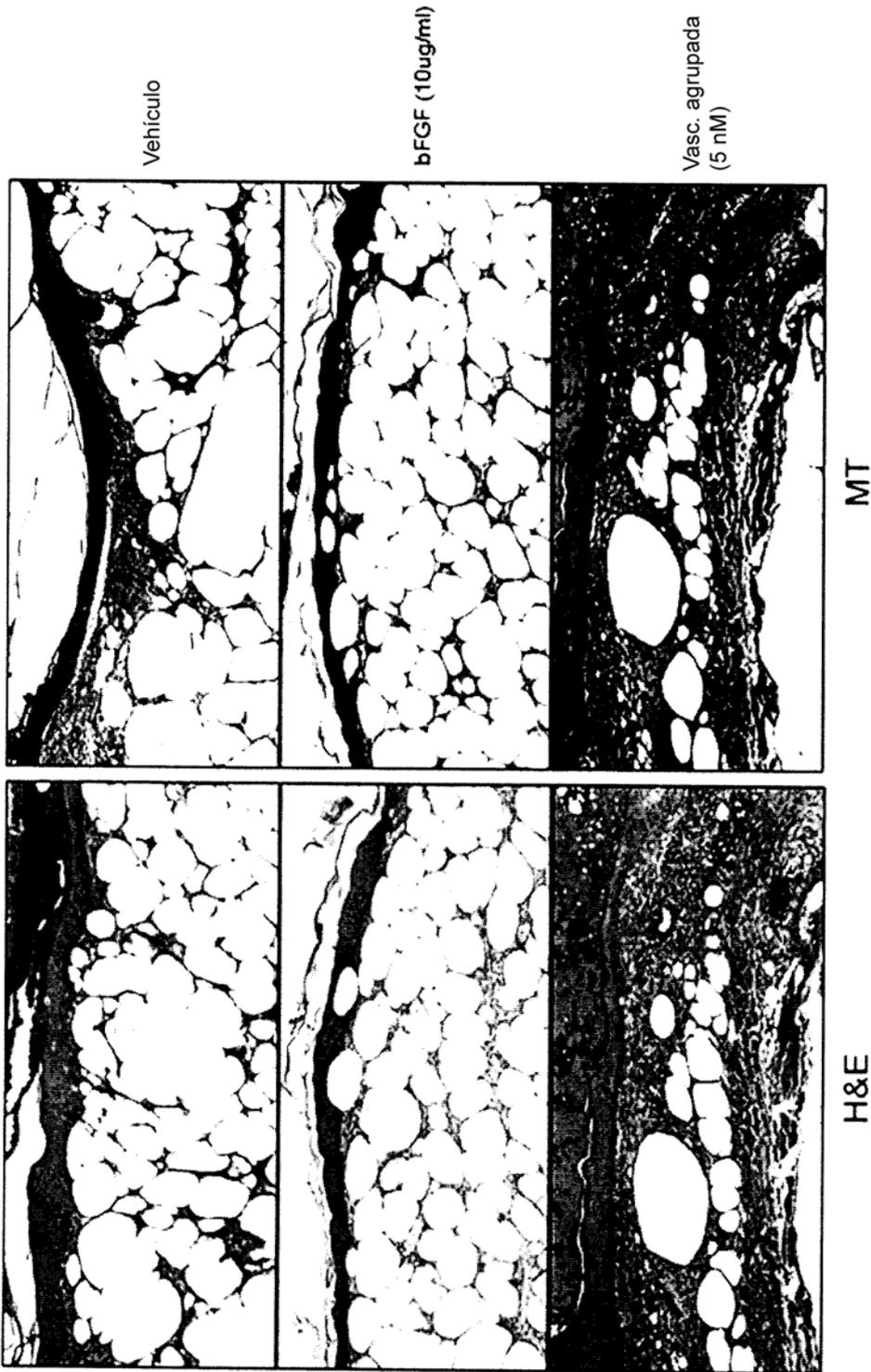


Fig. 4B

Puntuaciones histopatológicas de herida

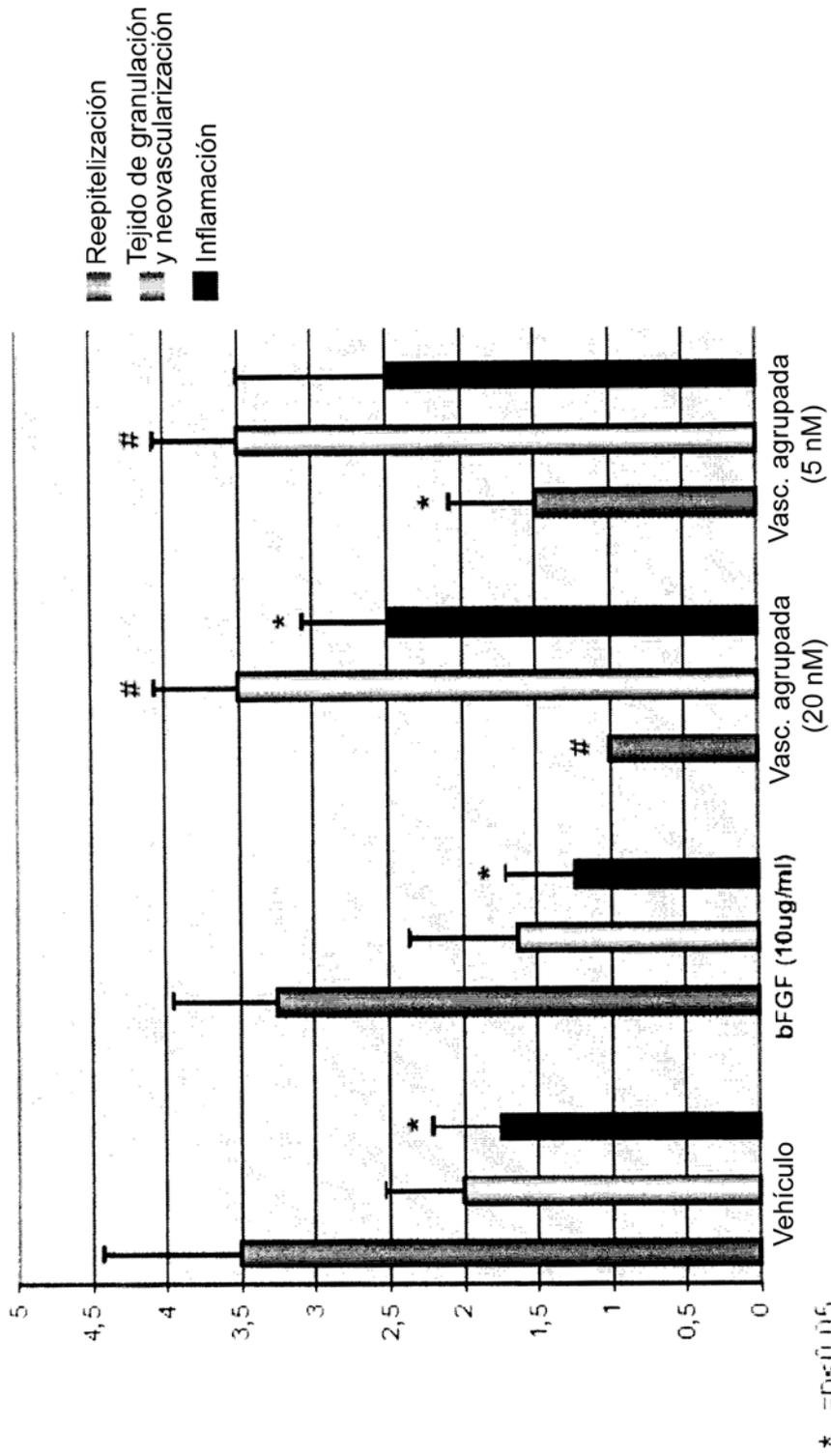


Fig. 4C

Ensayo de migración de cámara de Boyden (HUVEC, 4 h)

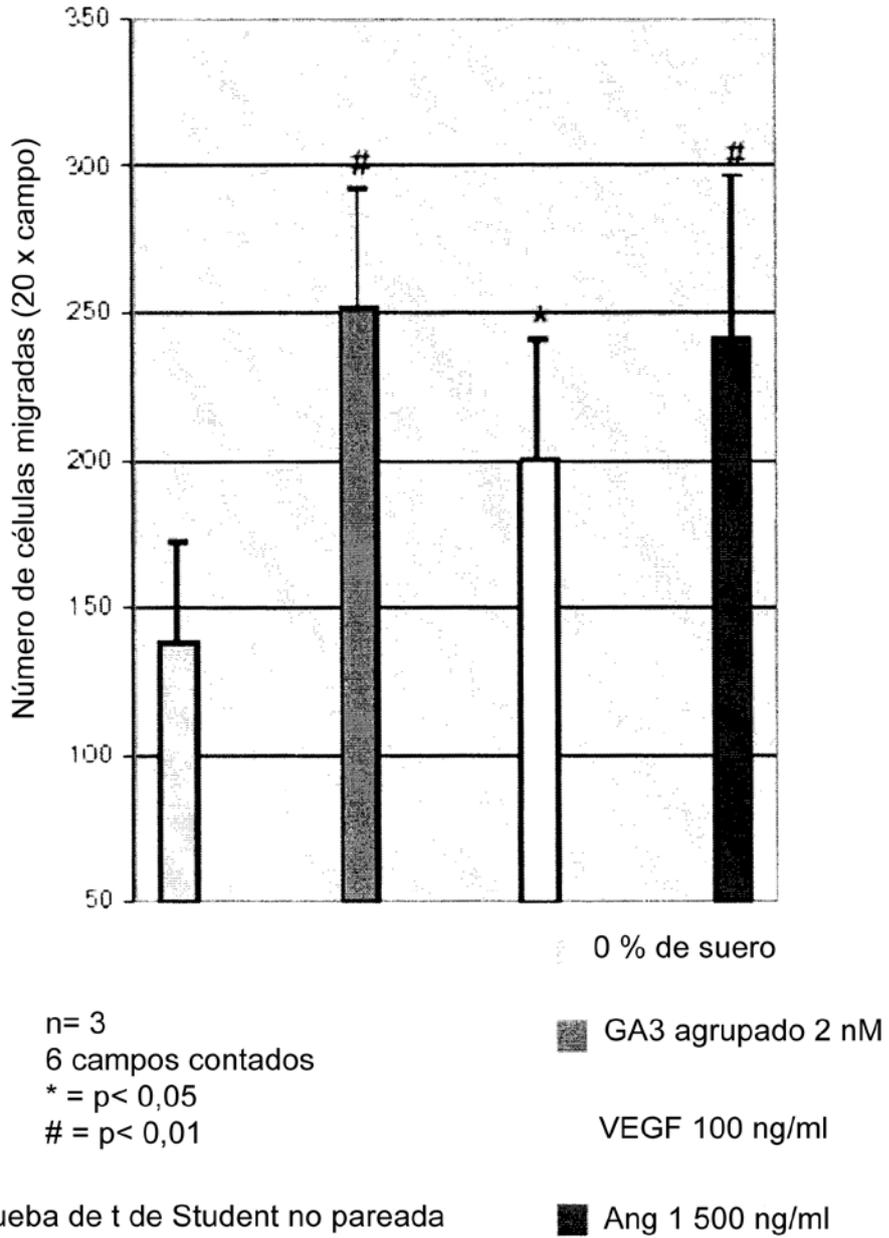


Fig. 5A

Zimograma en gelatina: HUVEC 16 horas libre de suero

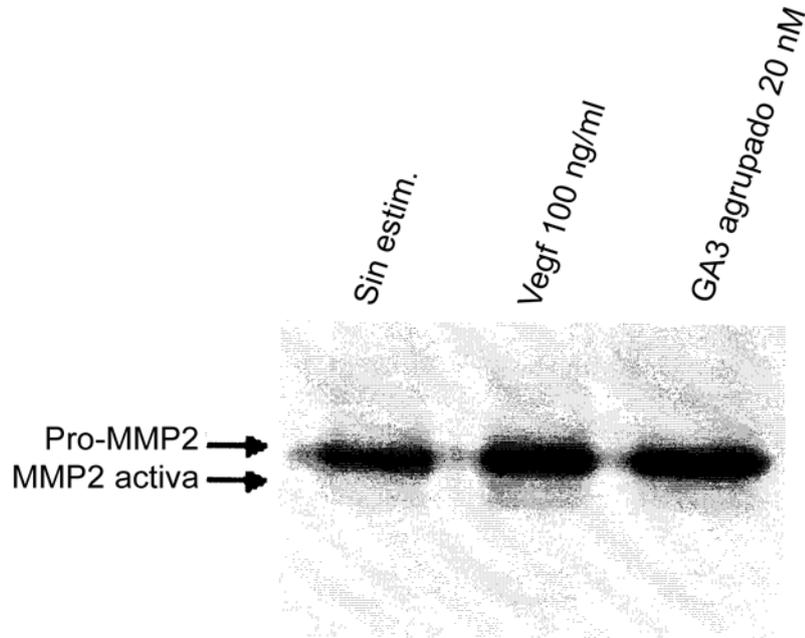


Fig. 5B

PEG-vasculotida

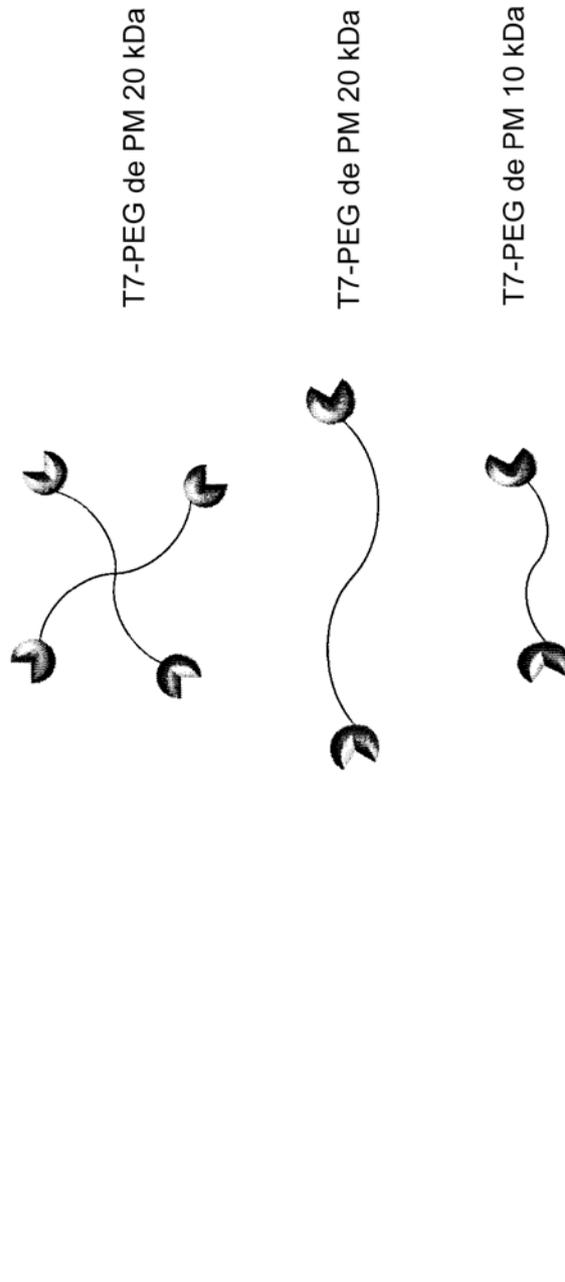


Fig. 6

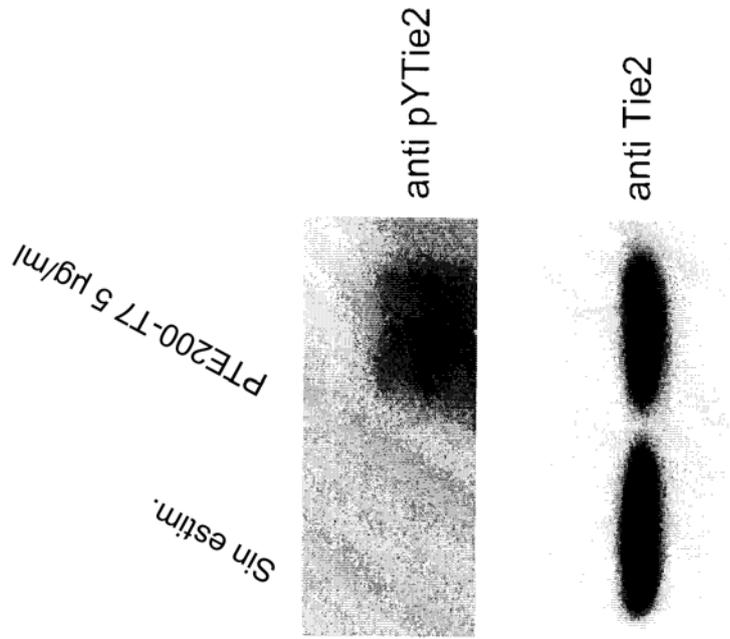


Fig. 7

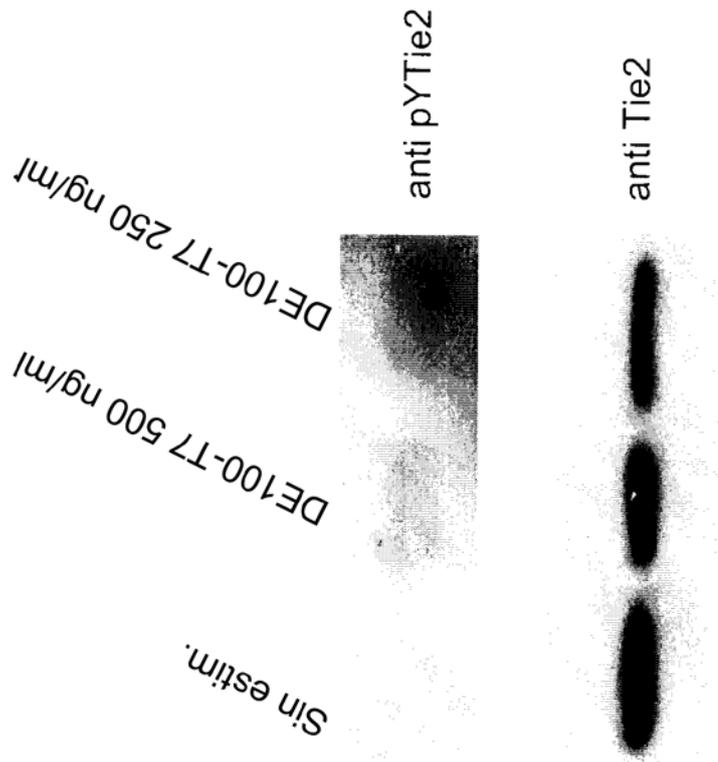


Fig. 8

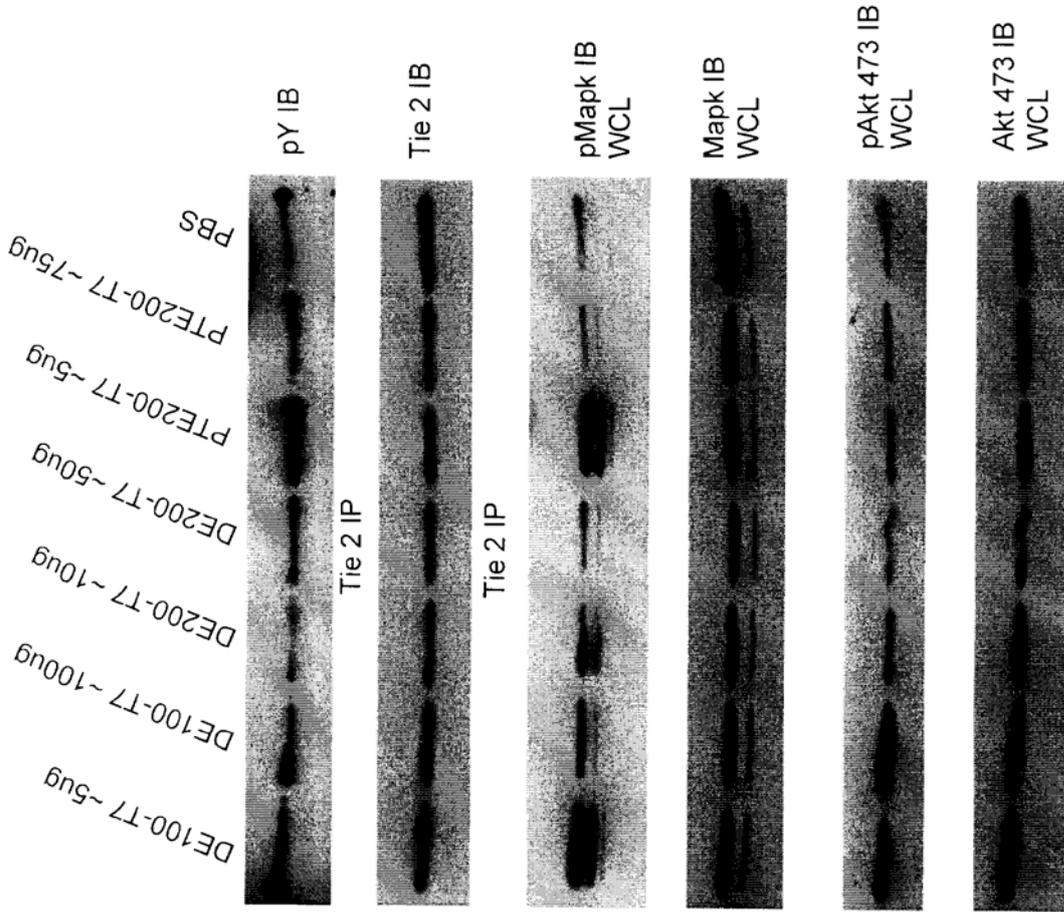


Fig. 9

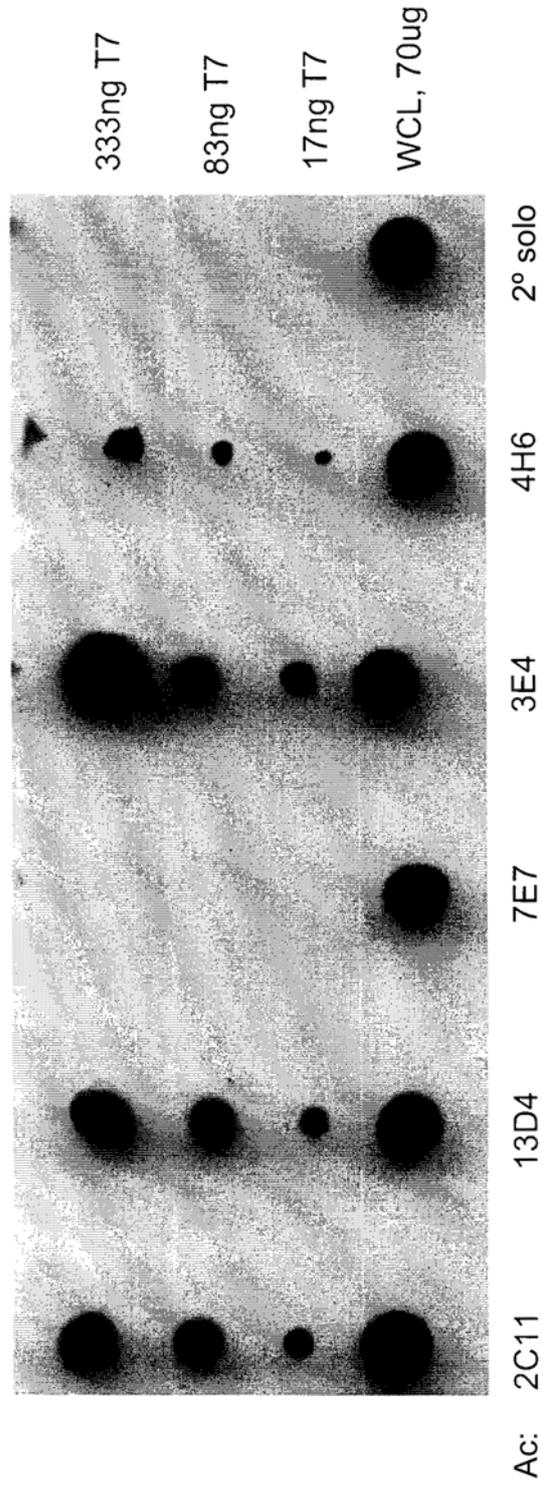


Fig. 10

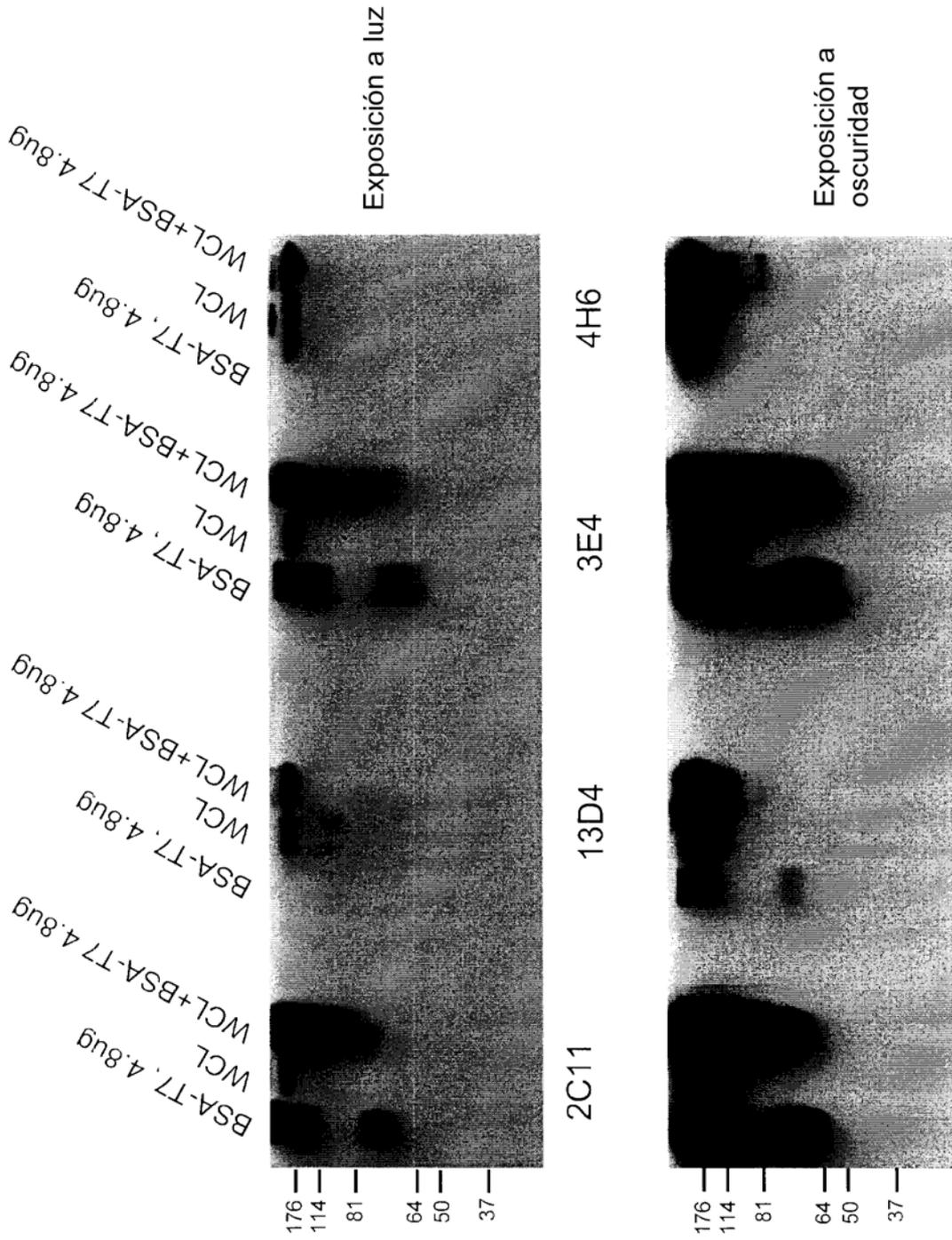


Fig. 11