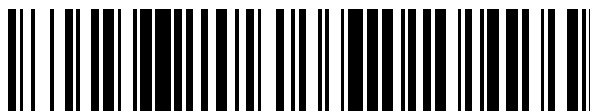


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 409**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2011** **PCT/US2011/043907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012** **WO12009471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2011** **E 11738546 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2593127**

54 Título: **Agente antiangiogénico y método de uso de tal agente**

30 Prioridad:

13.07.2010 US 363933 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2018

73 Titular/es:

**GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
P.O. Box 3987
Atlanta, Georgia 30302-3987, US**

72 Inventor/es:

**LIU, ZHI-REN;
YANG, JENNY J. y
LU, YIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 409 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

Agente antiangiogénico y método de uso de tal agente

Datos de solicitud relacionados previos

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de E.E.U.U. con nº de serie 61/363.933, presentada el 13 de julio de 2010.

Campo Técnico

10 Esta descripción se refiere a la inhibición o prevención de la angiogénesis como un medio para controlar o tratar una afección dependiente angiogénica, una afección caracterizada por, o dependiente de, la proliferación de los vasos sanguíneos. La descripción se refiere además al uso de un agente anti-angiogénico en combinación con un agente quimioterapéutico. La invención se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

15 La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares existentes, mientras que la vasculogénesis implica el crecimiento de los vasos que derivan de células progenitoras endoteliales. La angiogénesis es un proceso combinatorio que está regulado por un equilibrio entre moléculas pro- y anti-angiogénicas. Los estímulos angiogénicos (p. ej., hipoxia o citoquinas inflamatorias) dan como resultado la expresión inducida y liberación de factores de crecimiento angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estos factores de crecimiento estimulan las células endoteliales (EC) en la vasculatura existente a proliferar y migrar a través del tejido para formar nuevos canales endotelializados. La angiogénesis está implicada en la proliferación de células endoteliales.

20 La angiogénesis, inapropiada o patológica, está implicada en el crecimiento de la placa aterosclerótica, la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa, la fibroplasia retrolental, la fibrosis pulmonar idiopática, el síndrome de dificultad respiratoria aguda en adultos, y el asma. Además, la progresión tumoral está asociada con la neovascularización, que proporciona un mecanismo mediante el cual se administran nutrientes al tejido tumoral en crecimiento progresivo. Si bien el concepto de disminuir o incluso detener la progresión del cáncer dirigiéndose a su suministro de sangre se propuso por primera vez hace más de 30 años, los inhibidores de la angiogénesis están entrando solo ahora en la corriente principal de la terapéutica del cáncer.

25 Por consiguiente, existe siempre una necesidad en la técnica de métodos y agentes para reducir la angiogénesis patológica. Es esta necesidad, entre otras, a la que se dirige esta descripción.

Breve descripción de las figuras

30 La FIG. 1A es un dibujo esquemático de un anti-angiogénico que muestra las dos cadenas cortas de lámina β anti-paralela de la proteína.

La FIG. 1B es otro dibujo esquemático de un anti-angiogénico que muestra las dos cadenas cortas de lámina β anti-paralela de la proteína en la que la superficie hidrófoba está orientada hacia afuera.

35 La FIG. 1C es otro dibujo esquemático de un anti-angiogénico que muestra las dos cadenas cortas de lámina β anti-paralela de la proteína en la que la superficie hidrófoba está orientada hacia adentro.

La FIG. 2 muestra el espectro de RMN de un agente anti-angiogénico plegado (arriba) y desplegado (abajo) y la proteína huésped.

La FIG. 3A muestra un ensayo de proliferación de un agente anti-angiogénico frente a un agente de la técnica anterior (Anginex) con células HUVEC.

40 La FIG. 3B muestra un ensayo de proliferación de un agente anti-angiogénico frente a un agente de la técnica anterior (Anginex) con células cancerosas M4A4.

La FIG. 4A muestra gráficamente que el volumen del tumor permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente anti-angiogénico cuando se inició el tratamiento después de 8 días.

45 La FIG. 4B muestra gráficamente que el volumen del tumor permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente anti-angiogénico cuando se inició el tratamiento después de 22 días.

La FIG. 5 muestra gráficamente que hubo diferencias sustanciales en los pesos del tumor al final del primer tratamiento con un agente anti-angiogénico.

La FIG. 6 muestra gráficamente que los tumores crecieron a una velocidad normal en los ratones tratados con tampón y las proteínas del huésped, y se ralentizaron sustancialmente en los ratones tratados con el agente anti-

angiogénico.

La FIG. 7 muestra que los resultados de los estudios de densidad de vasos de ratones tratados con un agente anti-angiogénico.

5 La FIG. 8 muestra que no se observaron cambios significativos en la masa corporal de ratones en ningún grupo de tratamiento.

La FIG. 9 muestra que la viabilidad celular puede variar con la dosis.

La FIG. 10 muestra la curva de crecimiento del tumor a lo largo de 14 días o más de tratamiento usando diferentes dosis del agente anti-angiogénico.

La FIG. 11 es la curva de crecimiento del tumor de Avastin® y rProAgio-PEG.

10 La FIG. 12 muestra una representación gráfica del peso del tumor al final del curso del tratamiento de 14 días.

Definiciones

Se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de ciertos términos usados a lo largo de esta especificación.

15 “Angiogenesis” se define como cualquier alteración de un lecho vascular existente o la formación de nueva vasculatura que beneficia la perfusión tisular. Esto incluye la formación de nuevos vasos a través del brote de células endoteliales a partir de vasos sanguíneos existentes o de la remodelación de vasos existentes para alterar el tamaño, dirección de la madurez o propiedades de flujo para mejorar la perfusión sanguínea del tejido.

20 El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y aminoácidos miméticos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, a modo solamente de ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos peptídicos modificados, mientras que aún retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Ejemplos no limitantes de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio.

30 El término “variantes conservativamente modificadas” se aplica tanto a aminoácidos naturales como no naturales y a secuencias de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y combinaciones de los mismos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, “variantes conservativamente modificadas” se refiere a aquellos ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico natural y no natural no codifican una secuencia de aminoácidos natural y no natural, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. De este modo, a modo de ejemplo, cada secuencia de aminoácidos natural o no natural en esta memoria que codifica un polipéptido natural o no natural también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico natural o no natural. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) se puede modificar para originar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita.

45 El término “cantidad eficaz”, como se usa en esta memoria, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto a administrar que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se trata. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o un compuesto administrado incluye, pero no se limita a, un polipéptido de aminoácidos naturales, un polipéptido de aminoácidos no naturales, un polipéptido de aminoácidos naturales modificados, o polipéptido de aminoácidos no naturales modificados. Composiciones que contienen tales polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados se pueden administrar para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos. Se puede determinar una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual usando técnicas, como un estudio de escalado de dosis.

El término “secuencia de ácido nucleico” como se usa en esta memoria, se refiere al orden e identidad de los nucleótidos que comprenden un ácido nucleico.

“Ácido nucleico” se refiere a deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de esqueleto modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no naturales, que tienen propiedades de unión similares a los del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNAs).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes conservativamente modificadas de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, se pueden lograr sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o de deoxiinosina. El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, cDNA, mRNA, oligonucleótido, y polinucleótido.

Una secuencia de aminoácidos particular también abarca implícitamente “variantes de corte y empalme”. De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de corte y empalme de ese ácido nucleico. “Variantes de corte y empalme” como el nombre sugiere, son productos de corte y empalme alternativo de un gen. Después de la transcripción, un transcrito inicial de ácido nucleico puede ser cortado y empalmado de manera que diferentes productos de corte y empalme de ácido nucleico (alternativos) codifiquen polipéptidos diferentes. Los mecanismos para la generación de variantes de corte y empalme varían, pero incluyen empalmes alternativos de exones. Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico mediante transcripción de lectura directa también se abarcan por esta definición. Todos los productos de una reacción de corte y empalme, incluidas las formas recombinantes de los productos de corte y empalme, se incluyen en esta definición.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en esta memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímero de aminoácidos no naturales.

El término “farmacéuticamente aceptable”, como se usa en esta memoria, se refiere a un material, que incluye pero no se limita a, una sal, vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, se puede administrar el material a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuando de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término “cantidad profilácticamente eficaz”, como se usa en esta memoria, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales o al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales modificados aplicada de forma profiláctica a un paciente que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno a tratar. En tales aplicaciones profilácticas, tales cantidades pueden depender del estado de salud, peso y similares del paciente. Se considera que un experto en la técnica puede determinar tales cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación rutinaria, que incluye, pero no se limita a, un ensayo clínico de escalado de la dosis.

La frase “sustancialmente similar” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 75%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, 95% o más o cualquier valor entero de identidad de residuos de aminoácidos o nucleótido, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia, como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencia como los descritos por ejemplo a continuación, o mediante inspección visual. Preferiblemente, existe identidad sustancial en una región de la secuencia que es al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 20, más preferiblemente aproximadamente 40-60 residuos de longitud o cualquier valor entero entre ellos, preferiblemente en una región más larga que 60-80 residuos, más preferiblemente al menos aproximadamente 90-100 residuos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, como la región codificadora de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

El término “sinérgico”, como se usa en esta memoria, se refiere a una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos eficaces que es más eficaz que los efectos aditivos de dos o más agentes individuales. Un efecto sinérgico de una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos puede permitir el uso de dosis más bajas de uno o más de los agentes y/o una administración menos frecuente de los agentes a un sujeto con una enfermedad o afección específica. En algunos casos, se puede usar un efecto sinérgico de una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos para evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en esta memoria, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales y/o al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales modificados administrada a un paciente que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o, al menos, detener parcialmente, o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La eficacia de tales composiciones depende de condiciones que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o condición, terapia previa, estado de salud del paciente y respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico que lo trata. A modo de ejemplo solamente, pueden determinarse cantidades terapéuticamente eficaces mediante experimentación rutinaria, que incluye, pero no se limita a, un ensayo clínico de escalado de la dosis.

Descripción detallada

Esta descripción proporciona un agente anti-angiogénico y un método para inhibir la angiogénesis en el que la afección dependiente en un mamífero se trata mediante la administración de un agente anti-angiogénico al mamífero, en una cantidad y frecuencia terapéuticamente eficaz para producir una regresión o detención de la afección sin toxicidad significativa. La afección dependiente de la angiogénesis se puede seleccionar del grupo que consiste en neoplasma, que incluye un neoplasma de tumor sólido, que incluye un carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma de ovario, neuroblastoma, tumor del sistema nervioso central, neuroblastoma, glioblastoma multiforme o melanoma. Aunque no se puede completar una lista, se puede usar el agente anti-angiogénico para producir una regresión o detención de la mayoría, sino de todos, los tumores sólidos. El mamífero que recibe el tratamiento puede ser un ser humano.

En una realización específica, el agente anti-angiogénico incluye una variación de polipéptidos derivados del dominio uno de CD2, que puede provenir de fuentes humanas y no humanas. Más específicamente, se alteraron la estructura y función del dominio uno de CD2 para preparar nuevos polipéptidos con estabilidad y actividad variables. En algunos ejemplos, las alteraciones podrían usarse para preparar al menos dos cadenas cortas de láminas β anti-paralelas (p. ej., FIGs. 1A, 1B, y 1C) que imitan a la zona activa de varios polipéptidos anti-angiogénicos endógenos, como PF4, IL8, TSP-1, Endostatina, y otros péptidos sintéticos. En algunos ejemplos, el agente anti-angiogénico o polipéptido puede tener una lámina β formada por dos segmentos, un plegamiento anti-paralelo, una superficie hidrófoba orientada hacia adentro, una superficie hidrófila orientada hacia afuera; y los dos segmentos que tienen al menos cuatro aminoácidos. En otros ejemplos, se encontró que seis o más aminoácidos constituían un segmento. En otros ejemplos más, se encontró que ocho o más aminoácidos constituían un segmento. Los residuos de aminoácidos pueden ser alternativos entre hidrofiliidad e hidrofobicidad (p. ej., hidrófilo-hidrófobo-hidrófilo-hidrófobo o hidrófilo-hidrofóbo-hidrófobo).

Los agentes anti-angiogénicos tienen muchas utilidades in vivo, in vitro y ex vivo, que incluyen propiedades anti-angiogénicas en casos clínicos y no clínicos. Se conocen en la técnica métodos para preparar o crear una variación polipeptídica sistemática mediante técnicas de evolución dirigida. Se contempla y comprende que los métodos descritos en esta memoria se pueden usar para preparar otros polipéptidos que no sean CD2 con al menos dos cadenas cortas de lámina β antiparalela.

En una realización, el agente anti-angiogénico se puede preparar usando un diseño racional de polipéptido. El diseño racional incluye métodos en los que se identifican los residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica y se predice que tendrán un impacto específico sobre un polipéptido. Por ejemplo, uno de tales métodos incluye preparar un conjunto experimental de variantes de unos polipéptidos en los que los datos proporcionan información de actividad y secuencia para cada variante de polipéptido en el conjunto experimental; derivar un modelo de actividad que sea capaz de predecir la actividad basada en alteraciones de aminoácidos en posiciones específicas en uno o más polipéptidos que tienen actividades y propiedades específicas.

En otra realización específica, el agente anti-angiogénico se puede preparar creando mutaciones dentro del polipéptido huésped o dominio uno de CD2 (p. ej., ID de Secuencia N°s. 4, 5, y 7).

Un experto habitual en la técnica puede preparar agentes anti-angiogénicos usando tecnología recombinante. Por ejemplo, se puede preparar el ácido nucleico estimado de los polipéptidos o polipéptidos en las SEQ ID N°s: 1-11 usando métodos ordinarios. Alternativamente, se pueden generar los polipéptidos de SEQ ID N°s: 1-11 mediante técnicas de mutagénesis dirigida, para producir un agente anti-angiogénico deseado. Cualquier secuencia nucleica que difiera de cualquier secuencia, que incluye los ID de Secuencia N°s: 1 a 11, puede alterarse debido a la degeneración del código genético. La secuencia de ácido nucleico mutado puede luego subclonarse en un vector de expresión apropiado y expresarse en un huésped como levadura o E. coli. Después de la preparación, las técnicas de purificación son obvias para los expertos en la materia.

En una realización, el agente anti-angiogénico puede incluir glicosilación ligada a N. El proceso de glicosilación ligada a N se produce en eucariotas y tiene implicaciones en el plegamiento de polipéptidos, la solubilidad de los polipéptidos y la circulación sanguínea prolongada. La glicosilación ligada a N puede requerir la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr y se produce con mayor frecuencia cuando esta secuencia consenso se da en un bucle en el péptido. En un ejemplo, es decir, en el sistema de expresión de levadura Pichia, los sitios de glicosilación unida a N estaban en las posiciones N65.

En algunas realizaciones específicas, los agentes anti-angiogénicos controlan o inhiben la angiogénesis. La inhibición de la angiogénesis se considera generalmente que es la detención del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, ya sea que se desarrollen por brotes o por la llegada y posterior diferenciación en células endoteliales de células madre circulantes. Sin embargo, dado que el agente anti-angiogénico puede inducir la apoptosis de células endoteliales activadas, la inhibición de la angiogénesis también debe interpretarse como la muerte de células, particularmente células en vasos existentes cerca o dentro de un tumor cuando se activa por factores de angiogénesis tumorales. Por lo tanto, dentro del contexto de la presente invención, la inhibición de la angiogénesis debe interpretarse como que incluye la inhibición del desarrollo de nuevos vasos, inhibición que puede o no estar acompañada por la destrucción de vasos existentes cercanos.

El agente anti-angiogénico parece inhibir o prevenir la angiogénesis al inhibir o controlar la apoptosis. Los polipéptidos desarrollados demostraron una fuerte actividad en la inducción de la apoptosis de células endoteliales sin efectos sobre las células epiteliales y fibroblastos en los análisis in vitro. Además, los polipéptidos desarrollados ejercieron menos efecto sobre la estructura tubular formada por las células HUVEC, lo que sugiere una menor toxicidad en los vasos sanguíneos normales ya existentes. Los factores de supervivencia incluyen factores de crecimiento de células endoteliales vasculares o mitógenos, así como aquellos factores que no parecen tener un efecto estimulador de crecimiento directo, pero permiten que las células se recuperen de una lesión.

Estos agentes anti-angiogénicos se pueden incorporar a los métodos de tratamiento de un mamífero inhibiendo la angiogénesis que incluye las etapas de administrar los agentes anti-angiogénicos. En ciertas realizaciones, el polipéptido anti-angiogénico exhibió un tiempo de circulación prolongado en comparación con las moléculas pequeñas y los agentes peptídicos cortos.

Realizaciones específicas proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis y métodos para tratar enfermedades asociadas con la angiogénesis. En otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos para inhibir o reducir el crecimiento tumoral y métodos para tratar a un individuo que padece cáncer. Estos métodos implican administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos como se describió anteriormente. Estos métodos están particularmente dirigidos a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más particularmente, de seres humanos.

Como se describe en esta memoria, las enfermedades asociadas a la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, cáncer dependiente de angiogénesis, que incluye, por ejemplo, tumores sólidos, tumores de linaje sanguíneo como leucemias, y metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piógenos; trastornos inflamatorios como inflamación inmune y no inmune; reumatismo articular crónico y psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo del injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; Síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; placa de neovascularización; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; y granulación de heridas y curación de heridas; esclerodermia con psoriasis y telangiectasia, granuloma piógeno, colaterales coronarias, angiogénesis de miembros isquémicos, enfermedades corneales, rubeosis, artritis, neovascularización diabética, fracturas, vasculogénesis, hematopoyesis.

Un beneficio potencial de la combinación de un agente anti-angiogénico y un agente quimioterapéutico puede ser una mejora en el tratamiento y control de una afección dependiente de la angiogénesis con dosis reducidas de un agente quimioterapéutico. La combinación se puede administrar durante un periodo prolongado de tiempo, u opcionalmente se puede administrar una duración más corta de tratamiento debido a la eficacia aumentada de la combinación.

Dependiendo de la naturaleza de la terapia combinatoria, la administración de los agentes terapéuticos polipeptídicos de la invención puede continuar mientras se administra la otra terapia y/o posteriormente. La administración de los agentes terapéuticos polipeptídicos se puede hacer en una sola dosis, o en dosis múltiples. En algunos casos, la administración de los agentes terapéuticos polipeptídicos se inicia al menos varios días antes de la terapia convencional, mientras que en otros casos, la administración se inicia inmediatamente antes o en el momento de la administración de la terapia convencional.

En una realización, el agente anti-angiogénico se puede administrar en combinación con agentes quimioterapéuticos y otros agentes terapéuticos, así como radioterapias. El agente quimioterapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en alcaloide vinca, camptotecina, taxano, o análogo de platino, que incluye vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, 5 FU, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán, o ciclofosfamida. El agente quimioterapéutico se puede administrar en un régimen de dosis baja, en combinación con el agente anti-angiogénico debido al efecto antitumoral del agente anti-angiogénico. El agente quimioterapéutico puede administrarse a menos de la dosis máxima tolerada.

Se contempla que el agente anti-angiogénico se puede usar con agentes anti-neoplásicos, que incluyen los siguientes agentes anti-neoplásicos: Acividina; Aclarbucina; Hidrocloruro de Acodazol; AcrQnine; Adozelesin; Aldesleukina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrine; Anastrozol; Antramycin; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida;

- Hidrocloruro de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Beomicina; Brequinar sódico; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimero; Carboplatino; Carmustina; Hidrocloruro de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Hidrocloruro de Daunorubicina; Decitabina;
- 5 Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Hidrocloruro de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Hidrocloruro de Eflomitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Hidrocloruro de Epirubicina; Erbulozol; Hidrocloruro de Esorubicina; Estramustina; Fosfato sódico de Estramustina; Etanidazol; Aceite Etiodizado de Yodo 131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Hidrocloruro de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida;
- 10 Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Fluorocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Hidrocloruro de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; Hidrocloruro de Idarubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón alfa-2a; Interferón alfa-2b; Interferón alfa-n1; Interferón alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1b; Iproplatino; Hidrocloruro de Irinotecán; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Hidrocloruro de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Hidrocloruro de Losoxantrona; Masoprolol; Maitansina; Hidrocloruro de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato;
- 15 Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedapa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Hidrocloruro de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatino; Oxisurán; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromán; Puposulfán; Hidrocloruro de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero Sódico; Porfiromicina;
- 20 Prednimustina; Hidrocloruro de Procarbazona; Puromicina; Hidrocloruro de Puromicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Hidrocloruro de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Hidrocloruro de Espirogermanio; Espiromustina; Espiroplatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalán Sódico; Tegafur; Hidrocloruro de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina;
- 25 Hidrocloruro de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Hidrocloruro de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredapa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Hidrocloruro de Zorubicina.
- 30 Otros compuestos anti-neoplásicos incluyen: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleukina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; atrsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; polipéptido-1 morfogenético anti-dorsalización; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores génicos de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina deaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de baccatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzolestaurosoprina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilesperrina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano;
- 40 butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de campotecina; IL-2 del virus de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de la caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol;
- 45 criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; octofosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelina; dexifosfamida; dextrazoxano; dextrapamil; diaziquona; didemina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; diferil espiromustina; docosanol; dolasetron; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocanicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano;
- 50 fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; fmasteride; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloruro de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texapirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutathione; hepsulfam; heregulina; biscetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina;
- 55 ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunostimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yodoxorubicina; ipomeanol, 4-; irinotecan; iroplactol; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstina; sulfato de lentinán; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina;
- 60 levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprolol; maspina; inhibidores de matrilitina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostima; ARN de doble cadena desapareada; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos
- 65

mitoxina-saporina; mitoxantrona; morfaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil-lípido A+ sk de la pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor génico de multirresistencia a fármacos; terapia basada en el supresor tumoral múltiple 1; agente anticancerígeno mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstima; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreótido; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citoquinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; hidrocloreto de pilocarpina; pirarubicina; piritrexima; placetina A, placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de protein quinasa C; inhibidores de protein quinasa C; microalga; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado hemoglobina piridoxilada y polioxietileno; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la proteína quinasa ras farnesil; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; roglitimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcotitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señal; moduladores de la transducción de señal; proteína de unión de antígeno de una sola cadena; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastatina 1; escualamina; inhibidor de célula madre; inhibidores de división de célula madre; estipiarnida; inhibidores de estromelina; sulfmosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metiyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante tiroidea; tin etil etiopurpurina; tirapazamina; dihidrocloruro de titanoceno; topotecán; topsentina; toremifeno; factor de célula madre totipotente; inhibidores de la traducción; tretinoina; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosin quinasa; tirfostinas; inhibidores UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporetina; variolina B; sistema de vector, terapia génica de eritrocito; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; zinostatina estimalamer. Los expertos en la técnica también reconocerán otros numerosos compuestos que entran en esta categoría de agentes que son útiles en combinación con el agente anti-angiogénico.

Se contempla que el agente anti-angiogénico se pueda usar con Agentes Anti-cancerígenos Potenciadores Suplementarios, que incluyen los siguientes Agentes Potenciadores Suplementarios: Agentes Anti-cancerígenos Potenciadores Suplementarios: fármacos anti-depresivos tricíclicos (p. ej., imipramina, desipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, amoxapina y maprotilina); fármacos anti-depresivos no-tricíclicos (p. ej., sertralina, trazodona y citalopram); antagonistas sup. de Ca^{++} (p. ej., verapamil, nifedipina, nitrendipina y caroverina); inhibidores de Calmodulina (p. ej., prenilamina, trifluoroperazina y clomipramina); Amfotericina B; análogos de Triparanol (p. ej., tamoxifeno); fármacos antiarrítmicos (p. ej., quinidina); fármacos antihipertensivos (p. ej., reserpina); depleccionadores de Tiol (p. ej., butionina y sulfoxamina) y agentes reductores de la Resistencia Múltiple a Fármacos como Cremafor EL. Los compuestos de la invención también se pueden administrar con citoquinas como factor estimulante de colonias de granulocitos. Los expertos en la técnica también reconocerán otros numerosos compuestos que entran en esta categoría de agentes que son útiles en combinación con el agente anti-angiogénico.

Una realización también incluye un kit para tratar una afección dependiente angiogénica en un mamífero que comprende un agente anti-angiogénico y un agente quimioterapéutico. Se proporciona la combinación de agentes para permitir la administración en una cantidad y frecuencia terapéuticamente eficaz para producir un no asentamiento o regresión de la angiogénesis. En ciertas realizaciones, el agente anti-angiogénico y/o polinucleótidos se administran solos o en combinación con un agente anti-inflamatorio. Agentes anti-inflamatorios que se pueden administrar con los agentes anti-angiogénicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides (p. ej., betametasona, budesonida, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, y triamcinolona), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (p. ej., diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, floctafenina, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tenoxicam, ácido tiaprofénico, y tolmetina), así como antihistaminas, derivados de ácido aminoarilcarboxílico, derivados de ácido arilacético, derivados de ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazonas, derivados de ácido salicílico, tiazinocarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazaco, benzidamina, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, orgoteina, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, proquazona, proxazol, y tenidap.

Los agentes farmacéuticos incluyen las siguientes categorías y ejemplos específicos. No se pretende que la categoría esté limitada por los ejemplos. Los expertos en la técnica serán capaces de identificar fácilmente los agentes farmacéuticos que tienen utilidad fuera del sistema nervioso central. Los expertos en la técnica también reconocerán otros numerosos compuestos que entran en las categorías y que son útiles de acuerdo con la invención.

En algunas realizaciones, sería deseable aumentar la solubilidad y el tiempo de circulación sanguínea del agente anti-angiogénico. Para aumentar la solubilidad polipeptídica, el tiempo de circulación sanguínea, se puede usar polietilenglicol para derivatizar los polipéptidos de la invención, incluido, por ejemplo, poli(etilen glicol) (PEG), poli(vinilpirrolidona), polioxómeros, polisorbato y poli(vinil alcohol), siendo particularmente preferidos los polímeros de PEG. Los polímeros de PEG son polímeros de PEG que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 40.000. Otros polímeros hidrófilos adecuados, además de los ejemplificados anteriormente, serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica en base a la presente descripción. En general, los polímeros usados pueden incluir polímeros que se pueden anclar a los polipéptidos de la invención a través de reacciones de alquilación o acilación. En un ejemplo, el agente anti-angiogénico era PEGilado con una cadena-PEG de 20 kDa.

Las moléculas de polietilen glicol (u otros restos químicos) se deben unir al polipéptido teniendo en cuenta los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos del polipéptido. Hay un número de métodos de unión disponibles por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el polietilen glicol se puede unir covalentemente a través de residuos de aminoácidos a través de un grupo reactivo, como, un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que se puede unir una molécula activada de polietilen glicol. Los residuos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácidos N-terminales; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido C-terminal. Los grupos sulfhidrilo también se pueden usar como un grupo reactivo para unir las moléculas de polietilen glicol. Se prefiere con fines terapéuticos la unión a un grupo amino, como unión a un grupo N-terminal o lisina. Se pueden desear específicamente polipéptidos químicamente modificados en el N-terminal. Usando polietilen glicol como una ilustración de la presente composición, se puede seleccionar de una variedad de moléculas de polietilen glicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilen glicol a moléculas polipeptídicas (de polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación a realizar, y el método de obtención del polipéptido pegilado N-terminal seleccionado. Bajo condiciones apropiadas de reacción, se logra substancialmente una derivatización selectiva del polipéptido en el grupo N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo.

Hay disponibles una variedad de rutas de administración. El modo particular seleccionado puede depender del agente anti-angiogénico, la afección particular a tratar y la dosificación requerida para eficacia. Estos métodos se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que quiere decir, cualquier modo que produce niveles eficaces de una respuesta inmune sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Ciertos modos de administración son rutas parenterales.

Ciertas realizaciones específicas también proporcionan composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de componente activo (p. ej., el agente anti-angiogénico, el agente anti-angiogénico más el agente quimioterapéutico o anti-angiogénico más agente anti-inflamatorio), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, pastillas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con los aglomerantes y vehículos tradicionales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente anti-angiogénico junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

La cantidad del agente anti-angiogénico que será eficaz en el tratamiento (Véase, p. ej., FIG.9), inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido terapéutico se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, se pueden opcionalmente emplear ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimas. La dosis precisa a emplearse en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias del paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos in vitro o de animales.

Más específicamente, el agente o composiciones farmacéuticas se puede probar in vitro, y luego in vivo para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de usar en seres humanos. Por ejemplo, ensayos vitro para demostrar la utilidad terapéutica o profiláctica de un compuesto o composición farmacéutica incluyen, el efecto de un compuesto sobre una línea celular o una muestra de tejido del paciente. El efecto del compuesto o composición sobre la línea celular y/o muestra de tejido se puede determinar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ensayos de formación de rosetas y ensayos de lisis celular. De acuerdo con la invención, los ensayos de cultivo celular in vitro que se pueden usar para determinar si está indicada la administración de un compuesto específico, incluyen ensayos de cultivo celular in vitro en los que se crece una muestra de tejido del paciente en el cultivo, y se expone a o se administra un compuesto, y se observa el efecto de dicho compuesto sobre la muestra de tejido.

Se contempla que el agente anti-angiogénico se puede formular de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o bolsita que indique la cantidad de agente activo. Donde debe administrarse la composición por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o suero salino estéril de grado farmacéutico. Donde debe administrarse la composición por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o suero salino para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolus, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención dentro del sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar por un catéter intraventricular.

En una realización específica, puede ser deseable administrar el agente anti-angiogénico localmente a la zona que necesita tratamiento. Esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p. ej., junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, o en poroso o gelatinoso, que incluye membranas, como membranas sialásticas, o fibras. Cuando se administra un polipéptido, se debe tener cuidado de usar materiales a los que el polipéptido no se absorba.

En una realización específica donde el agente anti-angiogénico es un ácido nucleico que codifica un polipéptido, se puede administrar el ácido nucleico in vivo para promover la expresión de su polipéptido codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo para que se convierta en intracelular, p. ej., mediante el uso de un vector retroviral, o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas, o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en unión con un péptido tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo, etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente o incorporar dentro del ADN de la célula huésped para expresión, mediante recombinación homóloga.

Otras realizaciones están dirigidas a vectores que contienen un polinucleótido que codifica el agente anti-angiogénico en células huésped, y a la producción del agente anti-angiogénico mediante técnicas sintéticas y recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, viral, o vector retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o replicación defectiva. En el último caso, la propagación viral generalmente se dará solamente en células huésped complementarias. Los polinucleótidos que codifican al agente anti-angiogénico se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, como un precipitado de fosfato cálcico, o en un complejo con un lípido cargado. El polinucleótido inserto debe estar ligado operativamente a un promotor apropiado, como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de E. coli, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y promotores de LTRs retrovirales, para nombrar unos pocos. Otros promotores adecuados serán conocidos por los expertos en la técnica. Los constructos de expresión contendrán además sitios para la iniciación de la transcripción, terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La región codificante de los transcritos expresados por los constructos preferiblemente incluirán un codón de iniciación de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) localizado de modo apropiado al final del polipéptido a traducir. Como se indica, los vectores de expresión preferiblemente incluirán al menos un marcador seleccionable.

Se contempla que se pueden usar genes y secuencias reguladoras con la expresión y replicación del agente anti-angiogénico. La naturaleza de las secuencias reguladoras para la expresión génica pueden variar entre especies o tipos celulares, pero deberían incluir en general, según sea necesario, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas implicadas en la iniciación de la transcripción y traducción respectivamente, como una caja TATA, secuencia "caperuza" (capping), secuencia CAAT, y similares. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias amplificadoras o secuencias activadoras corriente arriba, según se desee.

En una realización, los polinucleótidos que codifican el agente anti-angiogénico se pueden fusionar a polinucleótidos que codifican secuencias señal que dirigirán la localización de un polipéptido a compartimentos particulares de una célula procariota o eucariota y/o dirigirán la secreción de un polipéptido. Por ejemplo, en *E. coli*, se debe desear dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásmico. Varios vectores están disponibles comercialmente para la construcción de proteínas fusión que dirigirán la localización de una proteína.

Una realización específica proporciona stents, que comprenden generalmente una estructura tubular (que incluye por ejemplo, formas en espiral), cuya superficie está recubierta con un agente anti-angiogénico como se describe anteriormente. Un stent puede ser una estructura, normalmente de forma cilíndrica, que se puede insertar en una vía corporal (p. ej., conductos biliares) o una porción de una vía corporal, que se ha estrechado, con contorno irregular, obstruida, u ocluida por un proceso de enfermedad (p. ej., crecimiento interno por un tumor) con el fin de prevenir la clausura o re-clausura de la vía.

Una realización específica también proporciona el uso de un agente anti-angiogénico en una amplia variedad de procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, dentro de un aspecto de la presente invención se puede utilizar una proteína anti-angiogénica (en forma de, por ejemplo, un spray o película) para recubrir o pulverizar una zona antes de la extirpación de un tumor, con el fin de aislar los tejidos normales circundantes del tejido maligno, y/o prevenir la propagación de la enfermedad a los tejidos circundantes. Dentro de otros aspectos de la presente invención, las mallas quirúrgicas que se han recubierto con proteína anti-angiogénica se pueden utilizar en cualquier procedimiento en donde se podría utilizar una malla quirúrgica.

Los ejemplos que siguen están expuestos para ayudar en la comprensión de la invención, pero no están destinados, y no deben interpretarse como, limitando el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión del agente anti-angiogénico

Se expresó y se purificó el agente anti-angiogénico a partir de *E. coli* bacteriana. Para ayudar a garantizar que el polipéptido diseñado aún se pliega adecuadamente, se confirmó la estructura con análisis ¹H-NMR. Se compararon el espectro de NMR del agente anti-angiogénico (120 μ M) y el de CD2-D1 (120 μ M). Como se muestra en la FIG. 2, el espectro de NMR del agente anti-angiogénico era casi idéntico al de CD2-D1 (arriba), mientras que el polipéptido no plegado (mediante disolvente orgánico) mostró un espectro completamente diferente (abajo). El polipéptido resultante mostró una propiedad estructural muy similar a la demostrada por similitud de espectros ¹H-NMR, CD, y espectro de fluorescencia tanto de la proteína huésped como de la proteína desarrollada.

Ejemplo 2: Células Endoteliales y Apoptosis

Para determinar los efectos del agente anti-angiogénico sobre las células endoteliales, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular usando células HUVEC. Las células se trataron con varias concentraciones de un ejemplo de agente anti-angiogénico desarrollado, anginex, y polipéptido huésped con el que se derivó el agente anti-angiogénico. Como se muestra en la FIG. 3A, el agente anti-angiogénico fue más eficaz en la inducción de la apoptosis de las células HUVEC (Fig. 2A). Además, se probó si los efectos fueron específicos de células endoteliales. Para este fin, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular con células HUVEC, M4A4, en presencia de Agente anti-angiogénico, Anginex, y proteína huésped 5 μ M o 10 μ M. Como se muestra en las FIGs. 3B y 9, estaba claro que la fuerte inhibición en la proliferación celular por el agente con células HUVEC, mientras que no se observaron efectos con células M4A4 epiteliales. Las observaciones indicaron que los efectos del agente anti-angiogénico eran específicos de células endoteliales.

Ejemplo 3: Inhibición del crecimiento tumoral del xenoinjerto de células PC-3

Era evidente la fuerte actividad del agente anti-angiogénico en la inhibición del crecimiento y la inducción de apoptosis en células HUVEC. Se preparó un modelo de xenoinjerto de células PC-3 usando ratones inmunodeficientes. Se trataron ratones portadores de tumores (6 ratones por grupo) con agente anti-angiogénico (10 mg/kg), agente anti-angiogénico PEGilado (10 mg/kg), proteína huésped (10 mg/kg), y tampón salino durante dos semanas vía dosis diaria. Los tratamientos se iniciaron 7 días después de la inoculación del tumor. Se midieron los tumores por volumen o por bioluminiscencia de células tumorales.

Como se muestra en las FIGs. 4A y 4B, el agente anti-angiogénico y el agente anti-angiogénico-PEG inhibieron el crecimiento tumoral. La FIG. 4A muestra gráficamente que el volumen del tumor permaneció relativamente

constante durante el curso del tratamiento con un agente anti-angiogénico cuando se inició el tratamiento después de 8 días. La FIG. 4B muestra gráficamente el efecto dosis-dependiente y que el volumen tumoral permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente anti-angiogénico cuando se inició el tratamiento después de 22 días. Mientras en los controles, los tumores crecieron a la velocidad normal en los ratones tratados con tampón y las proteínas huésped. Al final del curso del tratamiento, se cortaron y pesaron los tumores en cada grupo de tratamiento.

Como se muestra en la FIG. 5, hubo diferencias sustanciales en los pesos tumorales que comparaban el agente anti-angiogénico y los grupos control. Esta vez los tumores se inicializaron con 2×10^6 células. Los tratamientos se iniciaron a los 22 días después de la implantación del tumor. El agente anti-angiogénico inhibió completamente el crecimiento tumoral.

Como se muestra en la FIG. 6, en los grupos control, los tumores crecieron a velocidad normal en los ratones tratados con el tampón y las proteínas huésped (CD2). A partir de las imágenes, se puede observar que los tumores se mantuvieron constantes cuando se trataron con los agentes anti-angiogénicos examinadores. Solo para fines de referencia, la Proteína M1WT puede denominarse Angio1 y M1PEG puede denominarse Angio2.

Ejemplo 4: Densidad de vasos después de los tratamientos

La FIG. 7 muestra que la densidad del vaso, monitorizada usando tinción de inmunofluorescencia de secciones de tejido tumoral recogidas de ratones tratados, se redujo drásticamente después del tratamiento con agente Anti-angiogénico con agente Anti-angiogénico PEGilado en comparación con el grupo de tratamiento con proteína huésped PEGilada y tampón. Para determinar si los efectos del tratamiento con agente anti-angiogénico eran realmente en los vasos sanguíneos del tumor, se recolectaron los tumores después de los tratamientos. Se prepararon portaobjetos de tejido a partir de los tumores recolectados. Los portaobjetos de tejido se tiñeron inmunológicamente con anticuerpo frente a CD31, un marcador específico para células endoteliales. La tinción inmunológica de los portaobjetos de tejido tumoral se visualizó mediante microscopía confocal. Los resultados indicaron que el agente anti-angiogénico y tiene efectos específicos sobre la angiogénesis tumoral.

Ejemplo 5: Toxicidad e inmunogenicidad del agente Anti-angiogénico

Previamente se analizó la toxicidad de la proteína parental del dominio 1 de CD2 y no era tóxica en ratones. Para ayudar a garantizar que los nuevos diseños no alteran la toxicidad de la proteína, se examinó la toxicidad del polipéptido anti-angiogénico usando ratones CD-1. En primer lugar, se monitorizaron cuidadosamente los pesos corporales de los ratones desnudos durante un curso de tratamiento de 14 días. Como se muestra en la FIG. 8, no se observaron cambios significativos en el peso corporal de los ratones en ningún grupo de tratamiento. Además, se probó la toxicidad en ratones CD-1 normales. Se inyectaron tres grupos de ratones (7 ratones por grupo) por vía i.v. con una dosis, dos dosis y tres dosis de 100 μ l de polipéptido (100 mg/kg, 20 veces la dosis usada) con un intervalo de tres días entre cada inyección. Los animales se devolvieron a sus jaulas durante 30 días. No se observaron muertes entre los ratones evaluados. Todos los animales se comportaron normalmente (sin cambios en los hábitos alimenticios, sin ganancia o pérdida anormal de peso, sin apariencia anormal en el pelaje).

Los estudios de toxicidad mostraron que el agente anti-angiogénico y el agente anti-angiogénico con PEG no tenían toxicidad aguda por al menos tres dosis que eran aproximadamente 20 veces más altas que la dosificación usada en nuestro tratamiento de ratones tumorales. Además, también se probó si había daños hepáticos, renales y cardiovasculares después del tratamiento con el agente anti-angiogénico y el agente anti-angiogénico con PEG. Los análisis histológicos revelaron que no hay daños en los órganos de animales tratados.

Ejemplo 6: Glicosilación ligada a N

El polipéptido mostrado en la Secuencia con ID N°: 11 se expresó y se purificó a partir del sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Se logró la expresión de este polipéptido en la levadura *Pichia pastoris* tanto por expresión intracelular como por secreción. Este polipéptido se purificó adicionalmente usando una columna de intercambio iónico. El polipéptido se expresó como un polipéptido con cola de His. La cola de His se eliminó mediante escisión por trombina. La proteína glicosilada expresada y purificada a partir de levadura *Pichia pastoris* era un agente anti-angiogénico y se encontró que tenía glicosilación ligada a N. Como se muestra en la FIG. 13, las células tratadas con diversos ejemplos del agente anti-angiogénico mostraron una robusta viabilidad.

Ejemplo 7: Secuencias

La SEQ ID N°: 1 es la secuencia de aminoácidos del dominio uno de CD2 de una rata (CD2-D1 WT de Rata):

RDSGTVWGAL GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL KSGAFEILAN GDLKIKNLTR
DDSGTYNVTV YSTNGTRILN KALDLRILE

La SEQ ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos del dominio uno de CD2 de humano (CD2-D1 WT de Humano):

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKDKKIAQFRKEKETFKEDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDI

YKVSIDYDTKGKNVLEKIFDLKIQER

La SEQ ID N°: 3, denominada M1WT o Angio1, es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 derivada de la SEQ ID N° 1 por mutaciones W7Q, G8M, A9K, D94N, R96K, I97V, L98I, y E99I:

5 RDSGTVQMKL GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL KSGAFEILAN GDLKIKNLTR
DDSGTYNVTY YSTNGTRILN KALNLKVII

La SEQ ID N°: 4 es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 d derivada de la SEQ ID N° 1 por mutaciones E41I, K43V, K45L, M46G, K47S, P48V, y G53L:

RDSGTVKWKA GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL KSGAFEILAN GDLKIKNLTR
DDSGTYNVTY YSTNGTRILN KALS LDVNI

10 La SEQ ID N°: 5 es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 derivada de la SEQ ID N° 1 por mutaciones E41N, M46Q, y F49S:

RDSGTEVIKA GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL KSGAFEILAN GDLKIKNLTR
DDSGTYNVTY YSTNGTRILN KALKLTAIL

15 La SEQ ID N°: 6, denominada como ProAngio-PEG o Angio2, es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 derivada de la SEQ ID N° 3 por mutaciones M23C:

RDSGTVQMKL GHGINLNIPN FQCTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL KSGAFEILAN GDLKIKNLTR
DDSGTYNVTY YSTNGTRILN KALNLKVII

La SEQ ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 derivada de la SEQ ID N° 1 por mutaciones E41I, K43V, K45L, M46G, K47S, y F49S:

20 RDSGTVWGAL GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA IFVRLGSVKM KPLLKSGAFE ILANGDLKIK
NLTRDDSGTY NVTY YSTNGT RILNKALDLR ILE

La SEQ ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2:

RDSGTVWGALGHGINLNIPNFQMTDDIDEVRWERGSTLVANFKRKQKPLSKSGAFEILANGDLKIKNLTRDDSGTYNV
TVYSTNGTRILNKALDLRILE

25 La SEQ ID N°: 9, denominada como hProAngioB o Angio3, es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 derivada de la SEQ ID N° 2 por mutaciones E8S, T9V, W10Q, G11M, A12K, D99N, I102V, Q103I, y E104I:

KEITNALSVMKLGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFEKDTYELLKNGALKIKHLKTDDQDI
YKVSIDYDTKGKNVLEKIFNLKVII

30 La SEQ ID N°: 10, denominada como hProAngio o Angio4, es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 derivada de la SEQ ID N° 9 por mutaciones M30C:

KEITNALSVMKLGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFEKDTYELLKNGALKIKHLKTDDQDI
YKVSIDYDTKGKNVLEKIFNLKVII

35 La SEQ ID N°: 11, denominada como hProAngioY o Angio5, es la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio uno de CD2 de levadura:

KEITNALSVMKLGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFEKDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDY
KVSIDYDTKGKNVLEKIFNLKVII

Ejemplo 7: Supresión del crecimiento tumoral

40 La FIG. 10 muestra la curva de crecimiento del tumor a lo largo de 14 días o más de tratamiento. Los resultados muestran que hProAngio o Angio4, desarrollado a partir del polipéptido que codifica la secuencia con N° Id. 10, fue eficaz en la supresión del crecimiento tumoral. Los experimentos se llevaron a cabo usando el xenoinjerto PC-3 que usa hProAngio o Angio4 (10 mg/kg, dosis diaria) y usando tampón salino como control. Los tratamientos se iniciaron 8 días después de la inoculación del tumor.

Ejemplo 8: Efectividad contra Avastin®

45 Para probar además la efectividad del polipéptido anti-angiogénico, se llevaron a cabo experimentos con xenoinjertos PC-3 que usan rProAngio-PEG o Angio2 (20 mg/kg, dosis diaria) y Avastin (20 mg/kg, una dosis cada dos días) y se analizaron. Los tratamientos se iniciaron 21 días después de la inoculación del tumor. La FIG. 11 es la curva de crecimiento del tumor de Avastin® y rProAngio-PEG o Angio2. La FIG. 12 muestra una representación

gráfica del peso del tumor al final del curso de tratamiento de 14 días- se extrajeron y pesaron los tumores en cada grupo de tratamiento. Había diferencias significativas en los pesos y crecimiento del tumor de los grupos de animales que fueron tratados con Angio2 y Avastin®.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido CD2 para uso en un método para reducir la angiogénesis patológica en un individuo, comprendiendo el método:

5 administrar a un individuo una dosis eficaz de una variante del dominio uno del polipéptido de ser humano o de ratón,

en donde la administración proporciona la reducción de la angiogénesis patológica en el individuo, y

en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en Secuencia N° Id. 1, Secuencia N° Id. 2, Secuencia N° Id. 3, Secuencia N° Id. 4, Secuencia N° Id. 5, Secuencia N° Id. 6, Secuencia N° Id. 7, Secuencia N° Id. 8, Secuencia N° Id. 9, Secuencia N° Id. 10, y Secuencia N° Id. 11.

2. Polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el polipéptido reduce la angiogénesis patológica en el tratamiento de un trastorno seleccionado de crecimiento tumoral, aterosclerosis, retinopatía diabética, maculopatía relacionada con la edad, y fibroplasia retrolental.

3. Polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde dicha administración es mediante una ruta seleccionada de intravenosa, en o alrededor del tumor sólido, sistémica, intraarterial, intraocular, intraperitoneal, y tópica.

4. Polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el agente anti-angiogénico induce apoptosis de células endoteliales o apoptosis de células de mamífero.

5. Un polipéptido anti-angiogénico para uso en un método para reducir la angiogénesis patológica en un individuo, en donde el polipéptido anti-angiogénico comprende un segmento de aminoácidos que es una variante del dominio uno de CD2 en donde el polipéptido tiene una lámina β formada por dos segmentos, un pliegue anti-paralelo, una superficie hidrófoba orientada hacia adentro, una superficie hidrófila orientada hacia afuera; y los dos segmentos tienen al menos cuatro aminoácidos que alternan entre hidrofiliidad e hidrofobicidad, y en donde el polipéptido comprende además un resto de polietilén glicol (PEG).

6. El polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde el polipéptido tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Secuencia N° Id. 1, Secuencia N° Id. 2, Secuencia N° Id. 3, Secuencia N° Id. 4, Secuencia N° Id. 5, Secuencia N° Id. 6, Secuencia N° Id. 7, Secuencia N° Id. 8, Secuencia N° Id. 9, Secuencia N° Id. 10, y Secuencia N° Id. 11.

7. El polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Secuencia N° Id. 3, Secuencia N° Id. 4, Secuencia N° Id. 5, Secuencia N° Id. 6, Secuencia N° Id. 7, Secuencia N° Id. 8, Secuencia N° Id. 9, y Secuencia N° Id. 10.

8. Una composición farmacéutica para uso en un método para reducir la angiogénesis patológica en un individuo, en donde la composición farmacéutica comprende un péptido aislado o variante del mismo seleccionado del grupo que consiste en Secuencia N° Id. 1, Secuencia N° Id. 2, Secuencia N° Id. 3, Secuencia N° Id. 4, Secuencia N° Id. 5, Secuencia N° Id. 6, Secuencia N° Id. 7, Secuencia N° Id. 8, Secuencia N° Id. 9, Secuencia N° Id. 10, y Secuencia N° Id. 11.

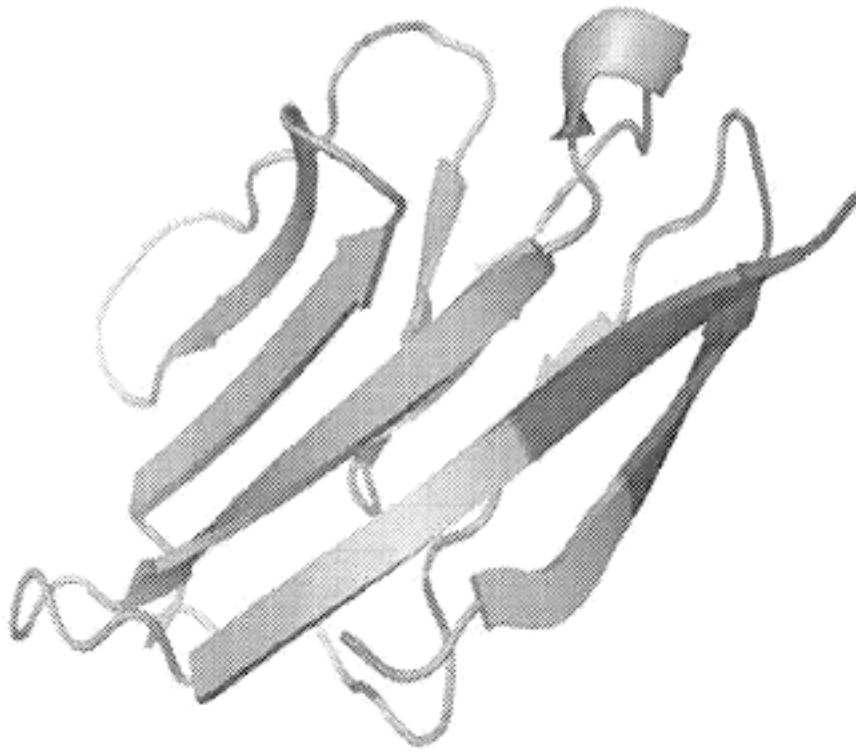


FIG. 1A

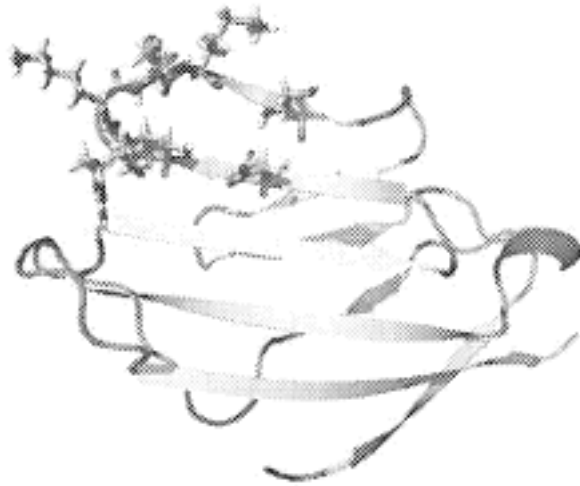


FIG. 1C



FIG. 1B

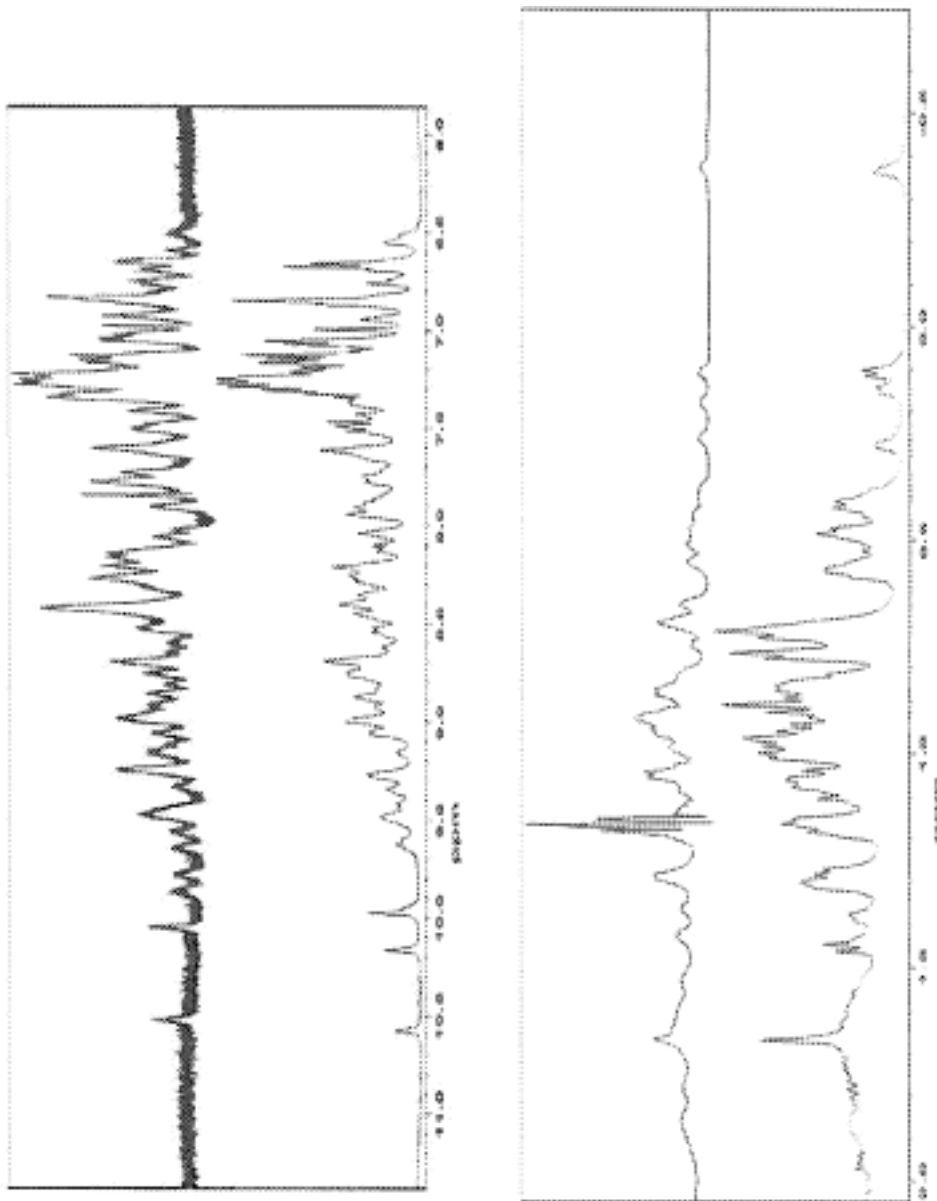


FIG. 2

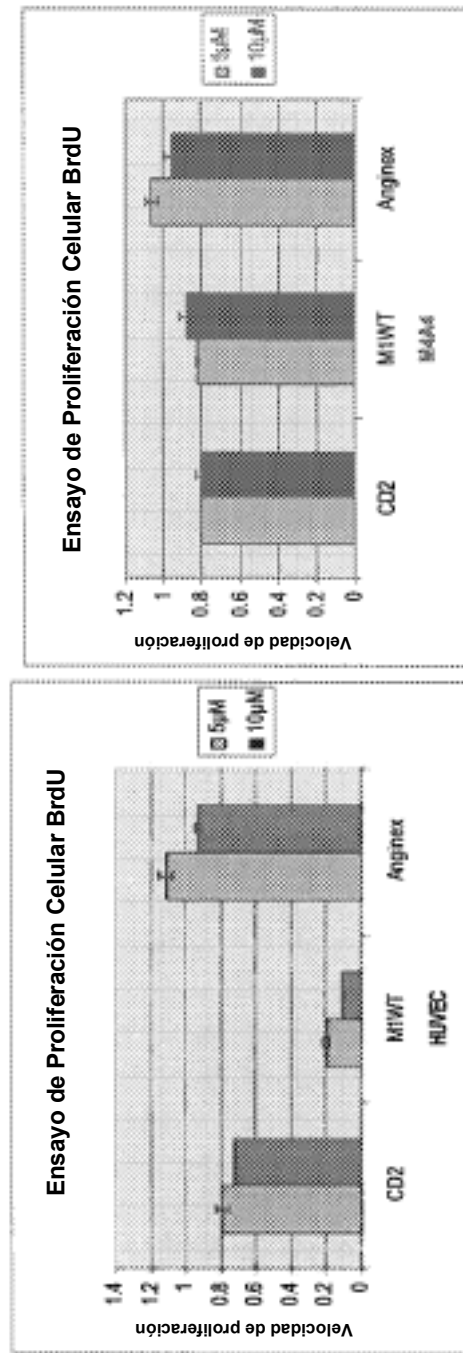


FIG. 3A

M1WT = Angio1 CD2 = huésped HUVEC = endotelial M4A4 = epitelial

FIG. 3B

Crecimiento del Tumor

S.c. xenoinjertos de PC-3 (seis ratones/grupo). El tumor se inicia con 1×10^7 células a 10 mg/kg de dosis diaria (i.p.) durante 14 días

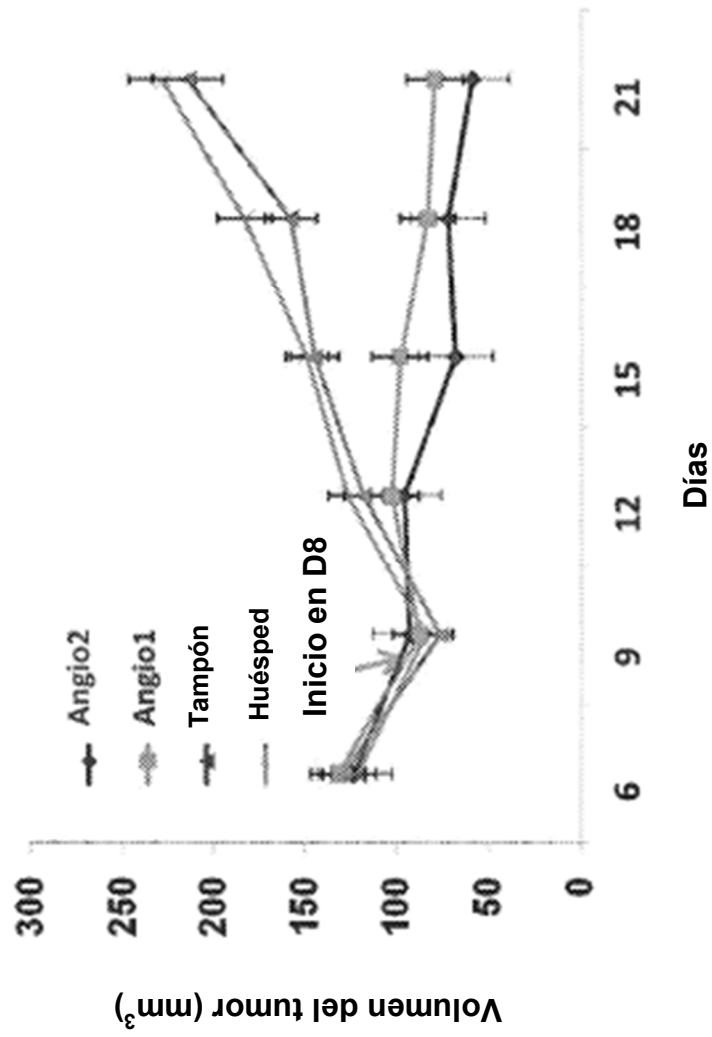


FIG. 4A

Crecimiento del Tumor

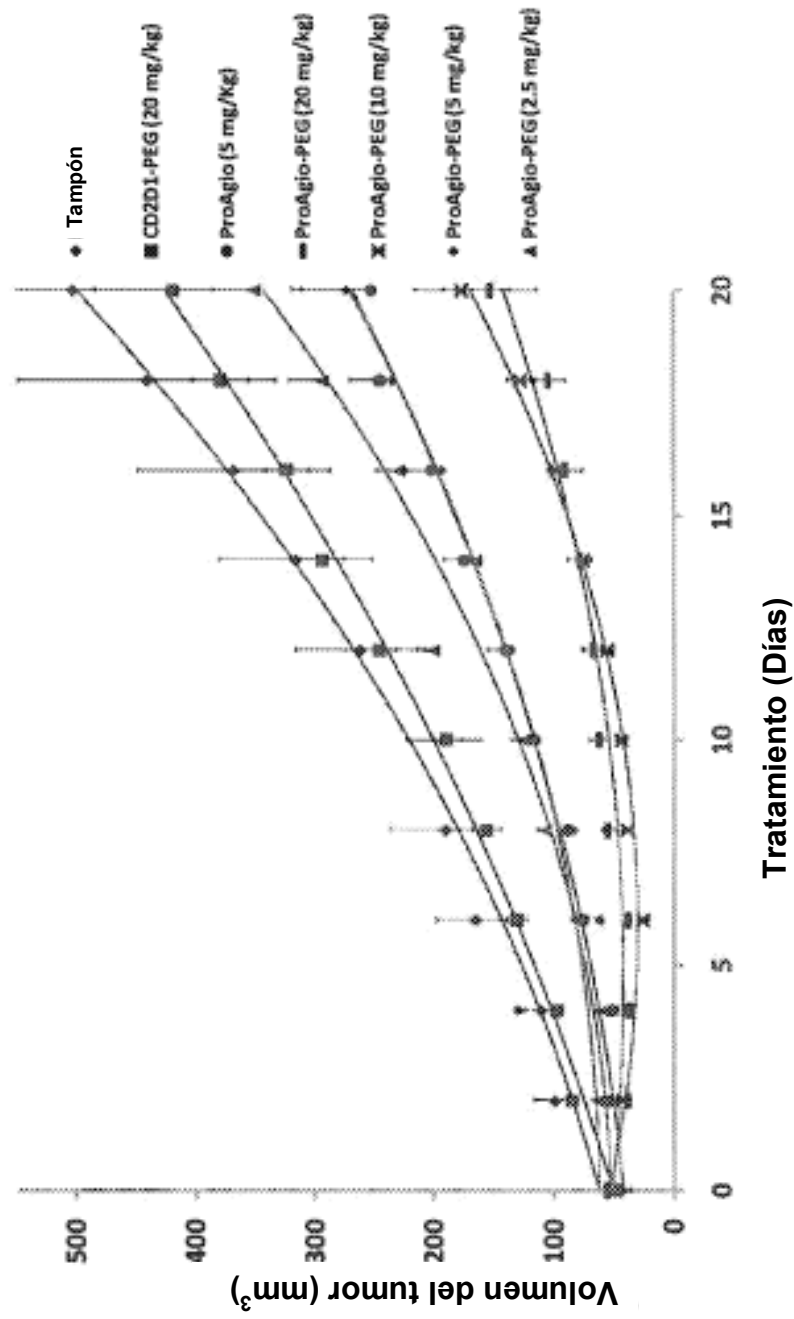


FIG. 4B

ProAgio = Angio1

ProAgio-PEG = Angio2

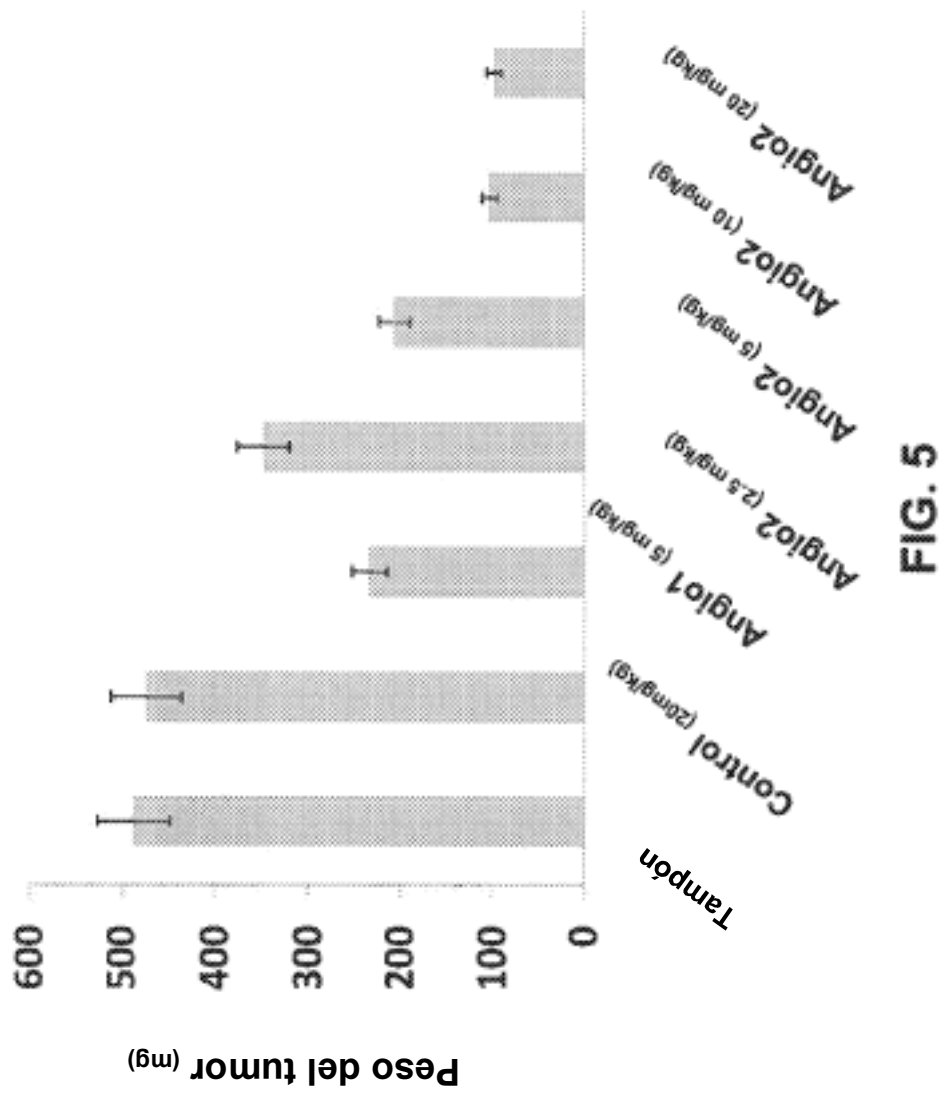
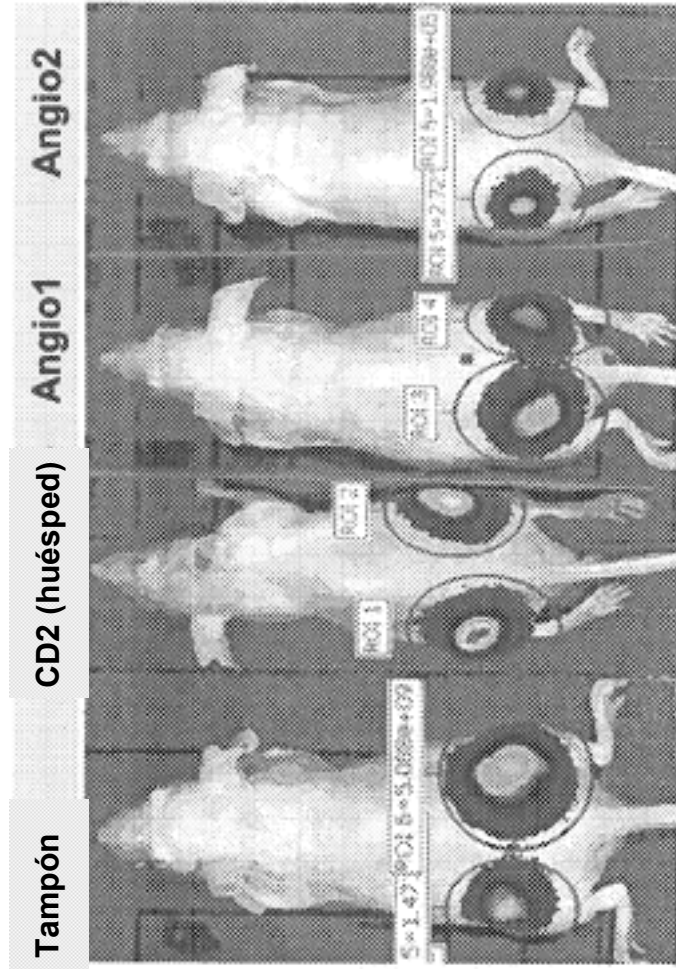
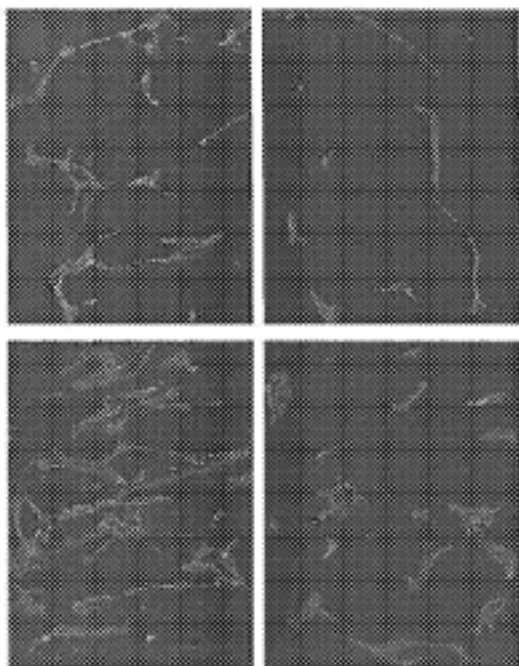


FIG. 6

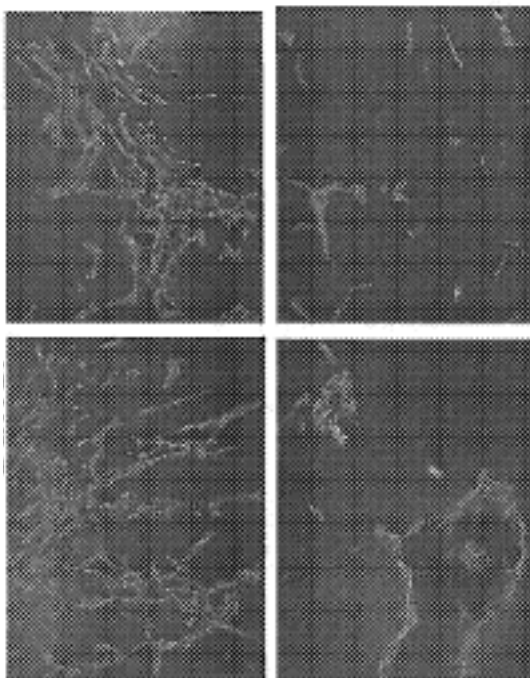


Día 8 después del tratamiento (Día 15 después de la inyección del tumor)

Huésped PEG



Tampón



Angio2

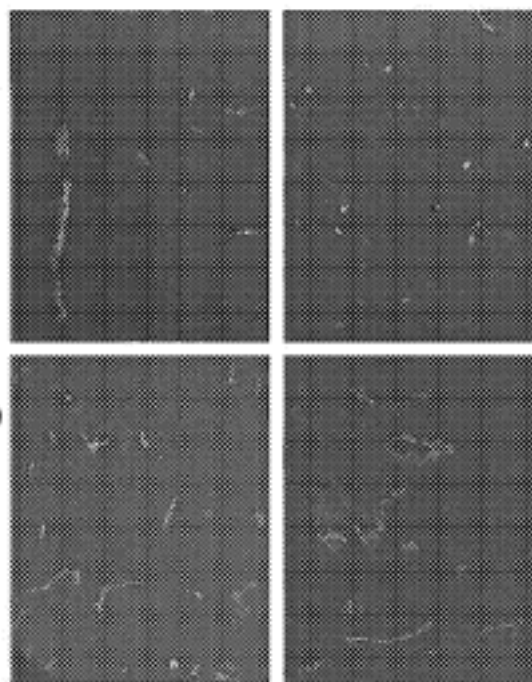


FIG. 7

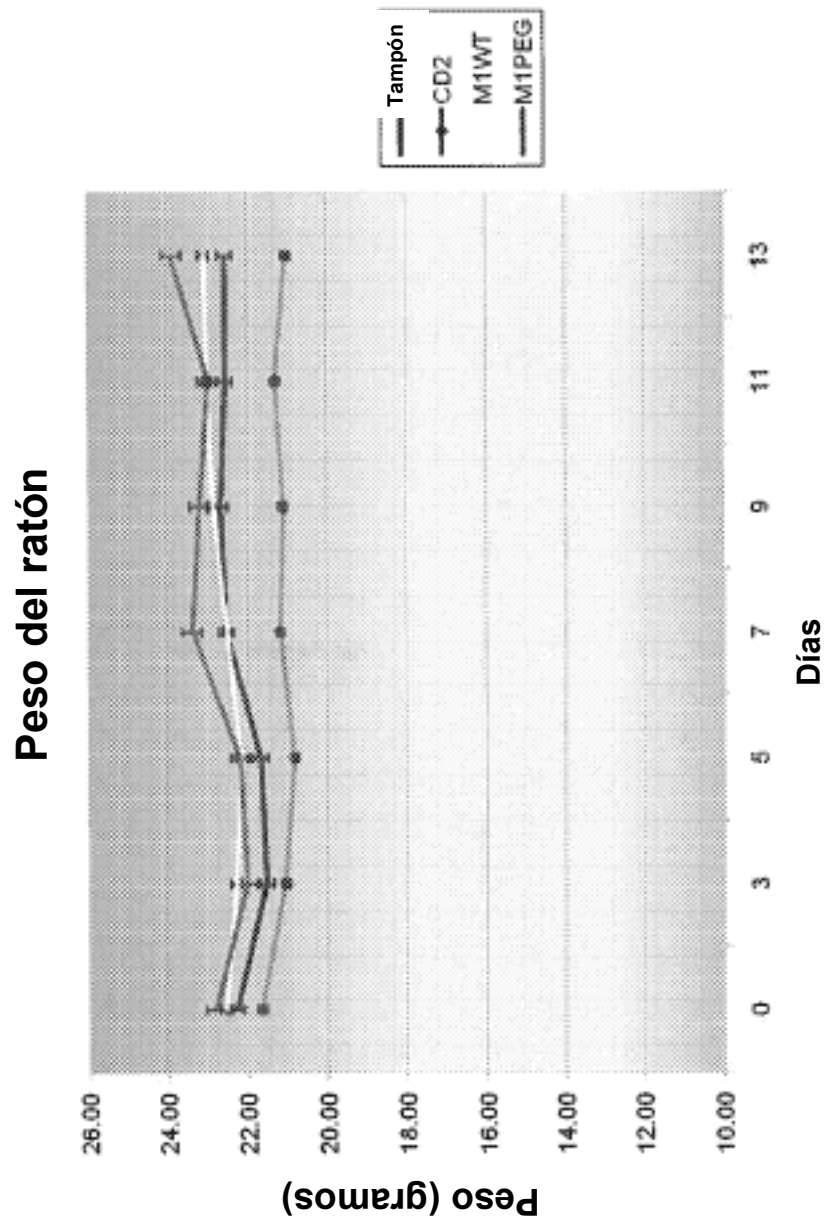


FIG. 8

M1PEG = Angio2

M1WT = Angio1

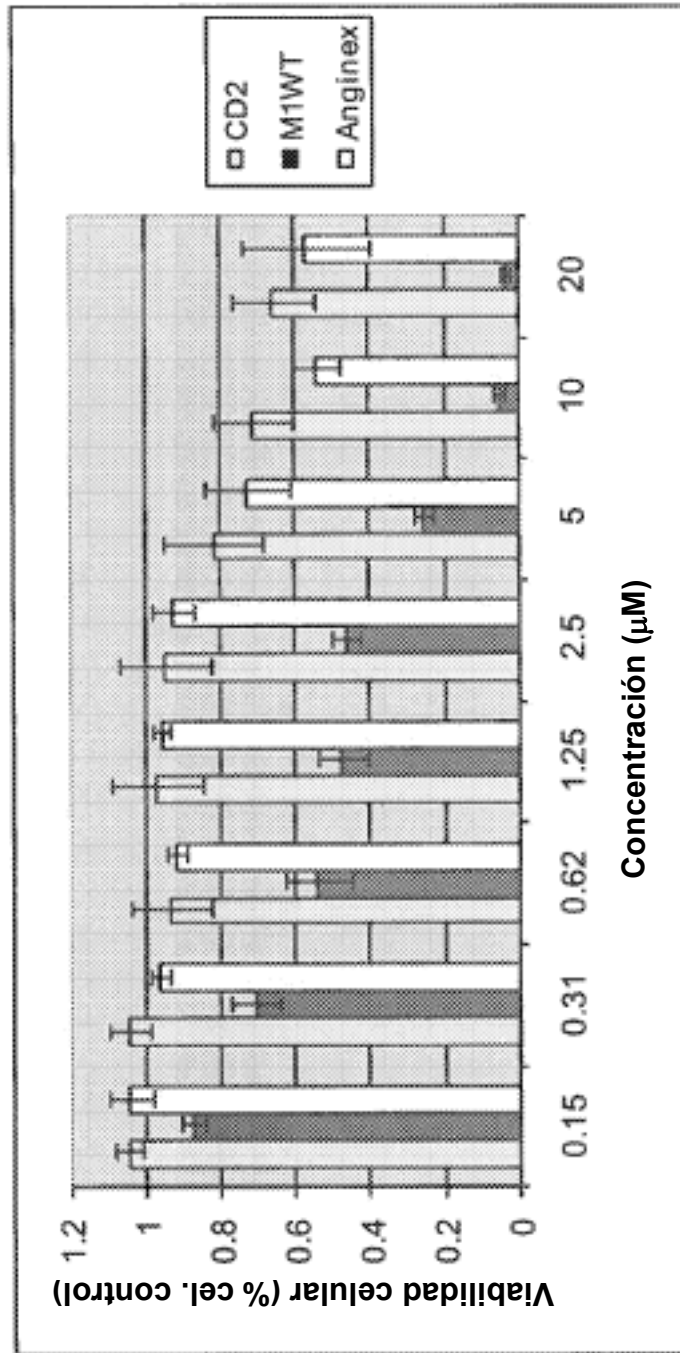


FIG. 9

M1WT = Angio1

Tumor PC-3, 6 ratones por grupo.
10 mg/kg de dosis diaria (i.p.) durante
14 días. Inicio 8 días después de la
implantación del tumor.

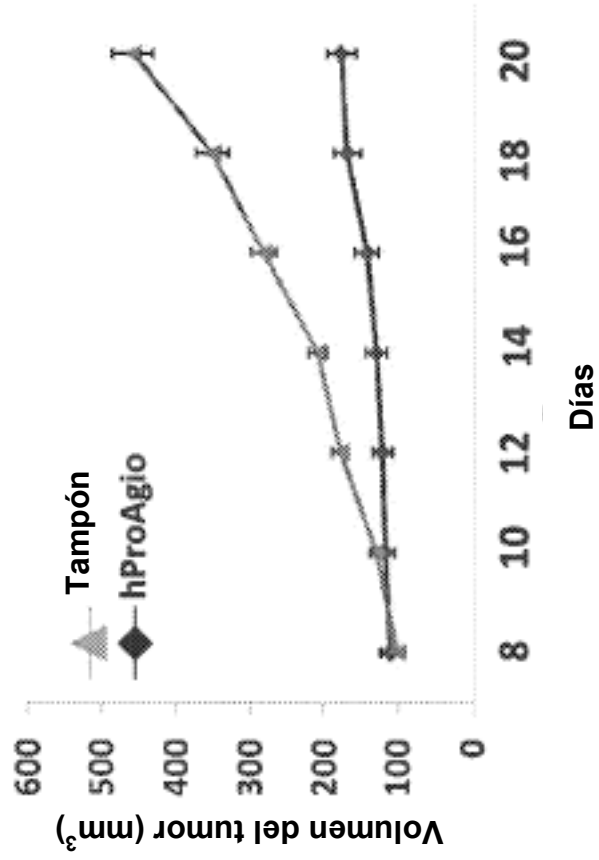


FIG. 10

hProAgio = Angio3

A

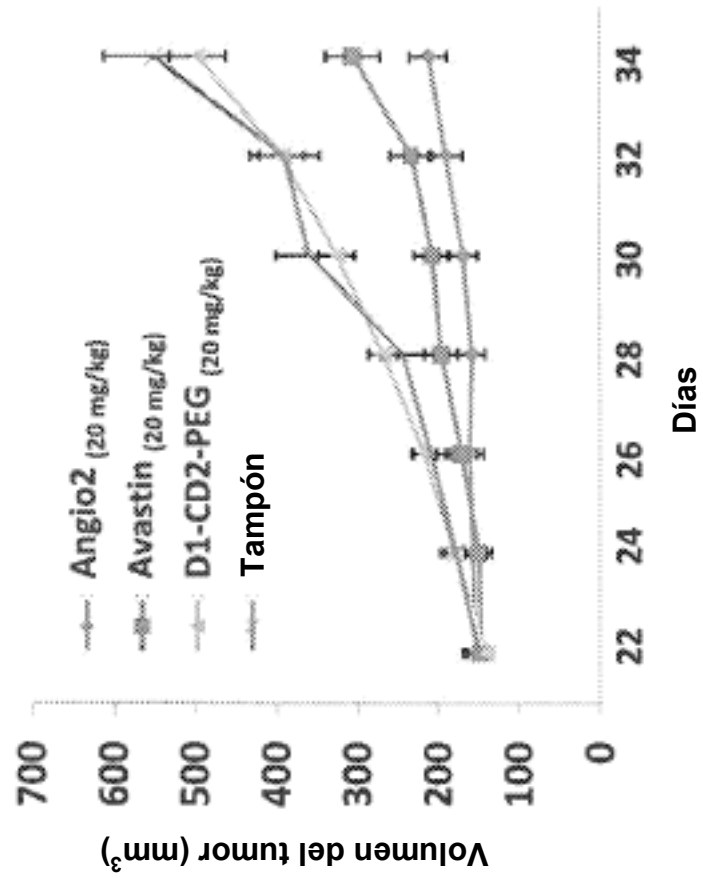
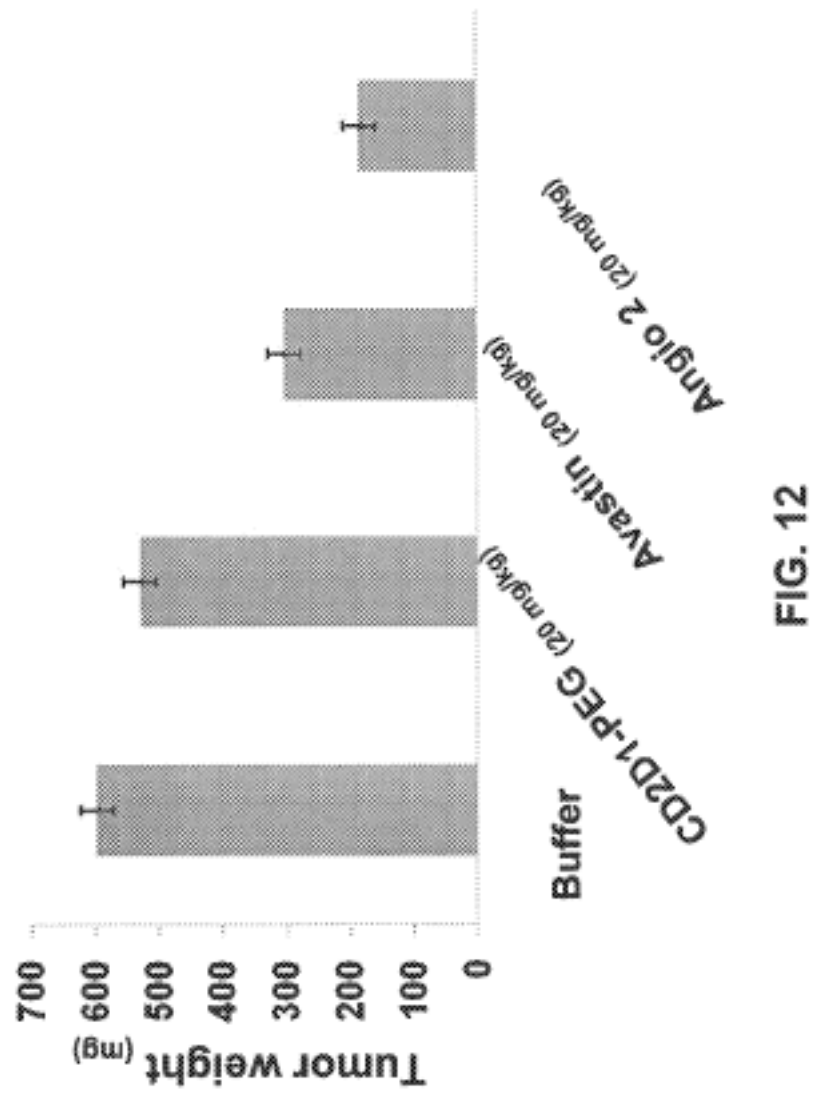


FIG. 11



In vitro activity for the viability of endothelial HUVEC cells

	EC* ₅₀ (μ M)
Angio1	1.47 +/- 0.3
Angio3	0.94 +/- 0.4
Angio5	2.03 +/- 0.4

*EC₅₀ is defined as at the concentration point where
Cell viability is 50% of buffer treated cells

#Proteins expressed in bacterial E.coli

*Proteins expressed in yeast Pichia. Protein is glycosylated

FIG. 13