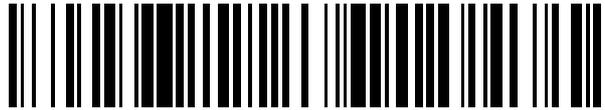


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 751**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61P 27/00	(2006.01)
A61P 27/06	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/FR2015/052133**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15767202 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3174549**

54 Título: **Oligopéptidos particulares como medicamentos anti-angiogénicos**

30 Prioridad:

31.07.2014 FR 1457407

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

12.11.2019

73 Titular/es:

**NEURONAX (50.0%)
Biopôle Clermont-Limagne
63360 Saint-Beauzire, FR y
UNIVERSITÉ DE LIMOGES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOBRON, STÉPHANE;
LALLOUE, FABRICE;
BIBES, ROMAIN y
VINCENT, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 730 751 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

Oligopéptidos particulares como medicamentos anti-angiogénicos.

5 La presente invención se refiere a un oligopéptido particular y a su utilización como medicamento en el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis en el ser humano o el animal, en particular como agente antitumoral.

10 La angiogénesis es el mecanismo responsable de la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. Es indispensable en algunos procesos fisiológicos, en particular para la colocación del sistema vascular en el embrión y para la implantación de la placenta, pero puede también ser responsable de desarrollos patológicos, como la poliartritis reumatoide, la degeneración macular en el adulto, y sobre todo el crecimiento de los tumores y el desarrollo de las metástasis. En efecto, está bien determinado que el desarrollo de una vascularización intra- o peri-tumoral es un evento clave para el crecimiento de un tumor y para la diseminación metastásica por la vía sanguínea.

15 Es por eso que, desde hace algunos años, se han llevado a cabo investigaciones sobre unas moléculas que presentan unos efectos anti-angiogénicos susceptibles de ser utilizadas en el tratamiento de los cánceres.

20 La mayoría de los agentes anti-angiogénicos actuales tienen como diana principalmente la cascada de VEGF ("Vascular endotelial Growth Factor", factores de crecimiento endotelial vascular) producidos por las células tumorales y su unión a los receptores, en particular utilizando unos anticuerpos bloqueadores, o unos inhibidores de los receptores de tirosina quinasa implicados en la angiogénesis y la proliferación tumoral.

25 Sin embargo, a pesar de que el VEGF sea reconocido como un factor regulador importante en el crecimiento tumoral y que constituye una diana preferida para las terapias anticancerosas, la elaboración de nuevos agentes inhibidores de la angiogénesis representa una meta importante para incrementar el número de opciones terapéuticas. Además, la identificación de este tipo de agentes que actúan sobre unas vías de la neo- o la anti-angiogénesis representaría un avance importante que puede permitir el desarrollo de un arsenal terapéutico con el fin de dirigirse a numerosas patologías en las que intervienen estos fenómenos de angiogénesis (degeneración macular por ejemplo).

30 Aunque algunos de los inhibidores de la angiogénesis desarrollados actualmente muestran unos efectos sobre el control del crecimiento de los tumores en asociación con una quimioterapia convencional, no son sin embargo suficientemente eficaces, en particular para el tratamiento de tumores sólidos de manera general y de los tumores del sistema nervioso central más específicamente. En efecto, algunas de estas moléculas, como los anticuerpos, pueden ser unas moléculas que presentan un peso molecular elevado que les impide difundirse en unas distancias importantes, en particular en una masa tumoral o pasar fácilmente la barrera hemato-encefálica.

35 Además, las moléculas anti-angiogénicas existentes son unas proteínas de síntesis que son complejas y costosas de fabricar. Deben ser utilizadas además en su mayoría en altas concentraciones y presentan unos efectos secundarios importantes como, por ejemplo, la Avastin® (becacizumab). Estos efectos secundarios, a veces con un resultado fatal, encontrados con el bevacizumab son, en particular, una leucopenia origen de infecciones así como un riesgo hemorrágico. Por otro lado, se han desarrollado otros enfoques de bloqueo de la vía de VEGF (anticuerpo anti-VEGF, anti-VEGF-R, pequeñas moléculas bloqueadoras de PI3K entre otros), pero presentan en la gran mayoría de los casos unos límites en términos de eficacia, de especificidad y de efectos indeseables, pudiendo estos últimos actuar sobre el sistema cardiovascular. Se observan así generalmente unas apariciones de hipertensión arterial con los diferentes anti-angiogénicos y unas toxicidades miocárdicas para algunos de ellos (Wu S *et al.* Lancet Oncol 2008; 9: 407-11; Nalluri SR, *et al.* JAMA 2008; 300(19): 2277-85; Chu TF, *et al.* Lancet 2007; 370: 2011-19).

Por lo tanto, subsiste una necesidad para un agente anti-angiogénico que evite estos numerosos inconvenientes.

50 Para responder a ésta, la invención propone un oligopéptido particular cuya secuencia se deduce de una parte de las unidades TSR ("Thrombospondin type 1 repeat") presentes en la SCO-espondina, glicoproteína específica del sistema nervioso central y presente en todos los vertebrados, de los procordados al ser humano. Se trata de una molécula de las matrices extracelulares segregada por un órgano particular situado en la cubierta del 3º ventrículo, el órgano sub-comisural. La SCO-espondina es una molécula de gran tamaño, compuesta por más de 4500 aminoácidos y que presenta una organización multi-modular que comprende diferentes unidades proteicas conservadas de las cuales en particular 26 son unidades TSR. Se sabe que ciertos péptidos deducidos de la SCO-espondina a partir de las unidades TSR presentan una actividad biológica sobre las células nerviosas (en particular descrita en la solicitud WO 99/03890) y que estos péptidos actúan sobre las células nerviosas por medio de un receptor específico (M. Bambad *et al.*, Cell & Tissue Research, vol. 315, 15-25 (2004)).

60 Las unidades TSR son unos dominios proteicos de aproximadamente 55 residuos, basados en la alineación de aminoácidos conservados cisteína, triptófano y arginina. Estas unidades se aislaron en primer lugar en la TSP-1 (tromboespondina 1) que es una molécula que interviene en la coagulación. Se han descrito después en otras numerosas moléculas con funciones biológicas diversas tales como el enganche celular, la movilidad, la proliferación, la agregación celular, la modulación de proteasas o la inhibición de la angiogénesis.

65

La TSP-1 es una glicoproteína de la matriz extracelular de un peso molecular de aproximadamente 120 kDa en su forma monomérica, que posee un dominio de unión a la heparina y unas unidades repetidas de tres tipos que pueden unirse a un cierto número de factores angiogénicos, de los cuales el FGF-2, el VEGF, el PDGF y el TGF- β 1 (*Lamszus et al., 1996; Margosio et al., 2003*). Esta interacción permite el secuestro de estos factores y limita sus interacciones con sus receptores respectivos. El segundo mecanismo de acción de la TSP-1 pasa en particular por su unión a las células endoteliales a través de los proteoglicanos, las integrinas, el CD47 y el CD36 (*Asch et al., 1987; Gao et al., 1996; Primo et al., 2005; Zhang et al., 2009b*). La interacción de TSP-1 con CD36 podría inhibir la señalización pro-angiogénica formando un complejo con NRP-1 y VEGFR-2 que impediría la activación del VEGFR-2 inducido por el VEGF. La TSP-1 puede además actuar sobre la NOS, inhibir la migración de las células endoteliales inducidas por FGF-2 y también inducir la apoptosis de las células endoteliales. Por otro lado, se ha descrito que las propiedades anti-angiogénicas de TSP1 implicaban una inhibición de la supervivencia, de la proliferación y de la migración de las células endoteliales (Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. *Nat Med.* 2000 Jan;6(1):41-8).

Se sabe, de manera general, que algunos fragmentos peptídicos de la TSP-1 así como algunos péptidos sintéticos cuya estructura es análoga a la de estos fragmentos peptídicos muestran una actividad similar a la tromboespondina-1 nativa.

A título de ejemplo, las patentes US nº 6.239.110. US nº 5.840.692. US nº 5.849.701. US nº 5.491.130 y US nº 6.051.549. US nº 5.190.918 y US nº 5.200.397 y US nº 6.384.189 describen la estructura y los efectos biológicos de varios de estos fragmentos peptídicos deducidos de la TSP-1 y de sus análogos sintéticos.

Además, se han desarrollado un cierto número de moléculas con objetivo anti-angiogénico inspiradas en las unidades TSR de la TSP-1. Se conocen varios derivados peptídicos o péptidos de este tipo, presentados como capaces de mimetizar los efectos de TSP-1, en particular ABT-510 y ABT-526. Sin embargo, a pesar de las secuencias de aminoácidos y la afinidad para sus receptores cercanos, la solubilidad y el efecto de estos péptidos de síntesis sobre las células endoteliales puede variar (*Haviv et al., 2005*). El ABT-510 en particular se ha demostrado inductor *in vitro* de la apoptosis dependiente de la capsasa-8 a través de la CD36 y ha reducido la vascularización tumoral en un modelo preclínico de injerto heterotópico de glioma en el ratón desnudo (*Anderson et al., 2007*). Por otro lado, ha sido objeto de estudios clínicos en diferentes cánceres, en particular el sarcoma y el carcinoma renal. Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado su inocuidad, se ha considerado insuficiente la eficacia en monoterapia del compuesto ABT-510 (*Baker et al., 2008; Ebbinghaus et al., 2007*).

Se han elaborado otros compuestos peptídicos a partir de unidades TSR de la TSP-1 como por ejemplo el 3TSR (*Ren et al., 2009*), o se han estudiado a partir de otras proteínas que tienen unas unidades TSR, como por ejemplo ADAMTS5 a partir de la cual se ha obtenido una proteína recombinante que tiene unas unidades TSR (*Sharghi-Namini et al., 2008*). El mecanismo de acción de esta proteína recombinante sigue siendo no obstante VEGF-dependiente. En efecto, la proteína recombinante ha mostrado que inhibía la estimulación de las células endoteliales por VEGF e inducía su apoptosis en presencia de VEGF. Por otro lado, la obtención de esta proteína recombinante en cantidad suficiente necesita recurrir a sistemas de expresión que pueden ser complejos para una calidad farmacéutica ya que pueden introducir unas contaminaciones o modificar la conformación (estructura terciaria) de la proteína a producir.

Actualmente, las secuencias de las unidades TSR conocidas por su eficacia son:

- la secuencia V-T-C-G (SEC ID nº2) que puede unirse al receptor CD36 o gpIV de las plaquetas;
- la secuencia C-S-V-T-C-G (SEC ID nº3): S.S. Tolsma *et al.* (*The Journal of Cell Biology*, vol. 122 p.497-511 (1993)) han mostrado que la actividad anti-angiogénica de la TSP-1 podía reproducirse *in vitro* e *in vivo* con diferentes péptidos sintéticos, de los cuales en particular dos secuencias deducidas del dominio TSR y que presentan en posición central la secuencia C-S-V-T-C-G (SEC ID nº3). Además de los estudios ulteriores han precisado que la actividad de neovascularización por TSP-1 podía desarrollarse según dos mecanismos diferentes que hacían intervenir dos regiones diferentes del TSR de las cuales una región que contiene la secuencia C-S-V-T-C-G (SEC ID nº3) (M.L. Iruela-Arispe, *Circulation*, vol. 100 p1423-31 (1999));
- la secuencia W-S-X-W (SEC ID nº4) que es capaz de unir la heparina y unos proteoglicanos permitiendo así un efecto biológico variable e interviniendo en el proceso de activación del TGF β por la TSP-1. La presencia de esta unidad W-S-X-W (SEC ID nº4), aunque insuficiente ella sola, es necesaria para esta activación de la citoquina que puede entonces intervenir en diferentes eventos biológicos tales como la inflamación, la angiogénesis o el desarrollo embrionario (G. D. Young y J. E. Murphy-Ullrich, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, p. 47633-47642 (2004)). Además, esta unidad parece actuar como competidor de ciertos factores de crecimiento pro-angiogénicos durante su unión a los proteoglicanos presentes en la superficie de las células endoteliales (T. Vogel *et al.*, *the Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 53 p.74-84 (1993)). Se trata también de la segunda región del TSR citada en M.L. Iruela-Arispe (*Circulation*, vol. 100 p1423-31 (1999)) que interviene en los mecanismos responsables de la actividad de neovascularización por la TSP-1. Sin embargo, la constitución exacta del aminoácido variante (X) o de los aminoácidos adicionales situados aguas arriba o

aguas abajo de esta unidad es importante para la actividad del péptido. Es el caso en particular de la eficacia de la unión a la heparina y de la inducción de la adhesión celular que se han encontrado aumentadas para un pentapéptido en el que X es la prolina o unos aminoácidos básicos ((N.H. Guo, The Journal of Biological Chemistry, vol. 267 p.19349-55 (1992)).

5 Hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún producto anti-angiogénico suficientemente eficaz y bien tolerado ni se ha ensayado ningún producto construido en base a todos los elementos descritos anteriormente para actividades anti-angiogénicas.

10 Es por eso que la invención propone un oligopéptido específico eficaz y bien tolerado, que suprima algunos inconvenientes de las terapias anti-angiogénicas existentes.

En particular, la invención tiene como objetivo un oligopéptido que presenta la secuencia siguiente:

15 $-W-S-X_1-W-S-X_2-C-S-X_3-X_4-C-G-$ (SEC ID n°1)

20 en la que X_1 , X_2 , X_3 y X_4 representan unas secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 5 aminoácidos, como medicamento inhibidor de la angiogénesis. Es útil en el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis seleccionada de entre los cánceres, la artritis, la poliartritis reumatoide, de entre las placas ateroscleróticas, neovascularización de un trasplante de córnea, cicatrices hipertróficas o queloides, la retinopatía proliferante, la retinopatía diabética, la degeneración macular en el adulto, la granulación, el glaucoma neovascular y la uveítis.

25 Esta secuencia de aminoácido se ha descrito en su forma $-W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G-$ (SEC ID n°5) en la patente WO 9903890 y WO 2009027350 pero de ninguna manera para actividades anti-angiogénicas.

30 De manera sorprendente e inesperada, el oligopéptido según la invención tiene un papel protector de la apoptosis de los HUVEC o de los HBMEC, y esto de manera comparable a una dosis elevada de VEGF (50 ng/ml), y no modula su proliferación. *In vitro*, los efectos del oligopéptido según la invención sobre las células endoteliales parecen por lo tanto opuestos a los de la TSP-1. Por otro lado, el oligopéptido según la invención favorece la migración en presencia de un factor angiogénico tal como el VEGF o el bFGF. Inhibe no obstante la migración de HBMEC inducida por unas células tumorales de glioblastoma cuando se le pone al contacto con U87-MG o HBMEC.

35 Además, ha demostrado que, al contrario de TSP-1, la acción del oligopéptido objeto de la presente invención no implica el receptor CD36.

Presenta así un papel inhibidor sobre los mecanismos de vascularización y un efecto anti-angiogénico importante que correlaciona el efecto anti-tumoral también observado. Debido a su pequeño tamaño, es también particularmente adecuado para el tratamiento de los tumores del sistema nervioso central, en particular de los glioblastomas.

40 El oligopéptido según la invención, para su utilización como anti-angiogénico, es único por sus efectos y sus mecanismos de acción originales. En efecto, ABT-510 que es la molécula anti-angiogénica más parecida por su origen, deriva de la parte central de la segunda repetición tromboespondina de tipo 1 situada en el extremo N-terminal de la TSP-1, proteína expresada por numerosos tipos celulares e implicada en diferentes procesos biológicos, incluyendo la angiogénesis, mientras que el oligopéptido según la invención representa la secuencia consenso de la parte N-terminal de las 27 repeticiones TSR de la SCO-espondina que es una proteína que presenta unas unidades TSR pero expresada específicamente a nivel del SNC y que interviene en particular durante el desarrollo.

50 El oligopéptido presenta además una inocuidad mejorada, no mostrando el oligopéptido según la invención ninguna toxicidad, incluso con inyecciones de 20 mg/lg.

Otras características y ventajas se desprenderán de la descripción siguiente de la invención, con respecto a los dibujos adjuntos, en los que:

55 - las figuras 1A a 1D representan unas observaciones macroscópicas (aumento de x20) realizadas después de la inyección de fluoresceína acuosa en la circulación sistémica de un embrión a ED9:

- * figura 1A: agua (control)
- * figura 1B: bevacizumab (control negativo)
- * figura 1C: VEGF a 10 ng/ml (control positivo)
- 60 * figura 1D: oligopéptido según la invención 250 µg/ml

- las figuras 2A a 2C representan unos resultados de análisis de factores solubles que intervienen en la angiogénesis:

65 * se han estudiado unos sobrenadantes de células U87-MG por *proteome array* (figuras 2A y 2B) para la búsqueda de proteínas implicadas en la angiogénesis, en presencia de agua estéril, de TSP-1 y del

oligopéptido según la invención

* las secreciones de VEGFA por U87-MG en el medio después de tratamientos con agua estéril, TSP-1 y el oligopéptido según la invención, se evaluaron por ELISA a partir de los sobrenadantes (figura 2C).

- las figuras 3A a 3C representan unos resultados del análisis del efecto del oligopéptido según la invención sobre la angiogénesis y la proliferación tumoral en el modelo de la CAM:

* a partir de tumores procedentes de injertos de U87-MG sobre la CAM, la vascularización de los tumores experimentales se ha estudiado a niveles macroscópicos (figura 3A - a a f) y microscópico (figura 3A g a l) después del tratamiento durante 48 horas con:

- H₂O: a, d, g y j
- TSP-1: b, e, h y k
- oligopéptido según la invención: c, f, i y l

La observación microscópica de los vasos se realiza después del marcado de éstos por SNA-1. Las barras de escala para las imágenes h e i de la figura 3A representan 1 mm y sus imágenes j, k y l de la figura 3A son unos aumentos (x2) de las imágenes g, h e i de la figura 3A, respectivamente; las cabezas de flechas muestran los vasos visibles, las flechas muestran las superficies tratadas y las estrellas las zonas sin vasos.

* la estructura de los tumores se ha visualizado después de un marcado por hematoxilina, eosina y azafrán de cortes de tumores experimentales (figura 3B a a c) y la proliferación de las células tumorales se ha estudiado por marcado inmunohistoquímico de Ki-67 con contra-coloración por hematoxilina (figura 3B d a i). Los tumores se han tratado durante 48 horas con

- agua: a, d y g
- TSP-1: b, e y h
- oligopéptido según la invención: c, f e i

las imágenes g, h e i de la figura 3B son unos aumentos (X4) de los bordes de las imágenes d, e y f de la figura 3B, respectivamente. Las flechas muestran las superficies tratadas y las estrellas las zonas sin marcado de Ki-67.

* el marcado de Ki-67 se ha cuantificado (figura 3C) en las diferentes condiciones con la ayuda del programa ImageJ y se efectuaron unas comparaciones entre el centro y el borde de los tumores y entre las condiciones por análisis de varianzas (ANOVA). Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con el centro del mismo tumor. \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ en comparación con el tumor control.

- la figura 4 representa los resultados del análisis cuantitativo de los ARNm en tumores experimentales procedentes de la CAM, representándose los diferentes genes por su expresión relativa comparada con los tumores controles

- la figura 5 representa los resultados del análisis semi-cuantitativo de la expresión proteica de la vimentina por transferencia western con o sin el oligopéptido según la invención sobre las células U87-MG

- la figura 6 representa los resultados del análisis del efecto funcional del oligopéptido según la invención sobre la apoptosis de HBMEC *in vitro*. Se trata de una síntesis de un análisis por ELISA Cell Death: los tratamientos por VEGF, TSP-1 y el oligopéptido según la invención (NX) se han efectuado separadamente o en combinación en un medio basal (BM).

Se han utilizado como controles el medio completo /CM) y el medio basal (BM). Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo. Las comparaciones entre diferentes tratamientos se han efectuado por análisis de varianzas (ensayo ANOVA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado con BM; \$ $p < 0,05$ comparado con BM+NX; # $p < 0,05$ comparado con CM,

- las figuras 7A a 7E representan los resultados del análisis de la actividad del oligopéptido según la invención sobre la proliferación, la vascularización y el crecimiento tumoral en el ratón desnudo;

* las imágenes A, B y C de la figura 7A representan el inmunomarcado del Ki-67 sobre cortes de tumores tratados por H₂O, TSP-1 o el oligopéptido según la invención respectivamente

* las imágenes D, E y F de la figura 7A son unos aumentos (X2) de las figuras A, B y C

* las imágenes G, H e I de la figura 7A representan el inmunomarcado del CD31 sobre cortes de tumores tratados por H₂O, TSP-1 o el oligopéptido según la invención respectivamente (las barras de escala

corresponden a 500 µm)

- * las imágenes J, K y L de la figura 7A son unos aumentos (X2) de las figuras G, H e I
- 5 * el marcado de Ki-67 se ha cuantificado en las diferentes condiciones con la ayuda del programa imageJ y se han efectuado las comparaciones entre el centro y el borde de los tumores y entre las condiciones (figura 7B) por análisis de varianzas (ensayo ANOVA). Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo. * $p < 0,05$ comparado con el centro de los mismos tumores; \$ $p < 0,05$ y \$\$ $p < 0,01$ comparado con el control
- 10 * el marcado de CD31 se ha cuantificado en las diferentes condiciones con la ayuda del programa imageJ y se han efectuado unas comparaciones entre el centro y el borde de los tumores y entre las condiciones (figura 7C) por análisis de varianzas (ensayo ANOVA). Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo. * $p < 0,05$ comparado con el centro de los mismos tumores; \$ $p < 0,05$ y \$\$ $p < 0,01$ comparado con el control
- 15 * las imágenes M y P de la figura 7D representan unos tumores de ratones después del tratamiento solo por hidrogel
- * las imágenes N y Q de la figura 7D representan unos tumores de ratones después del tratamiento por TSP-1 en el hidrogel
- 20 * las imágenes O y R de la figura 7D representan unos tumores de ratones después del tratamiento por el oligopéptido según la invención (NX) en el hidrogel
- 25 * la figura 7E representa las mediciones de los crecimientos tumorales tratados con H₂O, TSP-1 y el oligopéptido según la invención a 5, 12, 17, 19, 21 y 23 días después de la inyección de las células cancerosas. Las inyecciones de los tratamientos (hidrogel solo, TSP-1 y el oligopéptido según la invención (NX) se han realizado al día 21 (flecha negra). La comparación de los tamaños tumorales en comparación con los controles se ha efectuado por análisis de varianzas (ensayo ANOVA). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
- 30 La invención tiene por lo tanto como objetivo un oligopéptido que presenta la secuencia siguiente:

-W-S-X₁-W-S- X₂-C-S- X₃-X₄-C-G- (SEC ID n°1)

35 en la que X₁, X₂, X₃ y X₄ representan unas secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 5 aminoácidos, como medicamento inhibidor de la angiogénesis. Es útil en el tratamiento de por lo menos una enfermedad asociada a la angiogénesis, es decir una enfermedad caracterizada por una angiogénesis excesiva o anormal o por una proliferación de las células endoteliales, seleccionadas de entre: los cánceres, la artritis, la poliartritis reumatoide, unas placas de aterosclerosis, la neovascularización de un injerto de córnea, unas cicatrices hipertróficas o queloides, la retinopatía proliferante, la retinopatía diabética, la degeneración macular en el adulto, la granulación, el glaucoma neovascular y la uveítis.

En el sentido de la presente invención, se entiende por aminoácidos, los aminoácidos naturales y los aminoácidos no naturales.

45 Por "aminoácidos naturales" se entiende la forma L de los aminoácidos que pueden encontrarse en proteínas de origen natural, es decir: alanina (A), arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), cisteína (C), glutamina (Q), ácido glutámico (E), glicina (G), histidina (H), isoleucina (L), lisina (K), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y) y valina (V).

50 Por "aminoácidos no naturales" se entiende la forma D de los aminoácidos naturales, las formas homo de algunos aminoácidos naturales (tales como: arginina, lisina, fenilalanina y serina), y las formas nor de la leucina y de la valina. Comprende n también unos aminoácidos sintéticos como el ácido alfa-aminobutírico (Abu), la armatina (Agm), el ácido alfa-arinoisobutírico (Aib), la N-formil-trp (F-trp), la sarcosina, la estatina, la ornitina, la desaminotirosina. La desaminotirosina se incorpora en el extremo N-terminal, mientras que la agmatina y la estanina se incorporan en el extremo C-terminal de estos péptidos.

En la secuencia SEC ID n° 1, por lo menos un aminoácidos puede ser sustituido por uno de sus derivados o análogos.

Según un modo de realización preferido, X₁, X₂, X₃ y X₄ representan cada uno un aminoácido.

60 Preferentemente X₁ se selecciona de entre G, V, S, P y A, X₂ se selecciona de entre G, V, S, P y A, X₃ se selecciona de entre R, A y V y X₄ se selecciona de entre S y P. La secuencia correspondiente es la secuencia SEC ID n°6: W-S-X₁-W-S- X₂-C-S- X₃-X₄-C-G- la cual se selecciona de entre G, V, S, P y A, X₂ se selecciona de entre G, V, S, P y A, X₃ se selecciona de entre R, A y V y X₄ se selecciona de entre S y P.

65 Según una variante X₁ y X₂ pueden ser W-S-S-, W-S-G-, W-S-P-, W-S-A-, W-S-R-. La secuencia correspondiente es

la secuencia SEC ID n°7: -W-S-X₁-W-S- X₂-C-S- X₃-X₄-C-G- en la que X₁ y X₂ se seleccionan de entre W-S-S-, W-S-G-, W-S-P-, W-S-A-, W-S-R- y X₃ y X₄ representa unas secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 5 aminoácidos.

5 El oligopéptido puede ser modificado por amidación, acilación, pegilación, por adición de aminoácidos, pero también por modificación en *staples peptides* o mediante cualquier procedimiento de conjugación, en particular con la albúmina o unos polímeros como el PEG, o combinación con un gel, hidrogel. El oligopéptido puede también ciclarse.

10 El oligopéptido según la invención se puede obtener de diferentes maneras: por síntesis química en fase líquida o sobre soporte sólido (Fmoc por ejemplo), mediante otros métodos que utilizan las técnicas recombinantes y de construcciones genéticas que comprende n una secuencia o un fragmento de ADN que puede codificar para unos compuestos peptídicos que comprende n la secuencia del oligopéptido según la invención y que permiten recoger mediante unos sistemas de expresión eucariotas o procariotas el producto de expresión o expresar *in situ* el producto.
15 El oligopéptido según la invención puede presentarse en forma desglucosilada o glucosilada si es necesario. En algunos casos, y según el método de preparación, podrá ser necesario renaturalizar algunas estructuras terciarias del oligopéptido.

El oligopéptido según la invención:

- 20 - tiene un papel protector de la apoptosis de HUVEC o de HBMEC y no modula su proliferación
- favorece la migración en presencia de un factor angiogénico tal como el VEGF o el bFGF
- 25 - inhibe la migración de HBMEC inducida por unas células tumorales de glioblastoma cuando es puesto en contacto con U87-MG.

El oligopéptido según la invención se puede utilizar por lo tanto como principio activo terapéutico o medicamento anti-angiogénico en el tratamiento de diferentes patologías, en particular los cánceres, la artritis, la poliartritis reumatoide, de las placas de aterosclerosis, la neovascularización de un injerto de córnea, de las cicatrices hipertróficas o queloides, la retinopatía proliferante, la retinopatía diabética, la degeneración macular en el adulto, la granulación, el glaucoma neovascular y la uveítis.

Ventajosamente, es capaz de inhibir la neo-angiogénesis de tumores en el ser humano o en el animal.

35 Según otra ventaja, el pequeño tamaño del oligopéptido de secuencia SEC ID n° 1 facilita el paso de la barrera hematoencefálica y la bio-distribución rápida en el sistema nervioso central, así como la identificación de la zona tumoral. Su solubilidad en soluciones acuosas la hace compatible con la práctica clínica. Se puede por lo tanto utilizar como medicamento para el tratamiento de los tumores cerebrales en el ser humano o en el animal, en particular para el tratamiento de glioblastomas.

40 Por otro lado, como se trata de un oligopéptido procedente de una proteína presente en el organismo, presenta una tolerancia incrementada y unas propiedades de inducción de efectos secundarios indeseables restringidos con respecto a unas moléculas resultado de síntesis química o procedentes de plantas como el caso de numerosos anti-angiogénicos actuales. Además es soluble, no tóxico, y cuando está constituido por aminoácidos naturales, es no inmunógeno y es fácilmente eliminado por el organismo.

50 El modo de acción del oligopéptido según la invención es independiente del CD36, al contrario del de la TSP-1. En efecto, cuando el CD36 es activado por la TSP-1 en las células endoteliales, éste interfiere con la activación del VEGF-R2 (KDR) e induce la apoptosis de las células endoteliales. El oligopéptido según la invención favorece el acercamiento entre los dos receptores (CD36 y VEGFR-2), pero aumenta la expresión de CD36. En lugar de tener un papel de inhibidor directamente sobre las células endoteliales, el oligopéptido según la invención favorece la activación del VEGFR-2 en presencia de su ligando, conociéndose la vía del VEGF porque favorece la supervivencia de las células endoteliales y su migración.

55 Por otro lado, el oligopéptido según la invención es capaz de modular dos moléculas: CD36 y VEGF-R2 que participan en el fenómeno de angiogénesis.

60 El oligopéptido según la invención se puede administrar mediante cualquier modo de administración adaptado. Para el tratamiento de enfermedades que afecta el sistema nervioso central, se administra preferentemente por vía intratecal, intraventricular, intraparenquimatosa, epidural. Para las otras aplicaciones, es administrado preferentemente por vía intravenosa, por vía intraluminal, por vía intravítrea, por vía transesfenoidal o por vía tópica, no siendo estos modos de administración limitativos.

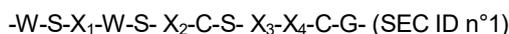
65 Se puede integrar en composiciones farmacéuticas en una forma cualquiera, en particular líquida o gel o cualquier otro soporte, en particular que permite la liberación controlada.

El oligopéptido se formula preferentemente en una composición farmacéutica, en particular una composición farmacéutica que se presenta en forma:

- líquida: puede formularse en particular en unas preparaciones inyectables en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones (preparaciones para perfusión),
- o sólida, y comprende cualquier tipo de soporte, en particular geles, biopolímeros o biomateriales o cualquier dispositivo médico, como los implantes o las bombas implantables por ejemplo, que permiten una liberación controlada o bien un sistema de vectorización.

En el marco del tratamiento de tumores, el oligopéptido según la invención puede ser utilizado eventualmente solo o en asociación con uno u otros varios principios activos anti-tumorales. Se puede utilizar con por lo menos un principio activo quimioterapéutico anti-canceroso, por ejemplo.

La invención tiene por lo tanto también como objetivo las composiciones farmacéuticas que comprende n un oligopéptido que presenta la secuencia siguiente:



en la que X_1 , X_2 , X_3 y X_4 representan unas secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 5 aminoácidos, tal como se ha descrito anteriormente para su utilización como medicamento inhibidor de la angiogénesis, siendo estas composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis seleccionada de entre los cánceres, la artritis, la poliartritis reumatoide, de las placas de aterosclerosis, la neovascularización de un injerto de córnea, cicatrices hipertróficas o queloides, la retinopatía proliferante, la retinopatía diabética, la degeneración macular en el adulto, la granulación, el glaucoma neovascular y la uveítis.

La invención se ilustra ahora por un ejemplo de oligopéptido según la invención y por unos resultados de ensayos que demuestran el efecto anti-angiogénico del oligopéptido según la invención, en particular del oligopéptido del ejemplo 1.

Ejemplo:



Este oligopéptido objeto de la presente invención corresponde a los 12 aminoácidos más conservados procedentes del cuarto dominio TSR de la SCO-espondina.

Ensayos

A. Estudios de los efectos del oligopéptido según la invención sobre la angiogénesis *in vitro*

El proceso de apoptosis se acompaña de la fragmentación del ADN y genera así unos nucleosomas solubles (histonas citoplásmicas asociadas al ADN fragmentado) que pueden ser evaluados por un método inmunoenzimático, ELISA Cell Death Plus (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Kit (Roche Molecular Diagnostics, Francia) según las recomendaciones del proveedor. Las células HBMEC se sembraron en una placa de 24 pocillos a la densidad de $5 \cdot 10^3$ células/pocillo y se dejaron 24 horas en reposo. Las células se cultivan en un medio basal, es decir en ausencia de factores de crecimiento que se modifica antes de exponerse a los diferentes tratamientos durante 24 horas. Después se recuperan y luego se centrifugan a 200 g durante 5 minutos. Las células se cuentan entonces, y después se ajustan a $3 \cdot 10^4$ células/ml en PBS. Se realiza una nueva centrifugación a 200 g durante 10 minutos. El sobrenadante se retira y el sedimento celular se recoge en 200 µl de tampón de lisis antes de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Después de una nueva centrifugación de 10 minutos a 1400 rpm, se distribuyen 20 µl de sobrenadante en los pocillos recubiertos con estreptavidina y cada condición se realiza por duplicado. Se añaden en cada pocillo 80 µl de solución de inmunorreactivo. Esta solución contiene un tampón de incubación así como 2 anticuerpos: un anticuerpo anti-histona acoplado con biotina y un anticuerpo anti-ADN acoplado con HRP (Horse Radish Peroxydase). Los 2 anticuerpos se unirán a la placa por medio de la estreptavidina. La placa se incuba durante 2h a temperatura ambiente, bajo agitación y en la oscuridad. Después de esta etapa, se realizan 3 lavados con 200 µl de tampón de incubación con el fin de eliminar el exceso de anticuerpos no fijados. Se añaden después en cada pocillo 100 µl de ABTS, que es el sustrato de la HRP. La incubación con la solución de ABTS se efectúa en la oscuridad durante un tiempo de 15 a 20 minutos. La reducción del ABTS por HRP permite la visualización de la apoptosis por reacción colorimétrica. La reacción se para entonces por la adición de 100 µl de solución stop ABTS y después los resultados se analizan gracias a un lector de placa a 405 nm. La cantidad de oligonucleosomas formada es proporcional a la intensidad de la coloración y a la apoptosis celular.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 6 y en la tabla 1 siguiente:

Condiciones	Valores de densidad óptica	Desviación estándar
-------------	----------------------------	---------------------

BM	0,259	
BM	0,414	
BM	0,279	0,06444444
BM+VEGF	0,234	
BM+VEGF	0,133	
BM+VEGF	0,195	0,03622222
BM+TSP	0,215	
BM+TSP	0,419	
BM+TSP	0,372	0,08022222
BM+NX	0,199	
BM+NX	0,138	
BM+NX	0,21	0,02955556
BM+VEGF+TSP	0,214	
BM+VEGF+TSP	0,235	
BM+VEGF+TSP	0,304	0,03533333
BM+VEGF+NX	0,217	
BM+VEGF+NX	0,118	
BM+VEGF+NX	0,097	0,04866667
BM+VEGF+TSP+NX	0,212	
BM+VEGF+TSP+NX	0,206	
BM+VEGF+TSP+NX	0,154	0,02444444
CM	0,14	
CM	0,135	
CM	0,15	0,00555556

Tabla 1: valores medios relativos a las densidades ópticas medidas para cada condición de tratamiento durante el ensayo de inducción de la apoptosis sobre las células HBMEC

- 5 *BM = medio basal*
CM = medio completo
NX = oligopéptido según la invención

10 Estos resultados muestran que el oligopéptido según la invención protege las células endoteliales humanas HBMEC de la apoptosis a un nivel similar al VEGF, y este efecto no se observa en presencia de TSP-1. En realidad, TSP-1 es conocido por inducir la apoptosis de las células endoteliales. Por otro lado, el tratamiento combinado oligopéptido según la invención + VEGF mejora este efecto protector.

15 B. Estudio de los efectos del péptido según la invención sobre la angiogénesis a partir de un modelo aviar de membrana corio-alantoidea (CAM)

20 La angiogénesis es uno de los mecanismos clave del desarrollo embrionario. Es también un proceso determinante bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas (cánceres en particular). Este mecanismo está bajo la dependencia de numerosos factores que poseen un potencial inhibidor o bien activador. Con el fin de evaluar las principales propiedades de estos factores *in vivo*, el modelo más extendido es el modelo de la CAM (membrana corio-alantoidea) a partir del embrión de pollo (Ribatti *et al.*, 2000). Presenta la ventaja de permitir ensayar los factores pro o anti-angiogénicos durante una fase de angiogénesis activa entre la fase embrionaria D4 y D10. Los efectos principales de las diferentes moléculas pueden, por lo tanto, evaluarse *in vivo*. El modelo de la CAM puede también servir para el desarrollo de tumor experimental. El injerto de células humanas cancerosas en la superficie de la CAM se realiza en la fase embrionaria de 9 días. Tres días después del injerto a ED12, se observa la formación de un tumor en la superficie de la CAM. Este último puede tratarse tópicamente durante las 48 h posteriores a esta fase y los tumores se extraen en ED14D.

30 Protocolo detallado:

35 Los huevos fecundados (Granja avícola Haas, Estrasburgo, Francia) se mantienen 24 h a 18°C antes de iniciar la incubación. Se incuban después en una incubadora (Maino, Italia) a 38°C con un porcentaje de humedad del 45%. Las fases embrionarias se determinan a partir de las tablas de Hamburger y Hamilton (H y H, 1951). En la fase embrionaria de D2,5 (ED 2,5) que corresponde a la fase 17 de H y H, se retiran 4 m de albúmina con la ayuda de una jeringa de 10 ml y después el contenido de cada huevo se extrae de su cáscara y se coloca en cestas de pesaje hexagonales (VWR, Estrasburgo, Francia). Estas últimas se colocan entonces en cajas de Petri (VWR, Estrasburgo, Francia) que contienen agua con el fin de asegurar el mantenimiento de una higrometría conveniente y limitar los riesgos de contaminaciones, y después se vuelve a incubar las cajas. En esta fase de desarrollo, la membrana corio-alantoidea empieza a vascularizarse. En la fase ED9 (fase 35 de H y H), se coloca un anillo de silicona de aproximadamente 1 cm de diámetro y de 1 mm de grosor, con el fin de enmarcar varios vasos sanguíneos. Se realizan dos enfoques experimentales.

1) Tratamientos sobre CAM

Se aplican entonces diferentes tratamientos (oligopéptido según la invención, agua destilada estéril, VEGF165, Bevacizumab) sobre la membrana con la ayuda de esponjas reabsorbibles a base de gelatina bovina que se depositan después sobre la CAM (Bloxang, Laboratorio Chauvin, Francia). Las esponjas se cortan estérilmente en cubos de 1 mm de arista y se impregnan con el oligopéptido según la invención a una concentración de 250 µg/l. El volumen de impregnación realizado es de 50 µl por esponja. Se efectúa un control impregnando las esponjas con el mismo volumen de agua destilada estéril. Se depositan dos controles suplementarios de la angiogénesis sobre la CAM, una esponja impregnada con VEGF165 a 10 ng/ml (control positivo) y otra impregnada con Bevacizumab a 250 µg/ml (control negativo).

Los resultados se presentan en las figuras 1A a 1D.

2) Tratamientos sobre los tumores procedentes de injerto de U87-MG

Para obtener un tumor, se inoculan las células U87-MG a razón de 200000 células en unos frascos de 75 cm² en presencia de medio basal. Se extrae entonces un volumen que contiene 4.10⁶ células y después de la centrifugación de 5 min a 311 g, se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en 20 µl de medio diferenciador que se depositan en el centro de un anillo de silicona previamente aplicado sobre la CAM de un embrión a ED9. Una vez efectuado el injerto, el embrión se vuelve a incubar. A ED11, los tumores pueden observarse bajo un binocular MZFL3 (Leica, Paris, Francia). En esta fase, los tumores se tratan tópicamente (parte apical del tumor) con 30 µl de oligopéptido según la invención a 250 µg/ml, o bien con 30 µl de agua destilada estéril hasta la fase ED13. Los tumores se extraen entonces y se realizan unas crio-secciones para permitir análisis inmunohistoquímicos. La red angiogénica se visualiza inyectando una solución de fluorescencia acuosa al 1% (CHU, Limoges), en la arteria vitelina con la ayuda de una micropipeta. Las observaciones macroscópicas de los tumores, así como la difusión de la fluoresceína en los vasos, se efectúan con un binocular de fluorescencia (MZFL3, Leica, Francia).

Los resultados obtenidos, presentados en la figura 1D, muestran una inhibición de la vascularización, después de 9 horas de tratamiento con el oligopéptido según la invención a 250 µg/ml.

El experimento se realiza con inyección de fluoresceína isotiocianato (FITC), lo cual ha permitido facilitar la observación de la vascularización de la CAM sobre la angiografía, y en particular de los microvasos más profundos.

Se constata que durante el tratamiento por VEGF (figura 1C), un agente pro-angiogénico, la microvascularización es densa y comprende numerosas ramificaciones vasculares. Por oposición, el efecto anti-angiogénico del oligopéptido según la invención (figura 1D) es comparable con el de Bevacizumab de Avastin® (figura 1B) sobre la microvascularización. Su acción parece particularmente marcada sobre los microvasos que constituyen la arborización vascular mientras que los vasos más importantes no parecen alterados.

C. Estudio de los efectos del péptido según la invención sobre la vascularización tumoral

Para obtener un tumor, se inoculan las células U87-MG a razón de 200000 células en unos frascos de 75 cm² en presencia de medio basal.

Se extrae entonces un volumen que contiene 4.10⁶ células y, después de la centrifugación de 5 minutos a 300 g, se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en 20 µl de medio diferenciador que se depositan en el centro de un anillo de silicona previamente aplicado sobre la CAM de un embrión a ED9. Una vez efectuado el injerto, el embrión se vuelve a incubar.

A ED11, los tumores pueden observarse en un binocular MZFL3 (Leica, Paris, Francia) y es posible un seguimiento de la evolución del crecimiento tumoral hasta ED14.

Los resultados se presentan a continuación:

a. Observación macroscópica del efecto del oligopéptido según la invención sobre la angiogénesis tumoral en un modelo CAM (figuras 3A a 3C)

Los tumores desarrollados sobre la CAM se observan sobre la membrana corio-alantoidea con la ayuda de un binocular de tipo MZFL3 (Leica, Francia) antes de ser extraídos.

Tres días después del injerto de las células tumorales, el tumor empieza a desarrollarse y empieza la vascularización. El color rosáceo debido a la presencia de capilares en la superficie del tumor desaparece en las 24 horas después del inicio del tratamiento por el péptido según la invención sobre tumores de tamaño reducido (1 a 2 mm de diámetro) y entre 24 y 48 horas para los tumores de diámetro superior a 2 mm. Aparece un color blanco nacarado en la superficie del tumor, lo cual sugiere la implementación de procesos necróticos susceptibles de conducir a la regresión tumoral

(figura 3A c). La extracción del tumor y de la CAM presente en el anillo (zona de tratamiento por el péptido según la invención o el control) permite visualizar los vasos que penetran en el tumor.

5 Se constata una disminución importante de la densidad de los vasos que irrigan el tumor tras el tratamiento con el oligopéptido según la invención, confirmando así su actividad anti-angiogénica sugerida por los resultados anteriores (figura 3A I).

Los valores que corresponden a los resultados expresados en la figura 3C se presentan en la tabla 2 siguiente:

	Borde1	Borde2	Centro1	Centro2
CAM 1TSP1	227	314	300	292
CAM 2TSP1	286	228	233	350
CAM NX	165	172	355,5	383,5
CAM NX	184	153	369	370
CAM Ctrl	310	342	331	346
CAM Ctrl	319	333	330	347

10 Tabla 2: esta tabla presenta los valores de la cuantificación del marcado de Ki-67 obtenidos para cada condición de tratamiento (TSP-1, oligopéptido según la invención NX y control sin tratamiento Ctrl) en función de la región tumoral estudiada (borde y centro).

15 b. Estudio de la vascularización y de la expresión de marcadores tumorales por inmunohistoquímica sobre el tumor tratado con el péptido según la invención (figura 5)

El endotelio vascular de los vasos de pollo se marca con la ayuda de una lectina, la SNA-1 (Sambucus Nigra Agglutinin-1, Vector Laboratories), acoplada FITC (isotiocianato fluorescencia).

20 Después de 10 minutos de fijación con 200 µl de PBS 1X-PFA 4% a temperatura ambiente, los cortes se inoculan con una solución de TBS 1X-Tween 0,05%-tripsina 0,1% pH 7,6 durante 10 minutos. Se lavan después 3 veces en PBS 1X y se aplica durante 1 hora 100 µl de una dilución al 1/200 de la lectina SNA-1 en una solución de TBS 1X-Tween 0,05% a pH 7,6. Después de los lavados (de los cuales el último con agua destilada), las láminas se montan después como se describe en el párrafo anterior y se observan con microscopio de fluorescencia. Se efectuaron recuentos de los vasos a partir de fotografías de aumento X100 y en una zona marginal que se extiende en 600 µm desde el borde del tumor. Se realizó después un ensayo estadístico de tipo ANOVA para validar la pertinencia del efecto observado. La lectina SNA-1 marca específicamente las células endoteliales de pollo que constituyen la pared vascular. El marcado SNA-1 sobre unos cortes de tumores no tratados muestra una estructura abundantemente vascularizada con grandes vasos situados en la base del tumor. Después del tratamiento por el péptido según la invención, el marcado SNA-1 desaparece más específicamente en la zona próxima de la superficie del tumor, lo cual sugiere una desaparición de la microvascularización en esta región.

35 El co-marcado vimentina/SNA-1 ha permitido complementar las observaciones anteriores aportando la prueba de que la inhibición de la angiogénesis tumoral inducida por el péptido según la invención contribuye no solamente a la regresión de la microvascularización tumoral sino también a la disminución del número de células tumorales diferenciadas que expresan la vimentina. El número de células que expresan la vimentina es más importante en los tumores controles que en los tumores (figura 5).

40 c. Estudio de la proliferación celular después del tratamiento de los tumores sobre el modelo CAM por el oligopéptido según la invención (figuras 7A a 7E)

45 Los tumores se fijan en PBS 1X-PFA 4% (24h), después se deshidratan en etanol absoluto y después en tolueno puro y se incluyen y se conservan a continuación en un bloque de parafina. Se realizan unos cortes de 4 µm a partir de un microtomo y se depositan en láminas Superfrost plus, y después se secan en una estufa a 50°C durante una noche.

50 Para realizar el inmunomarcado, los cortes se desparafinan y después se rehidratan mediante unos baños de concentraciones decrecientes de etanol y después se aclaran en PBS 1X.

55 Con el fin de desenmascarar los sitios antigénicos, las láminas se incuban en un tampón citrato a pH 7 (200 µM de ácido cítrico; 9,8 mM de citrato de sodio) y sufren un ciclo de calentamiento (4x5 minutos a 750 W en microondas). Las peroxidasas endógenas se inhiben, efectuando un baño de 10 minutos en metanol-5% H₂O₂. Después de 3 lavados, se realiza la saturación en PBS-BSA 3% y después la incubación con el anticuerpo anti-Ki67. Después de aclarar con PBS 1X, se aplica un anticuerpo conjugado con HRP durante una hora a temperatura ambiente. La revelación se efectúa con la DAB (3,3-diaminobencidina). Se realiza una contra-coloración en hematoxilina y los cortes se montan en una solución acuosa antes de ser observados con el microscopio Leica DMRX.

El marcado de Ki-67 se reparte de manera homogénea sobre el conjunto del tumor control (figura 7A D) mientras que en el tumor tratado por el péptido según la invención (figura 7A F) la zona periférica no expresa el marcador Ki67. Esta región que presenta un marcado Ki67 bajo corresponde a la banda caracterizada anteriormente en la que se constata una expresión muy baja de la vimentina y una reducción significativa del número de vasos. Este resultado sugiere por lo tanto un efecto potencial del péptido según la invención sobre la proliferación celular tumoral que podría deberse a la disminución significativa de la vascularización en la región correspondiente.

La acción del péptido según la invención sobre la inhibición de la angiogénesis tumoral se acompaña por lo tanto de una disminución de la expresión de un marcador de las células tumorales (vimentina) puesto en evidencia con la ayuda de tumores experimentales obtenidos sobre CAM así como una disminución significativa de la proliferación de las células tumorales.

d. Análisis proteico y transcriptómico llevado a cabo sobre tumores obtenidos sobre un modelo CAM y análisis de las variaciones de secreción de factores solubles que intervienen en la angiogénesis tras el tratamiento por el oligopéptido según la invención

Los perfiles de secreción de las células muestran un aumento importante de IL-8 en el medio de las células tratadas por TSP-1, mientras que el oligopéptido según la invención induce a un fuerte aumento de MCP-1 (figuras 2A y 2B) y una disminución de VEGF-A en el sobrenadante de U87-MG (figura 2C). El péptido tiene por lo tanto un buen efecto anti-angiogénico en un contexto que asocia células endoteliales y células tumorales.

Los valores correspondientes a los resultados expresados en las figuras 2B y 2C se presentan en las tablas 3 y 4 siguientes:

	H2O	TSP	NX
Serpina E1/PAI-1	0,92493716	0,85495271	0,86316564
TIMP-1	3,34398164	4,59322792	3,88752813
TIMP-4	1,24938431	2,0409603	2,15020158
TSP-1	0,12252001	0,08481339	0,07983378
uPA	1,52097324	1,48877709	1,20853125
VEGF	0,77683673	1,39678618	1,02082894
NRG1-p1 / HRG1-β1	0	0	0,14646286
Pentraxina 3 (PTX3) / TSG-14	1,09932408	0,71177425	0,61790135
IGFBP-1	2,17561046	1,7235348	1,1652976
IGFBP-3	0,56194267	0,57127158	0,18556444
IL-8 / CXCL8	1,38054145	2,90071833	1,69798791
MCP-1 / CCL2	0	0,15337442	1,86082798
DPPIV / CD26	0,1392225	0	0,08221834
Endoglina / CD105	0	0,09235922	0
Endotelina-1 (ET-1)	0,12820021	0,09940002	0,09417925

Tabla 3: Valores relativos a los resultados del análisis *proteome array* de los sobrenadantes de U87-MG después del tratamiento por H₂O (H2O), TSP-1 (TSP) u oligopéptido según la invención (NX) presentado en la figura B

	May	Val1	Val2	pg/ml1	pg/ml	Desviación estándar pg/ml	err std	pg/ml medio
CM	0,181	0,22	0,142	154,5	24,5	91,92388155	65,1942422	89,5
SN U87	0,4745	0,521	0,428	656,1666667	501,1666667	109,6015511	77,7315965	578,666667
SN U87 + TSP	0,509	0,5	0,518	621,1666667	651,1666667	21,21320344	15,048251	636,166667
SN U87 + NX	0,2995	0,333	0,266	342,8333333	231,1666667	78,96025723	56,0001824	287

Tabla 4: Valores relativos al histograma que muestra la evaluación de VEGF en el sobrenadante de U87-MG después del tratamiento por H₂O (H2O), TSP-1 (TSP) u oligopéptido según la invención (NX) por ELISA presentado en la figura C

En lo que se refiere a la acción inhibitora directa sobre los vasos del oligopéptido según la invención, se ha demostrado que la TSP-1 genera los mismos efectos pero a un grado menor sobre este modelo de tumores experimentales procedentes de CAM (figuras 2A, 2B y 2C). El oligopéptido según la invención es por lo tanto más eficaz que la TSP-1 en la inhibición de la vascularización tumoral.

El estudio de la expresión de los genes en tumores experimentales procedentes de CAM ha revelado globalmente un aumento de un factor 4 con respecto al control de todos los genes que codifican para los receptores (ITGB1, PDGFRβ, KDR, TIE-1, TIE-2, CD36) estudiados en los tumores tratados por el oligopéptido según la invención. Estos receptores pertenecen a la especie del pollo y se encuentran, por lo tanto, en los vasos hospedantes. Este aumento de expresión de genes se encuentra también en los tumores que han recibido TSP-1 pero a menor escala (figura 4). Por otro lado, la sobreexpresión de TIGB1 al mismo tiempo que la de CD36 diferencia el péptido según la invención (NX) de la TSP-1 (TSP). Además, los niveles de expresión observados de PDGFRB, TIE1, TEK y KDR en los vasos de los tumores experimentales muestran no obstante que el oligopéptido según la invención tiene un impacto importante a nivel del micro-entorno tumoral (figura 4).

Los valores correspondientes a los resultados expresados en la figura 4 se presentan en la tabla 5 siguiente:

	Con	RQ TSP medio	RQ NX medio
TIMP1	1	0,44922254	1,23669395
TIMP4	1	0,6642234	0,65521259
ITGB1	1	1,31677272	4,06957648
PDGFB	1	0,63265723	2,10425551
PDGFRB	1	2,5435188	4,36553671
VEGFA	1	0,53918053	1,29771382
KDR	1	1,55729461	4,20663176
ANGPT1	1	0,51056649	0,82414821
ANGPT2	1	0,2678366	0,67868709
TIE-1	1	1,79031205	3,96121105
TEK	1	1,38530537	4,53929902
CD36	1	2,96481544	3,83116437
FGF2	1	0,3429306	0,68597025
PLAU	1	1,49099798	1,15119235

Tabla 5: La tabla representa el RQ medio obtenido para cada gen según las diferentes condiciones de tratamiento. El RQ medio se obtiene a partir de un triplicado. Tratamiento “con” por control, “TSP” el tratamiento TSP-1 con tromboespondina 1 y NX tratamiento con el péptido según la invención

D. Estudio del efecto anti-angiogénico *in vivo* del péptido según la invención

La experimentación sobre los ratones confirma los resultados obtenidos con el modelo CAM. En este caso, los tumores procedían de injertos heterotópicos subcutáneos a nivel del muslo de ratones desnudos (figuras 7B, 7C y 7E).

Los valores correspondientes a los resultados expresados en las figuras 7B, C y E se presentan en las tablas 6, 7 y 8 siguientes:

	Borde1	Borde2	Centro1	Centro2
con	451	187	440	322
con	288	368	396	397
con	218	402	322	364
con	37	31	46	51
NX	49	50	227	240
NX	52	44	280	290
NX	27	4	123	238
NX	75	153	264	89
NX	21	22	26	40
TSP	302	246	297	282
TSP	362	370	322	182
TSP	53	42	66	53

	Borde medio	Centro medio		
Ctrl	247,75	292,25		
TSP	229,166667	200,333333		
NX	49,75	181,7		

Tabla 6

	borde	borde	borde	borde	centro	centro	centro	centro
CTRL	37	31	33	46	46	51	42	55
TSP1	53	42	39	45	66	53	63	56
NX	21	22	26	23	26	40	28	38

5

Tabla 7

Volumen (mm ³)	HidroGel	TSP	NX
D0	0	0	0
D5	43,5866889	33,5535167	46,4597889
D12	43,5633133	29,9250722	39,0419645
D17	73,3539325	49,8769811	70,5983644
D19	101,617334	81,0688689	78,82028
D21	118,098889	112,518586	135,630556
D23	197,82	101,875556	68,0333333

10 Tablas 6, 7 y 8: Estas tablas corresponden a los valores brutos obtenidos durante diferentes análisis llevados a cabo sobre los tumores tratados *in vivo*. Análisis de la proliferación (cuantificación marcado Ki67 (F), análisis de la vascularización (cuantificación marcado CD31 (G) y análisis del crecimiento tumoral en función del tiempo (medición del volumen tumoral (H). Tratamientos “con”, “CTRL” e “hidrogel” son las condiciones control, “TSP” y “TSP1” son los tratamientos con la tromboespondina 1 (TSP-1) y NX el tratamiento con el péptido según la invención

15 Los tumores tratados por el oligopéptido según la invención disminuyen de volumen 48 horas después del tratamiento y parecen menos vascularizados que los tumores controles y los tratados por TSP-1 (figura 7D R). Los estudios histológicos e inmuno-histoquímicos han mostrado una disminución del marcado CD31 sobre la periferia, por comparación con el control (figura 7A L, y figura 7C). Esta disminución de la cantidad de vasos se acompaña de una disminución de la proliferación celular, visualizada por una disminución del marcado Ki-67 (figura 7B).

20 La inhibición inducida sobre los mecanismos de vascularización por el oligopéptido según la invención conduce a la formación de una zona necrótica y a la disminución de la expresión de marcadores de células tumorales indiferenciadas en los tumores tratados con respecto a los tumores controles.

25 El oligopéptido según la invención puede por lo tanto ser utilizado en particular para el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis, en particular el glioblastoma, en particular en el marco de una identificación múltiple.

Listado de secuencias

30 <110> UNIVERSITE DE LIMOGES
NEURONAX

<120> OLIGOPÉPTIDOS PARTICULARES COMO MEDICAMENTOS ANTI-ANGIOGÉNICOS

35 <130> UNIV.LIM.07

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3

40 <210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido derivado a partir de SCO-espondina

<220>

<221> MOD_RES
 <222> 3
 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende 1 a 5 aminoácidos

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 6
 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende 1 a 5 aminoácidos

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 9
 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende 1 a 5 aminoácidos

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 10
 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende 1 a 5 aminoácidos

20 <400> 1

Trp Ser Xaa Trp Ser Xaa Cys Ser Xaa Xaa Cys Gly
 1 5 10

<210> 2

25 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido derivado a partir de TSR

<400> 2

Val Thr Cys Gly
 1

35 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido derivado a partir de TSR

45 <400> 3

Cys Ser Val Thr Cys Gly
 1 5

50 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> péptido derivado a partir de TSR

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 3

60 <223> Xaa significa un aminoácido

<400> 4

ES 2 730 751 T3

Trp Ser Xaa Trp
1

5 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligopéptido derivado a partir de SCO-Espondina

<400> 5

Trp Ser Gly Trp Ser Ser Cys Ser Arg Ser Cys Gly
1 5 10

15 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> oligopéptido derivado a partir de SCO-Espondina

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 3
 <223> Gly o Val o Ser o Pro o Ala

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 6
 <223> Gly o Val o Ser o Pro o Ala

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 9
 <223> Arg o Ala o Val

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 10
 <223> Ser o Pro

<400> 6

Trp Ser Xaa Trp Ser Xaa Cys Ser Xaa Xaa Cys Gly
1 5 10

45 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> oligopéptido derivado a partir de SCO-Espondina

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 3
 <223> Trp Ser Ser o Trp Ser Gly o Trp Ser Pro o Trp Ser Ala o Trp Ser Arg

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 6
 <223> Trp Ser Ser o Trp Ser Gly o Trp Ser Pro o Trp Ser Ala o Trp Ser Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> 9
5 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende 1 a 5 aminoácidos

<220>
<221> MOD_RES
<222> 10
10 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende 1 a 5 aminoácidos

<400> 7

Trp Ser Xaa Trp Ser Xaa Cys Ser Xaa Xaa Cys Gly
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Oligopéptido, caracterizado por la secuencia siguiente:

5 W-S-X₁-W-S-X₂-C-S-X₃-X₄-C-G (SEC ID n°1)

en el que X₁, X₂, X₃ y X₄ representan unas secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 5 aminoácidos,

10 para una utilización en el ser humano o en el animal, como medicamento inhibidor de la angiogénesis en el tratamiento de por lo menos una enfermedad asociada a la angiogénesis seleccionada de entre los cánceres, la artritis, la poliartritis reumatoide, de las placas de aterosclerosis, la neovascularización de un injerto de córnea, de las cicatrices hipertróficas o queloides, la retinopatía proliferante, la retinopatía diabética, la degeneración macular en el adulto, la granulación, el glaucoma neovascular y la uveítis

15 2. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que X₁, X₂, X₃ y X₄ representan cada uno un aminoácido, siendo dicho aminoácido natural o no natural.

3. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que:

- 20
- X₁ se selecciona de entre G, V, S, P y A, y/o
 - X₂ se selecciona de entre G, V, S, P y A, y/o
 - X₃ se selecciona de entre R, A y V, y/o
 - X₄ se selecciona de entre S y P.

25 4. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, modificado por amidación, acilación, pegilación.

5. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que presenta la secuencia siguiente:

30 W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID n°5)

6. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, como medicamento inhibidor de la neo-angiogénesis de tumores en el ser humano o en el animal.

35 7. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en el tratamiento de los tumores sólidos seleccionados de entre los tumores de mama, del pulmón, de los riñones, del intestino, del colon, de los ovarios, de la próstata.

40 8. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el tratamiento de los tumores cerebrales en el ser humano o en el animal.

9. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el tratamiento de glioblastomas.

45 10. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en asociación con por lo menos otro principio activo anti-tumoral.

11. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en asociación con un principio activo quimioterapéutico anti-canceroso.

50 12. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en asociación con un tratamiento de radioterapia anti-cancerosa.

55 13. Oligopéptido para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que está formulado dentro de una composición farmacéutica.

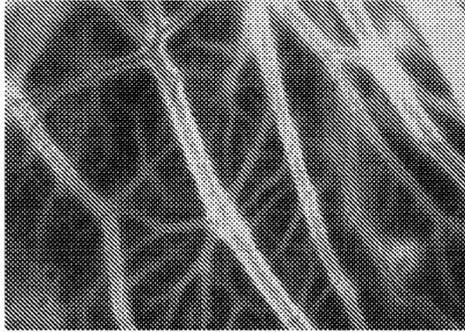


Figura 1A

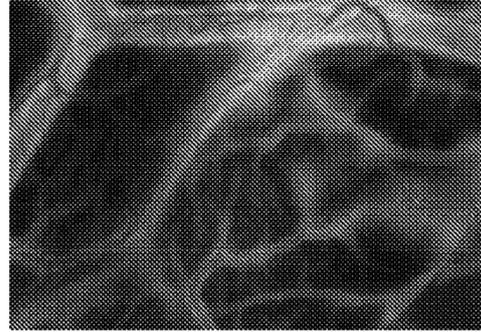


Figura 1B

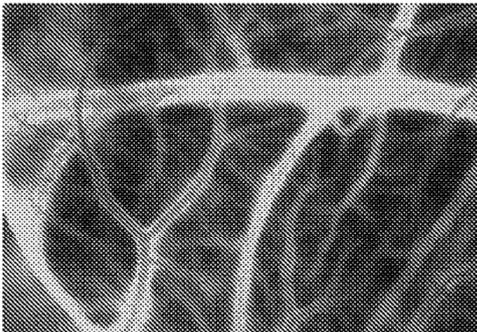


Figura 1C

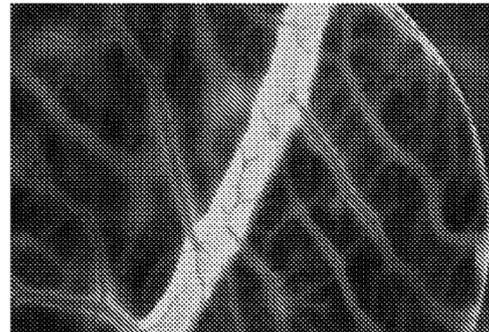


Figura 1D

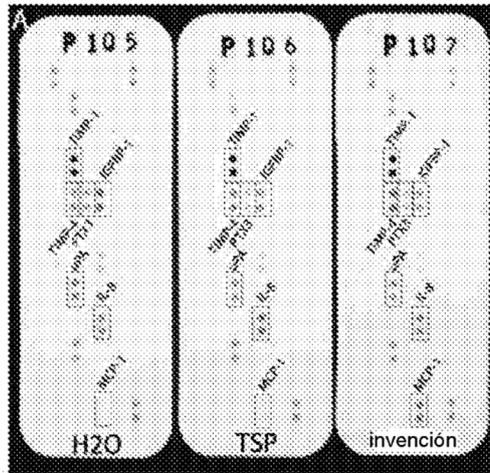


Figura 2A

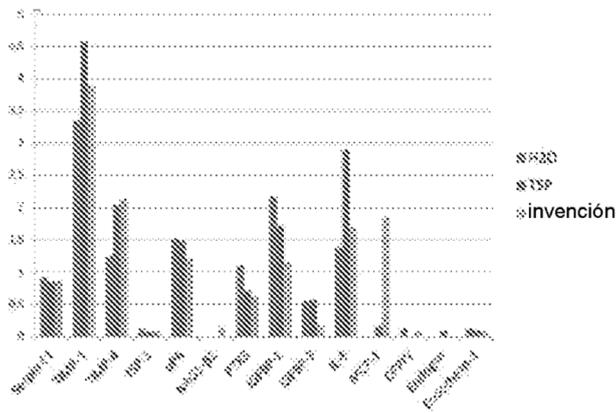


Figura 2B

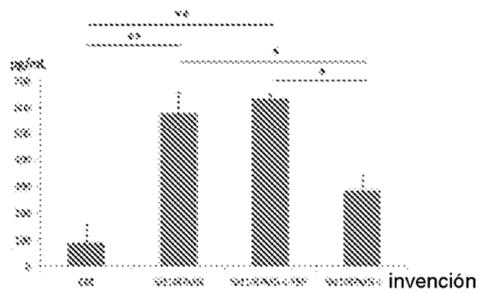


Figura 2C

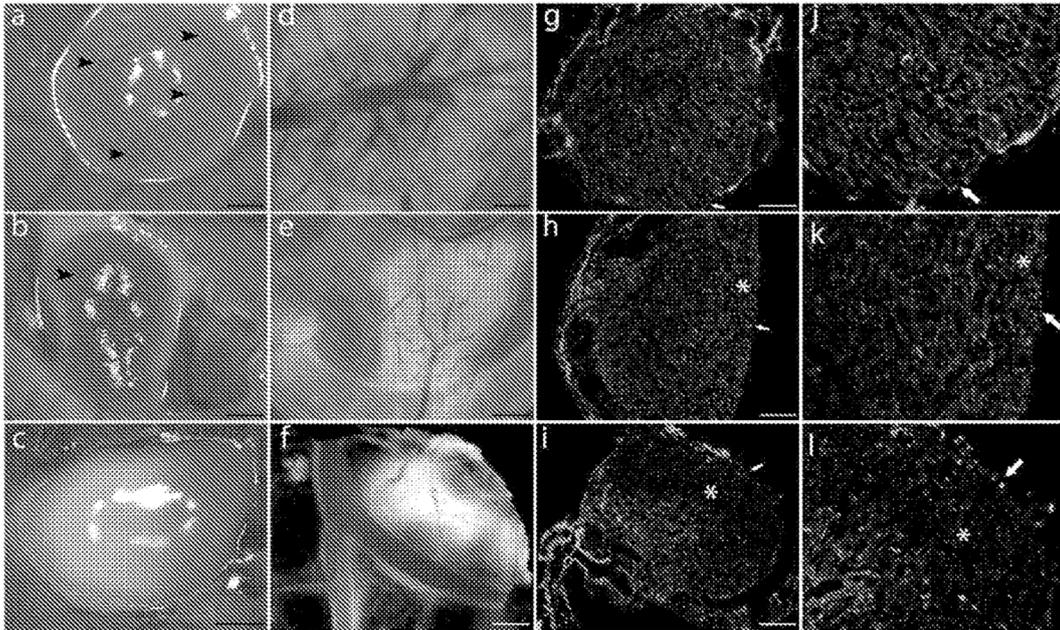


Figura 3A

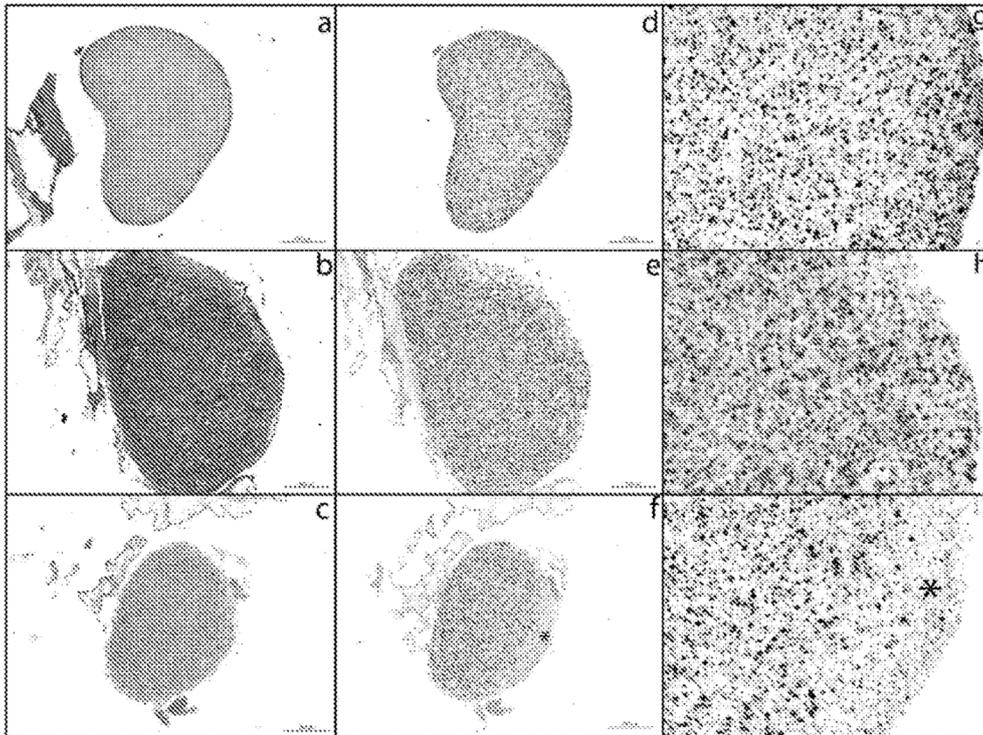


Figura 3B

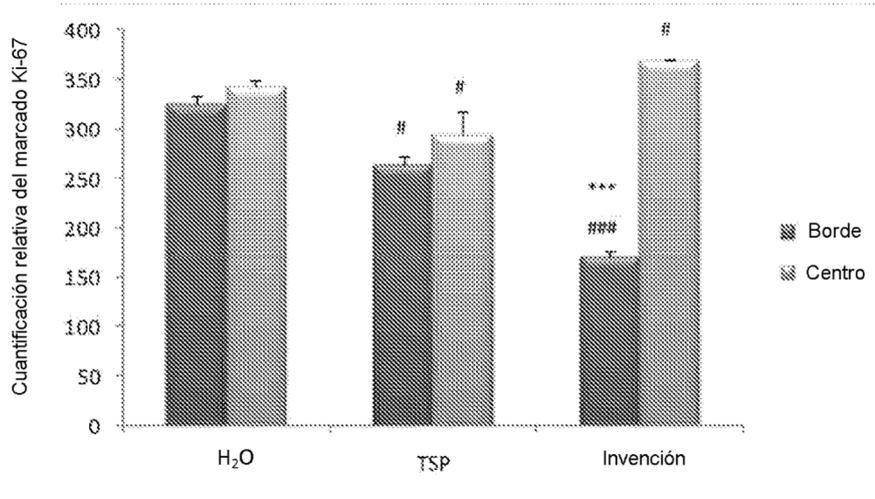


Figura 3C

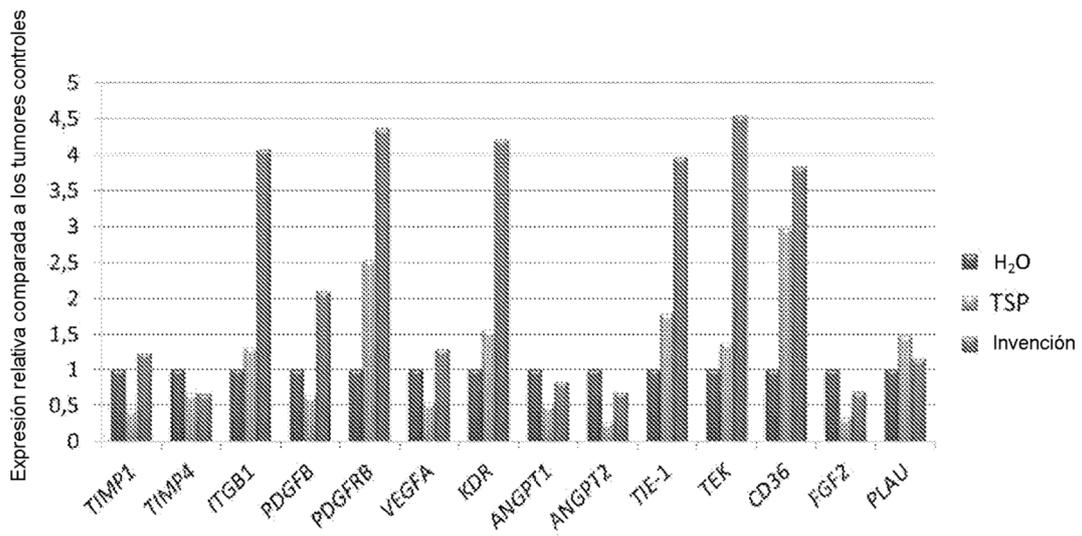


Figura 4

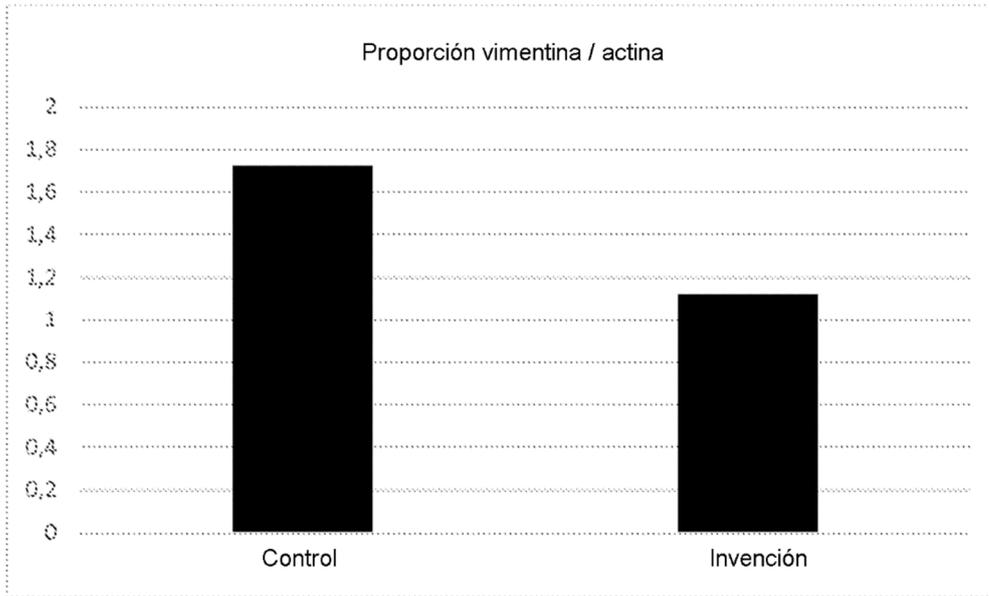


Figura 5

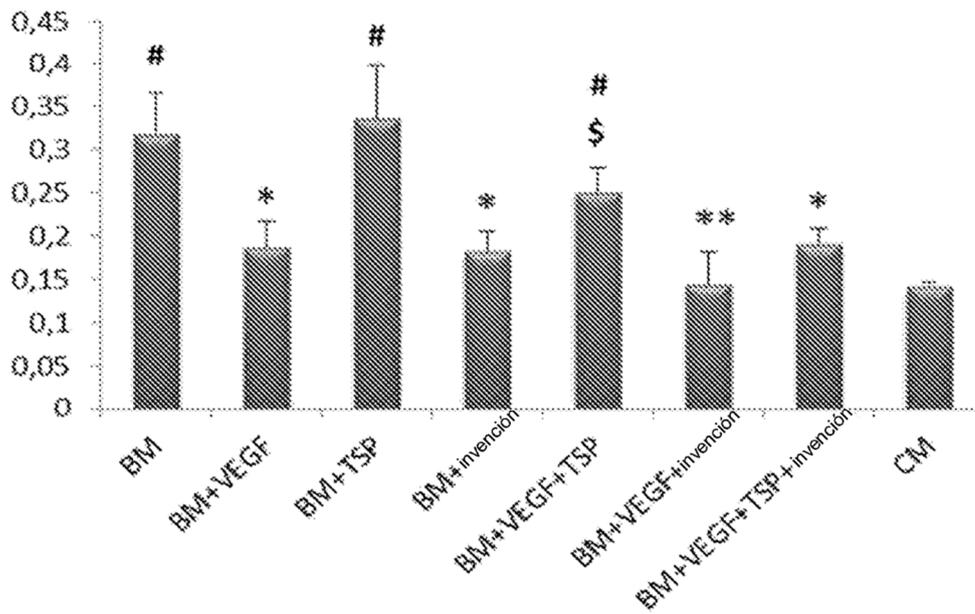


Figura 6

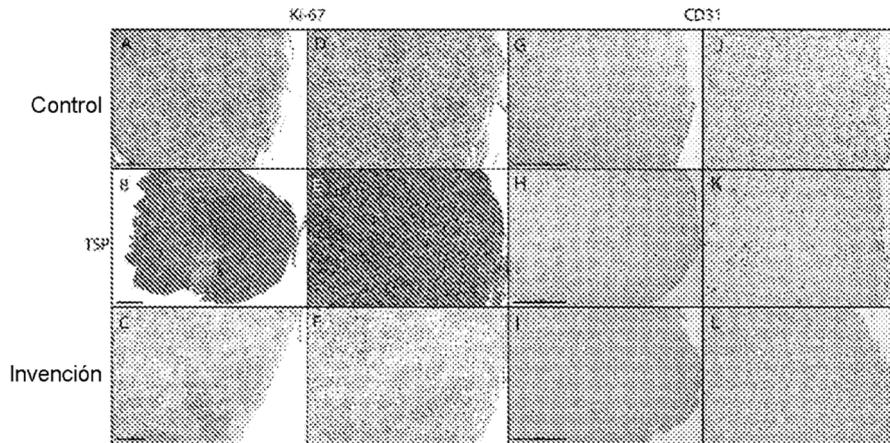


Figura 7A

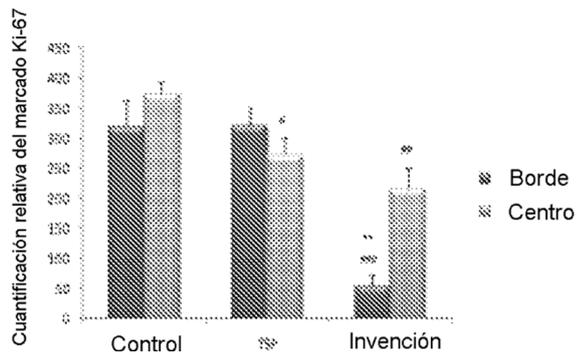


Figura 7B

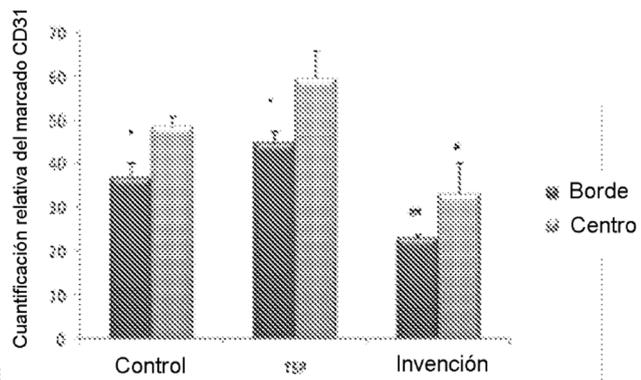


Figura 7C

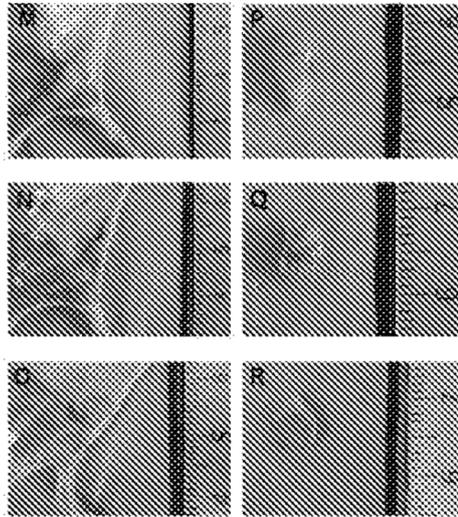


Figura 7D

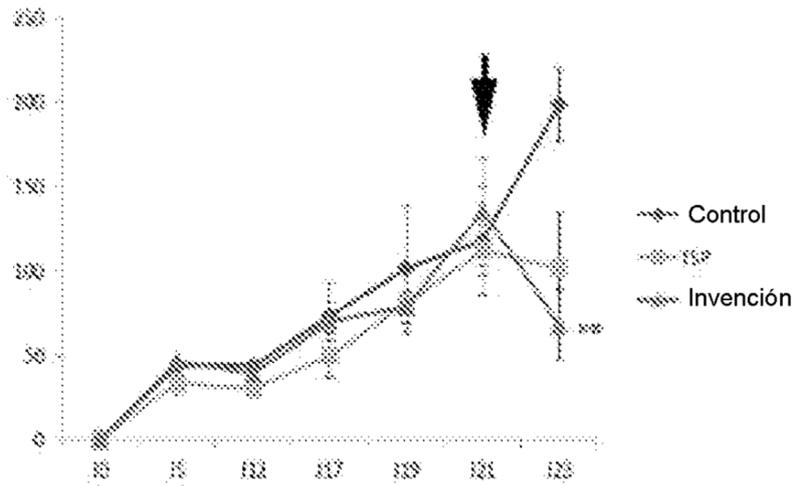


Figura 7E