(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 730 927**

(51) Int. Cl.:

A61P 29/00	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01)
A61L 27/00	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2010 PCT/US2010/056277**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11060104**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2010 E 10830687 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2504035**

(54) Título: **Composiciones y métodos para inhibir la adhesión celular o dirigir agentes diagnósticos o terapéuticos a sitios de unión a RGD**

(30) Prioridad:

10.11.2009 US 25974809 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2019

(73) Titular/es:

ALLEGRO PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)
31103 Rancho Viejo Road, No. 2249
San Juan Capistrano, CA 92675, US

(72) Inventor/es:

MACKEL, MICHAEL, JOHN y
PARK, JOHN

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 730 927 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

Composiciones y métodos para inhibir la adhesión celular o dirigir agentes diagnósticos o terapéuticos a sitios de unión a RGD

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere en general a los campos de la química y la medicina y, más particularmente, a las composiciones de materia y métodos utilizables para inhibir la adhesión celular a los sitios de unión de Arg-Gly-Asp (el tripéptido "RGD") y tratamientos relacionados para trastornos como la inflamación, la cicatrización de heridas, la prevención de la formación de cicatrices, la trombosis, la metástasis y los tumores cancerosos, la retinopatía diabética proliferativa o no proliferativa, la licuefacción del humor vítreo, la inducción de desprendimiento vitreo-retinal posterior (PVD), la patogénesis de las enfermedades vitenorrentinas , tales como flotadores, orificio macular idiopático, tracción vitreomacular, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular húmeda, neovascolarización coroidea, cirugía vitreorretiniana, oclusión venosa, neovascularización corneal, nervio óptico isquémico, rubiosis iridis y prevención de formación de cicatrices en cirugías de glaucoma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La secuencia tripeptídica de RGD se encuentra en varias proteínas, donde desempeña un papel en la adhesión celular. Los ejemplos de proteínas en las que está presente la secuencia del tripéptido RGD incluyen colágenos, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand (VWF), ciertas desintegrinas y ciertas discoidinas.

[0003] Las integrinas son receptores de superficie celular heterodiméricos que median la adhesión entre las células y la matriz extracelular (ECM) al unirse a ligandos que tienen una secuencia de RGD expuesta. Se cree que la unión normal a integrina-RGD desempeña un papel en la expresión génica involucrada en el crecimiento, migración y supervivencia celular. La regulación defectuosa de dicho crecimiento celular, la migración y la supervivencia pueden dar lugar a una serie de estados patológicos que incluyen trombosis, inflamación y cáncer. Por lo tanto, los péptidos RGD se han investigado como posibles imitadores de las proteínas de adhesión celular y por su capacidad para unirse a las integrinas, con fines terapéuticos como la inhibición de la apoptosis, la angiogénesis, la tumorigénesis, para el uso en su forma multimérica como agentes radioterapéuticos internos y cáncer, así como agentes de imagen de cáncer y para sus capacidades de transporte de drogas contra el cáncer.

[0004] En el ojo, las integrinas afectan una serie de procesos que incluyen el desarrollo ocular, la migración celular, la curación y algunos procesos patológicos. Las integrinas también pueden modular la inflamación y la trombosis en el tejido ocular. También se ha informado que el péptido RGD inyectado por vía intravítrea causa desprendimiento vitreorretiniano posterior en un modelo animal y, por lo tanto, puede ser útil en el tratamiento de ciertos trastornos de la retina y/o para facilitar la eliminación del cuerpo vítreo en un procedimiento de vitrectomía. [Ver Olivera, LB, et al., Vitrectomía asistida por péptidos RGD para facilitar la inducción de un desprendimiento de vítreo posterior: un nuevo principio en la vitreolisis farmacológica; Current Eye Research (8): 333-40 (25 de diciembre de 2002)].

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

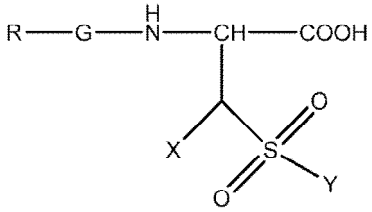
[0005] Según la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden un péptido de ácido RGCysteic como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas 1 a 15.

[0006] La presente descripción describe compuestos que comprenden ácido cisteico RG (es decir, RG-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH o Arg-Gly-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH) y sus derivados (incluidos las sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, estereoisómeros, multímeros, formas cíclicas, formas lineales, conjugados de fármacos, profármacos y sus derivados).

[0007] La presente invención también proporciona composiciones para inhibir la adhesión celular a los sitios de unión de RGD. En el presente documento también se describe un método para inhibir la adhesión celular a los sitios de unión de RGD o administrar otros agentes de diagnóstico o terapéuticos a los sitios de unión de RGD en sujetos humanos o animales administrando al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende un péptido de ácido RG-cisteico o un derivado de los mismos (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, estereoisómeros, multímeros, formas cíclicas, formas lineales, conjugados de fármacos, profármacos y sus derivados). Los ejemplos específicos de péptido de ácido cisteico RG de esta invención incluyen una forma lineal de Arg-Gly-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH (ejemplo referido aquí como Compuesto 1) y una forma cíclica de Arg-Gly-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH) (ejemplo referido aquí como Compuesto 2).

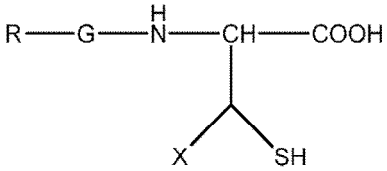
[0008] Las fórmulas generales para los derivados de ácido cisteico RG de la presente invención incluyen compuestos que tienen las fórmulas generales I-VII de la siguiente manera:

Fórmula general I:



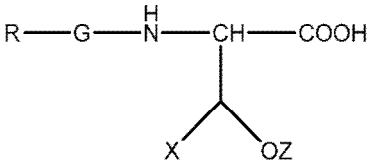
donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H e Y = OH o NH_2.

Fórmula general II:



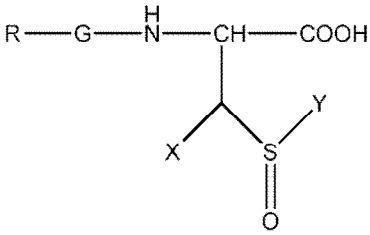
donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H.

Fórmula general III:



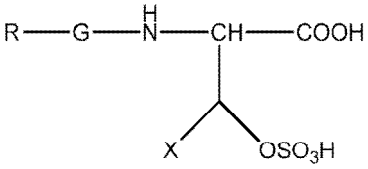
donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H y en donde Z se selecciona de: H o SO_3H

Fórmula general IV:



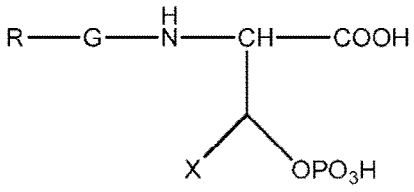
donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H; Y se selecciona de OH o NH_2.

Fórmula general V:



donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H.

Fórmula general VI:

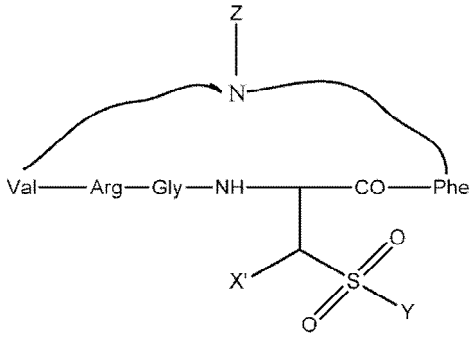


donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H.

Fórmula general VII: X_1-RG-ácido cisteico-X

donde X y X_1 se seleccionan de: cíclico o lineal - Phe-Val-Ala, -Phe-Leu-Ala, -Phe-Val-Gly, -Phe-Leu-Gly, -Phe-Pro-Gly, -Phe-Pro -Ala, -Phe-Val, o cualquier sal de cualquier combinación del isómero D o isómero L de: Arg, Gly, Cysteic, Phe, Val, Ala, Leu, Pro, Thr.

[0009] Los ejemplos de formas cíclicas de fórmula general VII incluyen:



donde X' se selecciona de: H, alquilo C_1-C_6, Ph o SO_3H y Z se selecciona de H o Me; Y se selecciona de OH, NH_2.

[0010] Los ácidos sulfónicos son ácidos más fuertes que los correspondientes ácidos carboxílicos. Esta mayor polaridad del grupo de ácido sulfónico conduce a una unión intermolecular más fuerte. Por ejemplo, el ácido RG-cisteico, que tiene un enlace OH más polarizado, puede formar enlaces de hidrógeno más fuertes que el ácido RG-aspártico (péptido RGD), que tiene un enlace OH relativamente menos polarizado, con los grupos amida de las proteínas en la integrina sitio de unión y/o tienen interacciones más fuertes con iones metálicos complejados en el sitio de unión de integrina.

[0011] Como se describe con más detalle en otra parte en este documento, un ejemplo específico de Fórmula General VII, glicinil-arginil-glicinil-cisteína-treonil-prolina-COOH (GRG Ácido Cisteico TP; denominado **Compuesto 1**) fue sintetizado y ensayado en animales y se encontró que son efectivos para inducir desprendimiento vítreo posterior (PVD) de la superficie de la retina al inhibir las interacciones integrina-matriz extracelular (ECM). Como se describe también con más detalle en otra parte del presente documento, el Compuesto 1 se ensayó en un modelo de cicatrización de heridas utilizando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y se demostró que inhibe la adhesión celular en un 74% en 12 horas en comparación con una inhibición del 40% por Péptido cíclico-RGD. Estos estudios sugieren y corroboran el razonamiento de que glicinil-arginil-glicinil-cisteica-treonil-prolina-COOH puede unirse a la integrina incluso más fuertemente que los propios péptidos RGD.

[0012] La secuencia peptídica de ácido cisteico RG, que puede estar en forma L o forma D, es un inhibidor competitivo de las interacciones integrina-ECM. La secuencia peptídica de ácido cisteico RG puede ser de derivados resistentes a la proteasa o de derivados cíclicos o de derivados profármacos o asociados con sistemas de administración de fármacos o de anticuerpos monoclonales.

[0013] Las composiciones de la presente invención se pueden usar para inhibir la angiogénesis, que puede ser útil para tratar la inflamación, la curación de heridas, la trombosis, las metástasis del cáncer y los tumores. Se puede encontrar una aplicación útil adicional en oftalmología que incluye, retinopatía diabética proliferativa o no proliferativa, licuefacción del vítreo, inducción de desprendimiento vitreo-retinal posterior (PVD), patogénesis de enfermedades vitreorretinianas, tales como agujero macular idiopático, tracción vitrequeomacéutica, degeneración

macular relacionada con la edad, degeneración macular húmeda, neovascularización coroidea, cirugía vitreoral, oclusión venosa y prevención de la formación de cicatrices en la cirugía de glaucoma. Aún más, las composiciones multiméricas y/o radiomarcadas de la presente invención son utilizables como agentes de diagnóstico/formación de imágenes para la detección de tumores y agentes radioterapéuticos para el tratamiento de tumores y como portadores de fármacos anticancerosos debido a sus propiedades de dirección tumoral.

[0014] Los biomateriales que incorporan un péptido de ácido cisteico RG también pueden proporcionar un microentorno adhesivo sintético para la supervivencia y el crecimiento de células a largo plazo y para la ingeniería de tejidos vivos para aplicaciones en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. A través de su propiedad de unirse a los receptores de adhesión de integrina, los péptidos de ácido cisteico RG pueden proporcionar una señal que promueve la adhesión cuando está atado a un biomaterial o andamio. Los materiales basados en ácido cisteico RG median la adhesión celular, la propagación y la migración de las células. Además, la adhesión celular mediada por integrina promueve la proliferación celular y la supervivencia y desempeña un papel clave en el ensamblaje y organización de estructuras y tejidos multicelulares.

[0015] Los fármacos para el tratamiento de la degeneración macular como Lucentis y Avastin se basan en la inhibición de VEGF, que de otro modo provoca el crecimiento de nuevos vasos, la angiogénesis y, por consiguiente, contribuye al edema macular. Se ha sabido que un pequeño péptido RGD puede inducir la apoptosis mediante la inhibición de la unión celular a la matriz extracelular1 mediante la unión competitiva como se muestra en la Patente de los Estados Unidos Nº 6,500, 924 de Brooks et al.

[0016] El motivo de unión o reconocimiento del péptido RGD se puede encontrar en las proteínas de la matriz extracelular y las integrinas que unen el citoesqueleto intracelular de las células con la ECM al reconocer los epítopos de adhesión de RGD. Ver, por ejemplo, Foos, R Y., Invest. Opthalmol. Vis. Sci. (1972) 11, 801-808. Las células, sin la unión al ECM, normalmente se someten a apoptosis.

[0017] En general, las interacciones entre los fibroblastos y los componentes de la glicoproteína de la matriz extracelular causan una formación importante de cicatrices mediada principalmente por la secuencia de aminoácidos que contiene RGD que interactúa en las integrinas de la superficie celular. También se sabe que la secuencia de RGD está involucrada en las interacciones célula-ECM durante las reacciones inflamatorias y homeostáticas (ver Hershkoviz, SM, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., (1994), 35, 2585-2591) y las integrinas desempeñan un papel importante en la migración celular en la curación de heridas o en procesos patológicos y en la modulación de la inflamación y la trombosis. Por lo tanto, potentes antagonistas de la integrina, como los péptidos RGD, podrían ser muy útiles como agentes farmacológicos como agentes antiinflamatorios, antimetastásicos o antitrombóticos (ver Elner, SG y Elner, VM, IOVS (1996) 37: 696-701. También se informa en la literatura que el receptor CD44 para el ácido hialurónico media las interacciones célula-célula y célula-matriz a través de su afinidad por el ácido hialurónico, y posiblemente también a través de su afinidad por otros ligandos como la osteopontina, los colágenos y la matriz de las aloproteasas (MMP).

[0018] La adhesión con hialuronano desempeña un papel importante en la migración celular, el crecimiento y la progresión del tumor y también participa en la activación de linfocitos, la recirculación y la localización, y la hematopoyesis. La expresión o disfunción alterada causa numerosos fenotipos patógenos (véase, por ejemplo, Jiang D., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. (2007) 23: 435-461; y Knudson, W. y otros, Matrix Bio. (2002) , 21: 15-23).

[0019] Recientemente, se ha demostrado que la interacción de CD44 y los componentes de la matriz celular (por ejemplo, HA) desempeñan un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias y la interrupción de las interacciones hialuronano-CD44 conduciría a una mejoría de la neovascularización coroidea (ver Hiroshi Mochimaru y otros, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (2009) 50: 4410-4415).

[0020] Estas evidencias demuestran que una molécula de adhesión como el péptido RGD o CD44 en las interacciones célula-célula y célula-ECM juega un papel importante en el desarrollo de numerosas enfermedades patógenas y la inhibición de las interacciones puede ser una nueva diana terapéutica en el tratamiento y curado de las enfermedades.

[0021] También se ha demostrado que los péptidos sintéticos se unen a integrinas y factores de crecimiento. Se ha encontrado que los pentapéptidos ciclados que contienen secuencias RGD inhiben la unión de la vitronectina a la integina $\alpha v\beta 3$ (ver Michael A. Dechantsreiter, et al., J. Med. Chem. (1999) 42: 3033-3040) y tanto la vitronectina como la fibronectina para $\alpha v\beta 3$ y las integrinas $\alpha IIb\beta 3$ (ver Roland Haubner et al., J. Am. Chem. Soc., (1996) 118: 7461-7472). Se ha demostrado que esta inhibición es útil en el tratamiento de enfermedades múltiples no relacionadas. En estudios de hámster, los pentapéptidos cíclicos retrasaron el crecimiento y la metátesis de los tumores en comparación con los animales de control (ver MA Buerkle et al., British J. Cancer (2002) 86: 788-795). También se ha demostrado que los pentapéptidos reducen la unión de glóbulos rojos falciformes al endotelio vascular y mejora el comportamiento hemodinámico (ver Eileen M. Finnegan et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., (2007) 293: H1038- H1045). Otro péptido cíclico que contiene la secuencia RGD ha mostrado una fuerte unión a $\alpha 4\beta 1$, una integrina que se sabe que desempeña un papel en la unión de leucocitos en respuestas inflamatorias e inmunes (ver Pina M. Cardarelli et al., J. Biol. Chem. (1994) 269: 18668-18673). Se ha demostrado

que un tetrapéptido sulfatado sintético se une fuertemente a VEGF (ver Maynard, JA Hubbell, Acta Biomaterialia (2005) 1: 451-459).

[0022] Además, en una aplicación importante y útil, se ha demostrado que un conjugado de fármaco péptido RGD dimérico es útil para la administración de fármacos dirigidos a la integrina para la orientación del tumor (ver Chen et al., J. Med. Chem., (2005) 48 (4): 1098-1106).

[0023] En otra aplicación igualmente importante y útil, se ha demostrado que los péptidos RGD radiomarcados multiméricos son útiles como agentes de diagnóstico/formación de imágenes para la detección de tumores y, como agentes radioterapéuticos para la focalización y el tratamiento específicos de tumores dirigidos a la integrina αvβ3 (ver Zi-Bo Li y col., J. Nucl. Medicine, (2007) 48: 1162-1171).

[0024] En oftalmología, la formación de cicatrices en la cicatrización de heridas por fibroblastos es uno de los principales problemas, particularmente en el glaucoma. Esto surge de las interacciones entre los componentes de fibroblastos y glicoproteínas de la MEC. El reconocimiento de las glicoproteínas ECM se produce a través de integrinas de la superficie celular que son específicas para epítopos de adhesión, como la secuencia Arg-Gly-Asp (o RGD). La secuencia de RGD, que está presente en varias matrices de proteínas plasmáticas, incluidas la fibronectina (FN) y la vitronectina (VN), participa en las interacciones célula-ECM que se producen durante las reacciones inflamatorias y homeostáticas. La inhibición de las interacciones entre los fibroblastos y las glicoproteínas de la ECM alivió la formación de cicatrices (véase Rami Hershkoviz y otros, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 2585-2591).

[0025] Las fibrillas de colágeno de la corteza vítrea posterior se adhieren a la interfaz vitreorretiniana, específicamente a la lámina limitante interna de la superficie de la retina (ver Sebag J., Eye (1992), 6: 541-552). La adherencia en la base vítrea, el disco óptico, a lo largo de los principales vasos retinianos y de manera facial a todo el polo posterior juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades vitreorretinianas, como el agujero macular idiopático, la tracción vitreomacular, la retinopatía diabética proliferativa, etc. (Akiba J. Quiroz MA, y col., Ophthalmol. (1990) 97, 1619-1655).

[0026] La inhibición de la angiogénesis está mostrando una promesa temprana con retinopatía diabética y degeneración macular, que resultan de un crecimiento excesivo de vasos sanguíneos oculares. En estos trastornos, los vasos interfieren con las estructuras normales del ojo o impiden que la luz llegue a la parte posterior del ojo. Los nuevos vasos sanguíneos son en sí mismos la principal patología, y detener el crecimiento de los vasos sanguíneos podría prevenir la ceguera. Por lo tanto, la angioinhibición podría resultar en no solo un tratamiento de estos trastornos; podría ser una cura. Además, se ha postulado que la separación del vítreo de la retina puede aliviar la tracción macular, reduciendo el riesgo de formación de orificios maculares. En consecuencia, el desprendimiento vítreo posterior por la inhibición de la fibronectina y la unión de laminina a las integrinas en la interfaz vitreorretiniana puede prevenir la neovascularización retiniana en ojos con retinopatía diabética y oclusión de la vena retiniana (ver Akiba J. Quiroz MA, Ophthalmol. (1990) 97, 1619-1655; Kelly NE, et al., Arch. Ophthalmol. (1991) 109, 654-659; y Kado M, et al., Am. J. Ophthalmol. (1988) 105: 20-24).

[0027] En los últimos años, los procedimientos quirúrgicos vítreos se han mejorado mucho para aliviar las tracciones vitreorretinianas y para reducir el edema retiniano. A pesar de la mejora continua en las técnicas quirúrgicas y la instrumentación, sigue siendo difícil lograr una remoción atraumática de la corteza vítrea en algunos pacientes, particularmente en retinofatía diabética y en pacientes pediátricos debido a complicaciones como roturas retinianas, desprendimiento de retina y daño de la fibra nerviosa de la retina (ver Sebag J., Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. (1987) 225: 89-93; y Han DP, et al., Arch. Ophthalmol. (1998) 106: 998-1000) etc. Por lo tanto, un enfoque menos traumático de La escisión selectiva de la interfaz vítrea sin dañar la retina es altamente deseable. En los últimos años, han aparecido en la literatura informes sobre varios agentes farmacológicos para la separación de la interfaz vitreorretiniana (ver Trese MT, Eye. (2002) 16: 365-368; Gandorfer A., et al., Am. J. Ophthalmol. (2002) 133: 156-159 y Hesse L., et al., Eye Res. (2000) 70: 31-39). La vitolólisis farmacológica que usa enzimas como la hialuronidasa (ver Patente de EE. UU. No. 6,863,886 de Karageozian et al.) y plasmina autóloga (Sakuma T, et al., Nippon Ganka Gakkai Zassi (2003) 107: 709-718) se ha explorado para promover la digestión de la matriz extracelular y para inducir desprendimiento vítreo posterior en el pasado. Sin embargo, una destrucción no específica de tejidos adyacentes por las enzimas empleadas impide el éxito de su aplicación terapéutica. En los últimos años, un nuevo enfoque que utiliza agentes farmacológicos no enzimáticos como la urea (ver Nickerson, C., et al., En J. Biomechanics, (2008) 41: 1840-1846, y en Macromol. Symp. (2005): 183-189) y el péptido RGD (ver Leonardo B. Oliviera, et al., Curr. Eye Res. (2002) 25: 333-340) se ha investigado al concentrarse en la separación de la interfaz vitreorretiniana. Se ha demostrado que un análogo sintético del péptido RGD compite por el motivo RGD de las proteínas ECM para interrumpir las interacciones integrina - ECM y aflojar las uniones in vitro (Williams JA, Pathol. Bio. (1992) 40: 813-821; Gehlsen KR, y otros, J. Cell. Biol. (1988) 106: 925-930; Pierschbacher, MD, y otros, J. Biol. CHem., (1987) 262: 17294-17298 y Zhon LL, et al., IOVS. (1996) 37: 104-113) e in vivo. Por lo tanto, la inyección intravítrea de péptidos RGD solubles condujo a una liberación de epítopos RGD de las proteínas ECM insolubles de la superficie retiniana, facilitando en consecuencia la PVD no enzimática en modelos de conejo. Claramente, estos resultados indican que la interfaz vitreorretiniana implica la conexión de la integrina al motivo RGD de la ECM, así como la adhesión de colágenos corticales vítreos a la laminilla limitante interna (ILL). Los péptidos RGD y sus

derivados promueven la migración de células epiteliales en una herida (ver PM Mertz el al., J. Burn Care Res. (1996) 17: 199-206) y mantienen su bioactividad cuando se incorporan a biomateriales sintéticos como hidrogeles (ver MP Lutolf, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (2003) 100: 5413-5418; y MP Lutolf, et al., Nature Biotechnol. (2003) 21: 513 - 518), otras matrices de polímeros (ver Horng-Ban Lin y otros, J. Biomed. Material. Res. (2004) 28: 329-342) o como películas de superficie sobre sustratos duros (DM Ferris y otros, Biomaterials (1999) 20: 2323-2331). Los péptidos RGD también promueven una mayor adhesión de las células epiteliales o endoteliales a las prótesis vasculares (consulte K.Walluscheck el al., Eur. J. Vascular and Endovascular Surgery (1996) 12: 321-330) y otros órganos artificiales (consulte Jeschke, Brigette, Biomaterials (2002) 23: 3455-3463) recubiertos con secuencia peptídica y se ha demostrado que apoyan el recrecimiento nervioso (ver M. Rafiuddin Ahmed et al., Brain Res. (2003) 993: 208-216). La superficie biológicamente activa de la prótesis puede contener fibras de resina sintética o polímeros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

[0028]

La Figura 1 muestra el efecto de tres péptidos, a saber, péptido RGD cíclico, péptido de ácido cisteico RG (Compuesto 1) y péptido RGE, sobre la cinética de la cicatrización de heridas;
La Figura 2 muestra un cromatograma de HPLC de péptido de ácido cisteico RG (Compuesto 1);
La Figura 3 muestra un cromatograma de masa de electropulverización de péptido de ácido cisteico RG (Compuesto 1);
La Figura 4 muestra un cromatograma de HPLC de péptido de ácido cisteico-RG cíclico (Compuesto 2); y la Figura 5 muestra un cromatograma de masas de electropulverización de péptido de ácido cisteico-RG cíclico (Compuesto 2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA Y EJEMPLOS

[0029] La presente invención proporciona compuestos novedosos, incluidos los de las Fórmulas Generales I a VII anteriores. Los ejemplos específicos incluyen la forma lineal de Arg-Gly-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH (ejemplo referido aquí como Compuesto 1) y la forma cíclica de Arg-Gly-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH) (ejemplo referido en el presente documento como Compuesto 2), así como derivados del mismo, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, estereoisómeros, mutímeros, formas cíclicas, formas lineales, formas multiméricas, conjugados de fármacos, profármacos y sus derivados.

Síntesis de los compuestos 1 y 2

[0030] La síntesis de péptidos en fase sólida convencional (SPPS; véase RB Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1963) 85 (14): 2149-2154) conocida por un experto en la técnica puede llevarse a cabo. El SPPS es un método preferido de síntesis debido a los altos rendimientos. En general, la primera etapa de la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida consiste en un conjunto de cadena peptídica con derivados de aminoácidos protegidos en un soporte polimérico. La segunda etapa de la técnica es la escisión del péptido del soporte de resina con la escisión concurrente de todos los grupos protectores de la cadena lateral para dar el péptido libre bruto. El principio general de SPPS es uno de los ciclos repetidos de acoplamiento-desprotección. La amina N-terminal libre de un péptido unido en fase sólida se acopla a una única unidad de aminoácido N-protegido. Esta unidad luego se desprotege, revelando una nueva amina N-terminal a la que se puede unir un aminoácido adicional. Ver Asymmetric Synthesis de Von GM Coppola y HF Schuster; John Wiley & Sons, New York 1987 para síntesis, protección y estrategias de desprotección y Greene's Protective Groups in Organic Synthesis de Peter GM Wuts y Theodora W. Greene, (2ª edición) J. Wiley & Sons, 1991. para estrategias de protección y desprotección.

[0031] De las dos formas principales usadas de síntesis de péptidos en fase sólida - Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo; grupo protector alfa-amino lábil de base) y t-Boc (t-butiloxicarbonilo; grupo protector de ácido lábil), Fmoc se puede usar preferiblemente en la síntesis de los péptidos presentes. Cada método involucra diferentes resinas y la protección de la cadena lateral de los aminoácidos y los pasos de escisión/desprotección consecuentes. Después de la escisión de la resina, los péptidos generalmente se purifican por HPLC de fase inversa utilizando columnas tales como C-18, C-8 y C-4.

Un ejemplo de síntesis de péptidos en fase sólida.

[0032] El siguiente es un resumen de los pasos sintéticos para la síntesis de péptidos en resina Wang como soporte sólido, utilizando el grupo protector de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) lábil de base.

Desprotección de fmoc

[0033] Cargue 0,08 mmol de resina Fmoc-Pro-Wang en una columna fritada equipada con una tapa de plástico. Lave la resina con 2 porciones de 3 ml de DMF (dimetilformamida) durante 1 minuto cada una. A continuación, agregue aproximadamente 3 ml de piperidina al 20% en DMF y deje que la desprotección de Fmoc continúe durante 15 minutos. Durante este tiempo, agite suavemente o agite la columna para asegurar una mezcla completa. Una vez

completada la reacción (aproximadamente 15 minutos), drene la columna de reacción y vuelva a lavar la resina con DMF (4 x 3 ml).

Acoplamiento de enlace amida

[0034] El aminoácido protegido por Fmoc deseado, Fmoc-Thr-tBu, (3 eq.; relativo a la carga de resina indicada por el proveedor) y DIEA (6 eq.) En DCM (0,5 M con respecto al aminoácido) luego se agregan a la resina. La mezcla se enfría a -20°C durante 20 minutos. A continuación, se agrega a la reacción el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), un reactivo de acoplamiento peptídico usado en la síntesis de péptidos en fase sólida (3 eq.). Después de agitarse a -20°C durante 8 horas, la mezcla de reacción se drena y la resina se lava con DCM (3x).

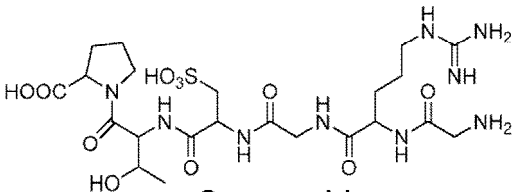
[0035] Después de la desprotección de Fmoc usando 20% de piperina en DMF (15 min) y el lavado con DMF (3x), el siguiente aminoácido protegido por Fmoc (3 eq.; relativo a la carga de resina), PyBop (se acopla de la misma manera como anteriormente.

Escisión

[0036] Para obtener el péptido en forma de ácido libre, el enlace éster se escinde utilizando condiciones fuertemente ácidas, como TFA (ácido trifluoroacético). Trate la resina con 2-3 ml de una solución de ácido trifluoroacético y agua 95:5. Agite suavemente la resina durante un período de 25 minutos. Luego, drene la columna y recoja cuidadosamente el filtrado en un recipiente de recolección de vidrio.

Síntesis del **Compuesto 1** (GRG Ácido cisteico TP):

[0037]



Compuesto 1

Paso 1. Carga de resina: Como material de partida se utiliza una resina de o-clorotritilo precargada con prolina.
Paso 2. Ensamblaje de péptidos: la síntesis de Fmoc se usa para ensamblar el péptido. Los aminoácidos protegidos se activan con PyBOP y los grupos Fmoc terminales se eliminan con piperidina al 20% en DMF. Los siguientes aminoácidos protegidos se utilizan en el orden en que aparecen:

a. Fmoc-Thr-tBu (Fmoc treonina-t-butil éster)
b. Fmoc-ácido cisteico-Pfp (Fmoc ácido cisteico-pentafluorofenil ester)
c. Fmoc-Gly (glicina Fmoc)
d. Fmoc-Arg-Pbf (Nα-Fmoc-Nω-(2,2,4,6,7 pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)-L-arginina)
e. Fmoc-Gly (glicina Fmoc)

Paso 3. Escisión del péptido a partir de la resina: el péptido resultante se escinde del soporte sólido y los grupos protectores se eliminan con una solución de 85,5% de TFA, 5% de fenol, 2% de agua, 5% de tioanisol y 2,5% de etanoditiol. Paso 4. Purificación: la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se utiliza para purificar los péptidos de ácido cisteico RG resultantes.

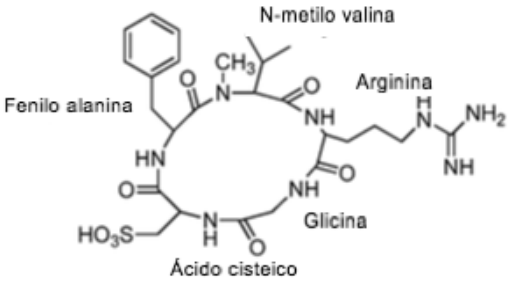
[0038] Una cantidad de **Compuesto 1**, preparada como se describió anteriormente, se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento para que tenga un área de pureza >98% [condiciones de HPLC: Tampón A: ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua, Tampón B: TFA al 0,1% en acetonitrilo, Fase móvil (MP) A: 97% Tampón A y 3% Tampón B, Fase móvil B: 79% Tampón A y 21% Tampón B, Fase móvil C: 50% Tampón A y 50 % de tampón B; para gradiente vea la Tabla 1 a continuación; caudal: 1,0 ml/minuto; columna: Waters Symmetry® C18, 5µ, 4,6 x 250 mm; temperatura de la columna: 30°C; detector: UV @ 220nm; volumen de inyección de muestra: 20,0 ml; preparación de la muestra: 20 µl de muestra diluida con 1,0 ml de la fase A móvil (aproximadamente 0,5 mg/ml)]. El cromatograma de HPLC correspondiente se muestra en la Fig. 2. Además, basándose en la adición gradual de los correspondientes aminoácidos para la síntesis de la secuencia peptídica, la Espectrometría de Masas por Electrospray determinó que el peso molecular del **Compuesto 1** purificado era 638,3 amu (masa teórica: 637,7 amu), que confirma la identidad del **Compuesto 1**. El espectrograma de masas de Electrospray del **Compuesto 1** se muestra en la Fig.3.

Tabla 1: Programa de gradiente de la bomba para detectar el Compuesto 1 por HPLC

Programa de gradiente de bomba				
Etapa	**Tiempo**	**%MP A**	**%MP B**	**%MPC**
0	**0,1 min**	**100**	**0**	**0**
1	**60 min**	**0**	**100**	**0**
2	**20 min**	**0**	**0**	**100**
3	**15min**	**100**	**0**	**0**

Síntesis del **Compuesto 2** (ácido cisteico-ciclo-RG fN (CH_3)V):

[0039]



Compuesto 2

Paso 1. Carga de resina: se utiliza una resina de o-clorotritilo como material de partida. Fmoc-N-metil-L-Val se une a la resina.
Paso 2. Ensamblaje de péptidos: 2. La síntesis de Fmoc se usa para el ensamblaje de péptidos. Los aminoácidos protegidos se activan con PyBOP y los grupos Fmoc terminales se eliminan con piperidina al 20% en DMF. Los siguientes aminoácidos protegidos se utilizan en el orden en que aparecen:

a. Fmoc-Phe (Fmoc-fenil alanina)
b. Fmoc-ácido cisteico-PfP (Fmoc-ácido cisteico pentafluorofenil ester)
c. Fmoc-Gly (Fmoc-glicina)
d. Fmoc-Arg-Pbf (Nα-Fmoc-Nω-(2,2,4,6,7 pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)-L-arginina)

Paso 3. Escisión del péptido de la resina: el péptido se escinde del soporte sólido usando ácido acético/TFA/DCM (1:3:3) Paso 4. Ciclización y desprotección al péptido cíclico deseado: ciclación mediante activación in situ usando difenilfosfloruro de azufre y bicarbonato de sodio en alta dilución. Las cadenas laterales se desprotegen utilizando 85,5% de TFA, 5% de fenol, 2% de agua, 5% de tioanisol, 2,5% de etanoditiol.
Paso 5. Purificación: HPLC se utiliza para la purificación.
Una cantidad de Compuesto 2, preparada como se describió anteriormente, se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento para que tuviera una >99% de área/área en pureza (condiciones de HPLC: Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,1% en agua, B: TFA al 0,1% en agua). (80% de acetonitrilo más 20% de agua); gradiente de 26% a 36% de B en 20 minutos; caudal: 1,0 ml/minuto; columna: Phenomenex C18 (2) 4,6 x 150 mm, 5 m, 100 A; detector: UV a 220 nm; volumen de inyección de muestra: 100,0 ml). El cromatograma de HPLC correspondiente se muestra en la Fig. 4. Además, en base a la adición gradual de los correspondientes aminoácidos para la síntesis de la secuencia peptídica, la Espectrometría de Masas por Electrospray determinó que el peso molecular del Compuesto 2 purificado era 625,3 amu (masa teórica: 625,77amu), que confirma la identidad del Compuesto 2. El espectrograma de masas con Electrospray del Compuesto 2 se muestra en la Fig. 5.

Métodos para inhibir la adhesión celular

[0040] La presente invención también proporciona métodos para inhibir la adhesión celular a los sitios de unión de RGD en un sujeto humano o animal mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de ácido cisteico RG (es decir, forma lineal de RG-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH o una forma cíclica de RG-NH-CH (CH_2-SO_3H)COOH) o un derivado del mismo (incluidas sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, estereoisómeros, multímeros, formas cíclicas, formas lineales, conjugados de medicamentos, profármacos y sus derivados).

[0041] El solicitante ha descubierto que los péptidos de ácido cisteico-RG sintéticos de la presente invención inducen la apoptosis mediante la inhibición competitiva de la unión celular a los componentes de la MEC. Por lo

tanto, los presentes péptidos de ácido cisteico-rg sintético y sus derivados se pueden usar como potentes antagonistas de la integrina como agente terapéutico contra la angiogénesis, inflamación, metástasis del cáncer, trombosis, prevención y tratamiento de la formación de cicatrices, así como agentes farmacológicos de vitreolisis. Además, en un aspecto importante de la presente invención, una orientación mejorada de las integrinas α, β utilizando péptidos de ácido cisteico RG multimerizados y radiomarcados, para uso como agentes radioterapéuticos internos para la detección de tumores (agente de diagnóstico o diagnóstico por imágenes) y el tratamiento del tumor es previsto en otro aspecto importante, los conjugados péptido ácido RG-cisteico mejorados o los conjugados peptídicos R-G-Ácido cisteico multiméricos funcionan como portadores de fármacos, por ejemplo, como portadores de fármacos anticancerosos para una eficaz focalización del tumor.

[0042] Como se describe en otra parte en este documento, los ácidos sulfónicos en los péptidos de ácido cisteico de RG son ácidos más fuertes que los ácidos carboxílicos correspondientes en los péptidos de RDG. Esta mayor polaridad del grupo ácido sulfónico conduce a un enlace intermolecular más fuerte. Por ejemplo, el ácido RG-cisteico, que tiene un enlace OH más polarizado, puede formar enlaces de hidrógeno más fuertes que el ácido RG-aspártico, que tiene un enlace OH relativamente menos polarizado, con los grupos amida y/o cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas en el sitión de unión de integrina y/o tienen interacciones más fuertes con iones metálicos complejados en el sitio de unión de integrina. Por lo tanto, los nuevos péptidos de ácido cisteico RG y sus derivados de la presente invención presentan compuestos y composiciones mejorados sobre los péptidos de RGD correspondientes en el reconocimiento y la unión del receptor de integrina.

[0043] Además, en pacientes diabéticos con hiperglucemia crónica asociada con PIO elevada, se informa que el glaucoma de ángulo abierto está relacionado particularmente con la acumulación de fibronectina en el tejido de la malla trabecular y se cree que el exceso de fibronectina inhibe el flujo de salida acuoso (ver Oshitari , T, et al., Am. J. Ophthalmol. (2007) 143: 363-365). La participación de la fibronectina en la interacción célula-ECM en la malla trabecular se indicó en el glaucoma primario de ángulo abierto (ver Mark S. Filla, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (2002) 43: 151-161; y Cheryl R. Hann, et al., Ophthalmic Res. (2001) 33: 314-324). También se ha informado que las células endoteliales del canal de Schlemm interactúan con la matriz extracelular para influir en las instalaciones de flujo de salida (ver Cindy K. Bahler y otros, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (2004) 45: 2246-2254). En vista de la inhibición de la salida acuosa por la presencia de un exceso de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, la aplicación de péptidos de ácido cisteico RG y sus derivados para tratar la PIO elevada de los pacientes diabéticos sería altamente beneficiosa para los pacientes diabéticos.

[0044] Los péptidos de ácido cisteico RG preferidos pueden ser un polipéptido de fusión, un polipéptido lineal o cíclico, un polipéptido derivado, que incluye un péptido de ácido cisteico RG derivado o asociado con sistemas de administración de fármacos u otros fármacos, tales como, por ejemplo, fármacos anticancerosos, un péptido multimerizado de ácido cistico RG, un anticuerpo monoclonal que contiene una secuencia de ácido cistoico RG que inmunorreacciona con el sitio de unión de integrinas o su fragmento funcional.

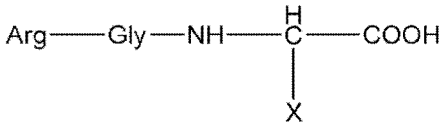
[0045] Los polipéptidos que contienen ácido CG-RG pueden tener una secuencia correspondiente a la secuencia de residuos de aminoácidos de la región de unión al adhesivo de la integrina natural, como las presentes en el fibrinógeno, la fibronectina, la vitronectina, el factor de von Willebrand, la laminina, la trombospondina y ligandos similares.

[0046] La presente secuencia peptídica consiste en tres aminoácidos que tienen grupos guanidino, sulfónicos y carboxílicos terminales y sus derivados acoplados y/o asociados con sistemas de administración de fármacos, que incluyen fragmentos peptídicos, glucoproteínas y grupos polímeros tales como PEG, Pluronic, y otros grupos poliméricos, y, liposomas y nanopartículas. Las composiciones farmacéuticas que los comprenden para el tratamiento de diversos trastornos patológicos incluyen formas de dosificación inyectables, de gel, de suspensión, de pomada, sólidas y líquidas.

[0047] Los receptores de integrina asociados con un motivo de adhesión celular, tales como fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinógeno, trombospondina y factor de von Willebrand, son el epítope diana del péptido ácido RG-cisteico y sus derivados. El tripéptido, ácido cisteico RG, se ha descubierto como una secuencia de aminoácidos mínima reconocible por los dominios de unión celular. Esta secuencia también puede interferir con las funciones inmunes no relacionadas con las integrinas. Por lo tanto, se ha descubierto que la secuencia de ácido cisteico RG sintético es para imitar el dominio de unión a células RGD, y una sustitución en el carbono α del ácido aspártico da una afinidad de unión más fuerte a las integrinas diana. Los ácidos sulfónicos en los péptidos de ácido cisteico RG son ácidos más fuertes que los correspondientes ácidos carboxílicos en los péptidos RDG. Esta mayor polaridad del grupo de ácido sulfónico conduce a una unión intermolecular más fuerte. Por ejemplo, el ácido RG-cisteico, que tiene un enlace OH más polarizado, puede formar enlaces de hidrógeno más fuertes que el ácido RG-aspártico, que tiene un enlace OH relativamente menos polarizado, con los grupos amida y/o cadenas laterales de los aminoácidos en el sitio de unión a integrina y/o tienen interacciones más fuertes con iones metálicos complejados en el sitio de unión de integrina.

[0048] Las fórmulas más generales para las secuencias de ácido cisteico RG de la presente invención son las siguientes:

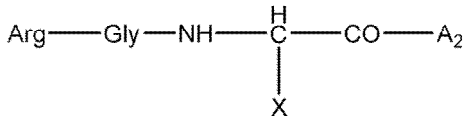
Fórmula A:



Donde X = $-CH(R_1)-S(=O)_2-Y$;
$-CH(R_1)-SH$;
$-CH(R_1)-OZ$;
$-CH(R_1)S(=O)Y$;
$-CH(R_1)-OS(=O)_2-OX_1$; y
$-CH(R_1)-OP(=O)_2-OX_1$; y

En donde Y = OX_1, NH_2; X_1 = -H, alquilo de cadena lineal C_1-C_6, fenilo; R_1 = H, alquilo de cadena lineal C_1-C_6, fenilo o SO_3H Z = H, SO_3H

Fórmula B:



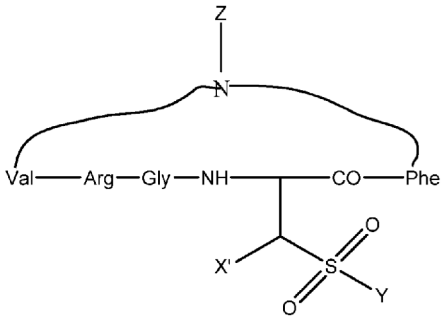
Donde X = $-CH(R_1)-S(=O)_2-Y$;
$-CH(R_1)-SH$;
$-CH(R_1)-OZ$;
$-CH(R_1)S(=O)Y$;
$-CH(R_1)-OS(=O)_2-OX_1$; y
$-CH(R_1)-OP(=O)_2-OX_1$; y

En donde Y = OX_1, NH_2; X_1 = -H, alquilo de cadena lineal C_1-C_6, fenilo; R_1 = H, alquilo de cadena lineal C_1-C_6, fenilo o SO_3H Z = H, SO_3H; y

A_2 se selecciona de: -Phe-Val-Ala, -Phe-Leu-Ala, -Phe-Val-Gly, -Phe-Leu-Gly, -Phe-Pro-Gly, -Phe-Pro-Ala, -Phe-Val, o sal o derivado N-alquilado de los mismos. Se puede usar cualquier combinación de forma D o L de Arg, Gly, Cysteic, Phe, Val, Ala, Leu, Pro, Thr, así como la forma cíclica de la secuencia anterior.

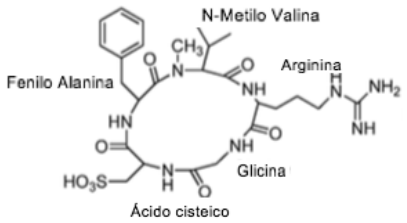
Ejemplos de formas cíclicas incluyen:

[0049]



donde X' se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph, SO_3H; Y = OH, NH_2 y Z = H, CH_3.

[0050] Las formas cíclicas también incluyen péptidos penta y hepta, tales como, por ejemplo, un compuesto específico de Fórmula general C, a saber, el **Compuesto 2** (Ciclo-RG-Ácido cisteico $fN(CH_3)V$), se muestra a continuación:



Compuesto 2

[0051] La Fórmula A abarca las Fórmulas Generales I-VI descritas en otra parte en este documento. La fórmula B abarca la fórmula general VII descrita en otra parte de este documento.

Fórmula D: A_1-Arg-Gly-NH-CH(X)-CO-A_2

Donde X = -CH(R_1)-S(=O)$_2$-Y;
-CH(R_1)-SH;
-CH(R_1)-OZ;
-CH(R_1)S(=O)Y;
-CH(R_1)-OS(=O)$_2$-OX_1; y
-CH(R_1)-OP(=O)$_2$-OX_1; y

En donde Y = OX_1, NH_2; X_1 = -H, alquilo de cadena lineal C_1-C_6, fenilo; R_1 = H, alquilo de cadena lineal C_1-C_6, fenilo o SO_3H Z = H, SO_3H; y

A_1 y A_2 se seleccionan de: -Phe-Val-Ala, -Phe-Leu-Ala, -Phe-Val-Gly, -Phe-Leu-Gly, -Phe-Pro-Gly, -Phe-Pro-Ala, - Phe-Val, o sal o derivado N-alquilado del mismo. Se puede usar cualquier combinación de forma D o L de Arg, Gly, Cysteic, Phe, Val, Ala, Leu, Pro, Thr, así como la forma cíclica de la secuencia anterior.

[0052] Las secuencias de ácido cisteico RG sustituidas incluyen análogos de ácido cisteico RG cíclicos.

[0053] La aplicación del ácido cisteico RG y sus derivados se puede realizar por vía subcutánea, dermatológica, oftálmicamente y sistémicamente, empleando un sistema de administración de fármacos o cualquier forma de dosificación farmacéuticamente aceptable de inyección o formulación sólida o en ungüento

[0054] Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía que sea adecuada para producir el efecto terapéutico deseado, que incluye pero no se limita a: oral, rectal, intravenosa, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intratecal, sublingual, bucal, intranasal, transmucosa, transdérmica, tópica, intraocular, intravítrea, otra enteral, otra parenteral y/u otras posibles vías de administración.

[0055] Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en cualquier dosis que proporcione el efecto terapéutico pretendido, evitando al mismo tiempo efectos adversos o tóxicos. Las dosis típicas en las que los compuestos de la presente invención se pueden administrar a sujetos humanos están en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1,0 g/kg.

[0056] Cuando es posible y apropiado, los compuestos de la presente invención pueden prepararse opcionalmente en forma de liposomas o nanopartículas (por ejemplo, nanocápsulas). La formación y el uso de liposomas es generalmente conocido por los expertos en la técnica. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos dispersos en un medio acuoso, de manera que forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares, a veces denominadas vesículas multilamelares (MLV). Las MLV son típicamente de 25 nm a 4 mm de diámetro. Cuando se someten a sonicación, las MLV forman pequeñas vesículas unilamelares (SUV) de aproximadamente 200 a 500 angstroms en diámetros que tienen núcleos que contienen la solución acuosa. En general, cuando se dispersan en un medio acuoso, los fosfolípidos pueden formar varias estructuras distintas de los liposomas, dependiendo de la relación molar de lípido a agua. A bajas relaciones molar de lípidos a agua, se formarán liposomas. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la tonicidad y la presencia o no de cationes divalentes. Los liposomas pueden interactuar con las células mediante diferentes mecanismos, que incluyen 1) endocitosis (p. ej., fagocitosis del liposoma por células como macrófagos y neutrófilos), adsorción a la superficie celular, 2) interacción con componentes de la superficie celular, 3) fusión con el plasma membrana celular mediante la inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática o 4) transferencia de lípidos liposómicos a membranas celulares o subcelulares, o viceversa. La variación de la formulación del liposoma puede alterar el mecanismo por el cual los liposomas interactuarán con las células en el seno paranasal, la mucosa nasal, etc.

[0057] Una nanocápsula es cualquier nanopartícula que consiste en una cubierta y un espacio, en el que se pueden

colocar las sustancias deseadas. Las técnicas para formar nanocápsulas son conocidas en la técnica. Las nanocápsulas poliméricas pueden fabricarse en tamaños y formas específicas. Pueden producirse como partículas monodispersas que tienen propiedades físicas y químicas definidas con precisión y, por lo tanto, pueden adaptarse para facilitar la liberación de la sustancia terapéutica o de diagnóstico en respuesta a determinados mecanismos de activación bimoleculares, como el pH, el flujo mucoso u otras condiciones presentes en el interior. El seno paranasal u otra área en el oído, nariz o garganta donde se implanta el dispositivo. Las nanocápsulas se pueden usar en la presente invención como "fármacos inteligentes" que tienen receptores químicos específicos o sitios de unión que se unirán a células diana específicas (por ejemplo, células cancerosas o células asociadas con afecciones inflamatorias).

[0058] Los siguientes son ejemplos no limitativos de formulaciones para preparaciones farmacéuticas que contienen compuestos de la presente invención. También se incluyen ejemplos de la seguridad y/o eficacia demostrada utilizando péptidos de ácido cisteico RG ejemplares o derivados para inhibir la adhesión celular. Tal como se usa en el presente documento, los términos "péptido de ácido cisteico RG", "péptido RGC", "péptido RGCys" y "compuestos de la presente invención" significarán de manera sinónima composiciones que contienen la secuencia de ácido cisteico RG y sus derivados, incluidos pero no limitados a los definidos por las fórmulas generales I-VII y los compuestos 1 y 3-5, como se describe en este documento.

Ejemplo 1

<u>Formulaciones farmacéuticas</u>

[0059] Los siguientes son ejemplos de formulaciones farmacéuticas **I-X**, que contienen péptidos de ácido cisteico RG de la presente invención, tales como cualquiera de los definidos por las Fórmulas Generales I-VII o cualquiera de los **Compuestos 1-5** como se describe en el presente documento.

Formulación I

Péptido del ácido cisteico R-G (péptido RGCys)	0,0001 mg a 10 g
NaCl	0,01 mg a 0,9 g
Agua	QS a 100,0 ml

Formulación II

Péptido de ácido cisteico R-G (péptido RGCys)	0,0001 mg a 10 g
EDTA	0,001 mg a 100 mg
NaCl	0,01 mg a 0,9 g
Agua	QS a 100,0 ml

Formulación III

RG-ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
EDTA	0,001 mg a 100 mg
NaCl	0,01 mg a 0,9 g
Ácido cítrico	0,0001 mg a 500 mg
Agua	QS a 100.0mL

Formulación IV

R-G-ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
NaCl	0,01 mg a 0,9 g
Tampón de fosfato a	pH = 3,0 - 9,0
Agua	QS a 100,0 ml

Formulación V

R-G-ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
EDTA	0,001 mg a 100 mg
NaCl	0,01 mg a 0,9 g
Tampón de fosfato a	pH = 3,0 - 9,0
Agua	QS a 100,0 ml

Formulación VI

R-G-ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
NaCl	0,01 mg a 0,9 g
Tampón de borate a	pH = 3,0 - 9,0

Agua	QS a 100,0mL

Formulación VII

R-G-ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
Ácido Hialurónico Sal Sódica	0,01 a 10%
Ácido Bórico	0,01 a 1,0%
Polietilenglicol (PEG 8000)	0,01 a 10%
Cloruro de sodio	0,10 a 0,9%
Cloruro de potasio	0,01 a 0,20%
Cloruro de calcio dihidrato	0,001 a 0,05%
Cloruro de magnesio Hexahidrato Preservativo	0,01 a 0,20%
pH	4,0 - 8,0
Agua	QS a 100,0mL

Formulación VIII

R-G-ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
Ácido Hialurónico Sal Sódica	0,01 a 10%
Celulosa de carboximetilo	0,01 a 10%
Ácido Bórico	0,01 a 1,0%
Polietilenglicol (PEG 8000)	0,01 a 10%
Cloruro de sodio	0,10 a 0,9%
Cloruro de potasio	0,01 a 0,20%
Cloruro de calcio dihidrato	0,001 a 0,05%
Cloruro de magnesio Hexahidrato Preservativo	0,01 a 0,20%
pH	4,0 - 8,0
Agua	QS a 100,0mL

Formulación IX

RG-Ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
Ácido hialurónico Sal sódica	0,01 a 10%
Alginato de sodio	0,01 a 10%
Ácido bórico	0,01 a 1,0%
Polietilenglicol (PEG 8000)	0,01 a 10%
Cloruro de sodio	0,10 a 0,9%
Cloruro de potasio	0,01 a 0,20%
Cloruro de calcio dihidrato	0,001 a 0,05%
Cloruro de magnesio Hexahidrato Preservativo	0,01 a 0,20%
pH	3,0 - 8,0
Agua	QS a 100,0mL

Formulación X

R-G-Ácido cisteico-péptido	0,0001 mg a 10 g
Ácido hialurónico Sal sódica	0,01 a 10%
Ácido algínico	0,01 a 10%
Ácido bórico	0,01 a 1,0%
Polietilenglicol (PEG 8000)	0,01 a 10%
Cloruro de sodio	0,10 a 0,9%
Cloruro de potasio	0,01 a 0,20%
Cloruro de calcio dihidrato	0,001 a 0,05%
Cloruro de magnesio Hexahidrato Preservativo	0,01 a 0,20%
pH	3,0 - 8,0
Agua	QS a 100,0mL

Ejemplo 2:

Comparación de los efectos inductores de PVD de los péptidos RGD y glicil-arginil-glicil-cisteína-treonil-prolina-COOH (GRG ácido cisteico TP; Compuesto 1) en conejos

[0060] En este ejemplo, *los efectos inductores de PVD de los péptidos RGD y el glicil-arginil-glicil-cisteico-treonil-prolina-COOH (RG-ácido cisteico péptido; GRG Ácido cisteico TP;* ***Compound 1****) se compararon en conejos. El protocolo para este estudio fue el siguiente:*

Protocolo:

Modelo animal

[0061]

a) 20 conejos machos y hembras

b) Con un peso aproximado de 1,5 - 2,5kg.

c) Divide en 2 grupos.

i) Se inyectaron 10 conejos por vía intravítrea con solución de RGD al 2,5% a pH = 6,5

a) 10 ojo derecho inyectado con solución de RGD al 2,5%

b) 5 ojo izquierdo usado como control BSS

c) 5 Ojos izquierdos inyectados con 2.5% RGD + 0,02% EDTA a pH = 6,5

ii) Se inyectaron 10 conejos por vía intravítrea con una solución de ácido cisteico RG al 2,5% a pH = 6,5

a) 10 Ojo derecho inyectado con una solución de ácido cisteico R-G al 2,5% a pH = 6,5
b) 10 Ojo izquierdo inyectado con una solución de ácido cisteico R-G al 2.5% + EDTA al 0,02% a pH = 6,5

Sustancias químicas activas

[0062]

d) EDTA de sodio - 99,0 - 100,5% de Spectrum Chemical Corp.
e) R-G-Ácido cisteico - proveedor de cGMP (Pureza> 98%).
f) Proveedor RGD - cGMP (Pureza> 98%).
g) Solución BSS

[0063] Tanto el ácido cisteico RG, como el RGD, el ácido cisteico RG + EDTA sódico, el EDTA sódico RGD +, y las soluciones de BSS se inyectaron en la cavidad vítrea 24 horas antes de la cirugía. Los conejos (10 mg/kg de peso corporal) se anestesiaron con una inyección intramuscular de 2,0 ml de una combinación 1:1 de xilazina (100 mg/ml) y clorhidrato de ketamina (100 mg/ml). Las pupilas se dilatan con clorhidrato de ciclopentolato tópico al 1% y clorhidrato de fenilefrina al 10%.

[0064] Todos los animales se examinaron inicialmente con biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para excluir cualquier animal con anormalidades vitreorretinianas preexistentes. La inyección intravítrea de 0,10 cc se administró 2 mm por detrás del limbo en el cuadrante supranasal utilizando una aguja de calibre 30 unida a una jeringa de 1,0 cc. Se debe tener cuidado para evitar dañar la lente o la retina.

[0065] Veinticuatro horas después de la inyección e inmediatamente antes del inicio de una vitrectomía mecánica, se realizó una ecografía con B-scan para determinar el estado del vítreo posterior y también la licuefacción del vítreo. Se realizó una vitrectomía Pars plana de dos puertos utilizando una fibra óptica de infusión y un cortador vítreo unido a una unidad de vitrectomía. Después de una vitrectomía central de 30 segundos, el cortador vítreo se dirigió a la superficie retiniana peripapilar, donde, mediante una aspiración baja (<30 mmHg), se intentó una separación de la vítrea cortical posterior de la superficie retiniana en 4 cuadrantes. Las esclerotomías se suturaron y se realizó una ecografía B-Scan postoperatoria para determinar la presencia y extensión de cualquier PVD presente en cada cuadrante. Los animales se sometieron a eutanasia con inyecciones de pentobarbital sódico intracardíaco y los ojos se enuclearon inmediatamente.

[0066] La clasificación de la licuefacción del vítreo y la PVD se clasificó siguiendo este sistema de clasificación para evaluar la extensión de la PVD en función del examen de ultrasonido posoperatorio B-Scan;

Grado 0, a) No se observa desprendimiento del vítreo posterior.
b) Licuefacción vítrea

Grado 1. a) Consiste en ojos en los que el vítreo se desprende en 2 o menos cuadrantes.
b) Licuefacción vítrea
Grado 2. a) Consiste en ojos en los que el vítreo se desprende en 3 o más cuadrantes, pero con los focos restantes a lo largo de los rayos medulares
b) Licuefacción vítrea
Grado 3. a) Consta de ojos en los que el vítreo está totalmente separado de la superficie de la retina.
b) Licuefacción vítrea

[0067] Todos los ojos sufrieron una penetración aguda en el polo superior sub-adyacente a la pars plana inmediatamente después de la enucleación para asegurar la rápida penetración del fijador. Se tuvo cuidado de evitar dañar la retina y el cristalino adyacentes. Los ojos se sumergieron en paraformaldehído al 2% más glutaraldehído al 2,5% durante un mínimo de 24 horas a 4 grados centígrados. Se retiró una calota posterior única, se deshidrató en metanol y se secó en dióxido de carbono hasta el punto crítico, se recubrió por pulverización catódica en oro y se fotografió con el microscopio electrónico de barrido.

Resultados:

Inyección: 2,5% de ácido cisteico R-G

[0068]

Grupo 1. En la línea de base, todos los animales no tienen PVD en ambos ojos.

Ojo examinado	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
OD tratado	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 2 - 3 Q Vítreo desprendido en 3 o más Q	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q
OS control	Grado 0	Grado 0	Grado 0	Grado 0	Grado 0

Inyección: 2,5% de RGD.

[0069]

Grupo 2. En la línea de base, todos los animales no tienen PVD en ambos ojos.

Ojo Examinado	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
OD tratado	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 2 - 3 Q Vítreo desprendido en 3 o más Q	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido
OS Control	Grado 0	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q	Grado 0

Inyección: 2,5% R-G-ácido cisteico + 0,02% de NaEDTA

[0070]

Grupo 3. En la línea de base, todos los animales no tienen PVD en ambos ojos.

Ojo Examinado	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
OD Tratado	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	---------- ---	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q
OS Control	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q	Grado 0	---------- -	Grado 2 - 3 Q Vítreo desprendido en 3 o más Q	Grado 0

Inyección: 2,5% RGD + 0,02% NaEDTA

[0071]

Grupo 4. En la línea de base, todos los animales no tienen PVD en ambos ojos.

Ojo Examinado	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
OD Tratado	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 0	Grado 3 - 4 Q Vítreo totalmente desprendido	Grado 0	Grado 1 - 2 Q Vítreo desprendido en 2 o menos Q
OS Control	Grado 2 - 3 Q Vítreo desprendido en 3 o más Q	Grado 2 - 3 Q Vítreo desprendido en 3 o más Q	Grado 0	Grado 0	Grado 0

[0072] Los resultados del estudio cinético en el Ejemplo 4 de este estudio muestran que el RGD y el R-G-Ácido cisteico (GRG Ácido cisteico TP; **Compuesto 1**) tienen propiedades e inyección similares al 2,5% de R-G-Ácido cisteico causan la separación completa de la vítreo de la retina en 24 horas, y además el vítreo de los conejos RGD y R-G-Ácido cisteico están completamente licuados.

[0073] En general, la actividad del ácido cisteico RG es igual o ligeramente mejor que la de la RGD en la inducción de PVD completa en los conejos y la licuación del vítreo. Esto posiblemente se deba a su capacidad de unión competitiva más fuerte a los sitios de unión de las interacciones de integrina-matriz extracelular que la RGD. Como se describe en otra parte del presente documento, los ácidos sulfónicos son ácidos más fuertes que los correspondientes ácidos carboxílicos. Esta mayor polaridad del grupo de ácido sulfónico conduce a una unión intermolecular más fuerte. Por ejemplo, el ácido RG-cisteico, que tiene un enlace OH más polarizado, puede formar enlaces de hidrógeno más fuertes que el ácido RG-aspártico, que tiene un enlace OH relativamente menos polarizado, con los grupos amida y/o cadenas laterales de los aminoácidos en el sitio de unión a integrina y/o tienen interacciones más fuertes con iones metálicos complejados en el sitio de unión de integrina.

[0074] Los resultados también indican que cuando estos compuestos se administran con un 0,02% de edetato de sodio, la actividad tanto de RGD como de R-G-Ácido cisteico no se altera.

[0075] Los resultados también muestran que no hubo efectos adversos o efectos de seguridad adversos de la inyección intravítrea del compuesto de ácido cisteico RG compuesto 1 o el compuesto de RGD.

Ejemplo 3:

Estudio de seguridad de inyecciones múltiples del compuesto peptídico RGC 1 (GRG Ácido cisteico TP) en ojos de conejo

[0076] En este ejemplo, se administraron múltiples inyecciones de compuesto de péptido 1 de RGC en los ojos de 5 conejos de Nueva Zelanda de 5 machos y 4 hembras que pesaban aproximadamente 1,5 a 2,5 kg y los ojos fueron examinados como se describe en los párrafos siguientes.

[0077] El protocolo del estudio fue el siguiente:

A) **Exámenes de referencia**: En la línea de base se examinaron los ojos derecho e izquierdo de los 9 conejos. Se examinaron la biomicroscopia con lámpara de hendidura y la oftalmoscopia indirecta para confirmar que ningún animal presentaba anomalías vitreorretinianas preexistentes. Además, la ecografía de barrido β, así como las exploraciones ERG, se realizaron en los ojos izquierdo y derecho de los 9 animales para obtener lecturas de referencia.
B) **Tratamientos experimentales**: Los 9 conejos recibieron inyecciones intravítreas de solución de RGC o solución salina (control). Las soluciones de tratamiento se prepararon como sigue:

Solución de RGC: una solución de 2,5 mg/100 ml de Compuesto 1 de RGC que contiene 0,02 mg de EDTA disódico + 0,80 mg de cloruro de sodio y agua estéril USP para inyección con un pH ajustado a 6,5.
Solución salina (control): una solución salina estéril isotónica de USP que tiene un pH ajustado de 6,5.

[0078] La dosificación procedió de la siguiente manera:

1) El ojo derecho de cada uno de los 9 conejos se inyectó por vía intravítrea con 100 de la solución de RGC de 2,5 mg/100 µl (que administró una dosis = 2,5 mg de Compuesto 1)

2) El ojo izquierdo de cada uno de los 9 conejos se inyectó por vía intravítrea con 1001 µl de solución salina (control).
3) Un día después de las inyecciones intravítreas iniciales, se examinaron los ojos derecho e izquierdo de los 9 conejos, mediante biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para verificar si alguno de los conejos tiene algún efecto adverso de la inyección.
4) En el séptimo día después de las primeras inyecciones, se examinaron nuevamente los ojos derecho e izquierdo de los 9 conejos mediante biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para determinar si alguno de los conejos presentaba efectos adversos de la inyección. Además, se realizó una exploración ERG en todos los ojos derecho e izquierdo de todos los animales para determinar si hubo cambios con respecto a la línea de base.
5) Se seleccionó al azar un grupo de 3 conejos, números 901, 904 y 909, y se realizó una vitrectomía mecánica en los ojos derecho e izquierdo de esos 3 animales seleccionados para determinar el estado del vítreo posterior.
6) Los 3 animales seleccionados al azar, números 901, 904 y 909, se sometieron a eutanasia con inyecciones intracardíacas de pento-barbital de sodio, y los ojos se enuclearon inmediatamente. Todos los ojos sufrieron una penetración aguda en el polo superior por debajo de la pars plana inmediatamente después de la enucleación para asegurar la rápida penetración del fijador. Se tuvo cuidado de evitar dañar la retina y el cristalino adyacentes. Los ojos se sumergieron en paraformaldehído al 2% más gluteraldehído al 2,5% durante un mínimo de 24 horas a 4 grados centígrados. Se retiró una calota posterior única, se deshidrató en metanol y se secó en dióxido de carbono hasta el punto crítico, se recubrió por pulverización catódica en oro y se fotografió con el microscopio electrónico de barrido. Las otras muestras fueron sometidas a examen histopatológico.

[0079] Los 6 conejos restantes, números 902, 903, 905, 906, 907 y 908 se inyectaron una segunda vez 7 días después de la primera inyección.

1) El ojo derecho de cada uno de los 6 conejos restantes se inyectó nuevamente por vía intravítrea con 100 de la solución de 2,5 mg/100 µl de RGC (que administró una segunda dosis de 2,5 mg de compuesto 1)
2) El ojo izquierdo de cada uno de los 6 conejos restantes se inyectó nuevamente por vía intravítrea con 1001 µl de solución salina (control).
3) Un día después de la segunda inyección intravítrea, se examinaron los ojos derecho e izquierdo de los 6 conejos restantes mediante biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para verificar si alguno de los conejos tiene algún efecto adverso por la inyección.
4) En el séptimo día después de la segunda inyección, se examinaron los ojos derecho e izquierdo de los 6 conejos escariados, mediante biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para detectar cualquier efecto adverso de las inyecciones. Además, se realizaron exploraciones ERG de los ojos izquierdo y derecho de todos los animales para determinar si hubo algún cambio desde la línea de base.
5) Se seleccionaron aleatoriamente tres conejos, números 902, 903 y 907, de los 6 animales restantes y se realizó una vitrectomía mecánica en los ojos derecho e izquierdo de esos 3 animales seleccionados al azar para determinar el estado del vítreo posterior.
6) Los 3 animales seleccionados al azar, números 902, 903 y 907 se sometieron a eutanasia con inyecciones de pentobarbital sódico intracardíaco, y los ojos se enuclearon inmediatamente. Todos los ojos sufrieron una penetración aguda en el polo superior por debajo de la pars plana inmediatamente después de la enucleación para asegurar la rápida penetración del fijador. Se tuvo cuidado de evitar dañar la retina y el cristalino adyacentes. Los ojos se sumergieron en paraformaldehído al 2% más gluteraldehído al 2,5% durante un mínimo de 24 horas a 4 grados centígrados. Se retiró una calota posterior única, se deshidrató en metanol y se secó en dióxido de carbono hasta el punto crítico, se recubrió por pulverización catódica en oro y se fotografió con el microscopio electrónico de barrido. Las otras muestras fueron sometidas a examen histopatológico.

[0080] El grupo restante de 3 conejos, números 905, 906 y 908, se inyectaron por tercera vez, 14 días después de la primera inyección, como sigue:

1) El ojo derecho de cada uno de los 3 conejos restantes se inyectó nuevamente por vía intravítrea con 100 de la solución de RGC de 2,5 mg/100 µl (que administra una tercera dosis de 2,5 mg de Compuesto 1)
2) El ojo izquierdo de cada uno de los 3 conejos restantes se inyectó nuevamente por vía intravítrea con 100 µl de solución salina (control).
3) Un día después de la tercera inyección intravítrea, se examinaron los ojos derecho e izquierdo de los 6 conejos restantes, mediante lámpara de hendidura, biomicroscopia y oftalmoscopia indirecta para verificar si alguno de los conejos tiene algún efecto adverso por la inyección.
4) En el séptimo día después de la tercera inyección, se examinaron nuevamente los ojos derecho e izquierdo de los 3 conejos restantes mediante biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para detectar cualquier efecto adverso de las inyecciones. Además, se realizaron exploraciones ERG de los ojos izquierdo y derecho de todos los animales para determinar si hubo algún cambio desde la línea de base.
5) La vitrectomía mecánica se realizó en los ojos derecho e izquierdo de los 3 animales restantes (números 905, 906 y 908) para determinar el estado del vítreo posterior.
6) Los 3 animales restantes (números 905, 906 y 908) se sacrificaron con inyecciones de pentobarbital sódico intracardíaco, y los ojos se enuclearon inmediatamente. Todos los ojos sufrieron una penetración aguda en el polo superior por debajo de la pars plana inmediatamente después de la enucleación para asegurar la rápida

penetración del fijador. Se tuvo cuidado de evitar dañar la retina y el cristalino adyacentes. Los ojos se sumergieron en paraformaldehído al 2% más gluteraldehído al 2,5% durante un mínimo de 24 horas a 4 grados centígrados. Se retiró una calota posterior única, se deshidrató en metanol y se secó en dióxido de carbono hasta el punto crítico, se recubrió por pulverización catódica en oro y se fotografió con el microscopio electrónico de barrido. Las otras muestras fueron sometidas a examen histopatológico.

3) Productos químicos activos

[0081] Los productos químicos activos utilizados en este estudio fueron los siguientes:

a. EDTA disódico - 99,0 - 100,5% de Spectrum Chemical Corp.
b. Péptido RGC (Compuesto 1)
c. Solución salina isotónica estéril USP

4) Formulaciones de estudio

[0082]

a) **Solución de RGC**: solución de 2,5 mg/100 µl de RGC que contiene 0,02 mg de EDTA disódico + 0,80 mg de cloruro de sodio y agua estéril de la USP para inyección ajustada a un pH = 6,5. Filtro estéril a través de un filtro de 0,22µ en un vial de 2,0 ml.
b) **Solución salina (control)**: solución salina isotónica estéril USP pH ajustado 6,5. Filtrado estéril a través de un filtro de 0,22µ en un vial estéril.

5) Anestesia para preparación de inyección

[0083]

a. Inyección intramuscular de 2,0 ml de una combinación 1:1 de xilazina (100 mg/ml) y clorhidrato de ketamina (100 mg/ml)
b. Las pupilas se dilataron con clorhidrato de ciclopentolato tópico al 1% y clorhidrato de fenilefrina al 10%.

6) Preparación de la inyección intravítrea:

[0084] Se proporcionó un vial estéril que contenía la solución de RGC que contenía 2,5 mg/100 µl y una solución salina isotónica estéril, con un pH ajustado de 6,5.

[0085] Antes de la inyección, el investigador confirmó que había 0,10 cc (100 microlitros) de solución en la jeringa de 1,0 cc.

7) Procedimiento de inyección:

[0086] Dado que las inyecciones intravítreas no dan lugar a un nivel de discapacidad visual suficiente para interrumpir la actividad diaria normal de los conejos, esto no se considera un procedimiento de supervivencia importante de acuerdo con la resolución sobre animales de las directrices de Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología.

[0087] Tanto la solución de RGC como las soluciones salinas estériles se inyectaron en la cavidad vítrea después del examen basal de la lámpara de hendidura, la biomicroscopia, la oftalmoscopia y el ERG se completaron en los conejos. Los conejos (10 mg/kg de peso corporal) se anestesiaron con una inyección intramuscular de 2,0 ml de una combinación 1:1 de xilazina (100 mg/ml) y clorhidrato de ketamina (100 mg/ml). Las pupilas se dilataron con clorhidrato de ciclopentolato tópico al 1% y clorhidrato de fenilefrina al 10%.

[0088] Todos los animales se examinaron inicialmente con biomicroscopia con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta para excluir cualquier animal con anormalidades vitreorretinianas preexistentes. La inyección intravítrea de 0,10 cc se administró 2 mm por detrás del limbo en el cuadrante supronasal utilizando una aguja de calibre 30 unida a una jeringa de 1,0 cc. Se tuvo cuidado de evitar dañar la lente o la retina.

[0089] Siete (7) días después de la inyección, se realizó una vitrectomía mecánica en los animales. Se realizó una vitrectomía Pars plana de dos puertos utilizando una fibra óptica de infusión y un cortador vítreo unido a una unidad de vitrectomía. Después de una vitrectomía central de 30 segundos, el cortador vítreo se dirigió a la superficie retiniana peripapilar, donde, mediante una aspiración baja (<30 mmHg), se intentó una separación de la vítrea cortical posterior de la superficie retiniana en 4 cuadrantes. Los animales se sometieron a eutanasia con inyecciones de pentobarbital sódico intracardíaco y los ojos se enuclearon inmediatamente.

[0090] Todos los ojos se sometieron a una penetración aguda en el polo superior sub-adyacente a la pars plana

inmediatamente después de la enucleación para asegurar la rápida penetración del fijador. Se tuvo cuidado de evitar dañar la retina y el cristalino adyacentes. Los ojos se sumergieron en paraformaldehído al 2% más gluteraldehído al 2,5% durante un mínimo de 24 horas a 4 grados centígrados. Se retiró una calota posterior única, se deshidrató en metanol y se secó en dióxido de carbono hasta el punto crítico, se recubrió por pulverización catódica en oro y se fotografió con el microscopio electrónico de barrido.

Análisis de resultados

[0091] Los datos sobre la seguridad entre los ojos tratados con solución de RGC y solución salina estéril se analizaron para seguridad utilizando las siguientes técnicas:

i) Biomicroscopia con lámpara de hendidura;
ii) Oftalmoscopia;
iii) ERG;
iv) Histopatología; y
v) Microscopía electrónica.

Perfil de seguridad:

[0092] La primera administración intravítrea de 100 µl de solución de RGC al 2,5% al grupo de nueve conejos números 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, no se asoció con ninguna toxicidad significativa en todos los puntos temporales. No hubo diferencias significativas en los efectos adversos informados entre el grupo RGC al 2,5% y el grupo de solución salina isotónica. Esta falta de toxicidad se determinó mediante examen clínico, oftalmoscopia indirecta y ecografía β y vitrectomía mecánica.

[0093] La biomicroscopía con lámpara de hendidura se realizó en todas las visitas del estudio y se centró en los párpados, la conjuntiva y la esclerótica, la córnea, los cambios endoteliales, la reacción de la cámara anterior, el iris, el cristalino y la cápsula, así como el vítreo anterior para detectar signos para la inflamación demuestran una falta casi completa de reacción inflamatoria a las inyecciones intravítreas de 100 µl de solución de RGC al 2,5% y el grupo de solución salina isotónica. En todos los puntos de estudio y en todos los grupos de estudio no parece haber signos de toxicidad significativa inducida por los artículos de prueba.

[0094] También se realizó un seguimiento de la evaluación clínica del segmento posterior a lo largo del estudio para asegurarse de que no había una toxicidad retiniana significativa presente. En cada punto de tiempo de evaluación se llevaron a cabo evaluaciones oftalmoscópicas indirectas y fondo de lámpara de hendidura con atención específica a cualquier signo de toxicidad retiniana. El segmento posterior se evaluó para detectar cambios en la densidad vítrea, licuefacción vítrea, unión vítrea y posible hemorragia. La retina se evaluó en busca de signos de toxicidad por RPE, compromiso retiniano vascular, hemorragia retiniana, exudados, desgarros retinianos, roturas o desprendimientos. No hubo cambios en el RPE al inicio del tratamiento, en todos los puntos del estudio y en todos los grupos de estudio no pareció haber signos de cambios significativos en el segmento posterior inducidos por los artículos de prueba. Es importante tener en cuenta que las exploraciones de ERG realizadas en los nueve animales antes de las inyecciones intravítreas, así como las exploraciones de ERG realizadas en todos los animales 1 día y 7 días después de la inyección no parecieron causar ningún signo de cambio significativo o toxicidad inducida por los artículos de prueba.

[0095] La segunda administración intravítrea de 100 µl de solución de RGC al 2,5% al grupo de seis conejos números 902, 903, 905, 906, 907, 908, no se asoció con ninguna toxicidad significativa en todos los puntos de tiempo. No hubo diferencias significativas en los efectos adversos informados entre el grupo RGC al 2,5% y el grupo de solución salina isotónica. Esta falta de toxicidad se determinó mediante examen clínico, oftalmoscopia indirecta y ecografía β y vitrectomía mecánica.

[0096] La biomicroscopía con lámpara de hendidura se realizó en todas las visitas del estudio y se centró en los párpados, la conjuntiva y la esclerótica, la córnea, los cambios endoteliales, la reacción de la cámara anterior, el iris, la lente y la cápsula, así como el vítreo anterior para detectar signos de inflamación falta completa de reacción inflamatoria a las inyecciones intravítreas de 100 µl de solución de RGC al 2,5% y el grupo de solución salina isotónica. En todos los puntos de estudio y en todos los grupos de estudio no parece haber signos de toxicidad significativa inducida por los artículos de prueba.

[0097] También se realizó un seguimiento de la evaluación clínica del segmento posterior a lo largo del estudio para asegurarse de que no había una toxicidad retiniana significativa presente. En cada punto de tiempo de evaluación se llevaron a cabo evaluaciones oftalmoscópicas indirectas y fondo de lámpara de hendidura con atención específica a cualquier signo de toxicidad retiniana. El segmento posterior se evaluó para detectar cambios en la densidad vítrea, licuefacción vítrea, unión vítrea y posible hemorragia. La retina se evaluó en busca de signos de toxicidad por RPE, compromiso retiniano vascular, hemorragia retiniana, exudados, desgarros retinianos, roturas o desprendimientos. No hubo cambios de RPE al inicio del estudio 7 días antes del segundo tratamiento, en todos los puntos del estudio y en todos los grupos de estudio no parece haber signos de cambios significativos en el segmento posterior

inducidos por los artículos de prueba. Es importante tener en cuenta que las exploraciones ERG realizadas en los seis animales por segunda vez después de las inyecciones intravítreas, así como las exploraciones ERG realizadas en todos los animales 8 días y 14 días después de la inyección no parecieron causar signos de cambio significativo. Toxicidad inducida por los artículos de prueba.

[0098] La tercera administración intravítrea de 100 µl de una solución de RGC al 2,5% al grupo de seis conejos números 905, 906, 908, no se asoció con ninguna toxicidad significativa en todos los puntos de tiempo. No hubo diferencias significativas en los efectos adversos informados entre el grupo RGC al 2,5% y el grupo de solución salina isotónica. Esta falta de toxicidad se determinó mediante examen clínico, oftalmoscopia indirecta y ecografía β y vitrectomía mecánica.

[0099] La biomicroscopía con lámpara de hendidura se realizó en todas las visitas del estudio y se centró en los párpados, la conjuntiva y la esclerótica, la córnea, los cambios endoteliales, la reacción de la cámara anterior, el iris, la lente y la cápsula, así como el vítreo anterior para detectar signos de inflamación falta completa de reacción inflamatoria a las inyecciones intravítreas de 100 µl de solución de RGC al 2,5% y el grupo de solución salina isotónica. En todos los puntos de estudio y en todos los grupos de estudio no parece haber signos de toxicidad significativa inducida por los artículos de prueba.

[0100] La evaluación clínica del segmento posterior también se siguió a lo largo del estudio para garantizar que no hubiera una toxicidad retiniana significativa presente. En cada punto de tiempo de evaluación se llevaron a cabo evaluaciones oftalmoscópica indirecta y fondo de lámpara de hendidura con atención específica a cualquier signo de toxicidad retiniana. El segmento posterior se evaluó para detectar cambios en la densidad vítrea, licuefacción vítrea, unión vítrea y posible hemorragia. La retina se evaluó en busca de signos de toxicidad por RPE, compromiso retiniano vascular, hemorragia retiniana, exudados, desgarros retinianos, roturas o desprendimientos. No hubo cambios de RPE al inicio del estudio 14 días antes del tercer tratamiento, en todos los puntos del estudio y en todos los grupos de estudio no parece haber signos de cambios significativos en el segmento posterior inducidos por los artículos de prueba. Es importante tener en cuenta que las exploraciones ERG realizadas en los tres animales por tercera vez después de las inyecciones intravítreas, así como las exploraciones ERG realizadas en todos los animales 15 días y 21 días después de la inyección no parecieron causar signos de cambio significativo. Toxicidad inducida por los artículos de prueba.

Ejemplo 4

<u>Propiedades antiadhesivas de los péptidos RGC: estudio cinético de la cicatrización de heridas con el compuesto 1 (GRG ácido cisteico TP), RGD cíclico y RGE</u>

[0101] En este ejemplo, en un modelo de curación de heridas, se ha demostrado que los péptidos RGC tienen propiedades antiadhesivas y, por lo tanto, pueden prevenir el desarrollo de muchas enfermedades patológicas vitreorretinianas y pueden inhibir las metástasis en células de melanoma humano y cáncer de colon.

[0102] Para probar las propiedades antiadhesivas de los péptidos RGC in vitro, se realizó un ensayo de cicatrización de heridas con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se sembraron HUVEC y se dejó crecer hasta una monocapa confluente sobre una superficie recubierta con fibronectina. Se creó una herida (una grieta de rasguño) arrastrando una pequeña punta de pipeta a través de la monocapa HUVEC. Luego, las células se incubaron en un medio de crecimiento fresco que contenía el péptido RGC (**Compuesto 1**; 10 mM), y se tomó una imagen del área de la herida en cinco campos diferentes en varios puntos temporales (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 horas) para determinar la cinética del cierre de la herida. El nivel de cierre de la herida se cuantificó determinando la fracción del área de la herida original que fue ocupada por HUVEC a través de la adhesión celular, la migración y la proliferación.

[0103] En los estudios de control, se utilizaron los siguientes péptidos en lugar de RGC (**Compuesto 1**): péptido RGD cíclico (1 mM), control positivo) y péptido RGE (1 mM, control negativo).

[0104] El efecto de los péptidos sobre la cinética de la cicatrización de heridas se presenta en la Figura 1.

[0105] Los resultados se muestran como un porcentaje del área original. Las barras de error corresponden a la desviación estándar en el tamaño de la herida en 2 - 6 ensayos independientes.

[0106] Los resultados de la cinética del cierre de la herida HUVEC muestran que el péptido RGC inhibe la cicatrización de la herida HUVEC en un 70% después de 24 horas, mientras que el RGD cíclico (péptido basado en RGD; RGDf-N(Me)V cíclico metilado en N) inhibe la cicatrización de heridas HUVEC en un 45% después de 24 horas. Ambos se compararon con un péptido RGE de control negativo que inhibió la cicatrización de heridas HUVEC en un 0% después de 24 horas. El efecto de RGC (**Compuesto 1**) es cuantitativamente comparable a la actividad del péptido basado en RGD, un inhibidor bien establecido de la actividad de unión a la integrina. Además, el péptido RGC exhibe propiedades similares a las actividades del péptido basado en RGD sin la apoptosis de las células HUVEC.

[0107] Como se describe en otra parte en este documento, la fuerte adhesión entre el vítreo y la retina podría explicar el desarrollo eventual de muchas enfermedades patológicas vitreorretinianas como la tracción vitreomacular, la retinopatía diabética proliferativa, el agujero macular, la degeneración macular relacionada con la edad y los flotadores. Por lo tanto, un enfoque no invasivo atraumático para lograr un desprendimiento de vítreo posterior, diferente de la separación mecánica del vítreo de la superficie retiniana interna, es altamente deseable (ver Tezel, TH et al, Retina (1998) 18: 7-15); y Verstraeten, TC, et al., Arch. Ophthalmol. (1993) 111: 849 - 854).

[0108] Como se describe en otra parte en este documento, se cree que los componentes de la MEC, particularmente las fibrillas de colágeno del vítreo cortical, se anclan a la superficie interna de la retina a través de los sitios de unión a la integrina (ver Foos, RY, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1972) 11: 801 -808) en la lámina limitante interior (ILL). También se sabe que las principales glucoproteínas adhesivas de la ILL en el ojo, como la fibronectina y la laminina, están fuertemente vinculadas a las integrinas (ver Curtis, TMet al., Am. J. Physiol., (1995) 269: L248-L260 ; Elner, SG, et al., IOVS (1996) 37: 696-701; y Horman,, SM, et al., Am. J. Physiol. (1995) 269: L248-L260) a través de las secuencias RGD (Arg-Gly-Asp) y varias integrinas se unen a través del motivo RGD presente en las proteínas ECM. Además, se sabe que la fibronectina se une a varias otras integrinas además de $\alpha_v\beta_3$, mientras que la vitronectina es específica de $\alpha_v\beta_3$.

[0109] La conexión primaria de las integrinas a la ECM implica la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) y la secuencia RGD se une a una grieta poco profunda localizada entre las subunidades α y β de la cabeza de la integrina (ver Xiong, et al., Science (2002) 296: 151-155). Dicha unión ayuda a modular varias vías de señalización celular, incluidas la adhesión celular, la migración, la diferenciación, la angiogénesis y la cicatrización de heridas (ver Ruoslahti, E., et al., Science (1987) 238: 491-497; y J. Clin. Invest. (1991) 87: 1-5).

[0110] Desde la matriz vítrea extracelular; por ejemplo, las fibrillas de colágeno están conectadas a la retina celular por los sitios de unión a integrina, la inyección intravítrea de péptidos RGC (oligopéptidos) podría liberar el motivo RGD de la matriz extracelular vítrea de la retina celular mediante una unión competitiva a los mismos sitios receptores de integrina.

[0111] Varios investigadores (véase Ruoslahti, E. y col., Science (1987) 238: 491-497; Hynes, RA y col., Cell (1992) 68: 303 -322; y Humphries, MJ, J. Cell Sci., (1990) 97: 585 -592) demostró que muchas integrinas (αvβ3, α5β1, α11β3, etc.) pueden ser inhibidas por pequeños péptidos que poseen el motivo de la secuencia RGD. También está bien documentado que las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$, así como la vitronectina y la fibronectina, estaban reguladas al alza en tumores como las células de melanoma humano (ver Nip, J., J. Clin. Invest., (1992) 90: 1406-1413), células de cáncer de mama humano (ver Rong, L. et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (2009) 50: 5988 -5996), y células epiteliales de pigmento de retina humanas (Peter C. Brooks, et al., J. Clin. Invest., (1995) 96: 1815 -1822). Por lo tanto, se ha demostrado que existe una buena correlación entre los potenciales metastásicos de las células del melanoma humano y la adhesión de las células del melanoma a la vitronectina del ganglio linfático a través del receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$ y que la adhesión fue inhibida por un péptido que contiene RGD (Nip, J., J. Clin. Invest., (1992) 90: 1406-1413). Esto demuestra que los péptidos RGD pueden ser un importante agente anti-angiogénico.

[0112] Además, se ha demostrado en una línea celular de cáncer de colon humano que cuando hay un aumento significativo en la adhesión celular, entonces hay un aumento de la actividad metastásica (Lehmann, M., Cancer Res., (1994), 54: 2102- 2107). Por lo tanto, los agentes que inhiben la adhesión celular inhiben eficazmente la metástasis en el cáncer de colon y el melanoma.

[0113] En base a los resultados del estudio de cicatrización de heridas donde se ha demostrado que RGC inhibe la adhesión celular, y tras la extrapolación del potencial metastásico de RGD en los modelos de cáncer de melanoma y colon, los péptidos de RGC y sus derivados pueden inhibir eficazmente las metástasis tumorales. Por ejemplo, en el melanoma y el cáncer de colon.

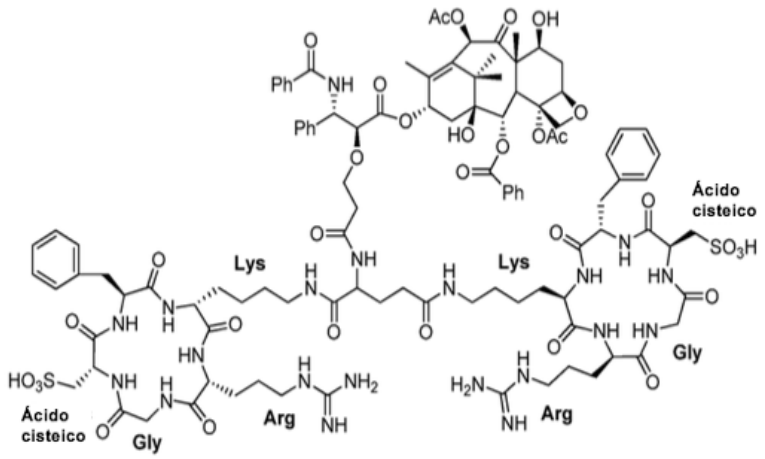
Ejemplo 5

<u>Uso de péptidos de ácido cisteico RG para dirigir o administrar agentes a los tumores</u>

[0114] En este ejemplo, se proporciona un conjugado de péptido de R-G-ácido cisteico-paclitaxel dimérico (Compuesto 3), que se muestra a continuación. Esta composición es útil como agente antitumoral. El péptido de R-G-ácido cisteico dimérico se une selectivamente a los receptores de integrina que se expresan altamente en ciertas células cancerosas y es útil para tratar ciertos cánceres metastásicos como, por ejemplo, el cáncer de mama metastásico, al inhibir la adhesión celular.

<u>Compuesto 3:</u>

[0115]



Compuesto 3

[0116] La síntesis y los mecanismos de acción, la biodistribución y la selectividad del tumor del correspondiente análogo de RGD del **Compuesto 3** son como se describe en Chen, X., et al.; Síntesis y evaluación biológica del conjugado dimérico de péptido-paclitaxel RGD como modelo para el suministro de fármacos dirigidos a integrina; J. Med. Chem., (2005) 48 (4):. 1098-1106).

[0117] Aunque el Compuesto 3 comprende un agente antitumoral particular, Paclitaxel, unido al péptido de R-G-ácido cisteico dimérico, debe apreciarse que este aspecto de la invención incluye todas las formas monoméricas o multiméricas de los péptidos de ácido cisteico R-G unidos a cualquier agente diagnóstico o terapéutico factible que pueda ser útil para diagnosticar, obtener imágenes o tratar un tumor u otro tejido o estructura que contenga integrina. Los ejemplos de sustancias antitumorales que se pueden unir a los péptidos de ácido cisteico R-G monomérico o multimérico de acuerdo con esta invención pueden incluir agentes antitumorales (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, modificadores de la respuesta biológica, inhibidores de la vascularización, bloqueadores de receptores hormonales, agentes crioterapéuticos u otros agentes que destruyen o inhiben la neoplasia o tumorigénesis) tales como; agentes alquilantes u otros agentes que matan directamente las células cancerosas atacando su ADN (p. ej., ciclofosfamida, isofosfamida), nitrosante u otros agentes que matan las células cancerosas al inhibir los cambios necesarios para la reparación del ADN celular (p. ej., carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), antimetabolitos y otros agentes que bloquean el crecimiento de las células cancerosas al interferir con ciertas funciones celulares, generalmente la síntesis de ADN (por ejemplo, 6 mercaptopurina y 5-fluorouracilo (5FU), antibióticos antitumorales y otros compuestos que actúan uniendo o intercalando el ADN y previniendo Síntesis de ARN (p. ej., doxorubicina, daunorubicina, epirrubicina, idarubicina, mitomicina-C y bleomicina) alcaloides de la planta (vinca) y otros agentes antitumorales derivados de plantas (p. ej., vincristina y vinblastina), hormonas esteroides, inhibidores de la hormona, antagonistas de los receptores hormonales y otros agentes que afectan el crecimiento de los cánceres sensibles a las hormonas (p. ej., tamoxifeno, herceptina, ingestantes de aromatasa como la aminoglutetamida y formestano, inhibidores de triazol como letrozol y anastrazol, inhibidores esteroideos como exemestano), proteínas antiangiogénicas, moléculas pequeñas, terapias genéticas y/u otros agentes que inhiben la angiogénesis o la vascularización de tumores (p. ej., met-1, met-2, talidomida), bevacizumab (Avastin), escualamina, endostatina, angioestatina, angiozima, AE-941 (Neovastat), CC-5013 (Revimid), medi-522 (Vitaxin), 2-metoxiestradiol (2ME2, panzem), carboxyamidotriazol, profármaco de combretastatina A4 (CA4P), SU6668, SU11248, BMS-275291, COL-3, EMD 121974, IMC-1C11, IM862, TNP-470, celecoxib (Celebrex), rofecoxib (Vioxx), interferón alfa, interleucina 12 (IL-12) o cualquiera de los compuestos identificados en Science Vol. 289, páginas 1197-1201 (17 de agosto de 2000), modificadores de la respuesta biológica (p. ej., Interferón, bacilo calmette-guerina (BCG), anticuerpos monoclonales, interleucina 2, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), etc.), antagonistas de los receptores de PGDF herceptina, asparaginasa, busulfan, carboplatin, cisplatin, carmustina, ctarabina, dacarbazina, etopósido, flucarbazina, flurouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, ifosfamida, irinotecano, lomustina, melfalano, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, tiotepa, tomudex, topotecano, treosulfano, vinblastina, vincristina, mitoazitrona, oxaliplatino, procarbazina, estreptocina, taxol, taxótero, análogos/congéneros y derivados de tales compuestos así como otros agentes antitumorales no mencionados aquí.

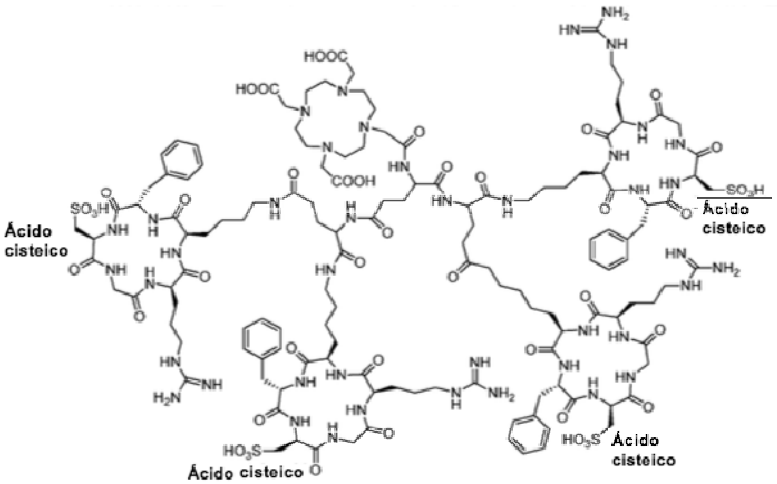
Ejemplo 6

<u>Péptidos de ácido cistéico R-G multiméricos marcados con ^{64}CU para imágenes de tumores integrina-expresivos</u>

[0118] En este ejemplo, los péptidos de R-G-ácido cisteico tetraméricos y octaméricos marcados con ^{64}C de la presente invención (compuestos 4 y 5 respectivamente), que se muestran a continuación, son útiles como agentes radioterapéuticos para fines de diagnóstico y diagnóstico por imágenes (por ejemplo, radiomarcaje de tumores para TEP), así como para dirigir o administrar agentes terapéuticos a tumores u otras células que expresan integrinas, como los tumores que expresan integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Compuesto 4:

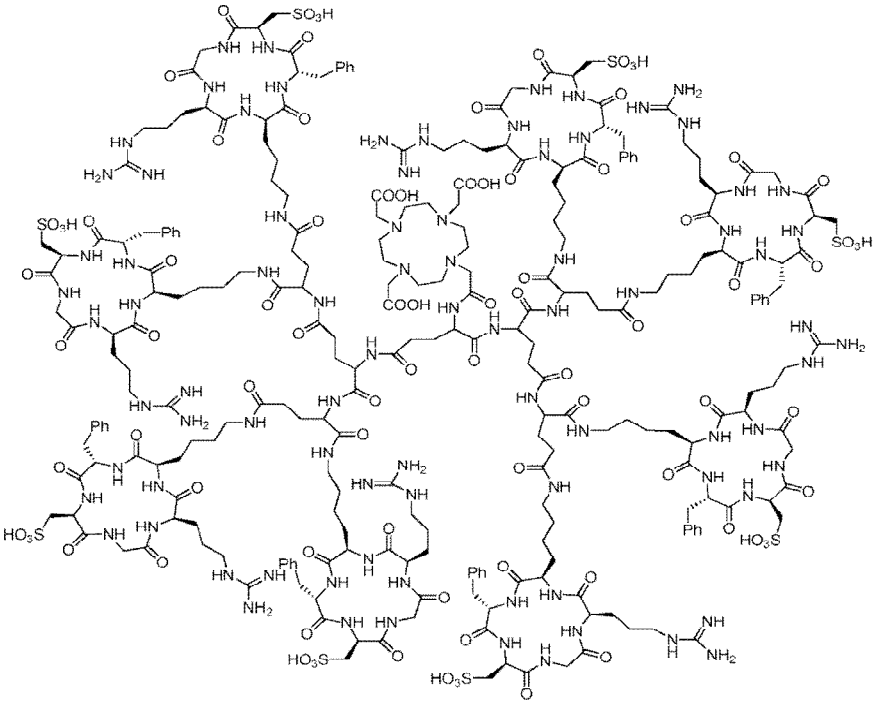
[0119]



Compuesto 4

Compuesto 5:

[0120]



Compuesto 5

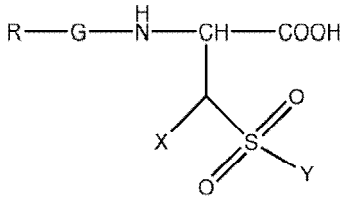
[0121] La síntesis y los mecanismos de acción, la biodistribución, la selectividad tumoral y el uso relacionado con PET de los análogos de RGD correspondientes de los Compuestos 4 y 5 son como se describen en Li, Z. et al., Péptidos RGD tetraméricos y octaméricos marcados con 64CU para la PET de animales pequeños de la expresión de integrina del tumor αvβ3; J. Nucl. Medicina. 48 (7) pp. 1162-1171 (2007).

[0122] Como se usa en el presente documento, cualquier referencia al tratamiento o tratamiento de una enfermedad o trastorno se interpretará de manera que incluya la prevención o prevención de la enfermedad o trastorno antes de que haya ocurrido o se haya detectado, así como el tratamiento de la enfermedad o trastorno después de que haya ocurrido o haya sido detectado.

[0123] Debe apreciarse que la invención se ha descrito aquí anteriormente con referencia a ciertos ejemplos o realizaciones de la invención, pero que se pueden realizar diversas adiciones, eliminaciones, alteraciones y modificaciones a esos ejemplos y realizaciones sin apartarse del alcance pretendido de la invención. Por ejemplo, cualquier elemento o atributo de una realización o ejemplo puede incorporarse o usarse con otra realización o ejemplo, a menos que se especifique lo contrario si hacerlo haría que la realización o el ejemplo no sean adecuados para su uso previsto. Además, cuando los pasos de un método o proceso se han descrito o enumerado en un orden particular, el orden de dichos pasos se puede cambiar, a menos que se especifique lo contrario, o al hacerlo, el método o proceso no sea viable para su propósito previsto. Todas las adiciones, supresiones, modificaciones y alteraciones razonables deben considerarse equivalentes de los ejemplos y realizaciones descritas y deben incluirse dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

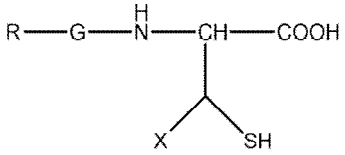
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



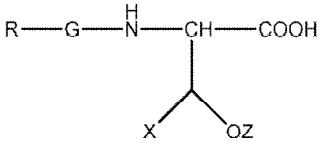
donde X se selecciona de H, alquilo C_1-C_6, Ph y SO_3H e Y se selecciona independientemente de OH y NH_2.

2. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



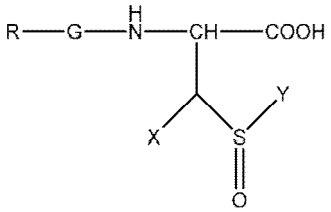
donde X se selecciona de: alquilo C_1-C_6, Ph y SO_3H.

3. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



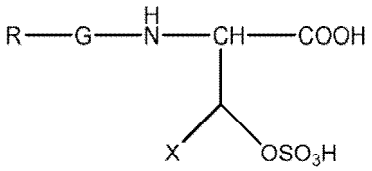
donde X se selecciona entre: alquilo C_1-C_6, Ph o SO_3H y en donde Z se selecciona entre: H y SO_3H.

4. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



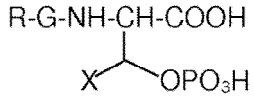
donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H; Y se selecciona de OH o NH_2.

5. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_3H.

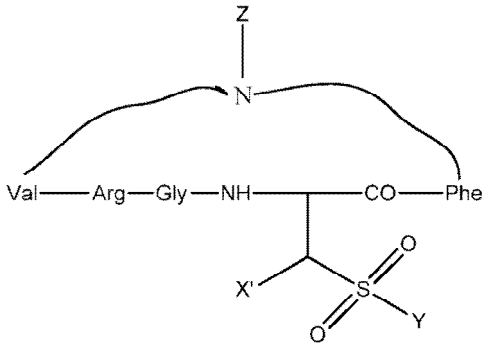
6. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



donde X se selecciona de: H, alquilo C_1 - C_6, Ph o SO_yH y en donde y es 2, 3 o 4.

7. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:
X_1-R-G-Ácido cisteico-X
Donde X y X_1 se seleccionan de cíclico o lineal - Phe-Val-Ala, -Phe-Leu-Ala, -Phe-Val-Gly, -Phe-Leu-Gly, -Phe-Pro-Gly, -Phe-Pro-Ala, -Phe-Val, o cualquier sal de cualquier combinación del isómero D o isómero L de: Arg, Gly, Cysteic, Phe, Val, Ala, Leu, Pro, Thr.

8. Una composición que comprende un péptido de ácido cisteico R-G que tiene la siguiente fórmula general:



donde X' se selecciona de: H, alquilo C_1-C_6, Ph o SO_3H y Z se selecciona de H o Me; Y se selecciona de OH, NH_2.

9. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente combinada con o unida a un material natural o sintético para uso en andamiajes tisulares, a granel o relleno para el tratamiento de una afección patológica.

10. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el material natural o sintético comprende al menos un material seleccionado del grupo que consiste en:
hidrogeles, colágenos, ácidos hialurónicos, polímeros, agentes de carga de tejidos y rellenos de tejidos.

11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 15 para uso en un propósito seleccionado de: inhibir la angiogénesis; tratar o prevenir enfermedades relacionadas con la angiogénesis; inhibición de la adhesión, migración o proliferación de células; tratamiento de la inflamación; tratamiento del cáncer; tratamiento de metástasis; dirigir o administrar un agente terapéutico o de diagnóstico a un tumor; tratamiento de la trombosis; causando vitreolisis; causando desprendimiento vitreorretiniano; facilitar la realización de una vitrectomía; facilitando la curación de heridas; radiomarcaje de tejidos que expresan integrinas particulares; tratamiento del glaucoma; andamiaje tisular, abultado o relleno para el tratamiento de una afección patológica.

12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el uso es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis seleccionado del grupo que consiste en: cáncer, malformación vascular, arteriosclerosis, adherencias vasculares, esclerosis edematosa, neovascularización del injerto corneal, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, pterigio, degeneración de la retina, degeneración macular seca y húmeda, neovascularización de la córnea, nervio óptico isquémico, rubiosis iridis, oclusión de la vena central, extirpación de membranas epiretinales, fibroplastia retrolental, conjunctivitis granular, artritis reumatoide, eritematoso luposo, tiroiditis, psoriasis, capilarectasia, granuloma piogénico, dermatitis seborreica y acné.

13. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición está en forma multimérica y está unida a una sustancia antitumoral, y en donde el uso es para tratar un tumor.

14. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la sustancia antitumoral se selecciona del grupo que consiste en: agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, modificadores de la respuesta biológica, inhibidores de la vascularización, bloqueadores de los receptores de hormonas, agentes crioterapéuticos; agentes que destruyen o inhiben la neoplasia o tumorigénesis; agentes alquilantes; agentes que matan directamente las células cancerosas atacando su ADN; ciclofosfamida; isofosfamida; las nitrosas, agentes que destruyen las células cancerosas al inhibir los cambios necesarios para la reparación del ADN celular; carmustina (BCNU);

lomustina (CCNU); antimetabolitos; agentes que bloquean el crecimiento de células cancerosas al interferir con la síntesis de ADN; 6 mercaptopurina; 5-fluorouracilo (5FU); antibióticos antitumorales; compuestos que actúan uniendo o intercalando el ADN y previniendo la síntesis de ARN; doxorubicina; daunorubicina; epirubicina; idarubicina; mitomicina-C; bleomicina; Vinca alcaloides; vincristina; vinblastina; hormonas esteroides; inhibidores hormonales; antagonistas de los receptores hormonales; agentes que afectan el crecimiento de los cánceres sensibles a las hormonas; tamoxifeno; herceptin; inhibidores de la aromatasa; aminoglutetamida; formestano; inhibidores de trriazol; letrozol; anastrazol; inhibidores de esteroides; exemestano proteínas antiangiogénicas; agentes de terapia génica; agentes que inhiben la angiogénesis o vascularización de tumores; met-1; met-2; talidomida; bevacizumab (avastin); escualamina; endostatina; angiostatina; angiozima; AE-941 (Neovastat); CC-5013 (Revimid); medi-522 (vitaxina); 2-metoxiestradiol (2ME2, Panzem); carboxiamidotriazol (CAI); combretastatina A4 profármaco (CA4P); SU6668; SU11248; BMS-275291; COL-3; EMD 121974; IMC-1C11; IM862; TNP-470; celecoxib (Celebrex); rofecoxib (Vioxx); interferón alfa; interleucina-12 (IL-12); modificadores de la respuesta biológica; bacilo calmette-guerin (BCG); anticuerpos monoclonicos; interleucina 2, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF); antagonistas del receptor de PGDF; herceptin; asparaginasa; busulfán carboplatino; cisplatino; carmustina; cloroambucil; citarabina; dacarbazina; etopósido; flucarbazina; flurouracilo; gemcitabina; hidroxiurea; ifosfamida; irinotecan; lomustina; melfalan; mercaptopurina; metotrexato; tioguanina; tiotepa; tomudex; topotecan treosulfan; vinblastina; vincristina; mitoazitrona; oxaliplatino; procarbazina; estreptocina; taxol y taxótero.

15. Una composición de materia que comprende un péptido de ácido cisteico RG que comprende glicina-arginina-glicina-(ácido cisteico)-treonina-prolina.

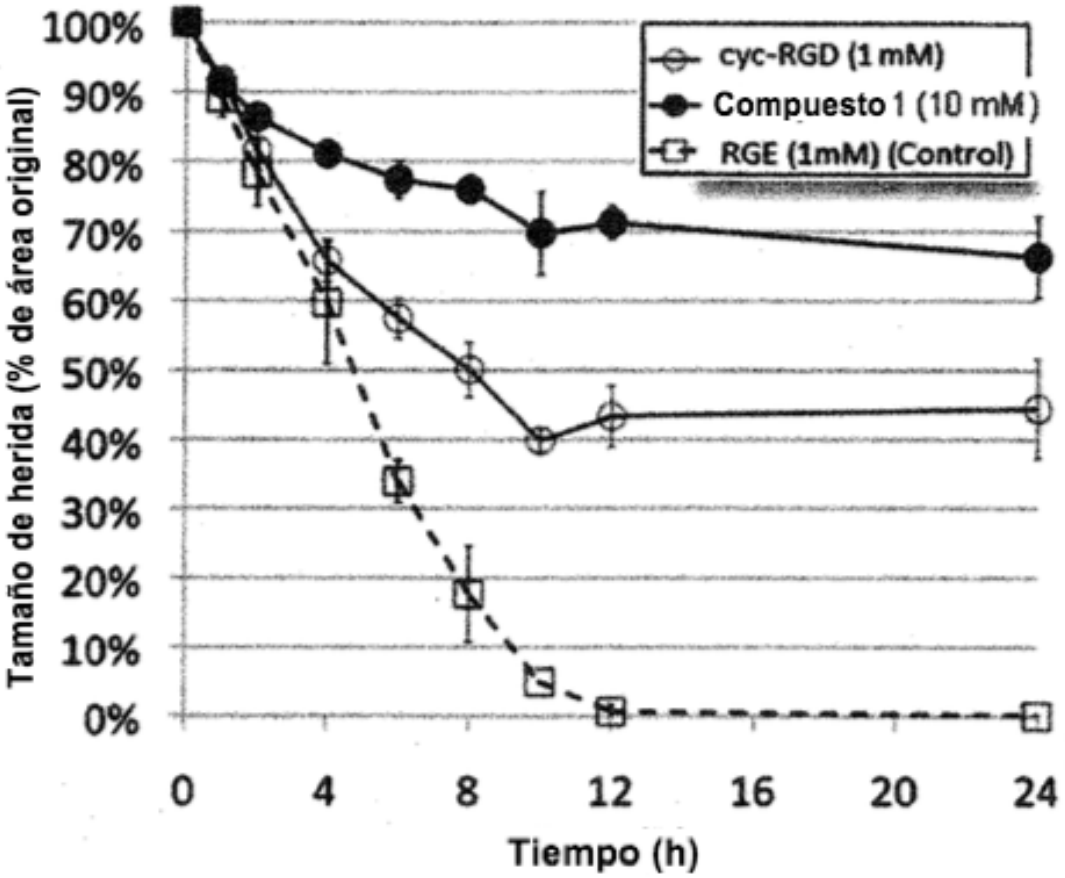
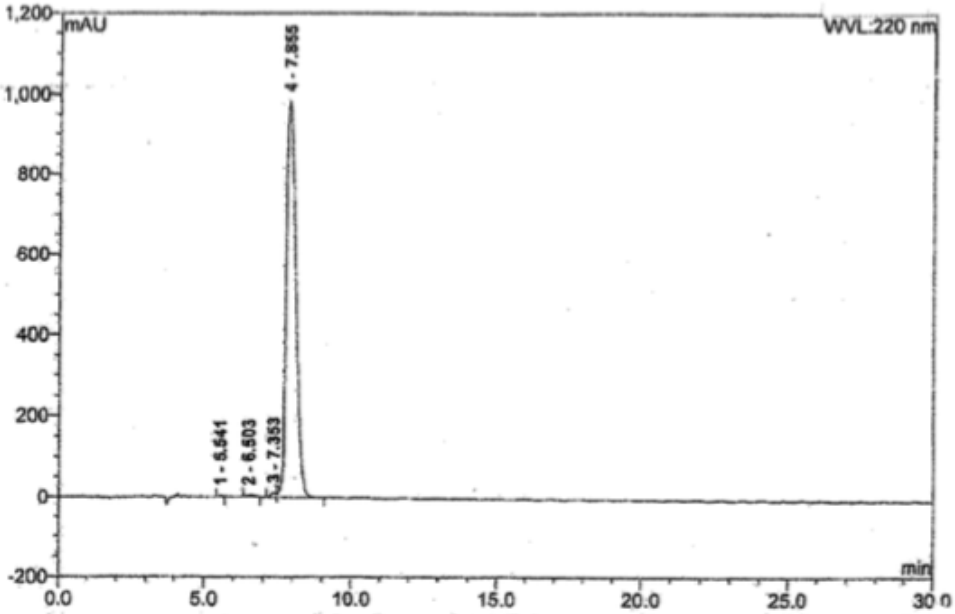

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Tamaño de herida (% de área original)
0
4
8
12
16
20
24
Tiempo (h)
cyc-RGD (1 mM)
Compuesto 1 (10 mM)
RGE (1mM) (Control)

Fig. 1



Nº	Temp. Ret. min		Nombre de pico	Anchura mAU	Area mAU*min	Área rel. %	Cantidad n.a.	Tipo
1	5.54	n.a.		3.672	0.410	0.11	n.a.	BMB*
2	6.50	n.a.		3.249	1.050	0.28	n.a.	BMB*
3	7.35	n.a.		10.874	2.352	0.62	n.a.	BM *
4	7.85	n.a.		983.518	373.819	98.99	n.a.	MB*
Total:				1001.312	377.631	100.00	0.000	

Fig. 2

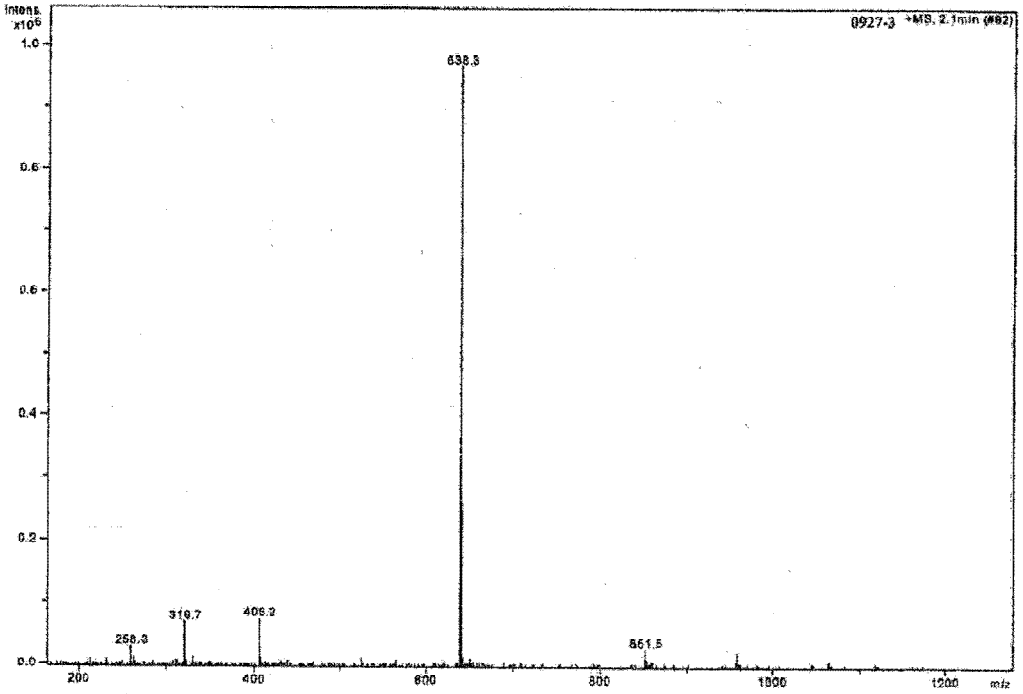
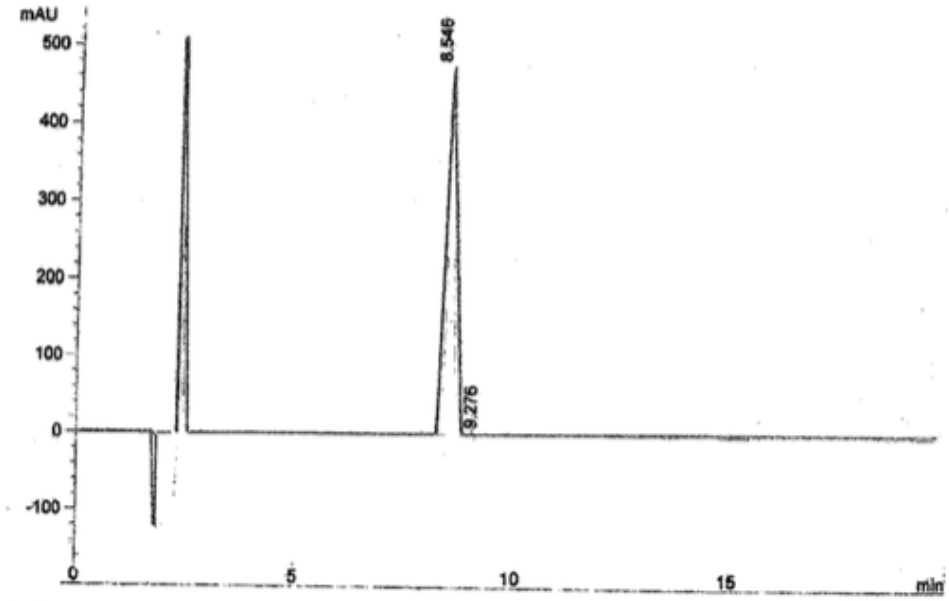

Intens.
x10^6
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0927-3 +MS, 2.1min (#62)
638.3
258.3
310.7
408.2
851.5
200
400
600
800
1000
1200
m/z

Fig. 3



Señal 1:VWD1 A, Longitud de onda=220 nm

Pico Nº	TA (min)	Tipo	Altura	Anchura (min)	Area	Area %
1	8.546	VV	479.609	0.171	5341.033	99.441
2	9.276	VV	1.319	0.315	30.004	0.559

Fig. 4

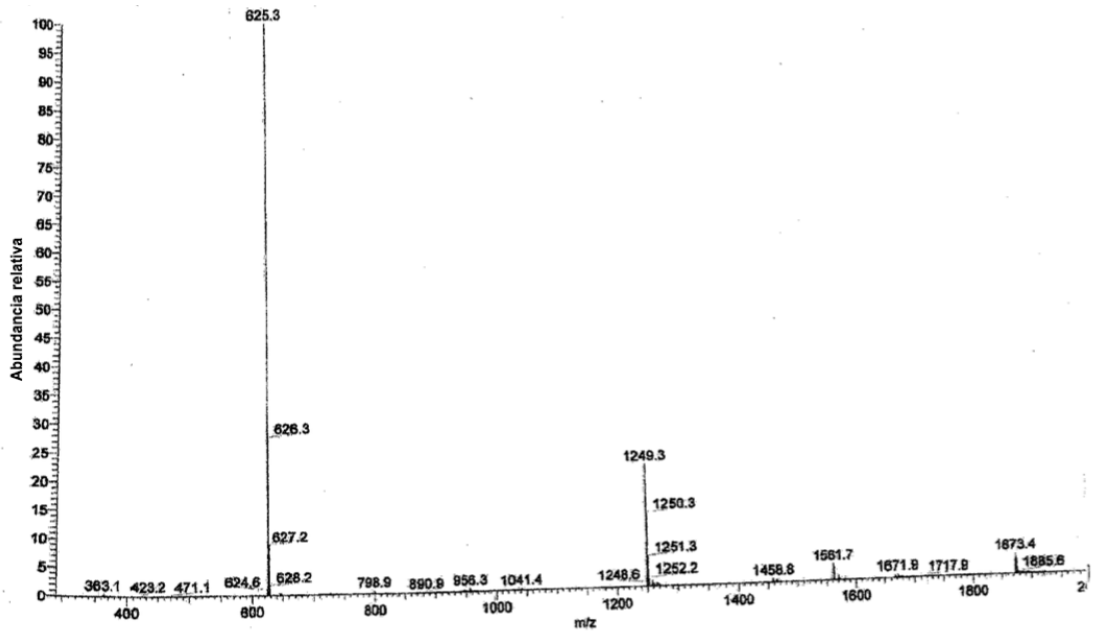

Abundancia relativa
m/z
625.3
626.3
627.2
628.2
624.6
363.1
423.2
471.1
798.9
890.9
956.3
1041.4
1248.6
1249.3
1250.3
1251.3
1252.2
1458.8
1561.7
1671.8
1717.8
1873.4
1885.6

Fig. 5