

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 217**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2014 PCT/US2014/041526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14197892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2014 E 14807179 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3003343**

54 Título: **Un péptido biomimético y una plataforma de administración biodegradable para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis y linfangiogénesis**

30 Prioridad:

**07.06.2013 US 201361832290 P**

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

**17.07.2020**

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)  
3400 North Charles Street  
Baltimore, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**POPEL, ALEKSANDER S.;  
PANDEY, NIRANJAN B.;  
LEE, ESAK;  
GREEN, JORDAN J. y  
SHMUELI, RON B.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 774 217 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

Un péptido biomimético y una plataforma de administración biodegradable para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis y linfangiogénesis

### 5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N.º 61/832.290, depositada el viernes, 7 de junio de 2013, que se incluye como referencia en su totalidad en esta invención.

### 10 ANTECEDENTES

El cáncer es un importante problema de salud pública en los Estados Unidos y otras partes del mundo. En la actualidad, 1 de cada 4 muertes en los Estados Unidos se debe al cáncer. La angiogénesis desempeña un papel fundamental en el crecimiento tumoral y en la metástasis en la mayoría de los tipos de cáncer. En particular, su importancia se ha demostrado en el cáncer de mama, la neoplasia maligna femenina más comúnmente diagnosticada en los Estados Unidos. La terapéutica antiangiogénica, ya sea en monoterapia o en combinación con otras terapéuticas, son prometedoras y están siendo investigadas intensamente en estudios preclínicos y clínicos. La terapéutica anti-VEGF se mostró una promesa temprana en ensayos clínicos; sin embargo, aunque la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó un anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (Genentech/Roche) para el cáncer de mama en 2008 en combinación con quimioterapia, en noviembre de 2011, la FDA revocó la indicación contra cáncer de mama porque no demostró un beneficio general de supervivencia.

Está en curso el desarrollo de terapias antiangiogénicas para tratar el cáncer de mama y otros tipos de cáncer, así como las enfermedades proliferativas oculares, como la degeneración macular relacionada con la edad. La linfangiogénesis también juega un papel importante en la metástasis del cáncer (Holopainen y col., 2011). Hasta la fecha, no se han aprobado fármacos peptídicos para el tratamiento del cáncer u otras enfermedades dependientes de la angiogénesis y la linfangiogénesis.

Los péptidos se han empleado como agentes terapéuticos para múltiples enfermedades y recientemente se han investigado en aplicaciones clínicas para atacar tumores, ya sea por imágenes o terapia (Folkman, 2010; Senger y col., 1983; Leung y col., 1989; Carmeliet, 2005; Carmeliet y Jain, 2000; Carmeliet y Jain, 2011; Rosca y col., 2011). Los péptidos miméticos son péptidos que imitan biológicamente los determinantes activos en biomoléculas. En general, los péptidos son herramientas atractivas como agentes terapéuticos debido a su vínculo al objetivo específico, la capacidad de penetrar en las células y la facilidad de modificación que dan flexibilidad para diferentes aplicaciones (Carmeliet y Jain, 2000; Folkman, 2006). Además, son menos tóxicos porque se vinculan a sus objetivos con alta especificidad y son baratos de producir.

Sin embargo, algunas de las propiedades que hacen que los péptidos sean candidatos atractivos también contribuyen a sus desventajas. Aunque los péptidos pueden interactuar específicamente con los receptores celulares, a veces estas interacciones pueden ser de baja afinidad. Además, el uso de péptidos como agentes terapéuticos está actualmente limitado debido a su corta vida media y a su reducida biodisponibilidad. Los intentos de modificar un péptido para aumentar su biodisponibilidad incluyen la sustitución con aminoácidos no naturales, la pegilación del péptido y la administración del péptido en una nano o micropartícula.

### 45 RESUMEN

El objeto descrito actualmente proporciona composiciones de péptidos, procedimientos y kits para tratar una enfermedad, trastorno o disfunción que está relacionada con la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis. Las composiciones peptídicas y procedimientos descritos actualmente, en algunos aspectos, inhiben la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis, que desempeñan un papel crítico en múltiples enfermedades o trastornos. Por consiguiente, en algunos aspectos, las composiciones y procedimientos del objeto actualmente descrito permiten la prevención o reducción de la formación de vasos sanguíneos, vasos linfáticos o tumores que afectan a una célula, tejido u órgano.

En algunos aspectos, el objeto actualmente descrito proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascular, antitumorigénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas.

En otros aspectos, el objeto actualmente descrito proporciona una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva de un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe

permeabilidad antiangiogénica, antivascolar, antitumorogénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas.

En aspectos adicionales, el objeto actualmente descrito proporciona un kit que comprende un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde  
5 el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascolar, antitumorogénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas.

En algunos aspectos, el objeto actualmente descrito proporciona una nanopartícula o una micropartícula que comprende un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascolar,  
10 antitumorogénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas.

En algunos aspectos, el objeto actualmente descrito proporciona un procedimiento para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorogénesis que afecta a una célula, comprendiendo el procedimiento: poner la célula en contacto con un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), en una cantidad suficiente para inhibir la  
15 angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorogénesis que afecta a la célula.

En algunos otros aspectos, el objeto actualmente descrito proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorogénesis o para prevenir o retrasar que un sujeto desarrolle una enfermedad relacionada con la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorogénesis, comprendiendo el procedimiento: administrar al sujeto un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), en una cantidad suficiente para tratar, retrasar o prevenir la enfermedad en el sujeto.  
20

Ciertos aspectos del objeto divulgado actualmente se han mencionado anteriormente, que son abordados en su totalidad o en parte por el objeto divulgado actualmente, otros aspectos se harán evidentes a medida que se avance en la descripción, cuando se tomen en relación con los ejemplos y figuras adjuntos, como se describe mejor en esta invención a continuación.  
25

### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Habiendo así descrito el objeto actualmente descrito en términos generales, ahora se hará referencia a las figuras adjuntas, que no están necesariamente dibujadas a escala, y donde:  
35

Las FIGS. 1A-1C muestran la proliferación (Panel A), la adhesión (Panel B) y la migración (Panel C) usando el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) con células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC);

Las FIGS. 2A-2C muestran la adhesión (Panel A), la proliferación (Panel B) y la migración (Panel C) usando el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) con células endoteliales retinianas humanas (HREC);  
40

Las FIGS. 3A-3D muestran un ensayo de formación de tubos de HUVEC usando un control CM (Panel A) y el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) (péptido SP2043 25  $\mu$ M; Panel B); y un ensayo de formación de tubo de células endoteliales microvasculares (MEC) usando un control (Ctrl; Panel C) y el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) (péptido SP2043 25  $\mu$ M; Panel D);  
45

La FIG. 4 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1), también referido en esta invención y en las figuras como SEC .1, sobre la adhesión de células endoteliales linfáticas (LEC);

La FIG. 5 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la formación del tubo de células endoteliales linfáticas (LEC);  
50

Las FIGS. 6A-6B muestran el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la señalización del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1) *in vitro* con células endoteliales microvasculares (MEC; Panel A) y células endoteliales linfáticas (LEC; Panel B);  
55

La FIG. 7 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 y SUM149, y la línea celular positiva de receptor de estrógeno MCF-7;

La FIG. 8 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la señalización del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en células MDA-MB-231;  
60

La FIG. 9 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre el crecimiento de tumores ortotópicos MDA-MB-231 en ratones SCID durante 33 días (ip, inyección intraperitoneal);

Las FIGS. 10A-10B muestran el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) (Panel B) sobre la fosforilación de c-Met y la angiogénesis in vivo (Panel A, control);

Las FIGS. 11A-11G muestran el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la angiogénesis como se ve mediante la tinción de lectina para inmunohistoquímica (IHC) y la tinción de LYVE-1 para linfangiogénesis in vivo: control teñido con lectina (Panel A) y LYVE-1 (Panel B); el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) teñido con lectina (Panel C) y LYVE-1 (Panel D); control y el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) (Panel E); y densidad de píxeles usando lectina (Panel F) y LYVE-1 (Panel G);

Las FIGS. 12A-12B muestran el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la metástasis de los tumores MDA-MB-231-luc en múltiples órganos en el modelo de metástasis pretratada con medios condicionados por tumor por flujo de fotones de células tumorales (Panel A) y el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la metástasis de tumores MDA-MB-231-luc a ganglios linfáticos como se ve al teñir con anticuerpo de vimentina para la presencia de células humanas (Panel B);

Las FIGS. 13A-13E muestran el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la neovascularización en comparación con aflibercept en un modelo de CNV (Paneles A-B) y en comparación con un control en un modelo de ratón rho-VEGF (Panel C-E);

La FIG. 14 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la neovascularización en un modelo de CNV inducido por láser en el ojo de un ratón;

Las FIGS. 15A-15B muestran el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la fuga vascular en el modelo de ratón Tet/Opsin/VEGF;

La FIG. 16 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la permeabilidad vascular mediada por VEGF en el ojo de un conejo;

La FIG. 17 muestra un ejemplo representativo del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) cargado (2%) en micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA); se usó PLGA en una relación L:G de 65/35, MW = 40-75 kDa. La barra de escala es de 10 micras;

Las FIGS. 18A-18B muestran: (Panel A) 2% y 5% de péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) micropartículas de PLGA cargadas y dimensionamiento; Distribución de partículas promediadas en número (Num. Avg) y distribución de partículas promediadas en volumen (Vol. Avg.) son indicadas (Media+DE); y (Panel B) los potenciales zeta (carga superficial) de 2% y 5% de péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) micropartículas cargadas;

La FIG. 19 muestra la liberación controlada de un peptídico marcado análogo de SP2043 de micropartículas de PLGA bajo condiciones fisiológicas *in situ*;

La FIG. 20 muestra la liberación controlada del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sin ninguna marca o modificación en micropartículas de PLGA *in situ* bajo condiciones fisiológicas (procedimiento que se muestra en la FIG. 32 a continuación);

La FIG. 21 muestra imágenes de SEM de micropartículas de PEGA que incorporan 2% en peso de SP2043 (izquierda) y 5% en peso de 2043 (derecha). PLGA en este ejemplo usó una relación L:G de 85/15, MW = 190-240kDa. La barra de escala es de 10 micras;

La FIG. 22 muestra que se usó el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) encapsulado en nanopartículas PLGA 65/35. Nanopartículas elipsoidales (izquierda) y nanopartículas esféricas (derecha);

La FIG. 23 muestra el efecto de la micropartícula PLGA 85/15 que encapsula el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la regresión en ojos de ratón después de la neovascularización coroidea inducida por láser en un modelo de ratón (se muestran datos de 2 semanas);

La FIG. 24 muestra el efecto de micropartículas PLGA 85/15 que contienen el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre el tiempo extra de neovascularización en un modelo de ratón AMD húmedo inducido por láser;

La FIG. 25 muestra el efecto de micropartículas PLGA 65/35 que contienen el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre

el tiempo extra de neovascularización en un modelo de ratón AMD húmedo inducido por láser;

La FIG. 26 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sobre la inhibición de la neovascularización en un modelo de conejo. Datos en el día 34 después de la inyección intravítrea en ojos de conejo;

La FIG. 27 muestra PLGA (85/15) encapsulando el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) en ratones transgénicos rho/VEGF;

La FIG. 28 muestra el efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) en combinación con otros agentes antiangiogénesis en un modelo de neovascularización coroidea inducida por láser en ratones;

La FIG. 29 muestra el efecto de polímeros, como los PBAE, sobre la capacidad del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) para autoensamblarse en nanopartículas de aproximadamente 100 nm. El polímero 447 se refiere a poli(1,4-butanodiol diacrilato-co-4-amino-1-butanol) de extremo cubierto (3-aminopropil)-4-metilpiperazina y el polímero 657 se refiere a poli(1,6-hexanodiol diacrilato-co-5-amino-1-pentanol) de extremo cubierto (3-aminopropil)-4-metilpiperazina (B6-S5-E7). +/- se refiere a con o sin el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1). El tamaño de partícula es mayor y la concentración de nanopartículas mayor cuando el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) está junto con el polímero para el autoensamblaje;

La FIG. 30 muestra nanopartículas PLGA y PLGA-PEG encapsulando SP2043;

Las FIGS. 31A-31B muestran el efecto del péptido SP2043 inyectado por vía intravenosa sistémicamente (SEQ ID NO:1) que contiene nanopartículas o péptido libre sobre la acumulación en el tumor, así como en otros órganos. La FIG. 31A muestra la acumulación por órgano y la FIG. 31B muestra acumulación total. En ambas figuras, el término "desnudo" se refiere al péptido libre, mientras que los términos "esfera", "elipse" y "PEG", es decir, polietilenglicol, se refieren a tres tipos diferentes de nanopartículas que contienen el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1); y

Las FIGS. 32A-32B muestran un procedimiento para cuantificar los péptidos descritos actualmente usando electroforesis y tinción con SimplyBlue (Panel A) seguido de espectrometría de masas (Panel B). El panel A contenía las siguientes muestras: carril 1, marcador; carril 2, 4 µg de péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) control positivo; carril 3, 4 µg de péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) en medio de PBS; carril 4, 4 µg de péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) en medio de FBS.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

El objeto actualmente descrito se describirá ahora más completamente a continuación con referencia a las figuras adjuntas, en las que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones del objeto actualmente descrito. Números similares se refieren a elementos similares en todas partes. La materia en cuestión divulgada actualmente puede representarse en muchas formas diferentes y no debería considerarse limitada a las realizaciones expuestas en esta invención; en lugar de ello, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción satisfaga los requisitos legales aplicables. Es más, se le ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones de la materia en cuestión divulgada actualmente expuesta en la presente memoria a un experto en la materia a la que pertenece la materia en cuestión divulgada actualmente, teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y las figuras asociadas. Por lo tanto, ha de entenderse que la materia en cuestión divulgada actualmente no ha de limitarse a las realizaciones específicas divulgadas y que se pretende que que estén incluidas modificaciones y otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### I. PÉPTIDOS MIMÉTICOS DERIVADOS DE COLÁGENO TIPO IV

Los péptidos generalmente ofrecen muchas ventajas sobre otros tipos de terapias para ciertas enfermedades, ya que no son inmunogénicos, son menos tóxicos porque se vinculan a sus objetivos con alta especificidad y son baratos de producir. Véanse, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional PCT nº WO 2008/085828 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT nº WO 2007/033215, cada una de las cuales se incorpora a esta invención como referencia en su totalidad. Los péptidos descritos actualmente exhiben propiedades antiangiogénicas, permeabilidad vascular, antitumogénica y/o antilinfangiogénicas, lo que podría conducir a un aumento de la supervivencia global en ciertas enfermedades. Por ejemplo, los péptidos descritos actualmente pueden beneficiar a pacientes con cáncer y pueden ayudar a tratar enfermedades proliferativas oculares, como la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética.

En general, los péptidos descritos actualmente se caracterizan por tener el motivo que comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTXPXXXXDINDVXNF (SEQ ID No:2). Los péptidos caracterizados por tener el motivo que comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTXPXXXXNINNVDXNF (SEQ ID No:4) se han descrito en la Publicación Internacional WO 2012/079088. Este motivo se determinó haciendo sustituciones en el péptido pentastatina-1. La publicación WO 2012/079088 reveló que, en algunas realizaciones, las posiciones en SEQ ID No:

3 denotadas por X podrían variarse y el péptido resultante todavía podría usarse para, y en algunas realizaciones, era mejor para, inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis, y para el tratamiento de un sujeto de la misma, mientras que otras posiciones en SEQ ID No: 3 no se pudieron variar para retener las características inhibitorias. En otras realizaciones, se encontró que X en las siguientes posiciones podría

5 tener las siguientes sustituciones en SEQ ID No: 3: la posición 7 podría ser M, A o G; la posición 9 podría ser F, A, Y o G; la posición 10 podría ser M, A, G, dA o Nle; la posición 11 podría ser F, A, Y, G o 4-CIPhe; la posición 12 y la posición 18 podrían ser Abu, G, S, A, V, T, I, L o AllyGly. En una realización, se describió el péptido caracterizado por tener el motivo que comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTAPFAFININNVINF (SEQ ID No: 3; también denominado SP2036).

10

Los péptidos descritos actualmente se caracterizan por tener el motivo que comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTXPXXXXDINDVXNF (SEQ ID No: 2), que difiere de la SEQ ID No: 4 previamente descrita en las posiciones 13 y 16 (Tabla 1). En una realización particular, se describe un péptido caracterizado por tener el motivo que comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTAPFAFIDINDVINF (SEQ ID No: 1, también denominado SP2043 y

15 SEQ.1) que difiere del SEQ ID No: 3 anteriormente descrito (también denominado SP2036) en las posiciones 13 y 16 (Tabla 1). Se describe en esta invención que la sustitución de aspartato en las posiciones 13 y 16 da como resultado un péptido que es menos hidrófobo, pero que aún puede usarse para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis que afecta a una célula, tejido u órgano, y para el tratamiento de un sujeto de los mismos. Además, debido a que este péptido es menos hidrófobo, es más fácil de producir.

20

TABLA 1. Péptidos Representativos

SEQ ID NO:1	LRRFST A P FAFI DINDV INF	SP2043
SEQ ID NO:2	LRRFST X P XXXX DINDV XNF	
SEQ ID NO:3	LRRFST A P FAFI NINNV INF	SP2036
SEQ ID NO:4	LRRFST X P XXXX NINNV XNF	

#### A. Realizaciones Representativas

25 En una realización particular, el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTAPFAFIDINDVINF (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTXPXXXXDINDVXNF (SEQ ID NO: 2), y donde X es cualquier aminoácido y la secuencia de aminoácidos es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:1.

30 X puede ser un aminoácido natural o no natural.

En otras realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTXPXXXXDINDVXNF (SEQ ID NO:2), donde X en la posición 7 es M, A o G; X en la posición 9 es F, A, Y o G; X en la posición 10 es M, A, G, dA o Nle; X en la posición 11 es F, A, Y, G o 4-CIPhe; X en la posición 12 y la posición 18 son Abu, G, S, A, V, T, I, L o

35 AllyGly y la secuencia de aminoácidos es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:1. Cada sustitución en un residuo X en esta realización se ha probado (como se muestra en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT No. WO 2012/079088, o en los ejemplos proporcionados a continuación en esta invención) o es una sustitución conservadora de aminoácidos para un aminoácido probado.

40 En algunas realizaciones, los péptidos descritos actualmente tienen varios residuos X que pueden ser cualquier aminoácido, ya sea natural o no natural (X7, X9, X10, X11, X12 y X18). Por aminoácidos naturales se entienden aquellos aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, como la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, lisina, ácido glutámico, glutamina, arginina, histidina, fenilalanina, cisteína, triptófano, tirosina, metionina, prolina, pirrolisina y selenocisteína. Por aminoácidos no naturales se entienden

45 aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza, pero que pueden incorporarse en una cadena de polipéptidos. Los aminoácidos no naturales incluyen, entre otros, ácido 2-aminobutírico (Abu), norleucina (Nle), 4-cloro-fenilalanina (4-CIPhe), alilglicina (AllyGly) y otros aminoácidos no naturales como los detallados en Ma (2003). Análogos de aminoácidos que son conocidos en la técnica pueden ser empleados en el objeto descrito actualmente.

50 Un "péptido" o "proteína" comprende una cadena de al menos tres aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los términos "proteína" y "péptido" pueden usarse indistintamente. Péptido puede referirse a un péptido individual o una colección de péptidos. Además, uno o más de los aminoácidos en un péptido divulgado actualmente pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso, un enlazador para conjugación, funcionalización u

otra modificación, y similares. En algunas realizaciones, las modificaciones del péptido conducen a un péptido más estable (por ejemplo, mayor vida media in vivo). En otras realizaciones, otras modificaciones pueden incluir la ciclación del péptido, la incorporación de D-aminoácidos, otras moléculas conjugadas con el N-terminal y el C-terminal, la conjugación de sondas fluorescentes, biomoléculas, tales como poli(etilenglicol), ligandos dirigidos y similares, 5 retroinversión y similares. Ninguna de las modificaciones debería interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido.

Por "péptido derivado del colágeno IV" se entiende un péptido que comprende un motivo del colágeno C-N- X(3)-V-C o P-F-X(2)-C o FX(2)FX(3)PFX(2)CNX(4)CNX. Si se desea, el péptido incluye al menos aproximadamente 5, 10, 20, 10 30, 40, 50 o más aminoácidos que flanquean el extremo carboxi o amino del motivo en la secuencia de aminoácidos que ocurre naturalmente. Los péptidos derivados del colágeno de tipo IV incluyen, por ejemplo, pentastatina-1, tumstatina y RGD dirigido. Por "alteración" se entiende un cambio en la secuencia o en una modificación (por ejemplo, una modificación postraslacional) de un gen o polipéptido en relación con una secuencia de referencia endógena de tipo agresivo.

15 Por "péptido aislado" se entiende un péptido actualmente descrito que se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente. Típicamente, el péptido es aislado cuando está al menos al 60%, en peso, libre de proteínas y moléculas orgánicas naturales con las que está naturalmente asociado. Preferiblemente, la preparación es al menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 99%, en peso, de un péptido actualmente 20 descrito. Se puede obtener un péptido aislado, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica dicho péptido; o sintetizando químicamente la proteína. La pureza se puede medir mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poli(acrilamida) o mediante análisis por HPLC.

25 Por "sustancialmente idéntico" se entiende un péptido, un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que exhibe al menos un 50% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en esta invención) o secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente, dicha secuencia es al menos 60%, más preferiblemente 80% u 85%, e incluso más preferiblemente 90%, 95% o incluso 99% idéntica al nivel de aminoácidos o ácido nucleico a la secuencia utilizada para la comparación.

30 Las "variantes funcionales" de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 incluyen fragmentos funcionales y/o péptidos de fusión funcionales. Una variante funcional de las secuencias actualmente descritas se refiere a un péptido aislado y/o recombinante que tiene al menos una propiedad, actividad y/o función característica del péptido codificado por SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, como exhibiendo permeabilidad antiangiogénica, antivascular, antitumorogénesis y/o 35 propiedades antilinfangiogénicas, lo que podría conducir a un aumento de la supervivencia general en ciertas enfermedades. En general, los fragmentos o porciones de los péptidos descritos actualmente abarcados por el objeto descrito actualmente incluyen aquellos que tienen una delección (es decir, una o más delecciones) de un aminoácido (es decir, uno o más aminoácidos) en relación con los péptidos codificados por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 (como N-terminal, C-terminal o delecciones internas). También se prevén fragmentos o porciones en las que solo se han 40 eliminado aminoácidos contiguos o en los que se han eliminado aminoácidos no contiguos. En general, los mutantes o derivados de los péptidos descritos actualmente incluyen variantes naturales o artificiales que difieren por la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos, o péptidos modificados en los que se modifica uno o más residuos, y mutantes que comprenden uno o más residuos modificados.

45 Generalmente, una variante funcional de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80% idéntica, al menos aproximadamente 81% idéntica, al menos aproximadamente 82% idéntica, al menos aproximadamente 83 % idéntica, al menos aproximadamente 84% idéntica, al menos aproximadamente 85% idéntica, al menos aproximadamente 86% idéntica, al menos aproximadamente 87% idéntica, al menos aproximadamente 88% idéntica, al menos aproximadamente 89% idéntica, al menos aproximadamente 90% 50 idéntica, al menos aproximadamente 91% idéntica, al menos aproximadamente 92% idéntica, al menos aproximadamente 93% idéntica, al menos aproximadamente 94% idéntica, al menos aproximadamente 95% idéntica, al menos aproximadamente 96% idéntica, al menos aproximadamente 97% idéntica, al menos aproximadamente 98% idéntica, o al menos aproximadamente 99% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 a lo largo de la longitud de la variante.

55 Generalmente, una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad con las secuencias descritas actualmente tiene al menos aproximadamente 80% idéntica, al menos aproximadamente 81% idéntica, al menos aproximadamente 82% idéntica, al menos aproximadamente 83% idéntica, al menos aproximadamente 84% idéntica, al menos aproximadamente 85% idéntica, al menos aproximadamente 86% idéntica, al menos aproximadamente 87% 60 idéntica, al menos aproximadamente 88% idéntica, al menos aproximadamente 89% idéntica, al menos aproximadamente 90% idéntica, al menos aproximadamente 91% idéntica, al menos aproximadamente 92% idéntica, al menos aproximadamente 93% idéntica, al menos aproximadamente 94% idéntica, al menos aproximadamente 95%

idéntica, al menos aproximadamente 96% idéntica, al menos aproximadamente 97% idéntica, al menos aproximadamente 98% idéntica, o al menos aproximadamente 99% idéntica a las secuencias actualmente descritas sobre la longitud de la variante.

- 5 En algunos aspectos, el objeto actualmente descrito proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascolar, antitumorigénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas. En otras realizaciones, el objeto actualmente descrito proporciona una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva de un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascolar, antitumorigénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas. En realizaciones adicionales, el objeto actualmente descrito proporciona un kit que comprende un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascolar, antitumorigénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas. En otras realizaciones adicionales, el objeto actualmente descrito proporciona una nanopartícula o una micropartícula que comprende un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), donde el péptido exhibe permeabilidad antiangiogénica, antivascolar, antitumorigénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas.
- 20 Además, los péptidos descritos actualmente pueden modificarse para hacerlos menos susceptibles a la proteólisis. Por ejemplo, se pueden truncar a la secuencia mínima potente. Tal truncamiento es importante para limitar la unión a otros receptores que diluirían la concentración efectiva, así como también conducirían a efectos secundarios inesperados. Tal truncamiento también abre la posibilidad de crear un único péptido multimodal a partir de múltiples péptidos cortos, cada uno de los cuales se orienta a la angiogénesis, a la linfangiogénesis y a la tumorigénesis por un mecanismo diferente. El tratamiento multimodal es muy importante para reducir la incidencia de la resistencia a fármacos, porque es menos probable que el tumor pueda montar una resistencia exitosa cuando es atacado simultáneamente desde múltiples frentes.

30 Además, los péptidos descritos actualmente con diferentes secuencias pueden usarse juntos en una composición o procedimiento. Puede haber composiciones o procedimientos en los que múltiples tipos de los péptidos descritos actualmente permiten una mejor prevención o reducción de la angiogénesis, la permeabilidad vascular, la tumorigénesis y/o la linfangiogénesis. Por lo tanto, en lugar de una composición con un solo péptido multimodal, una composición puede estar compuesta por múltiples tipos de péptidos aislados que no están enlazados covalentemente.

35 Además, en algunas realizaciones, los péptidos descritos actualmente son sales de tri-fluoro acetato (TFA). Sin embargo, para uso en humanos, las sales de TFA pueden ser modificadas a sales de acetato u otras sales farmacéuticamente aceptables.

40 El término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de composiciones activas que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de las fracciones sustituyentes particulares encontradas en las composiciones descritas en esta invención. Cuando los compuestos de la presente descripción contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición de base mediante el contacto de la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un solvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente descripción contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácido mediante el contacto de la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un solvente inerte adecuado. Algunos ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, hidriódico o ácidos de fósforo y similares, así como sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galactunónico y similares (véase, por ejemplo, Berge y col., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos de la presente descripción pueden contener funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de bases o de ácidos.

60 Además, es posible aumentar la vida media de los péptidos conjugando los péptidos con ciertas composiciones. Por ejemplo, es posible conjugar los péptidos con anticuerpos catalíticos o con polímeros, como el polietilenglicol (PEG), para aumentar su vida media y/o promover el autoensamblaje en partículas.

En algunas realizaciones, el objeto descrito actualmente proporciona una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un péptido descrito actualmente, o una variante funcional del mismo. En otras realizaciones, el objeto descrito actualmente proporciona un kit que comprende un péptido aislado descrito actualmente, o una variante funcional del mismo. La cantidad de péptido puede variar ampliamente, pero  
5 generalmente la cantidad es suficiente para realizar al menos uno de los procedimientos descritos actualmente.

Como se usa en esta invención, "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir, pero no se limita a, agua, solución salina, soluciones de dextrosa, albúmina sérica humana, liposomas, hidrogeles, micropartículas y nanopartículas. El uso de tales medios y agentes para composiciones farmacéuticamente activas es bien conocido en  
10 la técnica y, por lo tanto, no es necesario discutir aquí otros ejemplos y procedimientos para incorporar cada uno en composiciones a niveles efectivos. Dichas composiciones también pueden incluir recubrimientos, agentes antibacterianos y/o fúngicos, y cualquier otro ingrediente que sea biológicamente tolerable.

En general, la "cantidad efectiva" de un agente activo o dispositivo de administración de fármacos se refiere a la  
15 cantidad necesaria para obtener la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en esta materia, la cantidad efectiva de un agente o dispositivo puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente a administrar, la composición de la matriz de encapsulación, el tejido diana, y similares.

En general, un kit descrito actualmente contiene algunos o todos los componentes, reactivos, suministros y similares  
20 para practicar un procedimiento según el objeto divulgado actualmente. En un kit que comprende un péptido aislado o una variante funcional del mismo según el objeto descrito actualmente, el kit típicamente comprende una cantidad efectiva de péptido para prevenir, retrasar, reducir o tratar una enfermedad relacionada con la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis. En una realización, un kit comprende al menos un recipiente (por ejemplo, un vial, tubo o ampolla) que comprende un péptido aislado del objeto actualmente descrito.  
25 Típicamente, el péptido o péptidos aislados se suministrarán en uno o más recipientes, cada recipiente que contiene una cantidad eficaz de péptido aislado para permitir que ocurra un cambio en la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis.

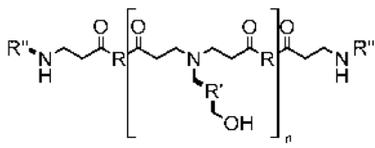
#### B. Plataformas de Administración Biodegradables Representativas

30 En algunas realizaciones, los péptidos descritos actualmente son efectivos cuando se cargan sobre o dentro de, o se asocian a, nanopartículas o micropartículas. En consecuencia, en algunas realizaciones, el objeto descrito actualmente proporciona una nanopartícula o una micropartícula que comprende un péptido descrito actualmente, o una variante funcional del mismo.

35 En realizaciones particulares, la nanopartícula o micropartícula comprende poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y/o PLGA-polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, aproximadamente 2% a aproximadamente 5% en masa del péptido aislado se carga en o dentro de nanopartículas o micropartículas de PLGA y/o PLGA-PEG. En otras realizaciones más, aproximadamente 6% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado se carga en o dentro  
40 de nanopartículas o micropartículas de PLGA y/o PLGA-PEG.

Además, en otras realizaciones, ciertas formulaciones de polímeros, micropartículas, nanopartículas y similares, que son adecuadas para usar con el objeto actualmente divulgado, se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT No. WO/2012/0128782 para "Polímeros Catiónicos Degradables Multicomponentes." Publicación  
45 de Solicitud de Patente Internacional PCT N° WO/2012/0114759 para "Sistemas de Administración de Péptidos/Partículas", Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N° WO/2014/066811 para "Pilo(beta-amino ésteres) reducibles para Administración de sira" y Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N° WO/2014/066898 para "Un Enfoque Capa por Capa para O-administrar ADN y sitiar a través de Puna: Una Plataforma Potencial para Modificar la Cinética de Administración", todo para Green y col., y cada uno de los cuales se incorpora  
50 aquí como referencia en su totalidad.

Como se usa en esta invención, el término "poli(beta-amino éster) (PBAE)" puede referirse a un compuesto de fórmula general:

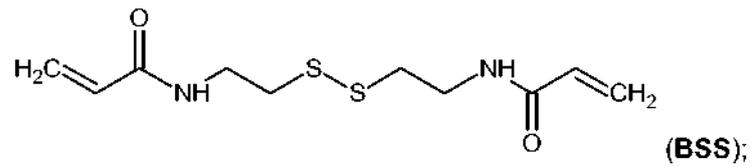
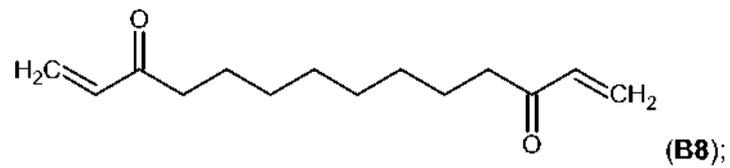
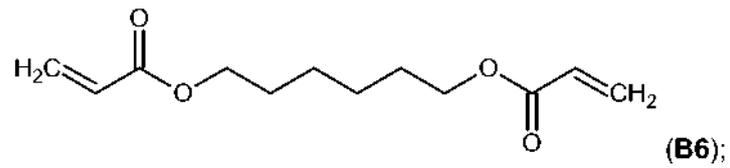
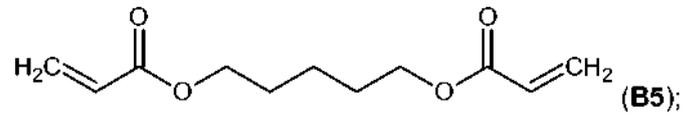
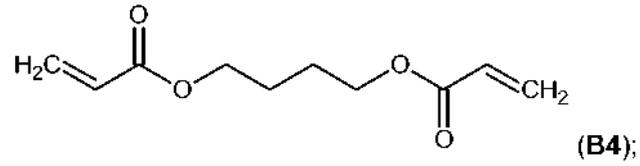
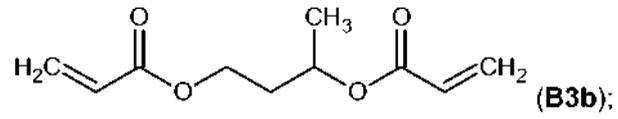
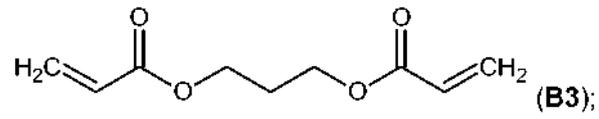


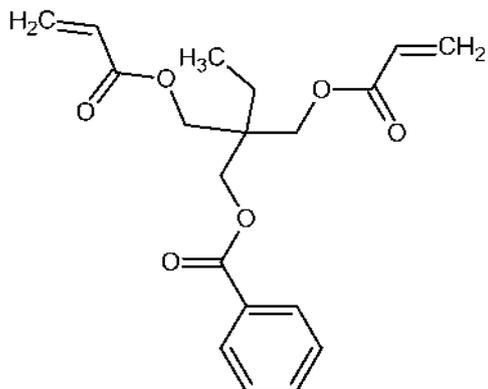
55

donde:

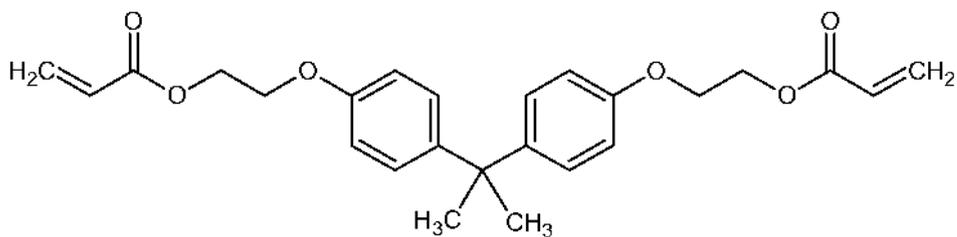
n es un número entero entre 1 y 10.000;

R comprende un eje central de un diacrilato seleccionado del grupo que consiste en:

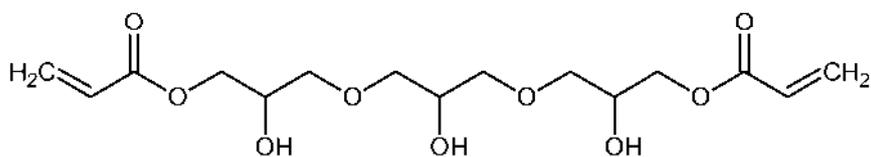




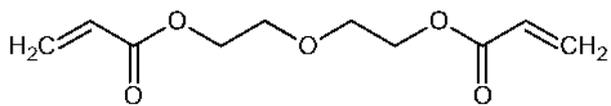
(BL1);



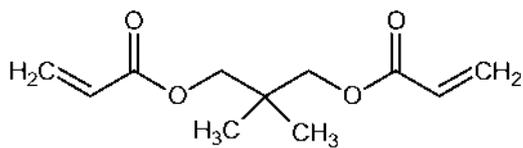
(BL2);



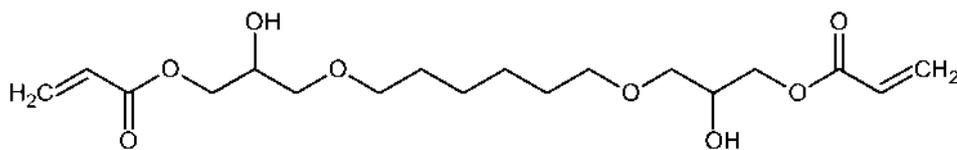
(BH1);



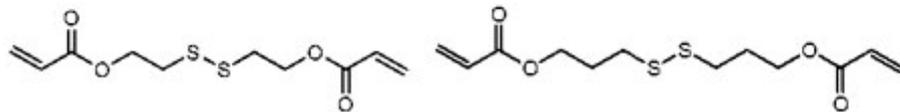
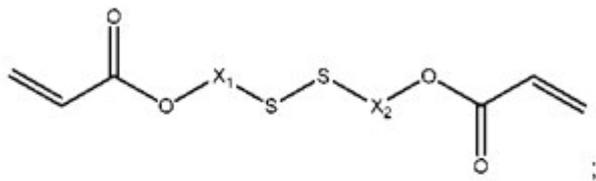
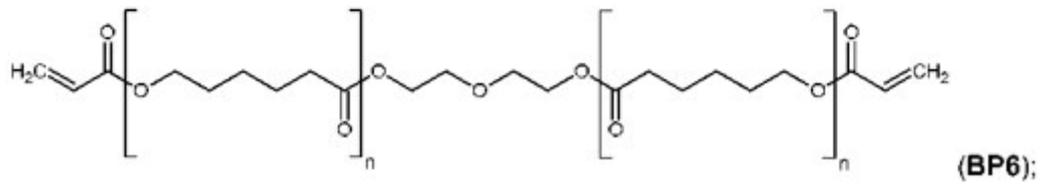
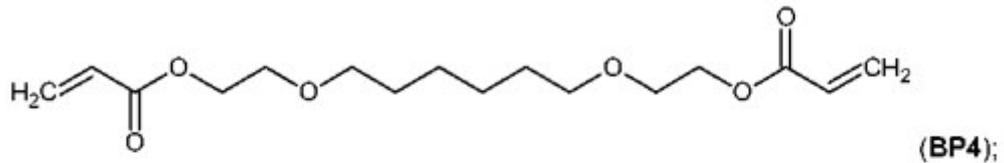
(BP1);



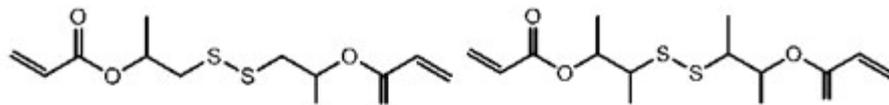
(BP2);



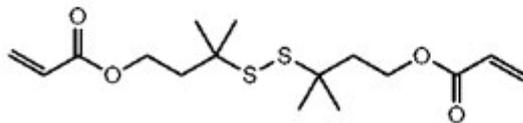
(BP3);



diaconato de 2,2'-disulfanodilbis(etano-2,1-dil); diacrilato de disulfanodilbis(propano-3,1-dil) ;



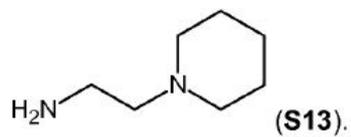
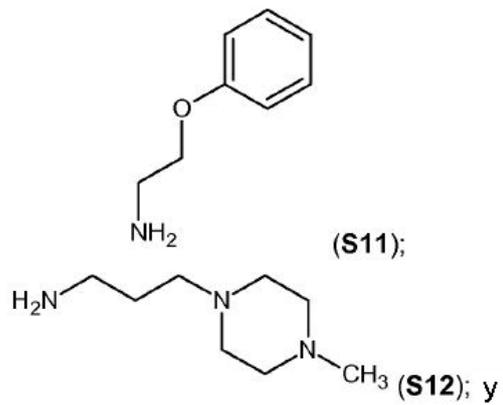
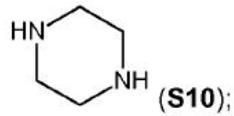
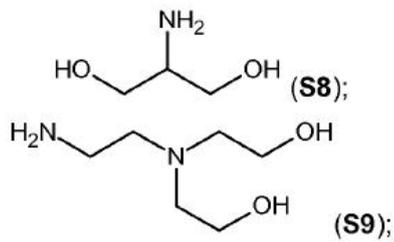
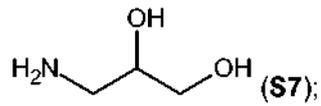
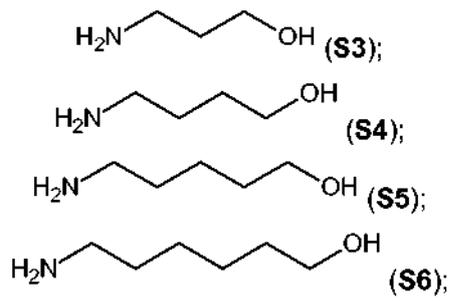
diacrilato de disulfanodilbis(propano-2,1-dil); diacrilato de disulfanodilbis(butano-3,2-dil);



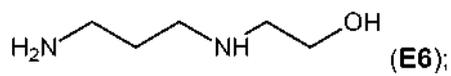
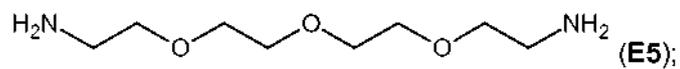
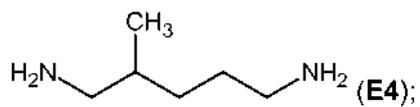
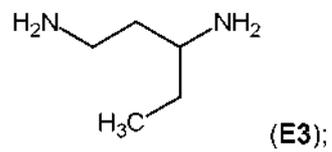
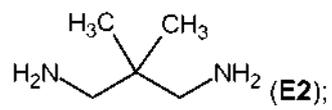
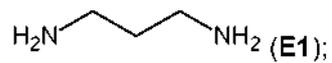
y diacrilato de isulfanediylbis(3-metilbutano-3,1-dil);

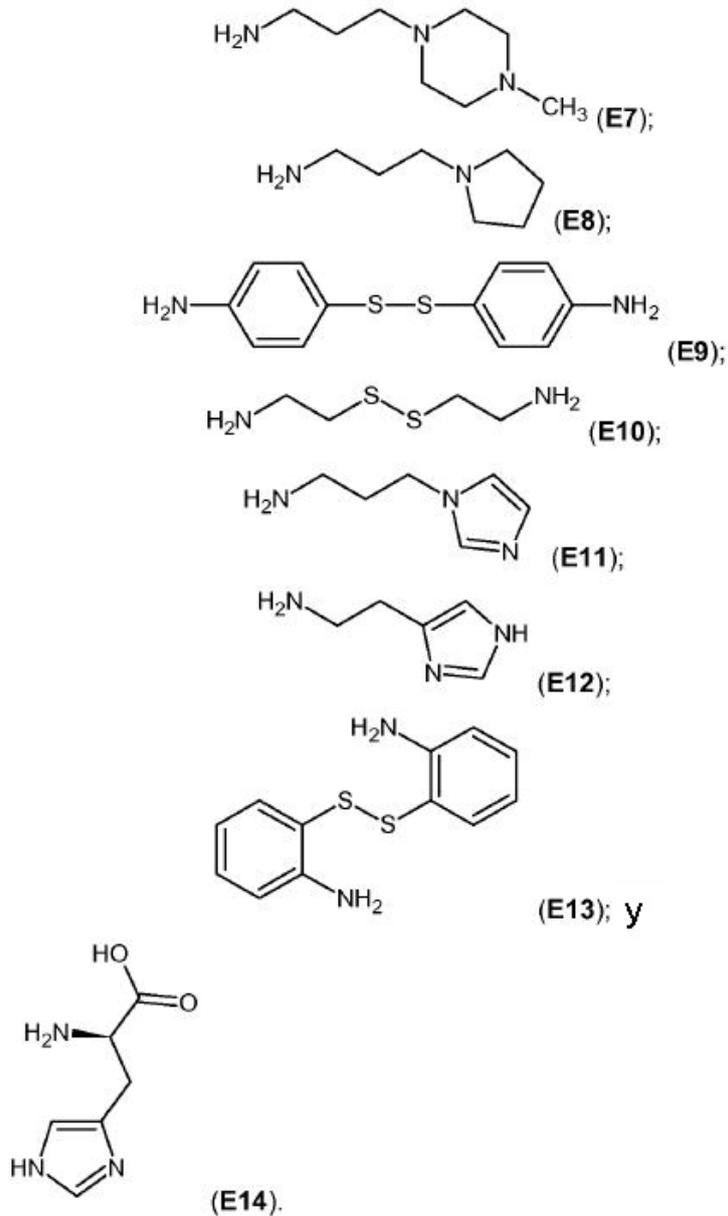
5

R' comprende una cadena lateral derivada de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



5 R" comprende un grupo final derivado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:





En tales realizaciones, las composiciones poliméricas pueden designarse como, por ejemplo, B6-S5-E7 o 657, en las que R es B6, R' es S5 y R'' es E7.

5

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la nanopartícula o micropartícula comprende un poli(beta-amino éster) (PBAE) y/o PBAE-PEG. En realizaciones particulares, la nanopartícula o micropartícula comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de las nanopartículas o micropartículas PBAE y/o PBAE-PEG. En otras realizaciones más, la nanopartícula o micropartícula comprende aproximadamente 6% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de las nanopartículas o micropartículas PBAE y/o PBAE-PEG.

En otras realizaciones más, la nanopartícula o micropartícula comprende una combinación de un poli(beta-amino éster) (PBAE), PLGA y PEG. En realizaciones particulares, la nanopartícula o micropartícula comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de partículas que

15

comprenden una combinación de un poli(beta-amino éster) (PBAE), PLGA y PEG. En otras realizaciones más, la nanopartícula o micropartícula comprende aproximadamente 6% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de partículas que comprenden una combinación de un poli(beta-amino éster) (PBAE), PLGA y PEG.

5

Como se usa en esta invención, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene al menos una dimensión en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm, incluido cualquier valor entero entre 1 nm y 1000 nm (que incluye aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 y 1000 nm y todos los enteros y enteros fraccionarios intermedios). En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene al menos una dimensión, por ejemplo, un diámetro, de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 200 nm. En otras realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 500 nm. En otras realizaciones más, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 1000 nm (1  $\mu\text{m}$ ). En tales realizaciones, la partícula también puede ser denominada como una "micropartícula". Por lo tanto, el término "micropartículas" incluye partículas que tienen al menos una dimensión en el intervalo de aproximadamente un micrómetro ( $\mu\text{m}$ ), es decir,  $1 \times 10^{-6}$  metros, a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ . El término "partícula" como se usa en esta invención pretende incluir nanopartículas y micropartículas. En algunas realizaciones, la micropartícula está entre 1-5  $\mu\text{m}$ . En otras realizaciones, la micropartícula es de 3-10  $\mu\text{m}$ . En algunas otras realizaciones, la micropartícula es de 10-20  $\mu\text{m}$ . En realizaciones adicionales, las micropartículas y nanopartículas tienen forma esférica. En otras realizaciones adicionales, las micropartículas y nanopartículas tienen una forma no esférica. En algunas realizaciones, las partículas tienen una forma elipsoidal con una relación de aspecto del eje largo al eje corto entre 2 y 10.

En algunas realizaciones, la micropartícula o nanopartícula tridimensional comprende un material que tiene una o más de las siguientes características: (i) uno o más enlaces degradables; (ii) un módulo extensible; y (iii) una temperatura de transición vítrea tal que el material que comprende la micropartícula o nanopartícula tridimensional es un sólido a temperatura ambiente y/o temperatura corporal. En otras realizaciones, el enlace degradable se selecciona del grupo que consiste en un enlace éster, un enlace disulfuro, un enlace amida, un enlace anhídrido y un enlace susceptible de degradación enzimática.

En realizaciones particulares, la micropartícula o nanopartícula comprende un polímero biodegradable o mezclas de polímeros seleccionados del grupo que consiste en poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(beta-amino éster) (PBAE), policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli-3-hidroxibutirato (P3HB) y poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). En otras realizaciones, polímeros no degradables que se usan en la técnica, tales como el poliestireno, se mezclan con un polímero degradable o polímeros de los mencionados anteriormente para crear un sistema de copolímero. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un polímero no degradable se mezcla con el polímero biodegradable.

Como se usa en esta invención, las composiciones "biodegradables" son aquellas que, cuando se introducen en las células, se descomponen por la maquinaria celular o por hidrólisis en componentes que las células pueden reutilizar o eliminar sin un efecto tóxico significativo en las células (es decir, menos de aproximadamente el 20% de las células mueren cuando los componentes son agregados a células *in vitro*). Los componentes preferiblemente no inducen inflamación u otros efectos adversos *in vivo*. En ciertas realizaciones preferidas, las reacciones químicas en las que se basa para descomponer las composiciones biodegradables no se catalizan.

En algunas otras realizaciones, la micropartícula o nanopartícula es biocompatible. El término "biocompatible", como se usa en esta invención, pretende describir composiciones que no son tóxicas para las células. Las composiciones son "biocompatibles" si su adición a las células *in vitro* da como resultado una muerte celular menor o igual al 20%, y su administración *in vivo* no induce inflamación u otros efectos adversos.

Un experto en la materia apreciará que las nanopartículas y micropartículas adecuadas para usar con los procedimientos descritos actualmente pueden existir en una variedad de formas, que incluyen, pero no se limitan a, esféricas, barras, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanoresortes, nanoanillos, partículas con forma de barra, partículas con forma de flecha, partículas con forma de lágrima, partículas con forma de tetrápodos, partículas con forma de prisma y una pluralidad de otras formas geométricas y no geométricas.

### 55 C. Términos Generales

Para mayor claridad, otros términos generales se describen a continuación. La identidad de secuencia se mide típicamente usando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, el Paquete de Software de Análisis de Secuencia de Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Dicho software puede hacer coincidir secuencias similares o idénticas asignando grados de homología a varias sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos:

glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, serina, treonina, lisina, arginina y fenilalanina, tirosina. En un enfoque ejemplar para determinar el grado de identidad, se puede utilizar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre  $e^{-3}$  y  $e^{-100}$  que indica una secuencia estrechamente relacionada.

5

La "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido incluye referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada, y pueden tomar en consideración adiciones, deleciones y sustituciones. Cuando se utiliza el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a las proteínas, se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos se sustituyen por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto, no cambian perjudicialmente las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de la secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en tales sustituciones conservadoras tienen similitud de secuencia. Los enfoques para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Típicamente, esto implica calificar una sustitución conservadora como un desajuste parcial en lugar de uno completo, aumentando así el porcentaje de identidad de la secuencia. Así, por ejemplo, cuando un aminoácido idéntico recibe una puntuación de 1 y una sustitución no conservadora recibe una puntuación de cero, una sustitución conservadora recibe una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo, según el algoritmo de Meyers and Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4: 11-17, 1988, por ejemplo, como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligentics, Mountain View, Calif., USA).

"Porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones, sustituciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo de base de ácido nucleico aminoácido idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

El término "identidad sustancial" u "homólogo" en sus diversas formas gramaticales en el contexto de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene la identidad deseada, por ejemplo, al menos 60% de identidad, preferiblemente al menos 70% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, en comparación con una secuencia de referencia que usa uno de los programas de alineación descritos usando parámetros estándar. Un experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse adecuadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de las secuencias de aminoácidos para estos fines normalmente significa una identidad de secuencia de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, 80%, 85%, 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%.

Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de una secuencia completa de ADNc o gen, o la secuencia completa de ADNc o gen. Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia de polipéptidos de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 5, 10 o 15 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 25 aminoácidos y aún más preferiblemente aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos o aproximadamente 150 aminoácidos.

## II. PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEPENDIENTES DE ANGIOGÉNESIS Y LINFANGIOGÉNESIS

### 55 A. Realizaciones Representativas

En algunas realizaciones, los péptidos descritos actualmente exhiben propiedades antiangiogénicas, antilinfangiogénicas, antitumorales y/o permeabilidad antivascular. La angiogénesis se refiere al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que se originan a partir de vasos sanguíneos existentes. La linfangiogénesis se refiere a la formación de vasos linfáticos de novo o de vasos linfáticos preexistentes, en un procedimiento que se cree que es similar al desarrollo de vasos sanguíneos o angiogénesis. La tumorigénesis se refiere a la formación de un tumor. La permeabilidad vascular se refiere a la propiedad de las paredes microvasculares sanguíneas, incluidas las paredes

capilares sanguíneas, que permite el intercambio selectivo de sustancias.

En algunas realizaciones, el objeto actualmente descrito proporciona un procedimiento para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis que afecta a una célula. El procedimiento comprende  
 5 poner en contacto una célula con un péptido aislado descrito actualmente o una variante funcional del mismo en una cantidad suficiente para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis de la célula. El contacto de la célula puede dar como resultado una inhibición de adhesión, migración, proliferación y/o formación de tubos que afectan a la célula. En una realización particular, la célula es una célula endotelial.

10 En otras realizaciones, el procedimiento para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis que afecta a una célula comprende: poner en contacto la célula con un péptido aislado, la secuencia de aminoácidos LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO: 1), en una cantidad suficiente para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis que afecta a la célula. En realizaciones adicionales, el contacto de la célula resulta en una inhibición de adhesión, migración, proliferación y/o formación de tubos que  
 15 afectan a la célula. En una realización particular, la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula endotelial, una célula microvascular y una célula linfática. En otras realizaciones, la célula se encuentra en el tejido adiposo y el procedimiento reduce o previene la obesidad. En otras realizaciones más, la célula es una célula trasplantada y el procedimiento reduce o evita el rechazo de tejidos y/u órganos después del trasplante de la célula. Por "trasplante de la célula", se entiende que la célula es movida de un cuerpo a otro cuerpo.

20 En algunas realizaciones, el péptido aislado es cargado en o dentro de una nanopartícula o una micropartícula antes de hacer contacto con la célula. En otras realizaciones, la nanopartícula o micropartícula comprende PLGA y/o PLGA-PEG.

25 Los procedimientos del objeto actualmente descrito se pueden practicar in vivo como un procedimiento terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno que implica angiogénesis, linfangiogénesis, permeabilidad vascular y/o tumorigénesis o como un procedimiento profiláctico para prevenir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis. Asimismo, el procedimiento se puede practicar in vitro como una herramienta de investigación para estudiar los efectos de la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad  
 30 vascular y/o la tumorigénesis en una célula. El procedimiento también se puede practicar ex vivo con fines terapéuticos o de investigación.

"Hacer contacto" significa cualquier acción que da como resultado que al menos un péptido aislado del objeto descrito actualmente contacte físicamente al menos una célula. Por lo tanto, esto puede comprender exponer la(s) célula(s) al  
 35 péptido aislado en una cantidad suficiente para dar como resultado el contacto de al menos un péptido aislado con al menos una célula. El procedimiento se puede practicar in vitro o ex vivo introduciendo, y preferiblemente, mezclando el péptido aislado y las células en un entorno controlado, tal como un plato o tubo de cultivo. El procedimiento se puede practicar in vivo, en cuyo caso el contacto significa exponer al menos una célula en un sujeto a al menos un péptido aislado del objeto actualmente descrito, tal como administrar el péptido aislado a un sujeto por cualquier vía  
 40 adecuada. Según el objeto divulgado actualmente, el contacto puede comprender introducir, exponer y similares, el péptido aislado en un sitio distante a las células a ser contactadas, y permitir las funciones corporales del sujeto, o naturales (por ejemplo, difusión) o movimientos de fluidos inducidos por el hombre (por ejemplo, remolinos) para dar como resultado el contacto del péptido aislado y la(s) célula(s).

45 En algunas realizaciones, el objeto actualmente descrito proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con angiogénesis, linfangiogénesis, permeabilidad vascular y/o tumorigénesis, o para prevenir o retrasar que un sujeto desarrolle una enfermedad relacionada con angiogénesis, linfangiogénesis, permeabilidad vascular y/o tumorigénesis, el procedimiento comprende: administrar al sujeto un péptido aislado  
 50 actualmente descrito, o una variante funcional del mismo, en una cantidad suficiente para tratar, retrasar o prevenir la enfermedad en el sujeto.

En realizaciones particulares, el objeto actualmente descrito proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis o para prevenir o retrasar que un sujeto desarrolle una enfermedad relacionada con la angiogénesis, la  
 55 linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis, comprendiendo el procedimiento: administrar al sujeto un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:1), en una cantidad suficiente para tratar, retrasar o prevenir la enfermedad en el sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto no es un ser humano.

60 Las enfermedades representativas incluyen aquellas enfermedades que dependen de la angiogénesis, la linfangiogénesis, la tumorigénesis y la permeabilidad vascular. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la

enfermedad es un cáncer. En otras realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, pulmón, glioblastoma, células renales, células hepáticas, cabeza y cuello. En otras realizaciones más, el procedimiento inhibe la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis en o alrededor de un tumor. En realizaciones adicionales, el tumor es un tumor primario o un tumor metastatizado establecido. En otras realizaciones adicionales, el procedimiento inhibe el establecimiento de metástasis o inhibe metástasis adicionales del cáncer. En otras realizaciones, el procedimiento inhibe la diseminación de células tumorales a través de la sangre y/o la vasculatura linfática.

En algunas realizaciones, el procedimiento inhibe la linfangiogénesis, la angiogénesis y/o la tumorigénesis perioperativamente para reducir o prevenir el rebrote tumoral y la metástasis. En otras realizaciones, el procedimiento inhibe la linfangiogénesis, la angiogénesis y/o la tumorigénesis postoperativamente, después de la extirpación quirúrgica completa o parcial del tumor primario, reduciendo o previniendo así el rebrote del tumor y la metástasis. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el procedimiento inhibe la linfangiogénesis, la angiogénesis y/o la tumorigénesis perioperativamente y/o postoperativamente.

En otras realizaciones adicionales, el procedimiento inhibe la linfangiogénesis, reduciendo o previniendo así el rechazo de tejidos y órganos después del trasplante, por ejemplo, con injertos de piel, injertos óseos y otros tejidos y órganos.

En algunas realizaciones, el procedimiento inhibe la angiogénesis y/o la linfangiogénesis en el tejido adiposo, reduciendo o previniendo así la obesidad.

En algunas realizaciones, la enfermedad está relacionada con la angiogénesis ocular o la retinopatía diabética. En otras realizaciones, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, glaucoma neovascular, retinopatía diabética proliferativa y retinopatía del prematuro.

En realizaciones adicionales, el péptido aislado se carga en o sobre una nanopartícula o una micropartícula antes de administrar al sujeto. En otras realizaciones más, la nanopartícula o micropartícula comprende PLGA y/o PLGA-PEG. En otras realizaciones, aproximadamente 2% a aproximadamente 5% en masa del péptido aislado se carga en o dentro de nanopartículas o micropartículas de PLGA. En otras realizaciones más, aproximadamente 6% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado se carga en o dentro de nanopartículas o micropartículas de PLGA y/o PLGA-PEG.

En algunas realizaciones, el péptido aislado se administra en combinación con al menos otro agente antiangiogénesis. En realizaciones particulares, al menos otro agente antiangiogénesis se selecciona del grupo que consiste en aflibercept, ranibizumab, bevacizumab y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el objeto descrito actualmente contempla el uso de los péptidos aislados en el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis, linfangiogénesis, tumorigénesis y/o permeabilidad vascular. El uso es en particular para procedimientos terapéuticos o profilácticos in vivo de inhibición de angiogénesis, linfangiogénesis, tumorigénesis y/o permeabilidad vascular. Ciertas realizaciones contemplan el uso de los péptidos aislados en la preparación de composiciones para uso médico, tales como composiciones farmacéuticas o terapéuticas. En general, el uso de los péptidos aislados es combinarlos con otras sustancias para hacer composiciones medicinales.

Los péptidos según la descripción son efectivos en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, en el tratamiento de humanos adultos, las dosis de 0,01 a 1000 mg, de 0,5 a 100 mg, de 1 a 50 mg por día y de 5 a 40 mg por día son ejemplos de dosis que pueden usarse. Una dosis no limitante es de 10 a 30 mg por día. La dosificación exacta dependerá de la vía de administración, la forma en que se administra el compuesto, el sujeto a tratar, el peso corporal del sujeto a tratar y la preferencia y experiencia del médico tratante.

#### *B. Términos Generales*

Por "enfermedad" se entiende cualquier condición, disfunción o trastorno que dañe o interfiera con la función normal de una célula, tejido u órgano.

Un "cáncer" en un animal se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de las células cancerígenas, por ejemplo, proliferación incontrolada, pérdida de funciones especializadas, inmortalidad, potencial metastásico significativo, aumento significativo de la actividad antiapoptótica, crecimiento y tasa de proliferación rápida y cierta morfología y marcadores celulares característicos. En algunas circunstancias, las células cancerosas tendrán la forma de un tumor; tales células pueden existir localmente dentro de un animal, o circular en el torrente sanguíneo como células independientes, por ejemplo, células leucémicas.

Por "formación de vasos sanguíneos" se entiende el proceso dinámico que incluye uno o más pasos de desarrollo y/o maduración de vasos sanguíneos, tales como angiogénesis, vasculogénesis, formación de una red de vasos

sanguíneos inmaduros, remodelación de vasos sanguíneos, estabilización de vasos sanguíneos, maduración de vasos sanguíneos, diferenciación de vasos sanguíneos o establecimiento de una red funcional de vasos sanguíneos.

5 Por "vasculogénesis" se entiende el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que se originan a partir de células madre, angioblastos u otras células precursoras.

Por "estabilidad de los vasos sanguíneos" se entiende el mantenimiento de una red de vasos sanguíneos.

10 Por "neoplasia" se entiende una enfermedad causada por o que resulta en niveles inapropiadamente altos de división celular, niveles inapropiadamente bajos de apoptosis, o ambos. Tumores sólidos, trastornos hematológicos y cánceres son ejemplos de neoplasias.

15 Un "tumor", como se usa en esta invención, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Como se usa en esta invención, los términos "tratar", "trato", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Se apreciará que, si bien no se excluye, tratar un trastorno o una afección no requiere que el trastorno, la afección o los síntomas asociados con estos se eliminen por completo.

20 Como se usa en esta invención, los términos "prevenir", "evitar", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a la reducción de la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto que no tiene, pero está en riesgo de o es susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

25 Por "reducir" se entiende una disminución en un parámetro (por ejemplo, formación de vasos sanguíneos) como detectado mediante procedimientos conocidos de la técnica estándar, tales como los descritos en esta invención. Como se usa en esta invención, reducir incluye un cambio del 10%, preferiblemente un cambio del 25%, más preferiblemente un cambio del 40% e incluso más preferiblemente un cambio del 50% o mayor.

30 El sujeto tratado por los procedimientos descritos actualmente en sus muchas realizaciones es deseablemente un sujeto humano, aunque debe entenderse que los procedimientos descritos en esta invención son eficaces con respecto a todas las especies de vertebrados, que están destinados a ser incluidos en el término "sujeto". En consecuencia, un "sujeto" puede incluir un sujeto humano para fines médicos, como el tratamiento de una afección o enfermedad existente o el tratamiento profiláctico para prevenir la aparición de una afección o enfermedad, o un sujeto animal para fines médicos o veterinarios, o fines de desarrollo. Los sujetos animales adecuados incluyen mamíferos  
35 que incluyen, pero no se limitan a, primates, por ejemplo, humanos, monos, simios y similares; bovinos, por ejemplo, ganado vacuno, bueyes y similares; ovinos, por ejemplo, ovejas y similares; caprinos, por ejemplo, cabras y similares; porcinos, por ejemplo, cerdos, puercos y similares; equinos, por ejemplo, caballos, burros, cebras y similares; felinos, incluidos gatos salvajes y domésticos; caninos, incluidos perros; lagomorfos, incluidos conejos, liebres y similares; y roedores, incluidos ratones, ratas y similares. Un animal puede ser un animal transgénico. En algunas realizaciones,  
40 el sujeto es un ser humano que incluye, pero no se limita a, sujetos fetales, neonatales, lactantes, juveniles y adultos. Además, un "sujeto" puede incluir un paciente afectado o sospechoso de estar afectado por una afección o enfermedad. Por tanto, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de forma intercambiable.

45 En aplicaciones terapéuticas y/o diagnósticas, las composiciones de la descripción pueden formularse para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>a</sup> ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Para ayudar en la biodisponibilidad, las composiciones de la descripción pueden administrarse en nanopartículas o micropartículas.

50 Las sales farmacéuticamente aceptables son generalmente bien conocidas por los expertos en la materia, y pueden incluir, a modo de ejemplo, pero sin limitación, acetato, bencenosulfonato, besilato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, carnisilato, carbonato, citrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicililarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato  
55 (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato o teoclatato. Otras sales aceptables farmacéuticamente se pueden encontrar en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>a</sup> ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, acetato, benzoato, bromuro, carbonato, citrato, gluconato, bromhidrato, clorhidrato, maleato, mesilato, napsilato, pamoato (embonato), fosfato, salicilato, succinato, sulfato o  
60 tartrato.

Dependiendo de las condiciones específicas a tratar, dichos agentes pueden formularse en formas de dosificación

líquidas o sólidas y administrarse sistémicamente o localmente. Los agentes pueden administrarse, por ejemplo, en una forma de liberación lenta temporizada o sostenida, como saben los expertos en la materia. Técnicas para formulaciones y administración se pueden encontrar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>a</sup> ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Las rutas adecuadas pueden incluir administración oral, bucal, spray por

5 inhalación, sublingual, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa, nasal o intestinal; administración parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraarticulares, intraesternales, intrasinoviales, intrahepáticas, intralesionales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intraoculares u otros modos de administración.

10 Para la inyección, los agentes de la descripción pueden formularse y diluirse en soluciones acuosas, tales como tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para dicha administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

15 El uso de vehículos inertes farmacéuticamente aceptables para formular las composiciones descritas en esta invención para la práctica de la descripción en dosis adecuadas para administración sistémica está dentro del alcance de la descripción. Con la elección adecuada del vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente descripción, en particular las formuladas como soluciones, pueden administrarse por vía parenteral, tal como por inyección intravenosa. Las composiciones pueden formularse fácilmente usando vehículos farmacéuticamente

20 aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración oral. Tales portadoras permiten que las composiciones de la descripción se formulen como tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto (por ejemplo, paciente) a ser tratado.

Para la administración nasal o por inhalación, los agentes de la descripción también pueden formularse mediante

25 procedimientos conocidos por los expertos en la materia, y pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, ejemplos de sustancias solubilizantes, diluyentes o dispersantes tales como, solución salina, conservantes, como alcohol bencílico, promotores de absorción y fluorocarbonos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente descripción incluyen composiciones donde

30 los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. La determinación de la cantidad eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente en vista de la descripción detallada proporcionada en esta invención.

Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos

35 farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de las composiciones activas en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de tabletas, grageas, cápsulas o soluciones.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener a través de la combinación de composiciones

40 activas con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio (scC) y/o

45 polivinilpirrolidona (PVP: povidona). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol,

50 polietilenglicol (PEG) y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que también pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión

55 hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con relleno como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, las composiciones activas pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles (PEG) líquidos. Además, se pueden agregar

60 estabilizadores.

Aunque en esta invención se emplean términos específicos, se usan solo en un sentido genérico y descriptivo y no

con fines de limitación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que pertenece el objeto actualmente descrito.

- 5 Después de una convención de derecho de patentes de larga data, los términos "uno", "una" y "el (la, los, las)" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Así, por ejemplo, la referencia a "un sujeto" incluye una pluralidad de sujetos, a menos que el contexto sea claramente contrario (por ejemplo, una pluralidad de sujetos), y así sucesivamente.
- 10 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos «comprender», «comprende» y «que comprende» se usan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario. Del mismo modo, el término "incluir" y sus variantes gramaticales están destinados a ser no limitativos, de modo que la recitación de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que se pueden sustituir o agregar a los elementos enumerados.
- 15 Para los propósitos de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, tamaños, dimensiones, proporciones, formas, formulaciones, parámetros, porcentajes, cantidades, características y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, son para entenderse como modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente"
- 20 aunque el término "aproximadamente" no aparezca expresamente con el valor, la cantidad o intervalo. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas no son ni necesitan ser exactos, pero pueden ser aproximados y/o mayores o menores según se desee, lo que refleja tolerancias, factores de conversión, redondeo, error de medición y similares, y otros factores conocidos por los expertos en la materia dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan
- 25 obtener por el objeto actualmente descrito. Por ejemplo, el término «aproximadamente», cuando se refiere a un valor, pretende abarcar variaciones de  $\pm 100\%$  en algunas realizaciones,  $\pm 50\%$  en algunas realizaciones,  $\pm 20\%$  en algunas realizaciones,  $\pm 10\%$  en algunas realizaciones,  $\pm 5\%$  en algunas realizaciones,  $\pm 1\%$  en algunas realizaciones,  $\pm 0,5\%$  en algunas realizaciones y  $\pm 0,1\%$  en algunas realizaciones de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son adecuadas para realizar los procedimientos descritos o emplear las composiciones descritas.
- 30 Además, el término "aproximadamente" cuando se usa en conexión con uno o más números o intervalos numéricos, debe entenderse que se refiere a todos esos números, incluidos todos los números en un intervalo y modifica ese intervalo al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. La recitación de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números, por ejemplo, todos los enteros, incluidas fracciones de los
- 35 mismos, incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, la recitación de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como fracciones de los mismos, por ejemplo, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 y similares) y cualquier intervalo dentro de ese intervalo.

#### EJEMPLOS

- 40 Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar orientación a un experto en la materia para practicar realizaciones representativas del objeto actualmente descrito. A la luz de la presente descripción y el nivel general de habilidad en la técnica, los expertos en la materia pueden apreciar que los siguientes ejemplos están destinados a ser solo ejemplares y que pueden ser empleados numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance del objeto divulgado actualmente. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo y no limitativo.

#### 45 EJEMPLO 1

##### Materiales y Procedimientos

- 50 *Crecimiento de Células en Cultivo Celular.* Para el crecimiento de células en cultivo celular, se adquirieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), células endoteliales microvasculares (MEC) y células endoteliales linfáticas (LEC) de Lonza y se mantuvieron según las recomendaciones del fabricante utilizando Medios Basales Endoteliales (EBM- 2) complementados con el Kit Bullet (EGM-2, Lonza). MEC y LEC se propagaron en Medio de Crecimiento Celular Endotelial Microvascular -2 (EGM-2MV, Lonza). Las células de cáncer de mama, MDA-MB-231
- 55 fueron suministradas por el Dr. Zaver Bhujwalla (JHMI, Radiología y Oncología). Las células se propagaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10% y antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1%). Las células se mantuvieron en condiciones estándar de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y los números de pasaje de todas las células usadas estaban entre 2 y 7.
- 60 *Síntesis de Péptidos* Los péptidos se sintetizaron usando síntesis en estado sólido y se suministraron como sales de TFA con un extremo C amidado y una amina en el extremo N (New England Peptide, Gardner, MA). La pureza de los péptidos fue > 95% y los proveedores proporcionaron la caracterización del producto (trazas de MALDI-TOF,

HPLC/MS y HPLC) como prueba de precisión de MW y pureza. Los péptidos se solubilizaron en DMSO al 5% y agua debido a su perfil hidrofóbico. Se comprobó el pH de los péptidos solubilizados y se encontró que estaba alrededor de pH 7. Para todos los experimentos, el% de DMSO se mantuvo en un umbral no tóxico (determinado por las curvas de toxicidad de DMSO en las células) con un porcentaje final de DMSO (<0,2%), que se utilizó como control en todos los experimentos.

5 *Ensayo de Proliferación.* Se realizó un ensayo de proliferación basado en colorimetría usando el reactivo de proliferación WST-1 (Roche, 11644807001) usando células HREC, células HUVEC y las células de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y SUM149. 2000 células/pocillo se colocaron en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, los medios se intercambiaron con medios completamente suplementados que contenían péptidos o vehículos DMSO equivalentes para los controles. Tres días después, los medios que contenían los péptidos se reemplazaron por medios EBM-2 sin suero que contenían reactivo WST-1 y las placas se incubaron durante cuatro horas según las recomendaciones del fabricante. Los cambios en el color, debido al colorante de formazán como resultado de la escisión de la sal de tetrazolio WST-1 por la succinato-tetrazolio reductasa mitocondrial, se leyeron en un lector de placa de fluorescencia Victor V (Perkin Elmer, MA) midiendo la absorbancia a 450 nm. Se crearon curvas de respuesta a la dosis del porcentaje de células vivas (en comparación con las células no tratadas, pero incubadas en medios completos con DMSO al 0,2%). Los ensayos se realizaron en al menos dos réplicas independientes y cada réplica se realizó utilizando tres triplicados experimentales.

20 *Ensayo de Migración.* El potencial inhibitorio de los péptidos se midió usando un sistema de ensayo de migración en tiempo real basado en la impedancia eléctrica (RT-CIM, ACEA Biosciences, CA). Las placas de 16 pocillos CIM (Roche, 05665817001) están compuestas por una cámara superior e inferior separadas por una membrana de policarbonato microporosa (8 µm). La membrana se revistió con fibronectina (20 µg/mL) y se agregaron 45.000 células/pocillo en medio libre de suero con o sin péptidos al compartimento superior. Se añadieron medios con 25 quimioatrayente (es decir, EBM-2 completamente suplementado) al compartimento inferior de la cámara y la placa se incubó a 37°C durante 20 horas. Los sensores integrados en la parte inferior del monitor de membrana registran continuamente los cambios de impedancia a medida que las células se mueven a través de la membrana. La tecnología RT-CIM permite una fácil cuantificación de la migración celular al monitorear el índice celular derivado de las impedancias medidas. Los ensayos se realizaron en al menos dos réplicas independientes y cada réplica se realizó utilizando dos duplicados experimentales. Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 no son adecuadas para los experimentos de tipo RT-CIM debido a su fenotipo alargado delgado, por lo que se investigó la inhibición de la migración utilizando un ensayo de tipo de cicatrización de heridas. Este ensayo se realizó utilizando el ensayo de Migración Oris Pro (Platypus Technologies, CMA 1.101). Brevemente, se agregaron 25.000 células/pocillo en medio completo a la placa de 96 pocillos que contiene tapones para bloquear la migración celular a la región central de los 35 pocillos. Se permitió que las células se adhirieran durante 4 horas, después de lo cual se retiraron los tapones. Las células se lavaron una vez con PBS y se añadieron a los pocillos medios completamente suplementados, con o sin compuesto. Después de 18 horas, las células se tiñeron con calceína AM (0,5 µg/mL) (Invitrogen, CA) y se tomaron imágenes de las células que migraron al centro del pocillo usando un microscopio Nikon (Eclipse T-100); las imágenes se adquirieron con el CCD Sencicam montado en un microscopio Nikon (Cooke Company, MI). La detección de las 40 células que migraron a la región previamente restringida fue posible debido a la adición de una máscara de detección en la parte inferior de la placa, que obstruyó de ser medidas las células que no migraron.

*Ensayo de Cicatrización de Herida* Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 no son adecuadas para los experimentos de tipo RT-CIM debido a su fenotipo alargado delgado, por lo que se investigó la inhibición de la migración utilizando un ensayo de tipo de cicatrización de heridas. Este ensayo se realizó utilizando el ensayo de Migración Oris Pro (Platypus Technologies, CMA 1.101). Brevemente, se agregaron 25.000 células/pocillo en medio completo a la placa de 96 pocillos que contiene tapones para bloquear la migración celular a la región central de los pocillos. Se permitió que las células se adhirieran durante 4 horas, después de lo cual se retiraron los tapones. Las células se lavaron una vez con PBS y se añadieron a los pocillos medios completamente suplementados, con o sin 50 compuesto. Después de 18 horas, las células se tiñeron con calceína AM (0,5 µg/mL) (Invitrogen, CA) y se tomaron imágenes de las células que migraron al centro del pocillo usando un microscopio Nikon (Eclipse T-100); las imágenes se adquirieron con el CCD Sencicam montado en un microscopio Nikon (PCO-TECH, Inc., Romulus, MI). La detección de las células que migraron a la región previamente restringida fue posible debido a la adición de una máscara de detección en la parte inferior de la placa, que obstruyó de ser medidas las células que no migraron.

55 *Ensayos de Adhesión* Similar a los ensayos de migración, la actividad de inhibición del péptido en la adhesión celular se evaluó utilizando la tecnología RT-CIM. En este caso, 25.000 células/pocillo se sembraron en placas E de 16 pocillos (Roche, Basilea Suiza) en presencia o ausencia del péptido. La adhesión se controló con el tiempo (3 horas) midiendo los cambios en la impedancia eléctrica, que es una medida directa de las células que se adhieren a los 60 electrodos. Los ensayos se realizaron en al menos dos réplicas independientes y cada réplica se realizó utilizando dos duplicados experimentales.

- Ensayos de Inhibición de Formación de Tubos.* Las composiciones también se probaron por su capacidad para inhibir la formación de tubos, un proceso crítico en la angiogénesis. Las células endoteliales forman espontáneamente una red de tubos cuando se colocan en placas en extractos de matriz extracelular. Este ensayo in vitro combina aspectos de adhesión y migración y se usa de forma rutinaria en la investigación de la angiogénesis (Oliveira-Ferrer y col., 2008). La capacidad de inhibir la formación de tubos es una evaluación exhaustiva del potencial antiangiogénico. El protocolo fue descrito por Arnaoutova y col. (2009) y consiste en colocar HUVEC en la parte superior del extracto de membrana basal. Después de la incubación a 37°C, las células se reorganizan naturalmente en una red de tubos. Así, 50 µL/pocillo de Matrigel (BD Biosciences, San José, CA) se colocaron en una placa fría de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 30 minutos para polimerización. Se agregaron 15.000 células/pocillo a la parte superior del gel y se incubaron en medio completo en presencia o ausencia de péptido durante 19 horas. Se capturaron imágenes usando el CCD Senciscam montado en un microscopio Nikon (Eclipse T-100). Los ensayos se realizaron en al menos dos réplicas independientes y cada réplica se realizó utilizando tres réplicas experimentales y se adquirió una imagen de un campo elegido al azar por pocillo.
- 15 *Xenoinjertos Tumoraes.* Tumores mamarios ortotópicos fueron iniciados en ratones SCID usando células humanas de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. Se inyectaron  $2 \times 10^6$  células por 100 µl de alícuota de suspensión de células individuales en la almohadilla de grasa mamaria de la mama. Los tumores alcanzaron volúmenes de 75-100 mm<sup>3</sup> en aproximadamente 14-21 días. Los ratones se asignaron al azar y se organizaron en grupos (8 ratones por grupo) con volúmenes tumorales similares (sin diferencia estadística entre los promedios) y se inició el tratamiento.
- 20 El péptido se administró una vez al día por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 10 mg/kg. Los tumores se midieron cada cuatro días usando calibradores y el volumen del tumor se calculó usando la fórmula  $V = ab^2/2$ , donde "a" es el diámetro más grande y "b" es el diámetro más pequeño.

- Modelo de Metástasis Inducido por TCM.* Antes de la inoculación del tumor, los ratones desnudos atímicos (hembras 5-6 semanas, 18-20 g) fueron tratados con 50 µL de TCM o SFM por vía subcutánea a través del pescuezo durante 2 semanas. Después de 2 semanas de tratamiento con TCM, se establecieron xenoinjertos tumorales MDA-MB-231-luc-D3H2LN en los mismos animales; las células ( $2 \times 10^6$ ) se mezclaron con 50 µL de medio completo (RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%) y 50 µL de Matrigel (High Concentrated, BD Biosciences) y se inyectaron en la almohadilla de grasa mamaria inguinal superior de los animales bajo anestesia (50 mg/kg de ketamina + 5 mg/kg de acepromacina en PBS, 50 µL/animal, dosificado por vía intraperitoneal). El tamaño del tumor primario se midió usando un calibrador, y se calculó el volumen w, usando la fórmula:  $V = 0,52 \times a \times b^2$ , donde "a" es el eje largo, y "b" es el eje corto del tumor. También se tomaron imágenes de los animales todas las semanas para rastrear metástasis tumorales anteriores, usando la cámara óptica IVIS Xenogen 200 (Xenogen, Alameda, CA) después de la inyección intraperitoneal de d-luciferina (Caliper 150 mg/kg). Se administraron 100 µl de D-luciferina (dos veces diluida) por vía intraperitoneal en ambos lados del abdomen (total de 200 µl/animales) para prevenir falla de inyección i.p. Después de 4 semanas, los GL (ganglios linfáticos) axilares y braquiales, los pulmones y el cerebro se recogieron y se bañaron en solución de D-luciferina durante 3 minutos y se colocaron en el generador de imágenes IVIS para detectar metástasis ex vivo. El flujo de fotones mediado por luciferasa se cuantificó utilizando el Análisis 3D Living Image® (Xenogen), y el flujo de fotones promedio se obtuvo de ocho pulmones, ocho cerebros y 14-16 GL como se describió anteriormente. En el caso de animales que muestran metástasis intraabdominales, se obtuvieron imágenes ex vivo de órganos abdominales, incluyendo estómago, bazo, riñón, hígado e intestino, utilizando el generador de imágenes IVIS.

- Modelo de Ratón de Neovascularización Coroidea (CNV).* La ruptura inducida por fotocoagulación con láser de la membrana de Bruch fue utilizada para generar CNV. Brevemente, se anestesiaron ratones hembra C57BL/6J de 4-5 semanas de edad con clorhidrato de xilazina (10 mg/kg) y clorhidrato de ketamina (50 mg/kg) y las pupilas se dilataron con tropicamida al 1% (Alcon Labs, Inc., Forth Worth, TX, EUA). Se administraron tres quemaduras de fotocoagulación con láser de diodo de 532 nm (tamaño de punto de 75 µm, duración de 0,1 s, 120 mW) a cada retina utilizando el sistema de suministro de lámpara de hendidura de un Fotocoagulador OcuLight GL (Iridex, Mountain View, CA, EUA) y un slide de cubierta sujeto a mano como lente de contacto. Las quemaduras se realizaron en las posiciones 9, 12 y 3 en punto del polo posterior de la retina. La producción de una burbuja en el momento de la fotocoagulación con láser, que indica la ruptura de la membrana de Bruch, es un factor importante para obtener CNV, por lo que solo se incluyeron en el estudio quemaduras en las que se produjo una burbuja. Los tratamientos se iniciaron siete días después de la fotocoagulación con láser e incluyeron inyecciones intravítreas de 0,1% de SP2043 (SEQ ID NO: 1) (1 µg en un volumen de 1 µL), 1% (10 µg en un volumen de 1 µL de SP2043 (SEQ ID NO: 1)) o vehículo bajo un microscopio de disección con un Sistema de Microinyección de Bomba Harvard (Harvard Apparatus, Holliston, MA) y micropipetas de vidrio extraídas. Algunos ratones fueron sacrificados para la medición de referencia. Catorce días después del láser, los ratones restantes se usaron para medir la cantidad de CNV en los sitios de ruptura de membrana de Bruch. Dos semanas después de la ruptura de la membrana de Bruch, los ratones fueron anestesiados y perfundidos con dextrano marcado con fluoresceína ( $2 \times 10^6$  de peso molecular promedio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y se prepararon soportes planos coroidales como se describió anteriormente. Brevemente, se retiraron los ojos, se fijaron durante 1 hora en formalina tamponada con fosfato al 10%, y se retiraron la córnea y el cristalino. La retina entera se diseccionó cuidadosamente de la ocular, y luego se hicieron cortes radiales desde el borde de la

ocular hasta el ecuador en los cuatro cuadrantes y se montaron de forma plana en Aquamount (Polysciences, Warrington, PA). Los soportes planos se examinaron mediante microscopía de fluorescencia con un microscopio Axioskop (Zeiss, Thornwood, NY, EUA) y las imágenes se digitalizaron con una cámara de video en color de 3 CCD (IK-TU40A, Toshiba, Tokio, Japón) y un capturador de fotogramas. Se usó el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) para medir el área de cada lesión de CNV. Las comparaciones estadísticas se realizaron con ANOVA y Bonferroni.

*Modelo de Regresión CNV.* Las membranas de Bruch de ambos ojos de los ratones C57BL/6J se rompieron con un láser después de anestesiarse a los ratones y dilatar sus pupilas con tropicamida al 1%. Siete días después, algunos ratones fueron sacrificados para establecer la neovascularización basal. En ese momento, se administró 1 µg de SP2043 (SEQ ID NO: 1) en un ojo y vehículo en el ojo asociado de otros ratones. Siete días después, todos los animales fueron perfundidos con dextrano marcado con fluoresceína, se les extrajeron los ojos, se diseccionó la retina y se montó sobre una superficie plana después de realizar cortes radiales, y se midió la fluorescencia. Las imágenes se digitalizaron utilizando una cámara de video con dispositivo de carga de 3 colores y un capturador de fotogramas y el área de hipervascularización se cuantificó mediante un software de análisis de imágenes.

*Ratones transgénicos con neovascularización inducida por VEGF.* En el día posnatal 14, se administró a ratones hemizigotos rho/VEGF una inyección intraocular de 1 µL de DMSO al 5%/agua, 1 µL de DMSO al 5%/agua que contenía 0,1 µg o 1 µg de SP2043 (SEQ ID No: 1) en uno ojo. Las inyecciones intraoculares se realizaron bajo un microscopio de disección con un sistema de microinyección Harvard Pump Micro (Harvard Apparatus, Holliston, MA) y micropipetas de vidrio extraídas. En el día 21 posnatal, se cuantificó el área total de neovascularización subretiniana (NV) por ojo. Brevemente, los ratones fueron anestesiados y perfundidos con 1 ml de PBS que contenía 25 mg/ml de dextrano marcado con fluoresceína (peso molecular promedio de  $2 \times 10^6$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se retiraron los ojos y se fijaron durante 1 hora en formol tamponado con fosfato al 10%. Se retiraron la córnea y el cristalino, y se diseccionó cuidadosamente toda la retina del ocular, se cortó radialmente desde el borde de la retina hasta el ecuador en los 4 cuadrantes y se montó en forma plana en medio de montaje (Aquamount; Polysciences, Warrington, PA) con fotorreceptores hacia arriba. Las retinas se examinaron por microscopía de fluorescencia con un aumento de 200 ×, lo que proporciona una profundidad de campo estrecha de modo que cuando se enfoca en NV en la superficie externa de la retina, el resto de los vasos retinianos están desenfocados, lo que permite una fácil delineación de la NV. El borde externo de la retina, que corresponde al espacio subretiniano in vivo, se identifica fácilmente y, por lo tanto, existe una estandarización del plano focal de slide a slide. Las imágenes se digitalizaron usando una cámara de video en color de 3 dispositivos acoplados cargados (CCD) y un capturador de fotogramas. Mediante el uso del software de análisis de imágenes (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD), un investigador enmascarado con respecto al grupo de tratamiento permitió que el software reconociera y calculara el área total de NV subretiniana por ojo como se describió anteriormente.

*Permeabilidad vascular de ojos de ratón:* Los ratones fueron inyectados intravítreamente con 1 µg de SP2043 (SEQ ID NO: 1) en un ojo, y el vehículo en el ojo asociado y el vehículo de control fue inyectado en el otro ojo de ratones adultos Tet/Opsin/VEGF doblemente transgénicos. Tres días después, los ratones recibieron 2 mg/ml de doxiciclina en el agua potable durante 3 días. En ese momento los animales fueron anestesiados y sus pupilas dilatadas como para la fundoscopia estándar. Se examinaron los ojos para comparar el número de animales que tenían desprendimientos de retina bajo los dos tratamientos mediante imágenes de fondo de ojo usando imágenes de retina Micron II e imágenes de tomografía de coherencia óptica usando protocolos publicados.

*Medición de la permeabilidad vascular en ojos de conejo:* En el día 0, se inyectó el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1; 50 µg) en el vítreo de conejo pigmentado con cinturón holandés y se inyectó el vehículo en el ojo asociado. En el día 3, se inyectaron 50 µg de VEGF (humano) en ambos ojos. El día 10, se inyectó fluoresceína sistémicamente en los conejos y 2 h más tarde se midió la fluorescencia de 5 mm a 8 mm delante de la retina mediante un fluorofotomero ocular Fluoroton Master FM-2.

*Materiales para formulaciones peptídicas:* PLGA [poli(D, L-lactida-co-glicólido)]; tres formulaciones: lactida: glicólido (65:35), MW 40,000-75,000; lactida: glicólido (72:25), MW 76,000-115,000; lactida: glicólido (85:15), MW 190,000-240,000], DCM [diclorometano], DMSO [dimetilsulfóxido] y DMF [N, N-dimetilformamida] se compraron de Sigma (St. Louis, MO). PVA [poli(alcohol vinílico); Mw 25.000] fue comprado de Polysciences (Warrington, PA). PLGA-PEG [metoxi poli(etilenglicol)-b-poli(lactida-co-glicólido)]; PEG: PLGA 5:20 kDa; 1:1 LA:GA) se adquirió de PolySciTech (West Lafayette, IN). PBAE [Poli(beta-amino éster)s] se sintetizaron como se describió previamente. Tampón NaAc (pH = 5) [tampón de acetato de sodio] se adquirió de Invitrogen (Grand Island, NY).

*Micropartículas de PLGA cargadas con péptido.* El PLGA se disolvió primero en DCM, a la concentración deseada (generalmente 20 mg/ml o 40 mg/ml), en un tubo de ensayo y se agitó vorticialmente para disolverlo completamente. El stock de péptidos en DMSO (usualmente 20 mg/mL) se micropipetó a la solución PLGA/DCM. La relación de masa de péptido a PLGA puede variar; una formulación común es 1:50 péptido:PLGA. Para micropartículas en blanco, solo

se usó un volumen equivalente de pipeta de DMSO. La mezcla se sonicó con el tubo de ensayo en hielo. La sonicación se realizó con una configuración de amplitud de '30', que equivalía aproximadamente a 5-10 W, durante 20 segundos. Esta emulsión primaria se vertió inmediatamente en 50 ml de solución de PVA al 1% y se homogeneizó a 3,6-3,8 krpm durante 1 minuto. Luego se transfirió el volumen completo a 100 ml de solución de PVA al 0,5% y se agitó en una campana química durante 3 horas. Se realizaron tres pasos de lavado. Para cada etapa de lavado, la solución de micropartículas se centrifugó a 4°C, 4 krpm, durante 5 minutos, y luego se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 40 ml de agua refrigerada, el gránulo de micropartículas se resuspendió y se repitieron los pasos de lavado. Después de la última etapa de centrifugación, se añadieron 5 ml de agua para resuspender la muestra. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se colocaron inmediatamente en un liofilizador. Después de la liofilización, todas las micropartículas se almacenaron a -20°C.

*Nanopartículas de PLGA cargadas con péptido:* El PLGA se disolvió primero en DCM, a la concentración deseada (generalmente 20 mg/mL o 40 mg/mL), en un tubo de ensayo y se agitó vorticialmente para disolverlo completamente. El stock de péptidos en DMSO (usualmente 20 mg/mL) se micropipetó a la solución PLGA/DCM. La relación de masa de péptido a PLGA puede variar; una formulación común es 1:50 péptido:PLGA. Para micropartículas en blanco, solo se usó un volumen equivalente pipeteado de DMSO. La mezcla se sonicó con el tubo de ensayo en hielo. La sonicación se realizó con una configuración de amplitud de '30', que equivalía aproximadamente a 5-10 W, durante 20 segundos. Esta emulsión primaria se vertió inmediatamente en 50 ml de solución de PVA al 1% y se sonicó a una configuración de amplitud de '60' durante 2 minutos. Luego se transfirió el volumen completo a 100 ml de solución de PVA al 0,5% y se agitó en una campana química durante 3 horas. Se realizaron tres pasos de lavado. Para cada etapa de lavado, la solución de micropartículas se centrifugó a 4°C, 17 krpm, durante 10 minutos, y luego se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua refrigerada, el gránulo de micropartículas se resuspendió y se repitieron los pasos de lavado. Después de la última etapa de centrifugación, se añadieron 5 ml de agua para resuspender la muestra. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se colocaron inmediatamente en un liofilizador. Después de la liofilización, todas las micropartículas se almacenaron a -20°C.

*Nanopartículas PLGA-PEG cargadas con péptido.* PLGA-PEG, PLGA-PEG-maleimida, o PLGA-PEG-conjugado a un ligando se disolvió primero en DMF a 10 mg/mL (u otra concentración deseada). Luego se añadió péptido (2043, 2043-IRD800; stocks a 20 mg/mL en DMF) a PLGA-PEG para el péptido final w/w% de 2% (u otra proporción deseada). Para nanopartículas en blanco, solo se agregó un volumen equivalente de DMF a PLGA-PEG. La solución PLGA-PEG/péptido/DMF se añadió gota a gota al agua Milli-Q girando en una placa de agitación para una relación de volumen final de orgánico:acuoso a 1:10. La mezcla se centrifugó bajo una campana química durante 4 horas. Las partículas se lavaron dos veces usando tubos de centrifuga Amicon Ultra-15 (Millipore) a 4°C, durante 10 minutos cada vuelta. Las partículas concentradas se almacenaron en agua a 4°C o se liofilizaron con diferentes cantidades de sacarosa (Sigma-Aldrich).

*Complejos polímero-péptido:* Cada tipo de polímero (PBAEs) y péptido (SP2043; SEQ ID NO: 1) se diluyó en tampón de NaAc a concentraciones variables dependiendo de las proporciones de masa deseadas de PBAE:2043 (de 1:1 a 100:1). La solución de PBAE se pipeteó a la solución 2043 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las partículas se caracterizaron por Análisis de Seguimiento de Nanopartículas Nanosight, Dispersión Dinámica de Luz y/o Microscopía Electrónica de Transmisión.

*Caracterización de partículas PLGA y PLGA-PEG:* Para el dimensionamiento, las micropartículas o nanopartículas se diluyeron primero a 1 mg/mL en agua o PBS y luego se clasificaron mediante DLS, NTA, SEM o TEM apropiado. Para carga, las partículas se disolvieron primero en DMSO. Para parte de la muestra, la muestra de DMSO se añadió a un volumen acuoso mayor para precipitar el PLGA. Para el péptido marcado, se usó un lector de placas Biotek Synergy 2 para medir la fluorescencia de las muestras y de un estándar de péptido marcado solamente. Para las muestras 2043 no marcadas, se usó PAGE y tinción con plata para cuantificar el péptido.

*Imágenes SEM de micropartículas y cuantificación de Imagen:* Las partículas liofilizadas se colocaron en cinta de carbono (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) y se colocaron en soportes de aluminio. Las muestras se pulverizaron con oro-paladio, y las imágenes SEM se realizaron con un LEO/Zeiss FESEM (Johns Hopkins School of Medicine).

## 55 EJEMPLO 2

### Péptido SP2043 (SEQ ID NO:1)

Se descubrió que el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) inhibe la proliferación, migración y adhesión de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC; FIG. 1) y de las células endoteliales de la retina (HREC; FIG. 2). Además, se descubrió que el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) (25 µM) inhibe la formación del tubo de HUVEC (FIG. 3, Paneles A y B) y la formación del tubo de células endoteliales microvasculares (MEC) (FIG. 3, Paneles C y D).

Además, se descubrió que el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) inhibe la adhesión de células endoteliales linfáticas (LEC; FIG. 4) y la formación de tubos de LEC (FIG. 5).

También se encontró que el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) inhibe la señalización del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1) in vitro en células MEC y LEC (FIG. 6). Además, se encontró que el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) inhibe la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y SUM149, así como la línea celular positiva de receptor de estrógeno MCF-7 in vitro (FIG 7). Además, se descubrió que el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) inhibía la señalización de HGF en células MDA-MB-231 (FIG. 8).

El péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) también mostró inhibición in vivo al inhibir el crecimiento de tumores ortotópicos MDA-MB-231 en ratones SCID (FIG. 9). 33 días después de la inyección del péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) en los ratones, el crecimiento de los tumores se inhibió aproximadamente en un 82% (usando 20 mg de SP2043/kg con una inyección intraperitoneal). El péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) también inhibió la fosforilación de c-Met y la angiogénesis in vivo (FIG. 10). El péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) inhibió la angiogénesis como se ve por la tinción con lectina para inmunohistoquímica (IHC) y la linfangiogénesis como se ve por la tinción con LYVE-1 in vivo (FIG. 11). SP2043 inhibió la metástasis de los tumores MDA-MB-231-luc a múltiples órganos en el modelo de metástasis pretratada con medios tumorales condicionados por el flujo de fotones de las células tumorales (FIG. 12A). El péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) también inhibió la metástasis de los tumores MDA-MB-231-luc a los ganglios linfáticos como se ve al teñir con anticuerpo de vimentina para la presencia de células humanas (FIG. 12B).

El efecto del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) también se observó en modelos oculares de enfermedades oculares humanas como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), el edema macular (ME) y el edema macular diabético (DME). El péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) inhibió la neovascularización en un modelo de neovascularización coroidea inducida por láser (CNV) más potente que aflibercept (FIGS. 13A-B), así como en un modelo de ratón rho-VEGF en comparación con un control (FIGS 13C-E). Además, el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) provocó la regresión de la neovascularización en un modelo de CNV inducido por láser en el ojo de ratón (FIG. 14). Además, el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) inhibió la fuga vascular en el modelo de ratón Tet/Opsin/VEGF (FIGS. 15A-B). Además, el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) inhibió la permeabilidad vascular mediada por VEGF en el ojo de conejo (FIG. 16).

EJEMPLO 3

#### Péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) en Micropartículas

Los péptidos aislados descritos actualmente pueden formularse y usarse en micropartículas o en nanopartículas. El péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) se formuló en micropartículas de PLGA para permitir la liberación sostenida a largo plazo y se mostró mediante imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) (2% de carga; FIG. 17). La FIG. 18A muestra un ejemplo representativo del tamaño de micropartículas de PLGA cargadas con SP2043 al 2% y 5%. El tamaño de las micropartículas se midió con ImageJ (Rasband, 1997-2012) de imágenes de SEM. Los resultados mostraron que la carga con el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) no afecta significativamente la distribución del tamaño de partícula. En algunas realizaciones, se usa aproximadamente 2% a 5% de PLGA cargado de péptido en los procedimientos descritos actualmente. Para uso in vivo, el 5% en masa de péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) es equivalente a 1 µg de péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) en 1 µL de solución de micropartículas inyectadas. Se midieron los potenciales zeta (carga superficial) de micropartículas cargadas con péptido SP2043 al 2% y 5% (SEQ ID NO: 1) en un Zetasizer Malvern (Malvern Instruments, Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido; FIG. 18B). Los resultados no mostraron diferencias significativas en la carga superficial entre el control (blanco) y las micropartículas cargadas con péptido.

La liberación controlada de un análogo peptídico marcado del péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) de micropartículas de PLGA se observó durante seis meses en condiciones fisiológicas in situ (PBS a 37°C; FIG. 19). Adicionalmente, también se observó la liberación controlada del péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) sin ninguna marca o modificación en micropartículas de PLGA *in situ* bajo condiciones fisiológicas (FIG. 20);

La FIG. 21 muestra imágenes de SEM de micropartículas de PEGA que incorporan 2% en peso de péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) (izquierda) y 5% en peso de 2043 (derecha). El péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) también se puede encapsular en nanopartículas y estas partículas (micro o nano) pueden tener diferentes formas no esféricas, tales como formas elipsoidales y esféricas (FIG. 22).

La micropartícula PLGA 85/15 que encapsula el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) causó la regresión en ojos de ratón después de la neovascularización coroidea inducida por láser en un modelo de ratón (FIG. 23); Además, estas micropartículas inhibieron el tiempo extra de neovascularización en un modelo de ratón AMD húmedo inducido por láser (FIG. 24). Las micropartículas PLGA 85/15 que encapsulan 2043 mostraron eficacia durante al menos 3 meses

in vivo después de una única inyección intravítrea.

Las micropartículas PLGA 65/35 que contienen el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) inhibieron el tiempo extra de neovascularización en un modelo de ratón AMD húmedo inducido por láser (FIG. 25). La inhibición de la neovascularización por el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) también se observó en un modelo de conejo (FIG. 26).

La FIG. 27 muestra PLGA (85/15) encapsulando el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) en ratones transgénicos rho/VEGF. La FIG. 28 muestra que el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) se puede usar en combinación con otros agentes antiangiogénesis, como aflibercept, para aumentar el efecto como se ve en un modelo de neovascularización coroidea inducida por láser en ratones.

Se pueden agregar polímeros, tales como PBAE, a SP2043 para autoensamblarlo en nanopartículas de aproximadamente 100 nm (FIG. 29). Se verificó que el tamaño de partícula y la concentración de nanopartículas es mayor cuando el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) estaba junto con el polímero para el autoensamblaje. La FIG. 30 muestra el efecto de las nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG que encapsulan el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1).

Péptido SP2043 inyectado por vía intravenosa sistémica (SEQ ID NO:1) que contiene nanopartículas o péptido libre acumulado en el tumor, así como en otros órganos (FIG. 31).

El procedimiento para cuantificar el péptido SP2043 (SEQ ID NO:1) comprendía electroforesis y tinción con SimplyBlue (FIG. 32, Panel A), seguido de espectrometría de masas (FIG. 32, Panel B).

#### EJEMPLO 4

#### 25 Discusión

El objeto descrito actualmente proporciona péptidos miméticos que pueden usarse para diferentes formas de cáncer, enfermedades oculares, tales como degeneración macular relacionada con la edad y otras enfermedades dependientes de angiogénesis y linfangiogénesis. En particular, el péptido mimético activo SP2043 (SEQ ID NO: 1) se probó en ensayos de angiogénesis y linfangiogénesis in vitro. Más particularmente, el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) demostró actividad antiangiogénica en los ensayos de proliferación, migración, adhesión y formación de tubos de células endoteliales de sangre y actividad antiangiogénica y antitumoral in vivo en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama y modelos de degeneración macular relacionados con la edad. El péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) también tiene propiedades antilinfangiogénicas. Además, se demostró que el péptido SP2043 (SEQ ID NO: 1) puede formularse y usarse en micropartículas o nanopartículas.

#### REFERENCIAS

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la materia a los que pertenece el objeto actualmente descrito. Se entenderá que, aunque se hace referencia a una serie de solicitudes de patentes, patentes y otras referencias en esta invención, dicha referencia no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica.

Abraham S, Guo F, Li LS, Rader C, Liu C, Barbas CF, 3rd, y col. (2007) Synthesis of the next generation therapeutic antibodies that combine cell targeting and antibody-catalyzed prodrug activation. *Proc Natl Acad Sci USA*;104: 5584-9.

Amaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G (2009) The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*;12. 267-74.

Avraamides, C. J.; Garmy-Susini, B.; Varner, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 8(8), 604-617.

Bhujwalla ZM, Artemov D, Natarajan K, Ackerstaff E, Solaiyappan M. Vascular differences detected by MRI for metastatic versus nonmetastatic breast and prostate cancer xenografts. *Neoplasia* 2001; 3:143-53.

Bhutia, S. K.; Maiti, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends Biotechnol.*, 2008, 26(4), 210-217.

Bradley, D. A.; Daignault, S.; Ryan, C. J.; Dipaola, R. S.; Smith, D. C.; Small, E.; Gross, M. E.; Stein, M. N.; Chen, A.; Hussain, M. Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in asymptomatic metastatic castration resistant prostate cancer

- patients: a randomized phase II trial by the prostate cancer clinical trials consortium. *Invest. New Drugs*. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005, 438(7070), 932-936.
- Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801), 249-257.
- 5 Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 Mayo 19;473(7347):298-307
- Eikesdal, H. P.; Sugimoto, H.; Birrane, G.; Maeshima, Y.; Cooke, V. G.; Kieran, M.; Kalluri, R. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(39), 15040-15045.
- 10 Elkin M and Vlodavsky I. Tail vein assay of cancer metastasis. *Curr Protoc Cell Biol* Capítulo 19: Unidad 19 12, 2001.
- 15 Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971,285(21), 1182-1186.
- Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*;29: 15-8.
- Folkman, J., Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 2006, 57, 1-18.
- 20 Gautier B, Goncalves V, Diana D, Di Stasi R, Teillet F, Lenoir C, y col. (2010) Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J Med Chem*;53: 4428-40.
- 25 Gentilucci L, De Marco R, Cerisoli L (2010) Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. *Curr Pharm Des*/16: 3185-203.
- Haviv, F.; Bradley, M. F.; Kalvin, D. M.; Schneider, A. J.; Davidson, D. J.; Majest, S. M.; McKay, L. M.; Haskell, C. J.; Bell, R. L.; Nguyen, B.; Marsh, K. C.; Surber, B. W.; Uchic, J. T.; Ferrero, J.; Wang, Y. C.; Leal, J.; Record, R. D.; Hodde, J.; Badylak, S. F.; Lesniewski, R. R.; Henkin, J. Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *J. Med. Chem.*, 2005, 48(8), 2838-2846.
- 30 Holopainen T, Bry M, Alitalo K, Saaristo A. Perspectives on lymphangiogenesis and angiogenesis in cancer. *J Surg Oncol*. 2011 Mayo 1;103(6):484-8. Hruby VJ, Sharma SD, Toth K, Jaw JY, al-Obeidi F, Sawyer TK, y col. (1993) Design, synthesis, and conformation of superpotent and prolonged acting melanotropins. *Ann NY Acad Sci*;680: 51-63.
- 35 Karagiannis, E. D.; Popel, A. S. Identification of novel short peptides derived from the alpha 4, alpha 5, and alpha 6 fibrils of type IV collagen with anti-angiogenic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 354(2), 434-439.
- 40 Karagiannis ED, Popel AS. A systematic methodology for proteome-wide identification of peptides inhibiting the proliferation and migration of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Sep 16; 105(37): 13775-80.
- Kenny, L. M.; Coombes, R. C.; Oulie, I.; Contractor, K. B.; Miller, M.; Spinks, T. J.; McParland, B.; Cohen, P. S.; Hui, A. M.; Palmieri, C.; Osman, S.; Glaser, M.; Turton, D.; Al-Nahhas, A.; Aboagye, E. O. Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand 18F-AH111585 in breast cancer patients. *J. Nucl. Med.*, 2008, 49(6), 879-886.
- 45 Koskimaki, J. E.; Karagiannis, E. D.; Rosea, E. V.; Vesuna, F.; Winnard, P. T. Jr.; Raman, V.; Bhujwala, Z. M.; Popel, A. S., Peptides derived from type IV collagen, CXC chemokines, and thrombospondin-1 domain-containing proteins inhibit neovascularization and suppress tumor growth in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. *Neoplasia*, 2009, 11(12), 1285-1291.
- 50 Koskimaki, J. E.; Karagiannis, E. D.; Tang, B. C.; Hammers, H.; Watkins, D. N.; Pili, R.; Popel, A. S. Pentastatin-1, a collagen IV derived 20-mer peptide, suppresses tumor growth in a small cell lung cancer xenograft model. *BMC Cancer*, 2010, 10, 29.
- 55 Lee E, Rosea EV, Pandey NB, Popel AS (2011) Small peptides derived from somatotropin conserved domain-containing proteins inhibit blood and lymphatic endothelial cell proliferation, migration, adhesion and tube formation. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(12): 1812-1821;
- 60 Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted

- angiogenic mitogen. *Science*, 1989, 246(4935), 1306-1309.
- Li M, Oliver E, Kitchens KM, Vere J, Alkan SS, Tamiz AP (2008) Structure- activity relationship studies of permeability modulating peptide AT-1002. *Bioorg Med Chem Lett*:18: 4584-6.
- 5 Ma J.S., Unnatural amino acids in drug discovery. CHIMICA OGGI chemistry today, 2003, 65-68. Mirochnik, Y.; Aurora, A.; Schulze-Hoepfner, F. T.; Deabes, A.; Shifrin, V.; Beckmann, R.; Polsky, C.; Volpert, O. V. Short pigment epithelial-derived factor-derived peptide inhibits angiogenesis and tumor growth. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15(5), 1655-1663.
- 10 Nabors, L. B.; Fiveash, J. B.; Markert, J. M.; Kekan, M. S.; Gillespie, G. Y.; Huang, Z.; Johnson, M. J.; Meleth, S.; Kuo, H.; Gladson, C. L.; Fathallah-Shaykh, H. M. A phase 1 trial of ABT-510 concurrent with standard chemoradiation for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Arch. Neurol.*, 67(3), 313-319.
- Ogan MD, Schmiedl U, Moseley ME, Grodd W, Paajanen H, Brasch RC., Albumin labeled with Gd-DTPA. An  
15 intravascular contrast-enhancing agent for magnetic resonance blood pool imaging: preparation and characterization. *Invest Radiol.* 1988 Dic;23(12):961.
- Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Viores MA, LaRochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA: Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal  
20 neovascularization, *Am. J. Pathol.* 1997, 151:281-291.
- Pemot M, Vanderesse R, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M (2011) Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*;7: 793-802.
- 25 Raman V, Artemov D, Pathak AP, Winnard Jr PT, McNutt S, Yudina A, Bogdanov Jr A, Bhujwala ZM. Characterizing vascular parameters in hypoxic regions: A combined magnetic resonance and optical imaging study of a human prostate cancer model. *Cancer Res* 2006; 66:9929-36.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-  
30 2012.
- Reardon, D. A.; Fink, K. L.; Mikkelsen, T.; Cloughesy, T. F.; O'Neill, A.; Plotkin, S.; Glantz, M.; Ravin, P.; Raizer, J. J.; Rich, K. M.; Schiff, D.; Shapiro, W. R.; Burdette-Radoux, S.; Dropcho, E. J.; Wittemer, S. M.; Nippgen, J.; Picard, M.; Nabors, L. B. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in  
35 recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26(34), 5610-5617.
- Reichert, J. Development trends for peptide therapeutics *Periodical* [Online], 2008, p. [http://www.peptidetherapeutics.org/PTF\\_Summary\\_2008.pdf](http://www.peptidetherapeutics.org/PTF_Summary_2008.pdf).
- 40 Rivera CG, Rosea EV, Pandey NB, Koskimaki JE, Bader JS, Popel AS (2011) Novel peptide specific (QSAR) analysis applied to collagen IV peptides with antiangiogenic activity. *J Med Chem*, 54(19):6492-500 (2011).
- Rosca EV, Koskimaki JE, Pandey NB, Rivera CG, Tamiz AP, Popel AS (2011) Anti-angiogenic peptides for cancer  
45 therapeutics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*;12: 1101-16.
- Rosca EV, Koskimaki JE, Pandey NB, Wolff AC, Popel AS (2011) Development of a biomimetic peptide derived from collagen IV with anti-angiogenic activity in breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*; 12:808-17.
- Saladin, P. M.; Zhang, B. D.; Reichert, J. M. Current trends in the clinical development of peptide therapeutics. *IDrugs*,  
50 2009, 12(12), 779-784.
- Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983, 219(4587), 983-985.
- 55 Tobe T, Okamoto N, Viores MA, Derevjani NL, Viores SA, Zack DJ, Campochiaro PA: Evolution of neovascularization in mice with overexpression of vascular endothelial growth factor in photoreceptors, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998,39:180-188.
- Aunque la materia en cuestión anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de  
60 claridad de comprensión, se entenderá por los expertos en la materia que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Popel, Aleksander  
 Pandey, Niranjan B

5 Lee, Esak  
 Green, Jordan J  
 Shmueli, Ron B

<120> UNA PLATAFORMA DE ADMINISTRACIÓN DE PÉPTIDOS BIOMIMÉTICOS Y BIODEGRADABLES PARA  
 10 EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEPENDIENTES DE ANGIOGÉNESIS Y DE LINFANGIOGÉNESIS

<130> 111232-00291.PI2423-02

<150> 61/832,290

15 <151> 2013-06-07

<160> 4

<170> Patente En versión 3.5

20

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia artificial basada en proteína de Colágeno humano Tipo IV

<400> 1

30

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp  
 1 5 10 15

Val Ile Asn Phe  
 20

<210> 2

<211> 20

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial basada en proteína de Colágeno humano Tipo IV

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> Xaa es cualquier aminoácido natural o no natural

45

<400> 2

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ile Asn Asp  
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe  
 20

50 <210> 3

ES 2 774 217 T3

<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Secuencia artificial basada en proteina de Colágeno humano Tipo IV

<400> 3

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asn Ile Asn Asn  
1 5 10 15

Val Ile Asn Phe  
20

10

<210> 4  
<211> 20  
<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia artificial basada en proteina de Colágeno humano Tipo IV

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(20)  
<223> Xaa es cualquier aminoácido natural o no natural

25 <400> 4

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn  
1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe  
20

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de LRRFSTXPXXXXINDVXNF (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido y la secuencia de aminoácidos es al menos 95% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID No: 1), donde el péptido exhibe propiedades antiangiogénicas, permeabilidad antivascular, antitumorogénesis y/o propiedades antilinfangiogénicas.
2. El péptido aislado de la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos según LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO: 1).
3. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva del péptido aislado de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
4. Una nanopartícula o micropartícula que comprende el péptido aislado de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
5. La nanopartícula o micropartícula de la reivindicación 4, donde la nanopartícula o micropartícula comprende:
- (a) poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y/o PLGA-poli(etilenglicol) (PEG); opcionalmente donde la nanopartícula o la micropartícula comprende aproximadamente 2% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 6% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de nanopartículas o micropartículas PLGA y/o PLGA-PEG; o
- (b) un poli(beta-amino éster) (PBAE) y/o PBAE-PEG; opcionalmente donde la nanopartícula o micropartícula comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 5% o aproximadamente 6% a aproximadamente 10%, en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de las nanopartículas o micropartículas PBAE y/o PBAE-PEG; o
- (c) una combinación de un PBAE, PLGA y PEG; opcionalmente donde la nanopartícula o micropartícula comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 5% o aproximadamente 6% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de partículas que comprenden una combinación de un PBAE, PLGA y PEG.
6. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorogénesis que afecta a una célula, el procedimiento comprende:
- poner en contacto la célula con un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de LRRFSTXPXXXXINDVXNF (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido y la secuencia de aminoácidos es al menos 95% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID No: 1), en una cantidad suficiente para inhibir la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorogénesis que afecta a la célula.
7. El procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 6, donde el péptido aislado tiene la secuencia de aminoácidos según LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO: 1).
8. El procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, donde:
- (a) el contacto de la célula resulta en una inhibición de adhesión, migración, proliferación y/o formación de tubos que afectan a la célula; o
- (b) la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula endotelial, una célula microvascular y una célula linfática; o
- (c) el péptido aislado se carga en o dentro de una nanopartícula o micropartícula antes de contactar con la célula; opcionalmente donde la nanopartícula o micropartícula comprende PLGA y/o PLGA-PEG, o PBAE-PEG, o PBAE, PLGA y PEG.
9. Un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de LRRFSTXPXXXXINDVXNF (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido y la secuencia de aminoácidos es al menos 95% idéntica a LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID No: 1) para usar en un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con angiogénesis, linfangiogénesis, permeabilidad vascular y/o tumorogénesis o para prevenir o retrasar que un sujeto desarrolle una enfermedad relacionada con angiogénesis, linfangiogénesis, permeabilidad vascular y/o tumorogénesis, el procedimiento comprende:

administrar al sujeto el péptido aislado en una cantidad suficiente para tratar, retrasar o prevenir la enfermedad en el sujeto.

10. El péptido aislado para usar de la reivindicación 9, donde el péptido aislado tiene la secuencia de aminoácidos según LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO: 1).

11. El péptido aislado para usar en el procedimiento de la reivindicación 10, donde la enfermedad comprende una neoplasia, opcionalmente donde la neoplasia comprende un tumor sólido o un cáncer, además opcionalmente donde la neoplasia comprende un cáncer, y donde:

10

(a) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, pulmón, glioblastoma, ocular, células renales, células hepáticas, cabeza y cuello; o

(b) el procedimiento inhibe el establecimiento de metástasis o inhibe metástasis adicionales del cáncer; o

15

(c) el procedimiento inhibe la diseminación de células tumorales a través de la sangre y/o la vasculatura linfática.

12. El péptido aislado para usar en el procedimiento de la reivindicación 10, donde:

20 (a) el procedimiento inhibe la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis en o alrededor de un tumor, opcionalmente donde el tumor es un tumor primario o un tumor metastatizado establecido; o

(b) el procedimiento inhibe la linfangiogénesis, la angiogénesis y/o la tumorigénesis perioperativamente y/o postoperativamente, o

25

(c) el péptido aislado se administra en combinación con al menos otro agente antiangiogénesis, opcionalmente donde al menos otro agente antiangiogénesis se selecciona del grupo que consiste en aflibercept, ranibizumab, bevacizumab y combinaciones de los mismos; o

30 (d) el procedimiento inhibe la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis que afecta a una célula que se encuentra en el tejido adiposo y el procedimiento reduce o previene la obesidad; o

(e) el procedimiento inhibe la angiogénesis, la linfangiogénesis, la permeabilidad vascular y/o la tumorigénesis que afecta a una célula trasplantada y el procedimiento reduce o previene el rechazo de tejidos y/u órganos después del trasplante de la célula.

35

13. El péptido aislado para usar en el procedimiento de la reivindicación 10, donde la enfermedad está relacionada con la angiogénesis ocular o la retinopatía diabética; opcionalmente donde la enfermedad relacionada con la angiogénesis ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, glaucoma neovascular, retinopatía diabética proliferativa y retinopatía del prematuro.

40

14. El péptido aislado para usar en el procedimiento de la reivindicación 10, donde el péptido aislado se carga en o dentro de una nanopartícula o micropartícula antes de administrar al sujeto, opcionalmente donde la nanopartícula o micropartícula comprende:

45

(a) PLGA y/o PLGA-PEG, que comprende opcionalmente aproximadamente 2% a aproximadamente 5% o aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de la nanopartícula o micropartícula de PLGA que comprende PLGA; o

50 (b) PBAE y/o PBAE-PEG, o

(c) PLGA, PBAE y PEG; opcionalmente que comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en masa del péptido aislado cargado sobre o dentro de la nanopartícula o micropartícula de PBAE que comprende PBAE.

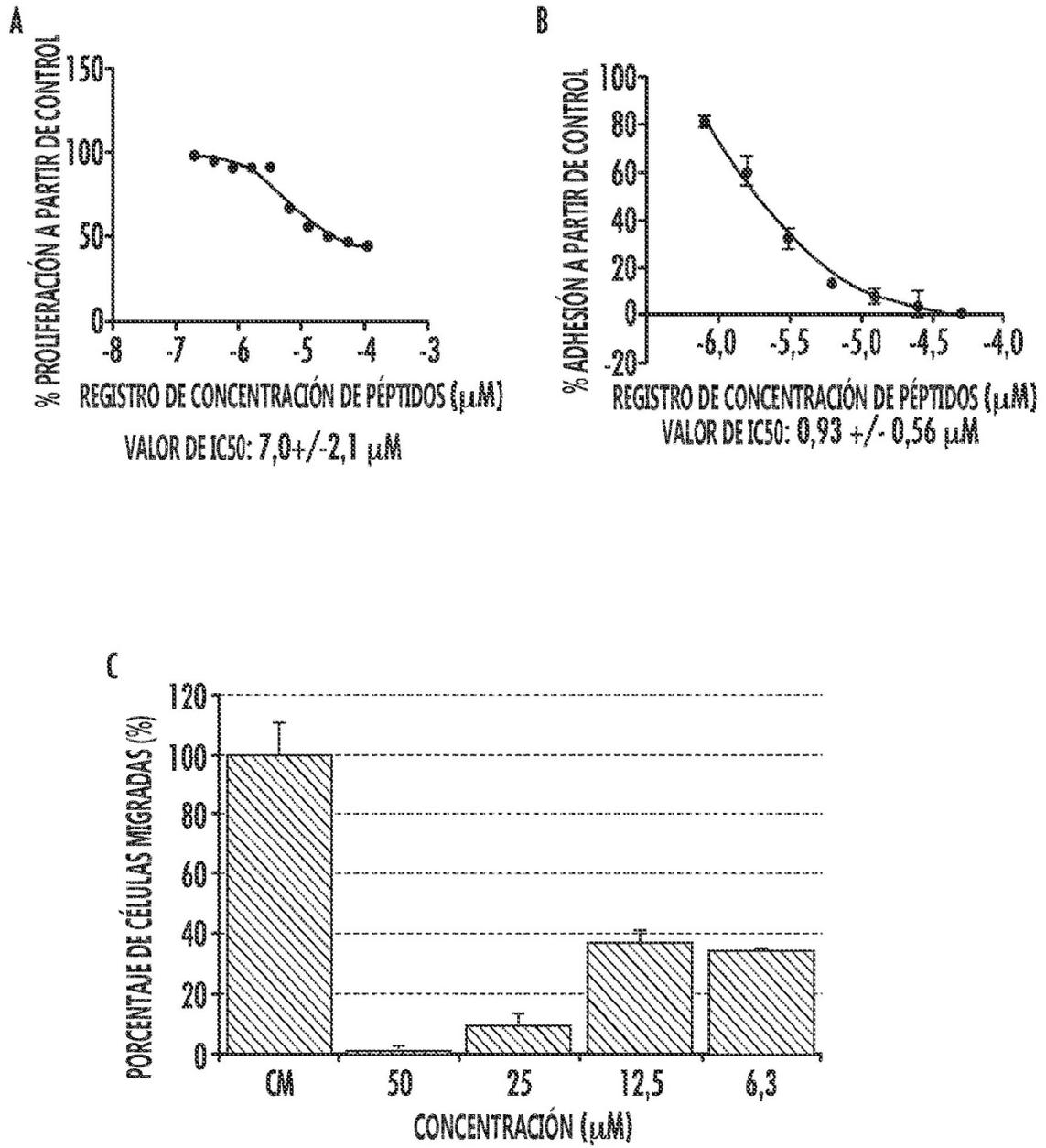
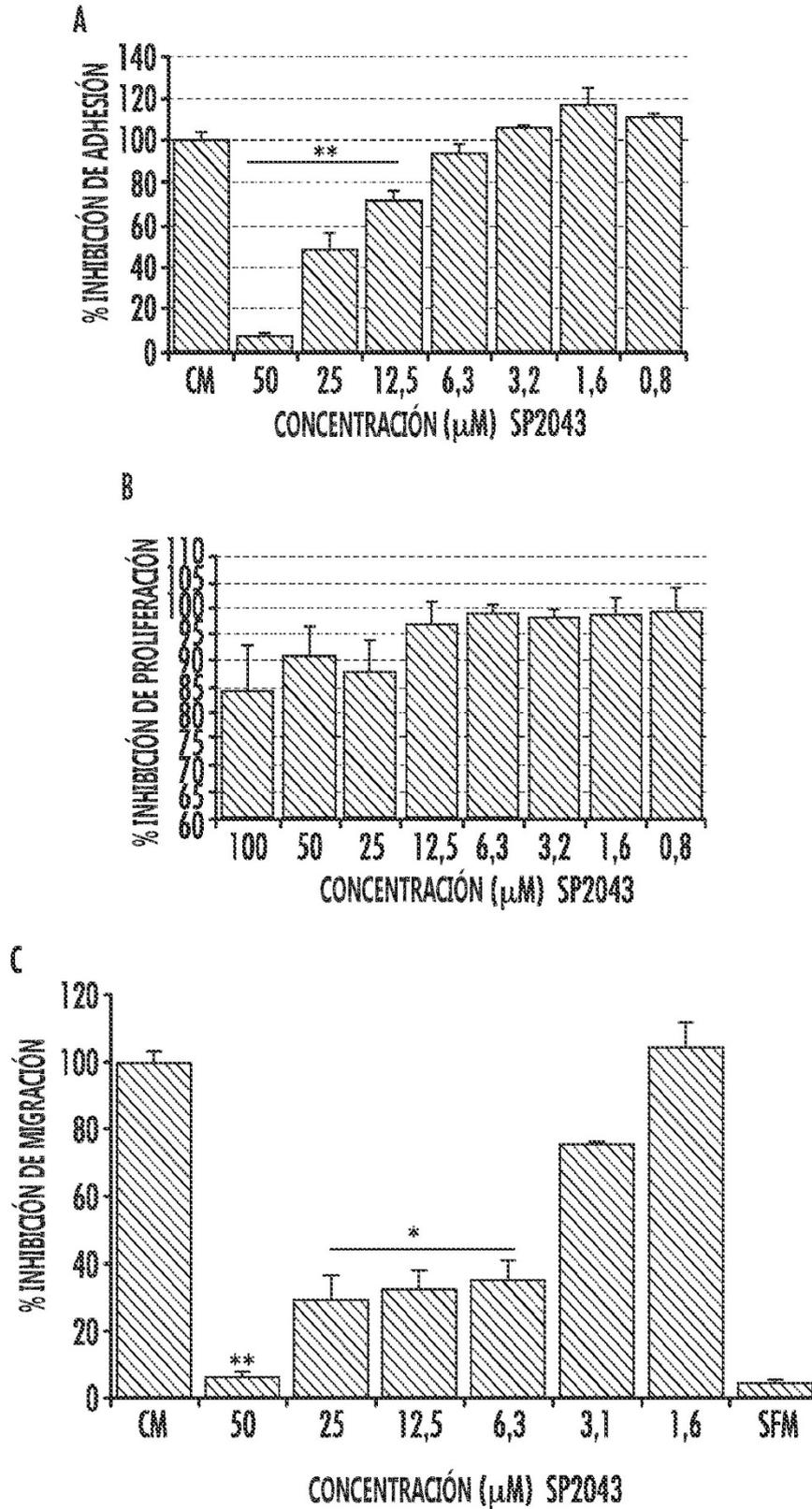
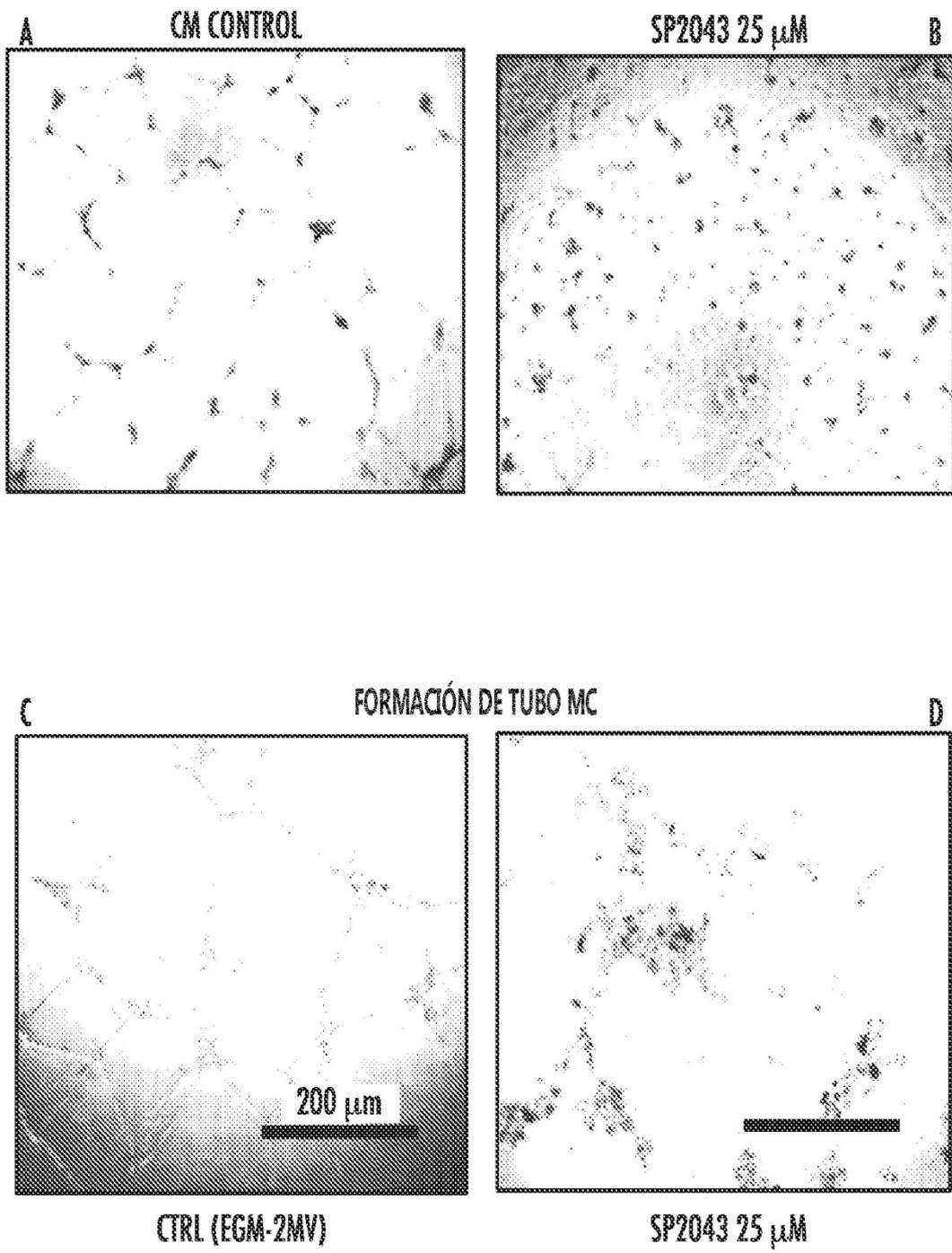


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**

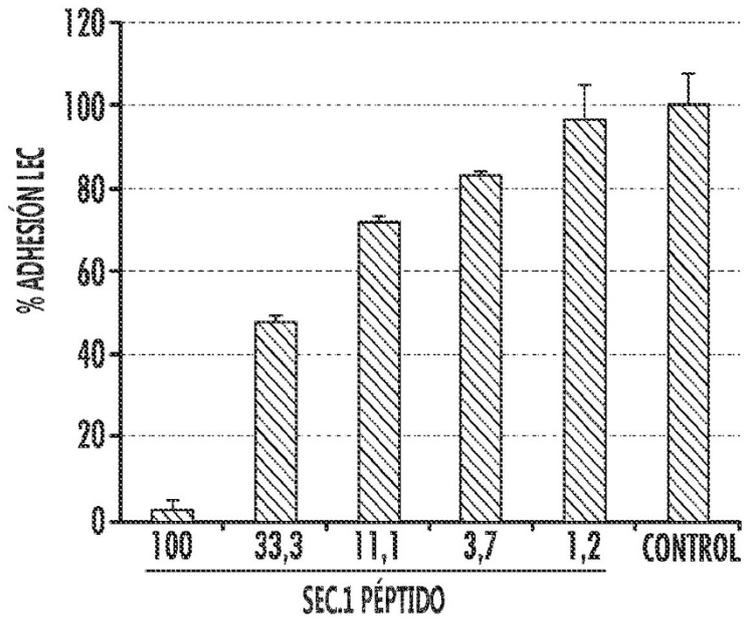


FIG. 4

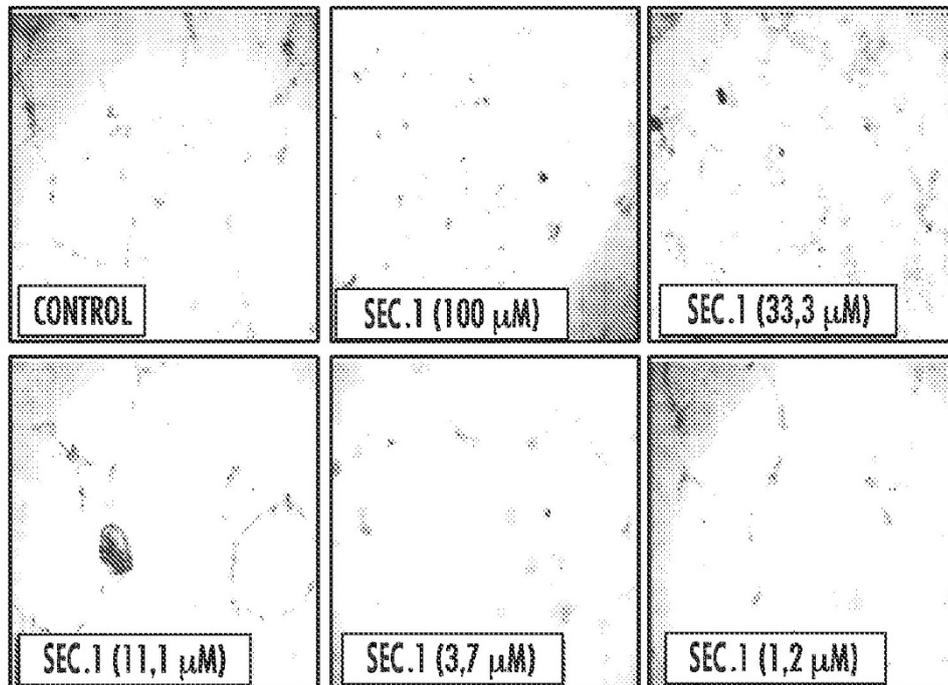


FIG. 5

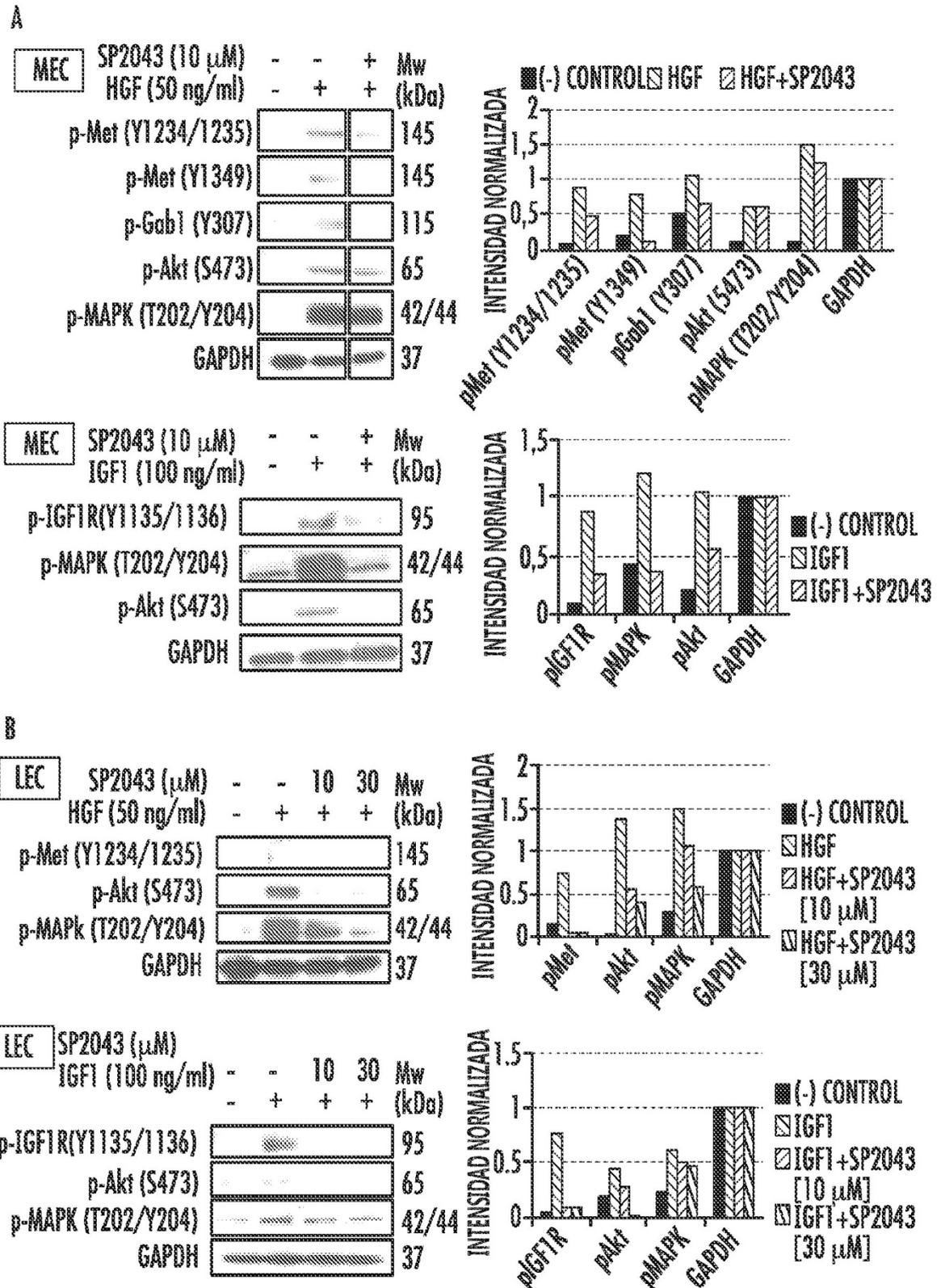


FIG. 6

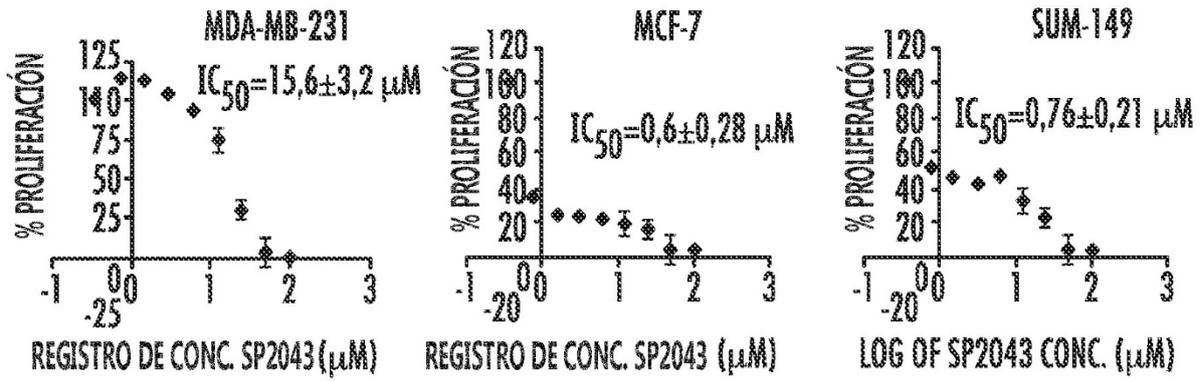


FIG. 7

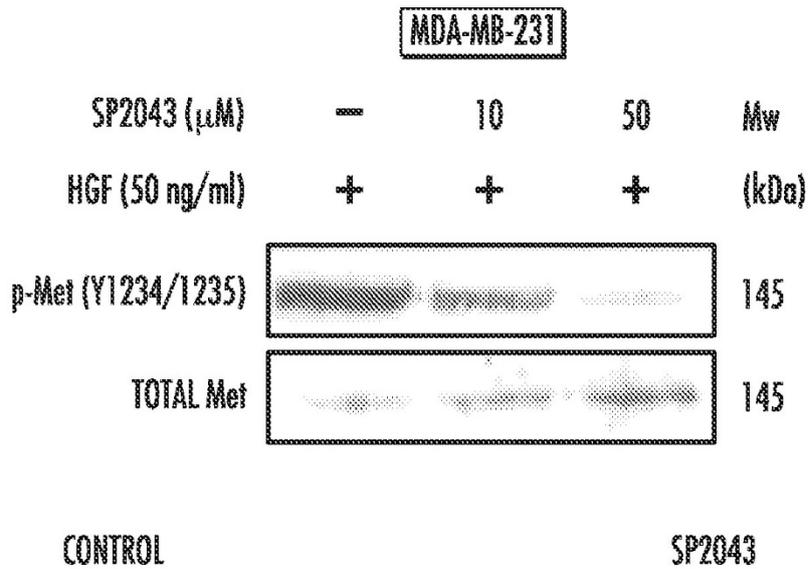


FIG. 8

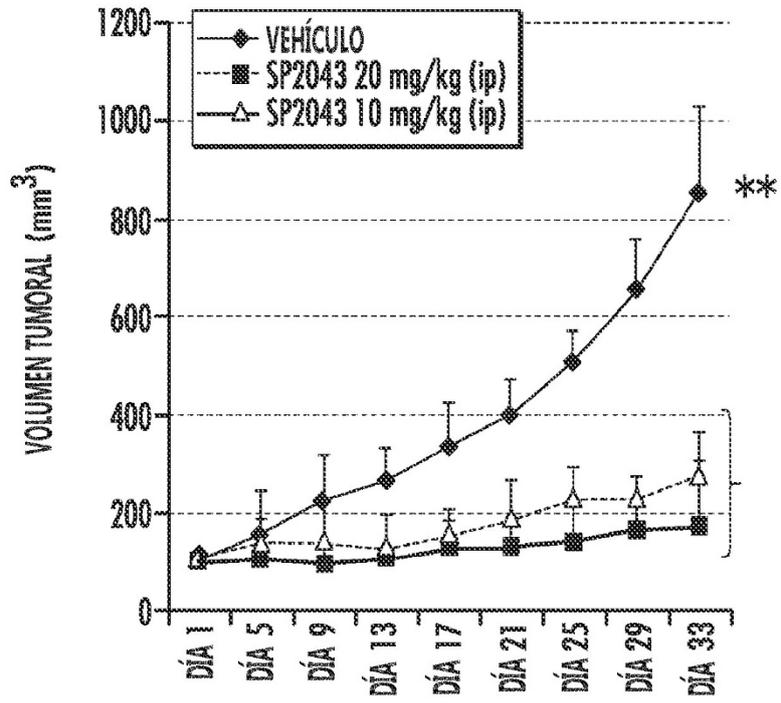


FIG. 9

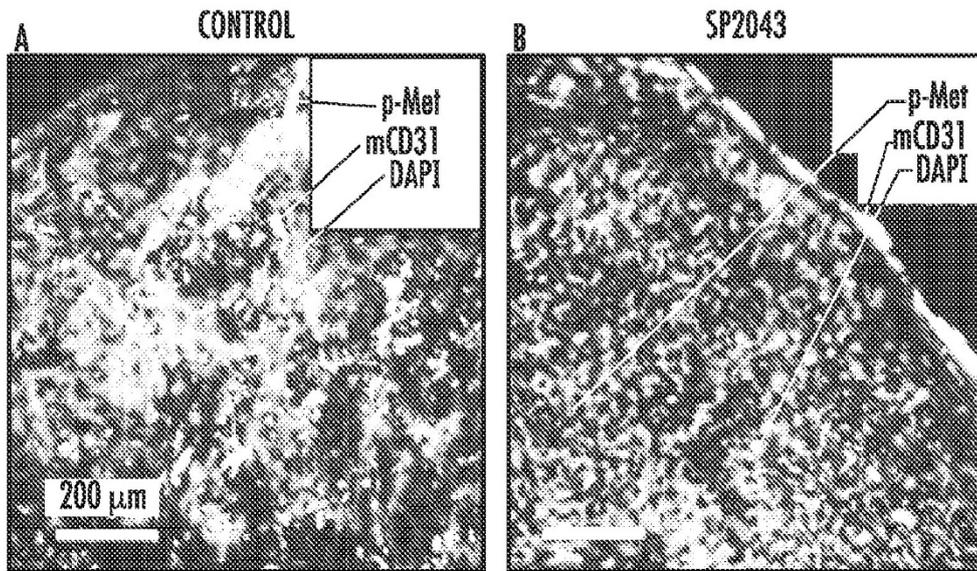


FIG. 10

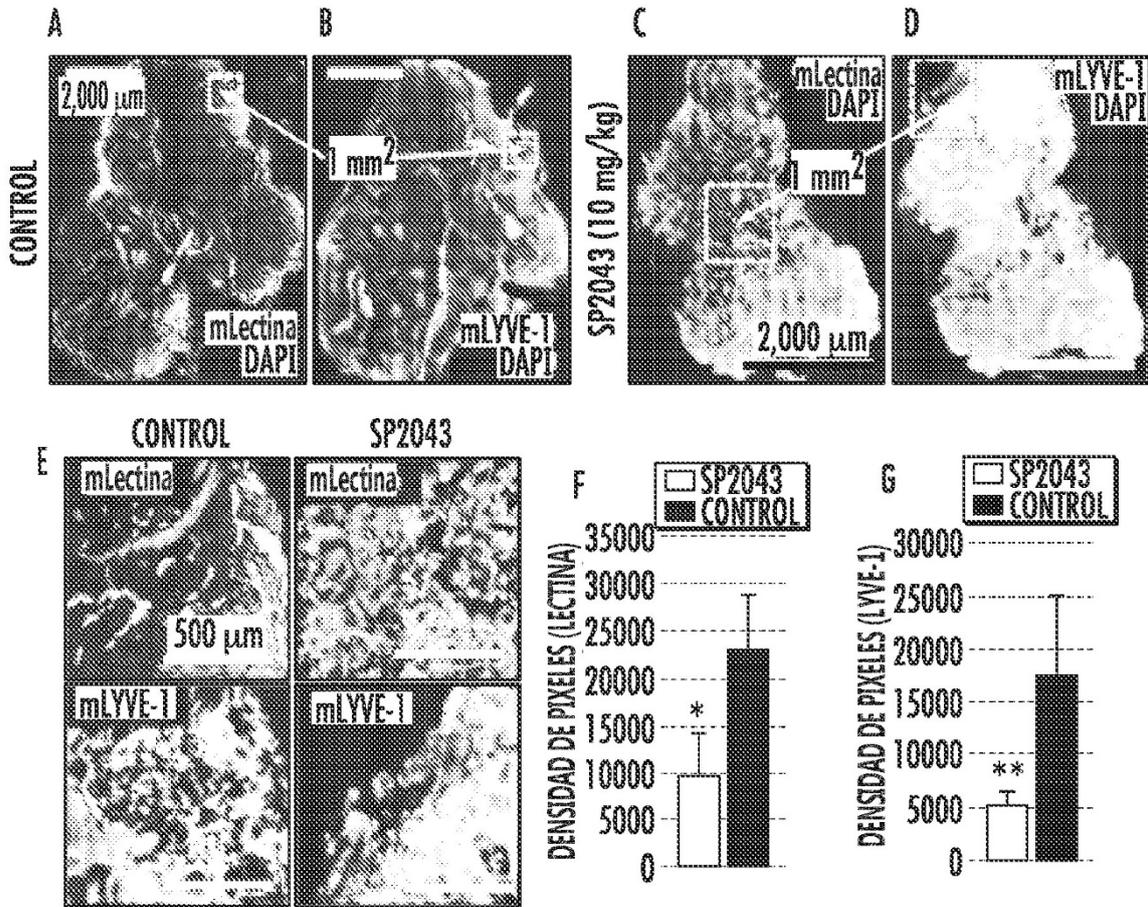
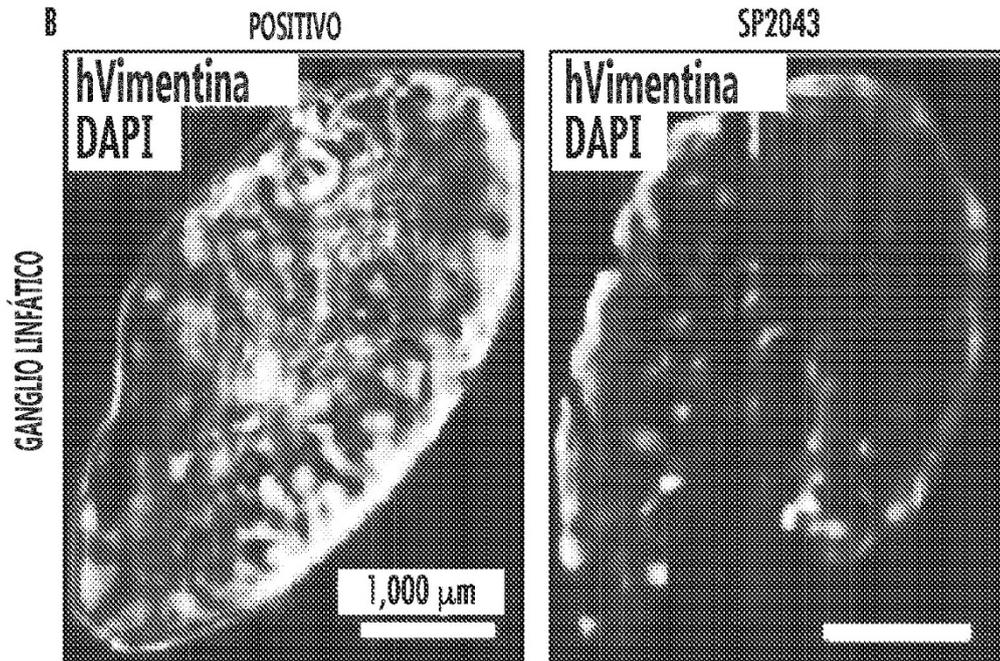
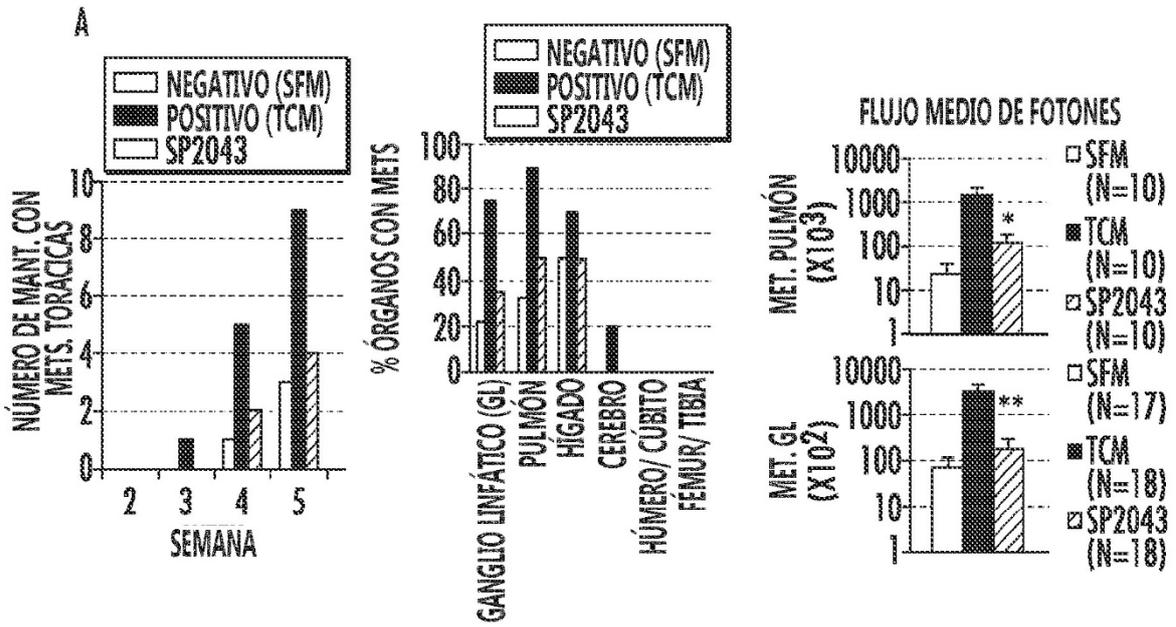
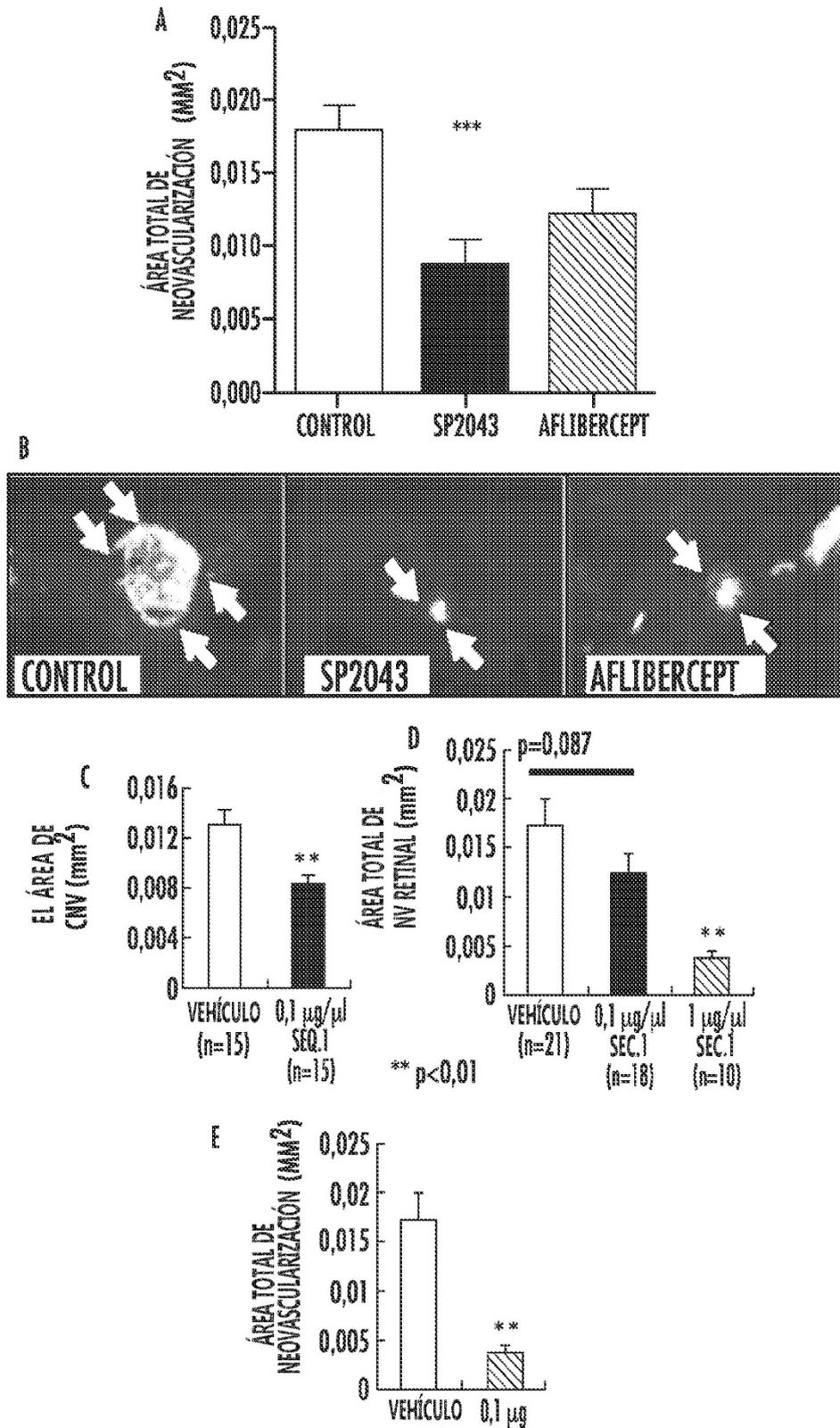


FIG. 11



**FIG. 12**



**FIG. 13**

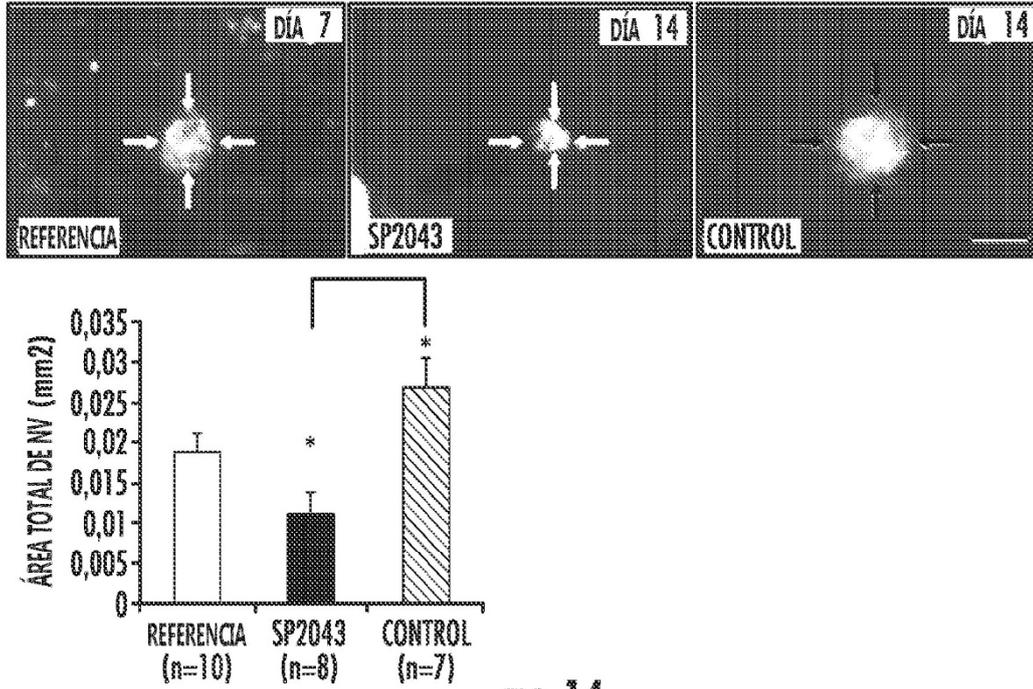


FIG. 14

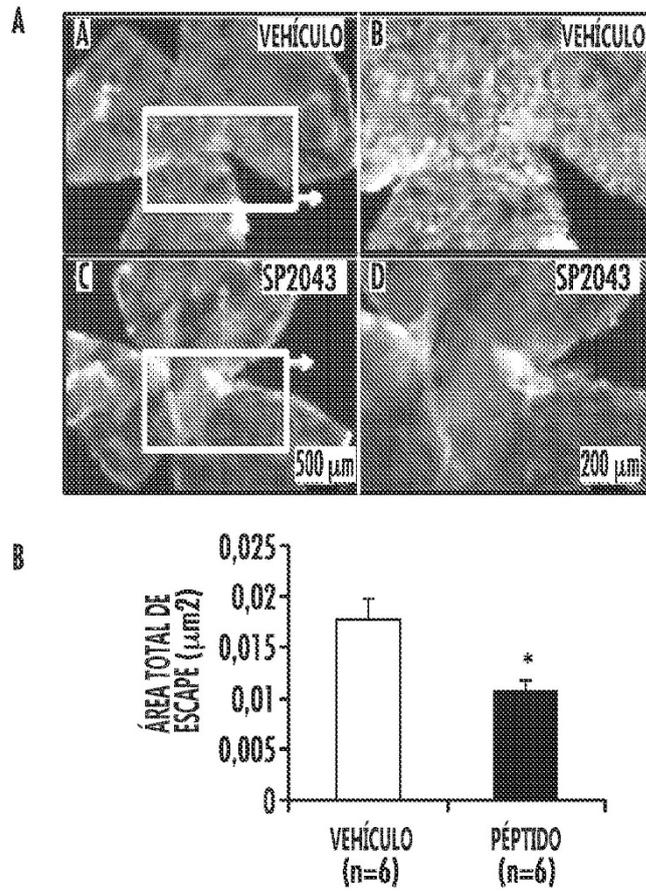


FIG. 15

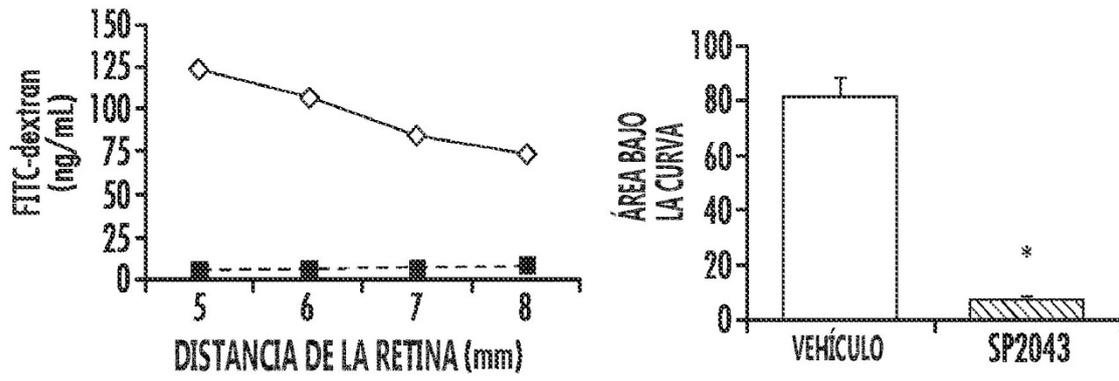


FIG. 16

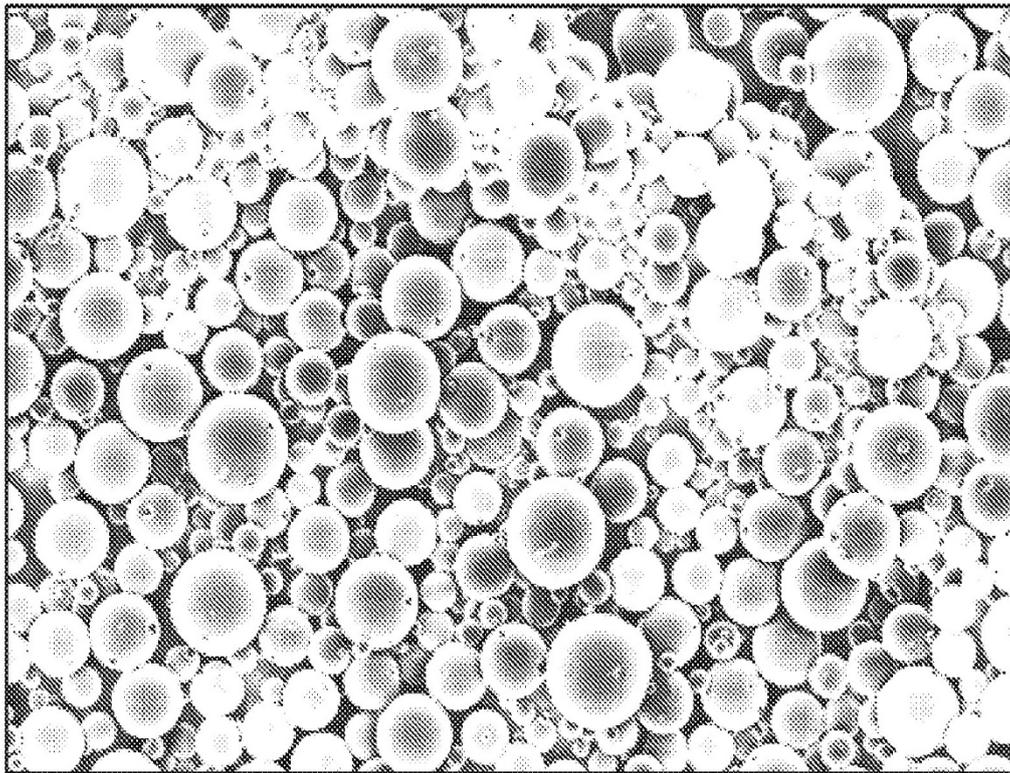
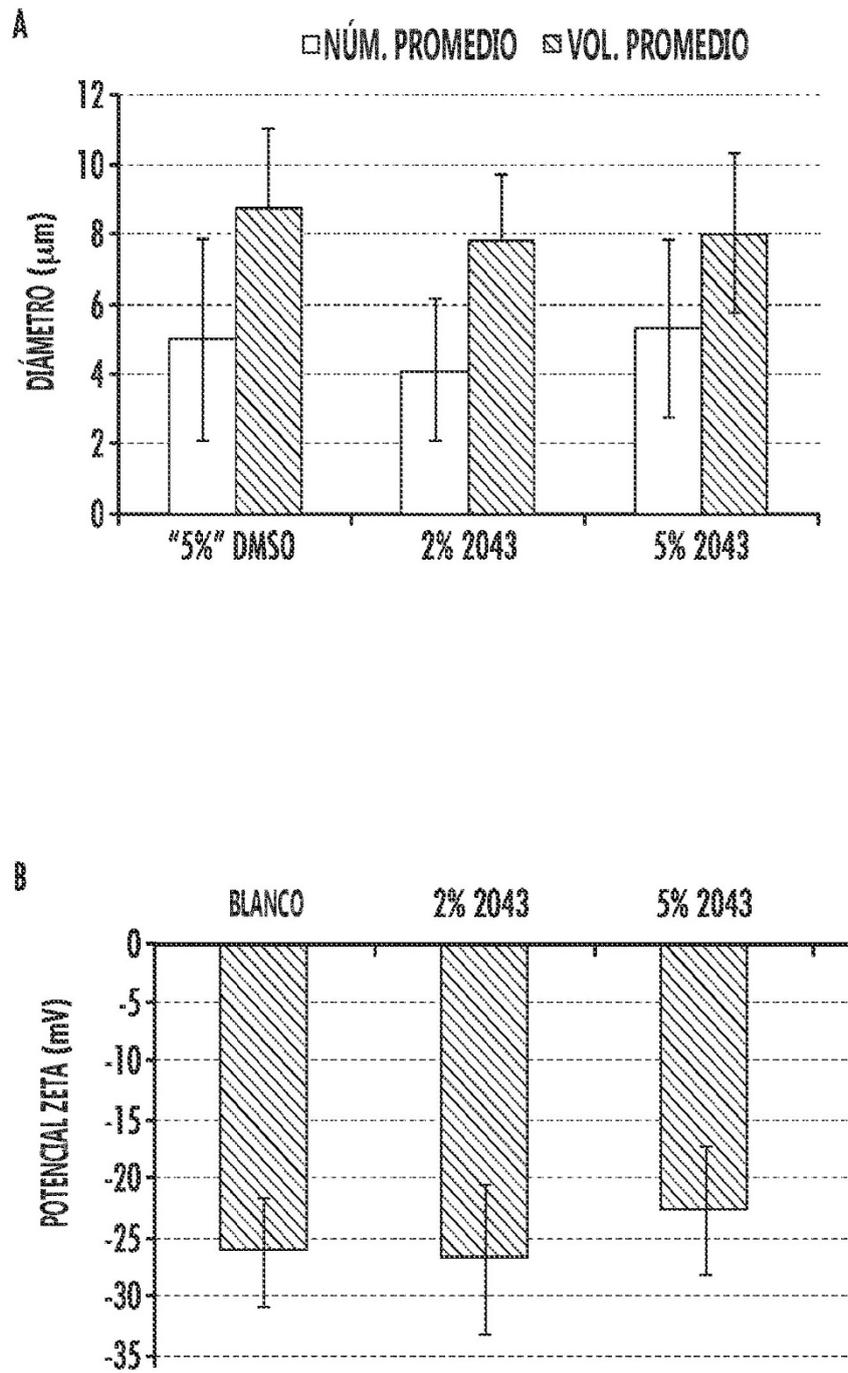
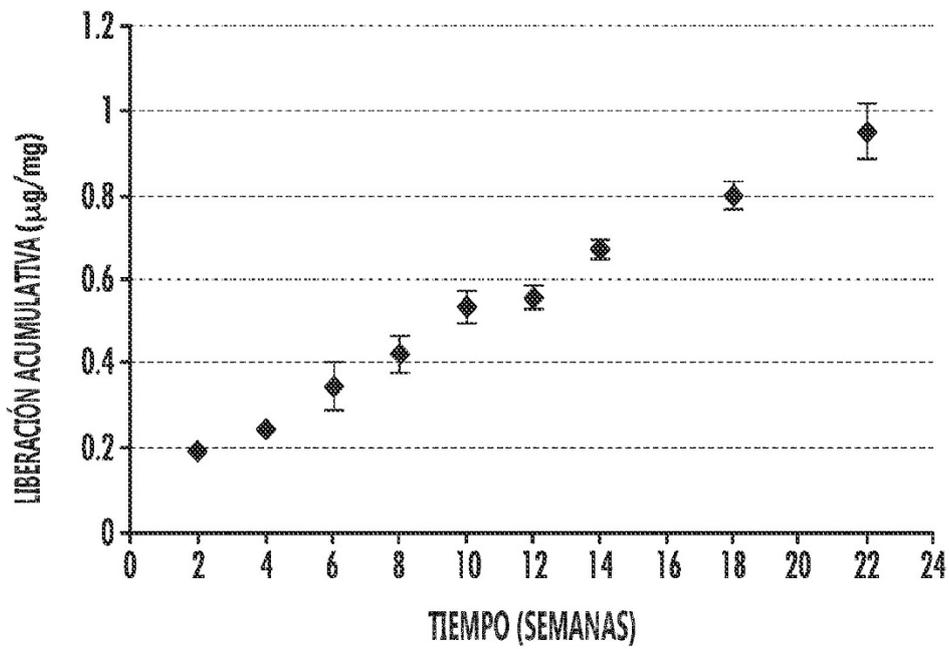
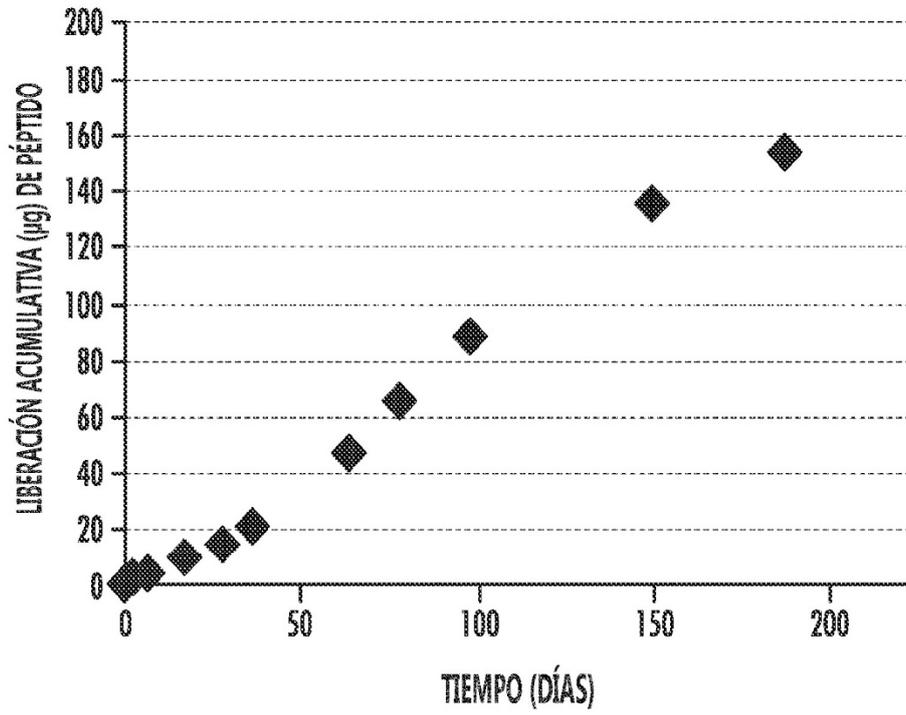


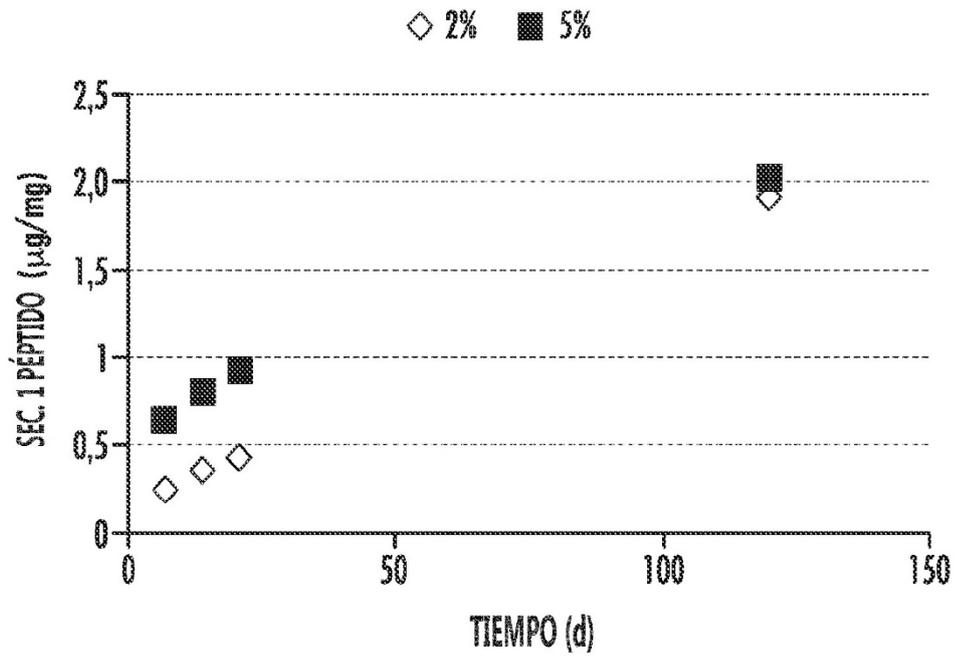
FIG. 17



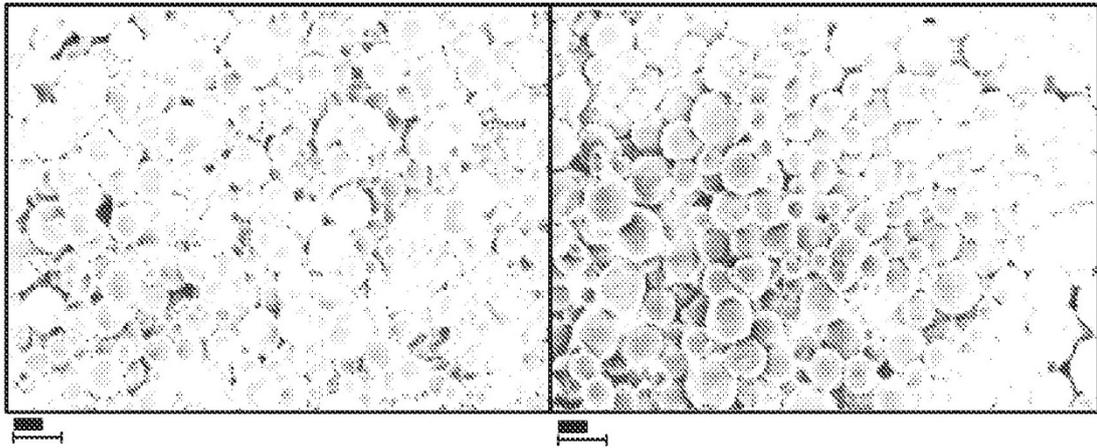
**FIG. 18**



**FIG. 19**



TIEMPO (d)  
**FIG. 20**



**FIG. 21**

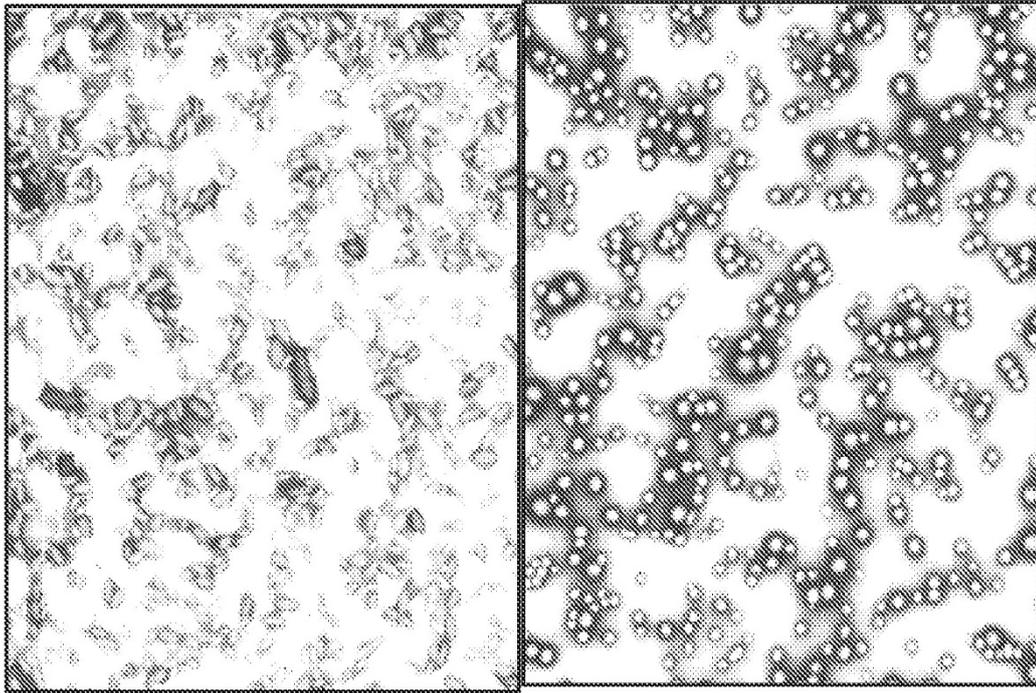


FIG. 22

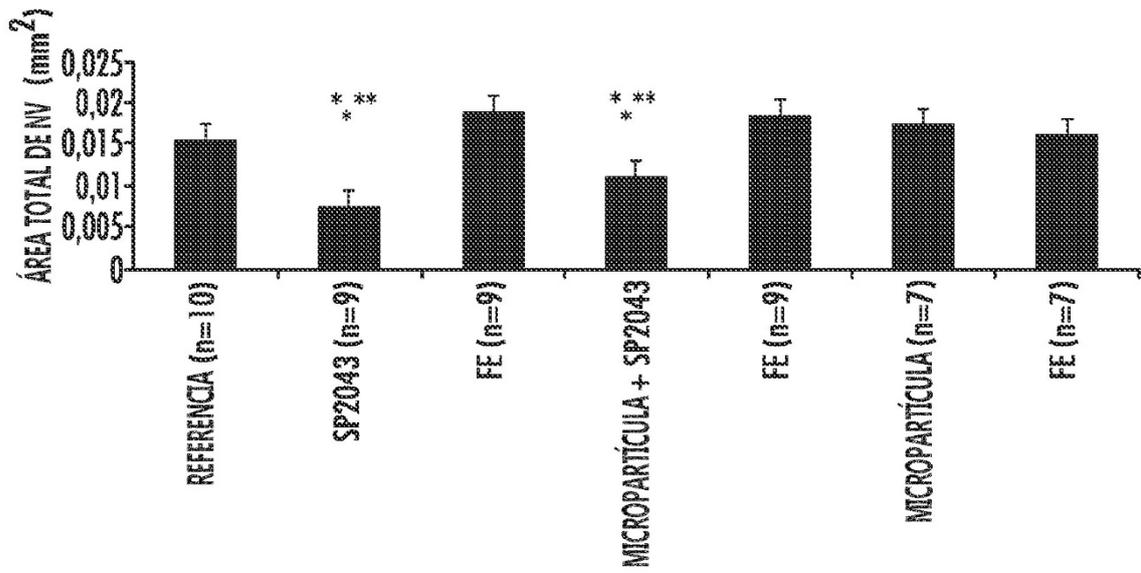


FIG. 23

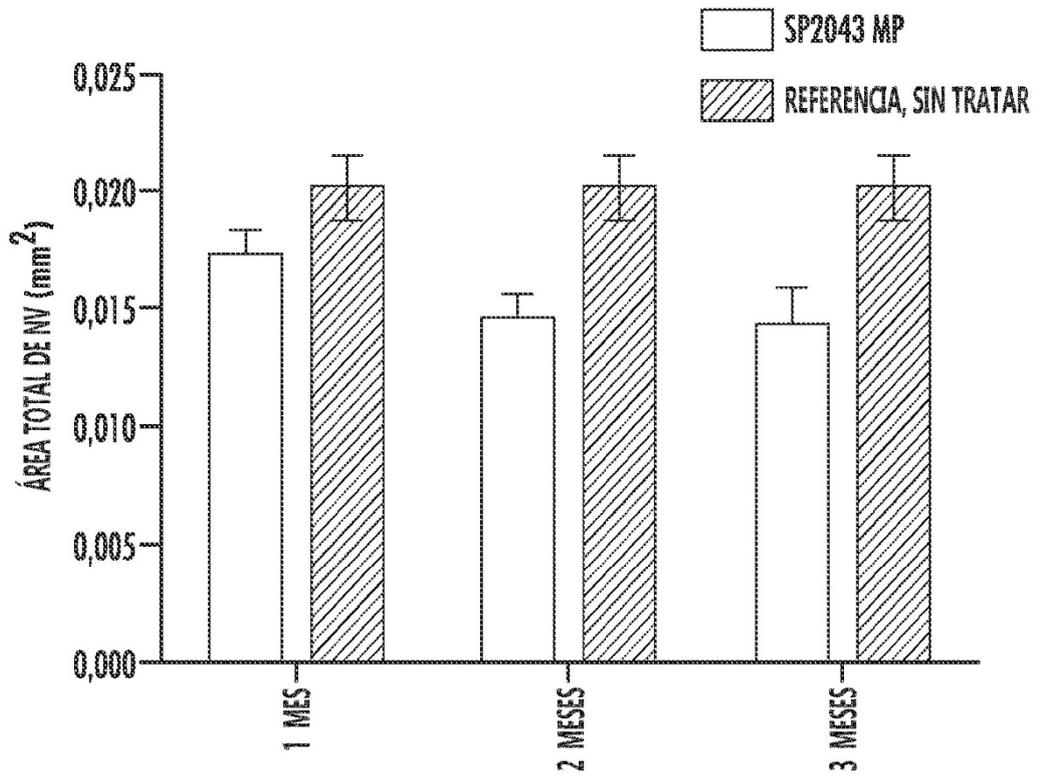


FIG. 24

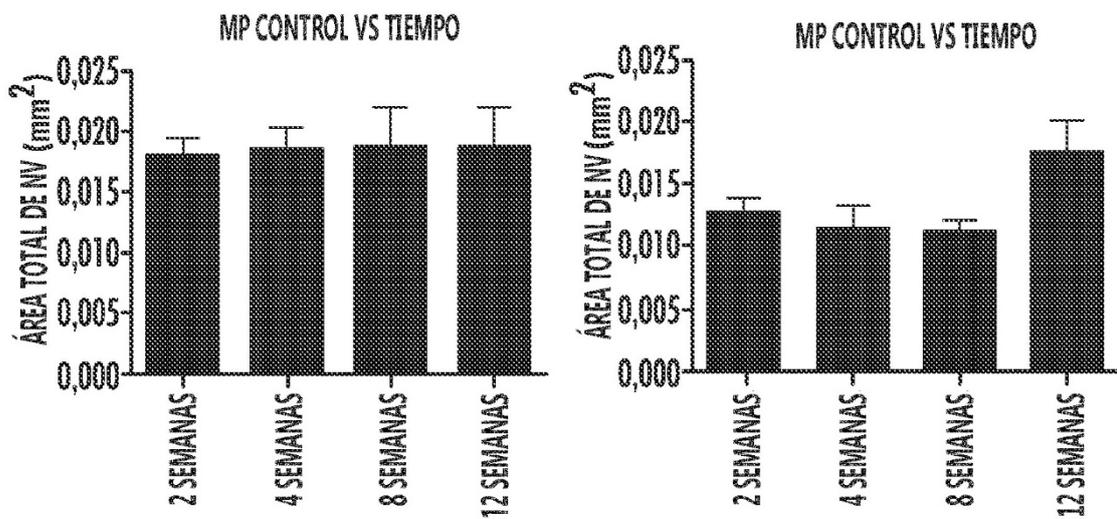
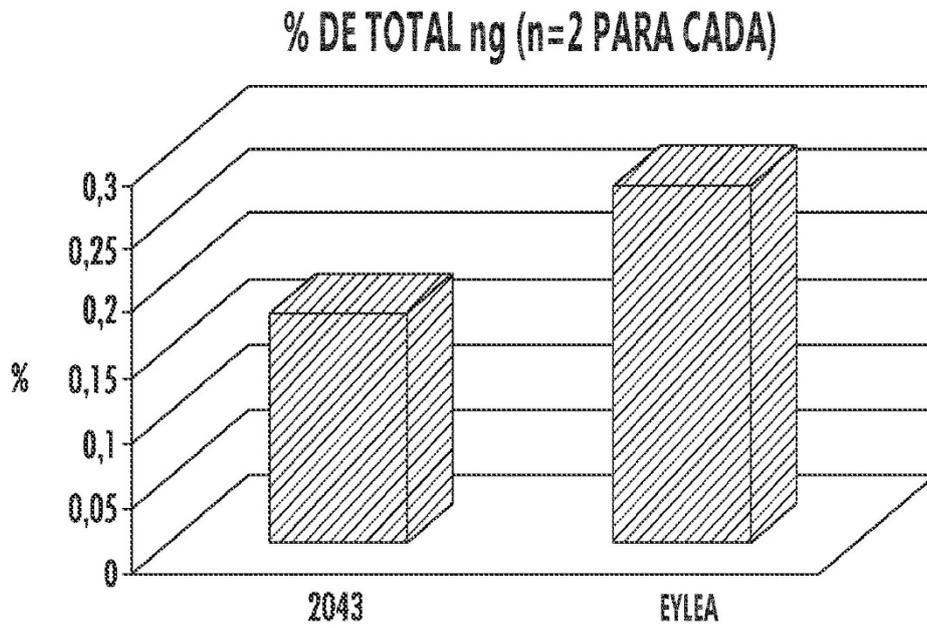
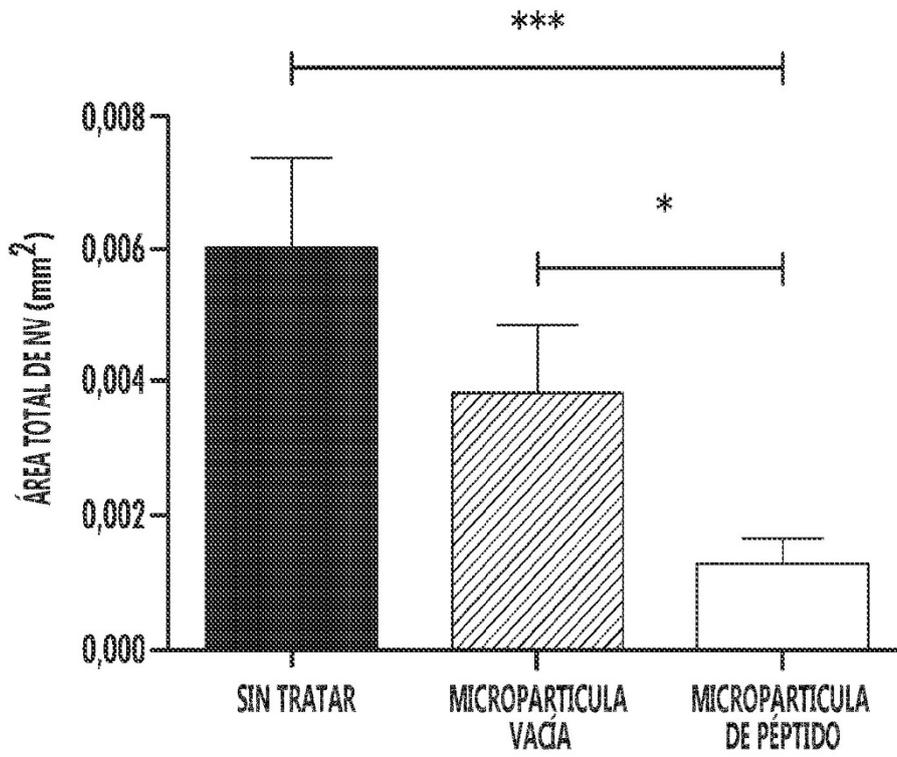


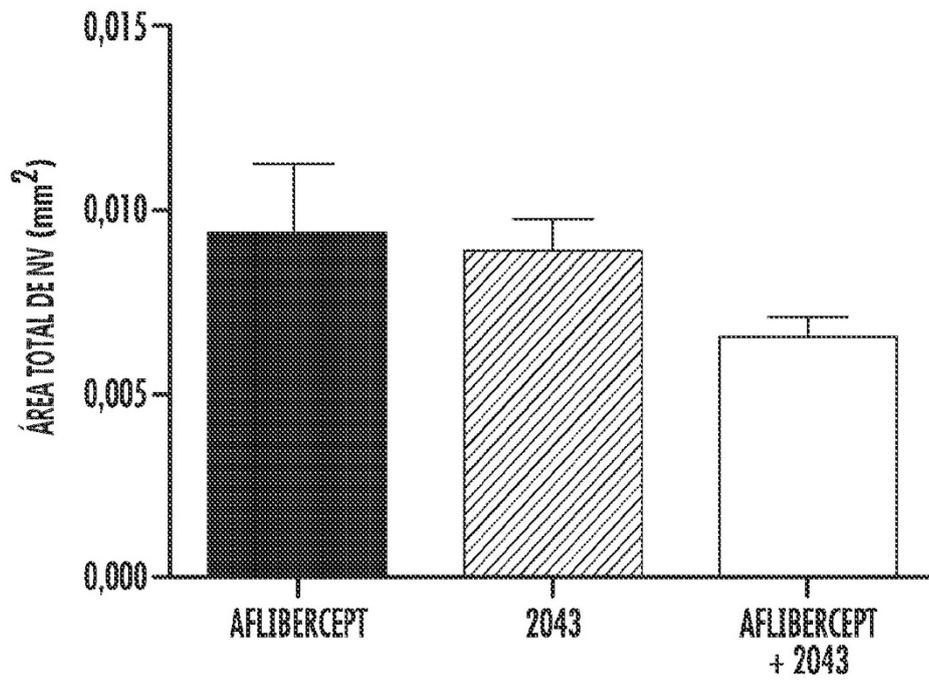
FIG. 25



**FIG. 26**



**FIG. 27**



**FIG. 28**

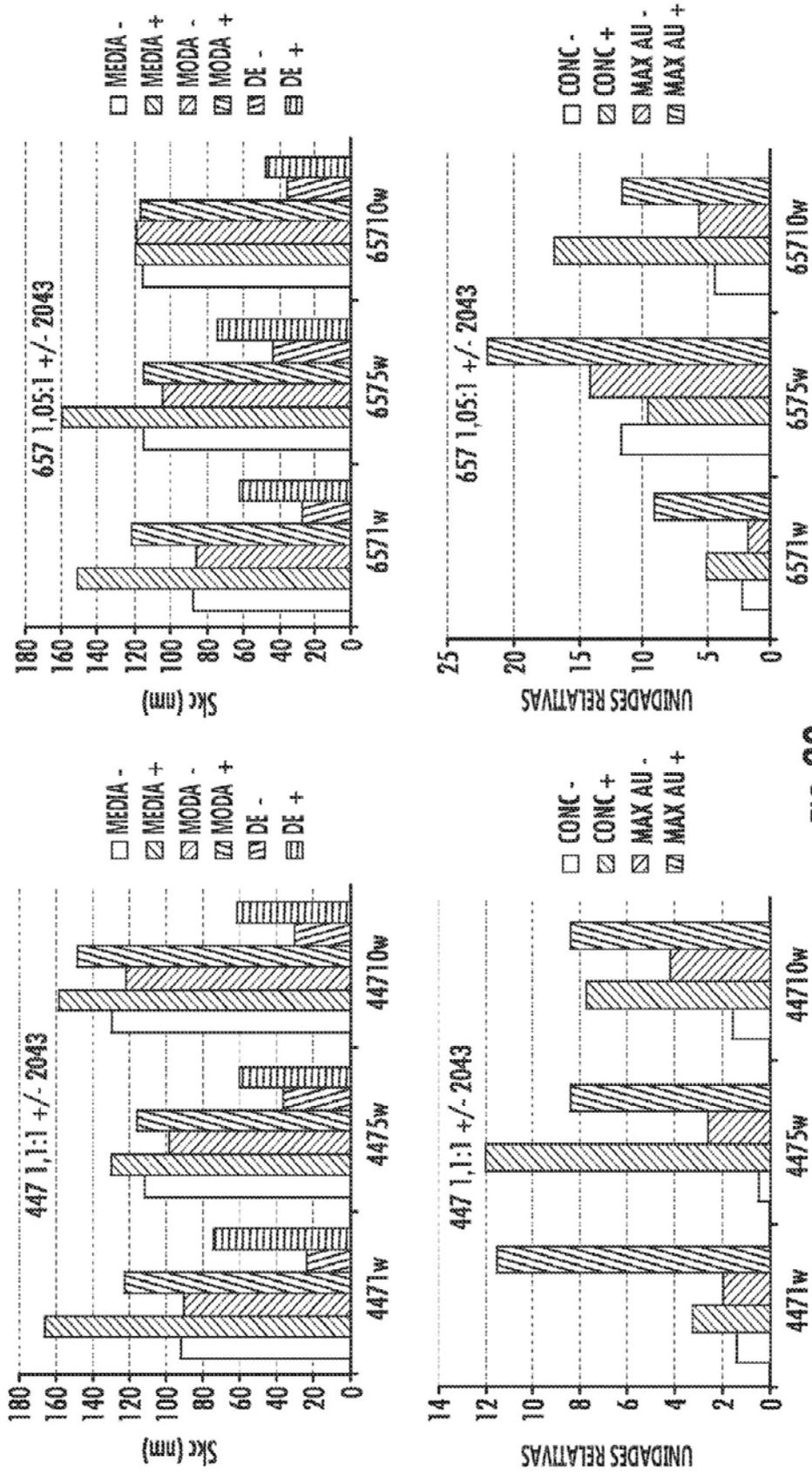
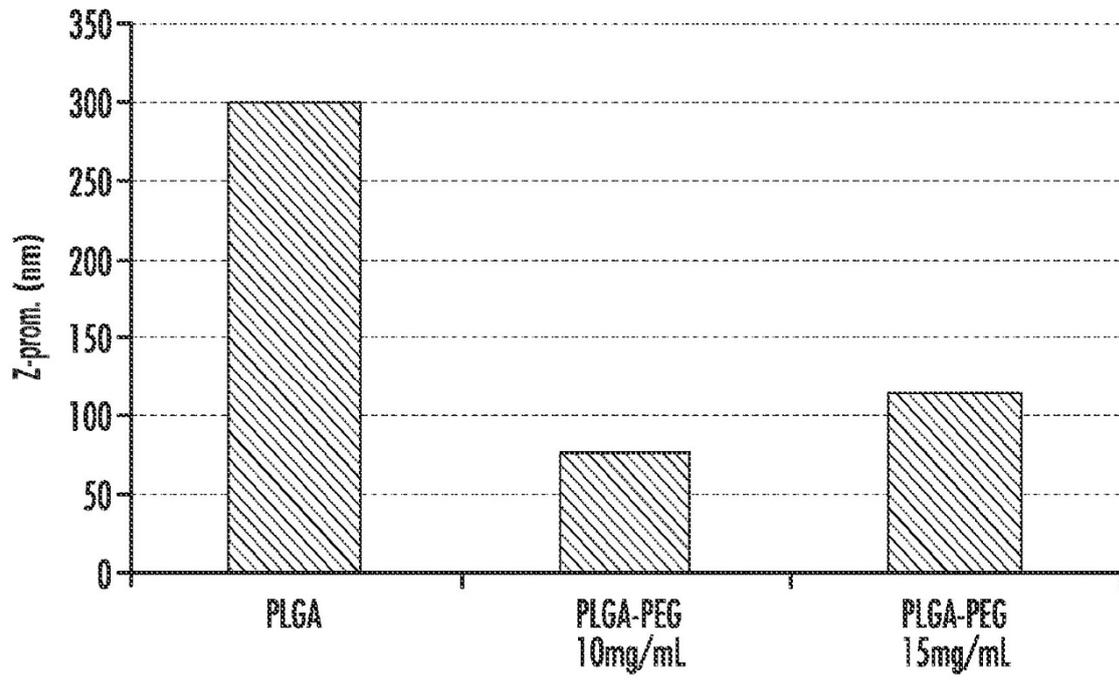


FIG. 29



**FIG. 30**

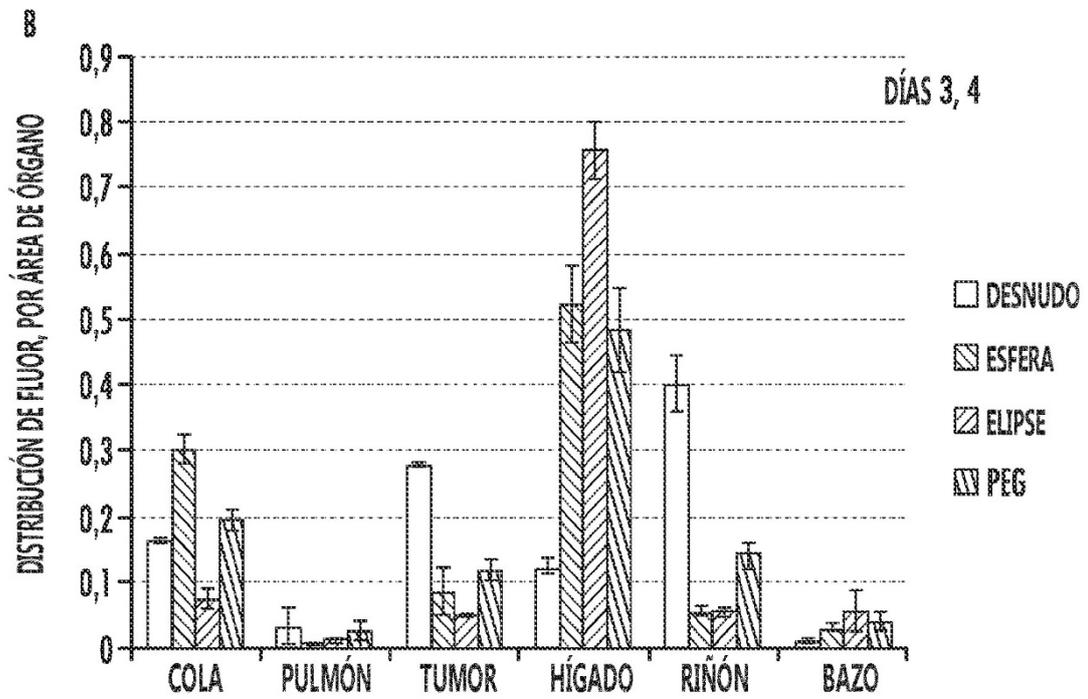
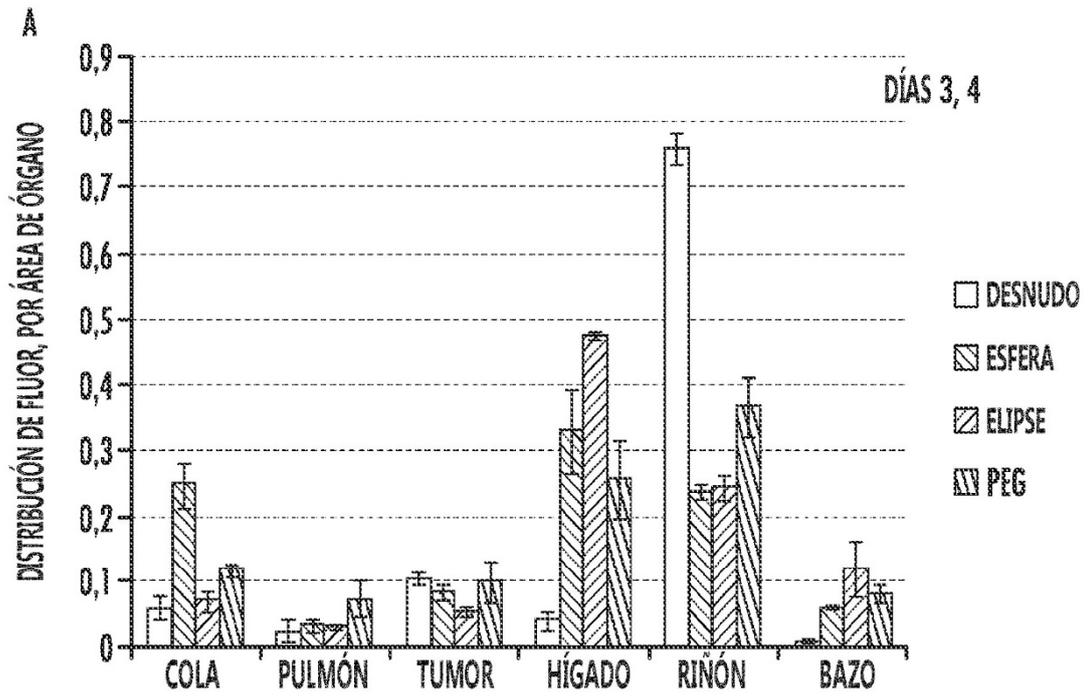
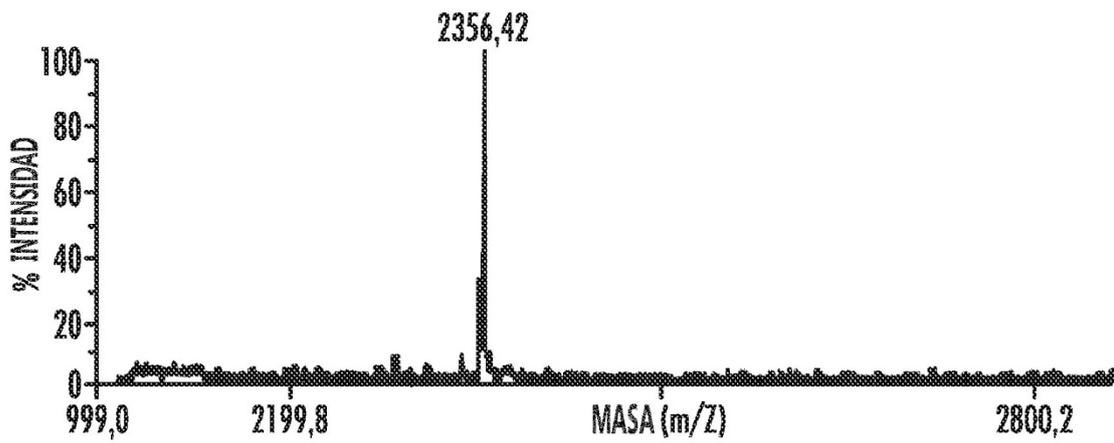
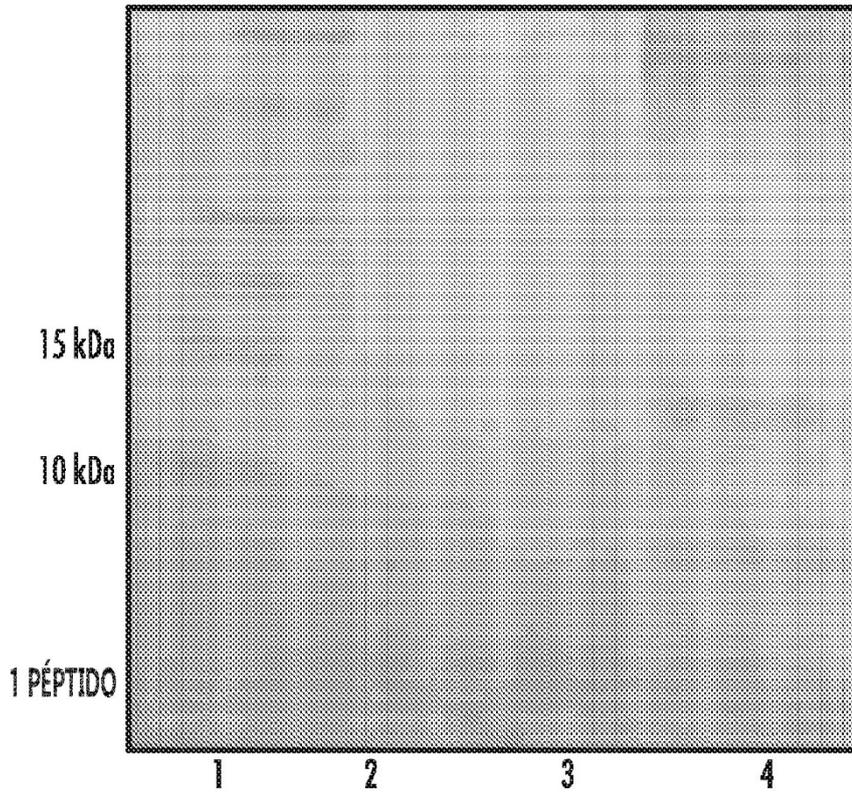


FIG. 31



**FIG. 32**