

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 460**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 7/18 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2004 E 04708820 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1590458**

54 Título: **Péptido antagonista del receptor B₂ de bradiquinina proveniente de la piel de un anfibio**

30 Prioridad:

06.02.2003 GB 0302624

03.10.2003 GB 0323193

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

19.03.2013

73 Titular/es:

**QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST (100.0%)
UNIVERSITY ROAD
BELFAST BT7 1NN, GB**

72 Inventor/es:

**SHAW, CHRIS;
HIRST, DAVID;
CHEN, TIANBAO;
O'ROURKE, MARTIN y
RAO, PINGFAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 460 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

Péptido antagonista del receptor B₂ de bradiquinina proveniente de la piel de un anfibio

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos y uso de los mismos. En particular, se refiere a moléculas antagonistas de bradiquinina.

Introducción

10 La serie formidable de moléculas bioactivas, incluyendo péptidos, presentes en piel de anfibio, ha sido objeto de estudio durante aproximadamente 40 años (Erspamer, V. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 79C, 1-7). La fuente de estos cócteles moleculares son las glándulas venenosas o granulares especializadas, que como respuesta a estrés o ataque de un depredador, se secretan a la superficie de la piel (Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri Erspamer, G. F., Montecucchi, P.P y De Castiglione R. (1985) *Peptides* 6Supl. 3, 7-12). Desde los estudios pioneros sobre los péptidos de piel de anfibio por Vittorio Erspamer, se han caracterizado estructuralmente varios cientos de péptidos y se han clasificado en familias en base a similitudes estructurales, por ejemplo, bombesina, taquiquininas y bradiquininas (Lazarus, L. H. y Atilla, M. (1993) *Prog. Neurobiol.* 41, 473-507).

15 Las bradiquininas se encuentran en las secreciones de la piel de muchos anfibios anuros incluyendo especies representativas de las familias Ranidae, Hylidae y Bombinatoridae (Conlon, J. M. y Aronsson, U. (1997) *Peptides* 18, 361-365; Yasuhara, T., Ishikawa, O., Nakajima, T., Araki, K. y Tachibana, S. (1979) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 27, 486-491; Anastasi, A., Bertaccini, G. y Erspamer, V. (1966) *Br. J. Pharmacol.* 27, 479-485; Yasuhara, T., Hira, M., Nakajima, T., Yanaihara, N. y Yanaihara, C. (1973) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 21, 1388-139; Lai R., Liu H., Hui Lee W. y Zhang Y. (2 001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 259-263).

20 Las acciones de bradiquinina son diversas, incluyendo vasodilatación con hipotensión inducida posterior, aumento de la permeabilidad vascular, inducción de dolor y contracción de una diversidad de tipos de músculo liso (Regoli, D., Rizzi, A. y Cab, G. (1997) *Pharmacol. Res.* 35, 513-515). Sin embargo, las acciones de algunas variantes estructurales tales como filoquinina (bradiquinil-1YSulfato de *Phyllomedusa* sp.) con frecuencia son más potentes y prolongadas, por ejemplo sobre la inducción de vasodilatación/hipotensión (Anastasi, A., Bertaccini, G. y Erspamer, V. (1966) *Br. J. Pharmacol.* 27, 479-485).

30 A diferencia de la estrategia de administración suprafisiológica de agonistas de bradiquinina evolucionados en anfibios, las serpientes hemotóxicas son bastante diferentes. Los venenos de estos reptiles son una fuente rica de péptidos pequeños que potencian la acción de bradiquinina sobre el músculo liso vascular de mamífero inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Higuchi, S., Murayaraa, N., Saguchi, K., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A. CM., Ogawa, T., Deshimaru, M. y Ohno, M. (1999) *Immunopharmacology* 44, 12 9-135). Los péptidos tipo, del veneno de la víbora Brasileña, *Bothrops jararaca*, fueron los compuestos líderes en el desarrollo de fármaco inhibidor de ACE que son actualmente el pilar principal en el tratamiento de hipertensión (Moser, M. (2002) *J. Hypertension* 20, S3-S10).

35 La solicitud PCT WO8607263 divulga un péptido RPPGLGfLR, que es un antagonista de receptor de bradiquinina. El péptido es un derivado de la bradiquinina de mamífero.

No teniendo conocimiento de ningún estudio previo dirigido a determinar se existían análogos de piel de anfibio para péptidos potenciadores de bradiquinina del veneno de reptil, los inventores se embarcaron en un estudio sistemático diseñado para abordar esta cuestión.

40 Compendio de la invención

45 De forma sorprendente, en su investigación en busca de un péptido potenciador de bradiquinina de anfibio, los presentes inventores han encontrado un péptido antagonista del receptor de bradiquinina en la secreción de la piel del sapo Chino, *Bombina maxima*. Este péptido, denominado en lo sucesivo en la presente memoria quinestatina, representa una clase estructural completamente novedosa de péptido de piel de anfibio que tiene una actividad inhibitora de bradiquinina única.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido aislado como se expone en la reivindicación 1.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el péptido de y para su uso en los métodos de la invención comprende la secuencia de aminoácidos:

50 pGlu-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.NH₂ (SEC ID N°: 3).

El péptido de la invención puede ser de cualquier longitud, siempre y cuando conserve la actividad inhibitora de bradiquinina. Preferentemente, el péptido de y para su uso en la invención tiene actividad antagonista del receptor B₂. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el péptido es un nonapéptido. En una realización particularmente

preferida, el péptido es un nonapéptido que tiene una secuencia de aminoácidos:

pGlu-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.NH₂ (SEC ID N°: 3).

5 Se ha de comprender que los péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención abarcan péptidos sin modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia correspondiente a la de SEC ID N°: 3 en la cual el extremo C no está amidado y la glutamina N terminal no se ha ciclado para formar piroglutamato se incluye en la invención. Sin embargo, se prefieren los péptidos que tienen tales modificaciones postraduccionales.

10 Un péptido se considera que tiene actividad antagonista de bradiquinina si en un receptor de bradiquinina definido que contiene preparación farmacológica, el péptido puede inhibir eficazmente la actividad farmacológica de bradiquinina. En realizaciones preferidas, el péptido puede inhibir eficazmente la actividad farmacológica de bradiquinina selectivamente en los receptores B₂ de bradiquinina.

Como un segundo aspecto, la invención proporciona además un polinucleótido aislado que codifica un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En una realización preferida, el polinucleótido comprende la secuencia:

CAAATTCIGGTTTAGGCCCTCTGCGT (SEC ID N°: 5).

15 Aunque los polinucleótidos de la invención generalmente se encuentran en forma aislada, los mismos pueden estar integrados con otras moléculas genéticas, tales como una molécula de vector. Por consiguiente, en un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de vector que comprende un polinucleótido aislado del segundo aspecto de la invención.

20 Además, la invención proporciona en un cuarto aspecto un método *in vitro* para antagonizar la actividad de bradiquinina en una célula o tejido, comprendiendo dicho método administrar un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención a dicha célula o tejido.

25 De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención se proporciona un método *in vitro* para constreñir músculo liso vascular, comprendiendo dicho método administrar un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención a dicho músculo liso.

30 La demostración sorprendente de que las quinestatinas muestran actividad de antagonismo de bradiquinina significativa posibilita el uso de tales péptidos y los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo enfermedades del sistema cardiovascular, enfermedades neurológicas o enfermedades degenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer.

35 Por tanto, de acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención para su uso en un método para tratar una afección asociada con actividad de bradiquinina, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de este tipo a un paciente que lo necesita.

40 Los péptidos de la invención también se ha observado que inhiben la angiogénesis. Por tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención para su uso en un método para inhibir la angiogénesis, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de este tipo a un paciente que lo necesita. La invención, por tanto, se puede usar para tratar trastornos mediados por angiogénesis, tales como trastornos autoinmunes o artritis reumatoide. Por tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por angiogénesis, por ejemplo artritis reumatoide, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de este tipo a un paciente que lo necesita.

45 En un aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Otro aspecto de la invención proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención para su uso en medicina, por ejemplo para su uso en el tratamiento de enfermedad cardiovascular o para el tratamiento de enfermedad autoinmune.

Se proporciona además mediante la invención, el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención como un polinucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad cardiovascular o para el tratamiento de enfermedad autoinmune.

- 5 Las características preferidas de cada aspecto de la invención son al igual que para los otros aspectos *mutatis mutandis*.

Descripción detallada

10 Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores han descubierto una clase novedosa de inhibidor de bradiquinina, que han denominado quinestatinas. En particular, los inventores han observado que las quinestatinas, por ejemplo SEC ID N°: 3, tienen actividad vasodilatadora potente.

Cualquier quinestatina adecuada se puede usar en la presente invención. En realizaciones preferidas la quinestatina comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 3 o un análogo biológicamente activo o fragmento de la misma.

15 Como se usa en la presente memoria, un “agonista” es una sustancia que estimula a su compañero de unión, típicamente un receptor. La estimulación se define en el contexto del ensayo particular o puede ser evidente en la bibliografía a partir de una descripción en la presente memoria que hace una comparación con un factor o sustancia que se acepta como un “agonista” o un “antagonista” del compañero de unión particular en condiciones sustancialmente similares a las apreciadas por los expertos en la materia. La estimulación se puede definir con respecto a un aumento en un efecto o función particular que se induce mediante la interacción del agonista o agonista parcial con un compañero de unión y puede incluir efectos alostéricos.

20 Como se usa en la presente memoria, un “antagonista” es una sustancia que inhibe a su compañero de unión, típicamente un receptor. La inhibición se define en el contexto del ensayo particular o puede ser evidente en la bibliografía a partir de una descripción en la presente memoria que hace una comparación con un factor o sustancia que se acepta como un “agonista” o un “antagonista” del compañero de unión particular en condiciones sustancialmente similares a las apreciadas por los expertos en la materia. La inhibición se puede definir con respecto a una disminución en un efecto o función particular que es inducida por la interacción del antagonista con un compañero de unión y puede incluir efectos alostéricos. Como se usa en la presente memoria, un “agonista parcial” es una sustancia que proporciona un nivel de estimulación a su compañero de unión que es intermedio entre el de un antagonista completo o total y un agonista definido por cualquier estándar aceptado de actividad agonista. Se reconocerá que la estimulación y por tanto, la inhibición están definidas intrínsecamente por cualquier sustancia o categoría de sustancias definidas como agonistas, antagonistas o agonistas parciales. Como se usa en la presente memoria, “actividad intrínseca” o “eficacia”, se refiere a una medida de eficacia biológica del complejo de compañero de unión. Con respecto a farmacología de receptor, el contexto en el cual la actividad intrínseca o eficacia se tiene que definir dependerá del contexto del complejo del compañero de unión (por ejemplo, receptor/ligando) y la consideración de una actividad pertinente para un resultado biológico particular. Por ejemplo, en algunas circunstancias, la actividad intrínseca puede variar dependiendo del sistema de segundo mensajero particular implicado. Véase Hoyer y Boddeke, (1993) *Trends Pharmacol Sci.* 14(7): 270. La determinación de si tales evaluaciones contextualmente específicas son pertinentes y cómo podrían ser estas pertinentes en el contexto de la presente invención, será evidente para un experto en la materia.

Actividad biológica

40 La actividad biológica se puede evaluar por cualquier medio conocido en la técnica o como se describe en la presente memoria. En realizaciones preferidas se considera que un análogo o fragmento es biológicamente activo si el mismo es capaz de inhibir vasodilatación inducida por bradiquinina y/o es capaz de inhibir angiogénesis. Preferentemente, se considera que un análogo o fragmento es biológicamente activo, es decir, tiene actividad de quinestatina si el mismo es capaz de inhibir vasodilatación inducida por bradiquinina y es capaz de inhibir angiogénesis.

En realizaciones preferidas de la invención, los análogos o fragmentos de la invención están desprovistos de efectos sobre el músculo liso directos, es decir, desprovistos de efectos vasoactivos.

50 En realizaciones particularmente preferidas, la DI50 de la quinestatina o el análogo o fragmento en el músculo liso arterial es menor que la IDI50 de HOE 140, preferentemente al menos 10 veces, por ejemplo al menos 20 veces, más preferentemente al menos 30 veces, aún más preferentemente al menos 40 veces y lo más preferente al menos 50 veces menos que la DI50 de HOE 140 en una preparación comparable. En realizaciones particularmente preferidas, la DI50 de la quinestatina o análogo o fragmento en el músculo liso arterial es del orden de 1×10^{-8} M en comparación con la DE50 de bradiquinina (5×10^{-6} M), es decir, 50 – 100 veces más potente que HOE 140 para antagonizar al receptor B₂ de bradiquinina.

55 La actividad biológica de los péptidos de quinestatina (incluyendo fragmentos, variantes, derivados y análogos de los mismos), se puede ensayar mediante diversos métodos. Por ejemplo, en una realización en la que se ensaya la capacidad de unión o de competir con quinestatina (o bradiquinina) por la unión al receptor B₂ de bradiquinina, se

- 5 pueden usar diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo que usan técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos de "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando etiquetas de oro coloidal, de enzima o isótopo radiactivo, por ejemplo), transferencias de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunolectroforesis y similares. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención.
- 10 Cuando se identifica un ligando de quinestatina o se está evaluando la capacidad de un fragmento polipeptídico, variante o derivado descrito en la presente memoria de multimerizar, se puede ensayar la unión, por ejemplo, por medios bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía en gel reductor y no reductor, cromatografía de afinidad de proteína y transferencia de afinidad. Véase en general, Phizicky, E., y *col.*, *Microbiol. Rev.* 59: 94-123 (1995).
- 15 La actividad antiangiogénesis se puede ensayar usando cualquier ensayo convencional, tal como el ensayo de Matrigel y los ensayos usados en los Ejemplos.

Fragmentos

- 20 Un "fragmento" de una quinestatina significa un tramo de restos de aminoácidos de al menos 6 aminoácidos, típicamente al menos 7 aminoácidos, preferentemente al menos 8 aminoácidos de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 3, que conserva la actividad biológica de quinestatina, por ejemplo, la capacidad de antagonizar de forma selectiva bradiquinina en los receptores B₂ de bradiquinina.

- 25 Los análogos de quinestatina de y para su uso en la invención se refieren a un polipéptido modificado mediante la variación de la secuencia de aminoácidos de una quinestatina, por ejemplo, SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, por ejemplo mediante la manipulación del ácido nucleico que codifica la proteína o mediante la alteración de la propia proteína. Tales análogos de la secuencia de aminoácidos de quinestatina natural pueden implicar inserción, adición, supresión y/o sustitución de uno o más aminoácidos, mientras que proporcionan un péptido capaz de dilatar el músculo liso arterial.

- 30 Preferentemente tales análogos implican la inserción, adición, supresión y/o la sustitución de 15 o menos aminoácidos, más preferentemente de 10 o menos, incluso más preferentemente de 5 o menos y lo más preferible de 1 o 2 aminoácidos únicamente.

- 35 Los análogos de la invención incluyen péptidos multiméricos o de fusión incluyendo tal péptido de quinestatina, secuencias análogas o fragmentos y profármacos que incluyen tales secuencias, derivados de los péptidos de la invención, incluyendo el péptido enlazado a un compañero de acoplamiento, por ejemplo una molécula efectora, una etiqueta, un fármaco, una toxina y/o un vehículo o molécula transportadora. Las técnicas para acoplar los péptidos de la invención a compañeros de acoplamiento tanto peptídico como no peptídico se conocen bien en la técnica.

- Los análogos de la invención incluyen péptidos de fusión. Por ejemplo, los análogos pueden comprender péptidos de la invención enlazados, por ejemplo, a anticuerpos que dirigen los péptidos a tejido enfermo, por ejemplo, tejido cardíaco o tejido tumoral.

- 40 Los péptidos de quinestatina descritos en la presente memoria se pueden fusionar con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM) o porciones de las mismas (CH1, CH2, CH3 o cualquier combinación de las mismas) y partes de las mismas, dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y muestran una semivida aumentada *in vivo*. Las proteínas de fusión USch pueden ser más eficaces para unirse y neutralizar a otras moléculas que a los polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismos en solitario. Véase, por ejemplo, Fountoulakis y *col.*, *J. Biochem.*, 270: 3958-3964 (1995).

- 45 Las proteínas de fusión de la invención también incluyen péptidos de quinestatina fusionados con albúmina, por ejemplo albúmina sérica humana recombinante o fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.876.969, Patente EP 0 413 622 y Patente de Estados Unidos N° 5.766.883).

- Los polinucleótidos que codifican tales proteínas de fusión descritas en la presente memoria también están incluidos en la invención.

50 Análogos de péptido inversos

- 55 Los retroanálogos o análogos inversos de péptidos naturales o sus derivados sintéticos también pueden ser útiles, pero no forman parte de la invención reivindicada. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0497 366, U.S. 5.519.115 y Merrifield y *col.*, 1995, *PNAS*, 92: 3449-53. Como se describe en el documento EP 0497 366, los péptidos inversos se producen invirtiendo la secuencia de aminoácidos de un péptido de origen natural o sintético. Tales péptidos inversos conservan la misma estructura tridimensional general (por ejemplo, alfa hélice) que el

5 péptido parental con la excepción de la conformación alrededor de sitios sensibles a proteasa internos y las características de los extremos N y C. Los péptidos inversos se supone que no solamente conservan la actividad biológica del péptido "normal" no invertido sino que también poseen propiedades mejoradas, incluyendo actividad biológica aumentada. (Véase Iwahori y col., 1997, Biol. Pharm. Bull. 20: 267-70). Los análogos de y para su uso en la presente invención pueden por lo tanto comprender péptidos inversos de quinestatinas naturales y sintéticas.

Los péptidos inversos particularmente útiles incluyen péptidos que tienen la fórmula genérica:

Arg-Xaa-Pro-Xaa-Leu-Gly-Xaa-Xaa-Xaa (SEC ID N°: 2; en la Xaa es cualquier resto de aminoácido).

Un péptido inverso particularmente preferido tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 4.

10 Los péptidos (incluyendo péptidos inversos y fragmentos de ambos) se pueden generar completamente o parcialmente mediante síntesis química o mediante expresión a partir de ácido nucleico. Los péptidos se pueden preparar fácilmente de acuerdo con métodos de síntesis de péptidos líquidos convencionales o, preferentemente, en fase sólida bien establecidos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), en M. Bodanzsky y A. Bodanzsky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York (1984).

15 **Péptidos multiméricos**

Como se ha descrito anteriormente, los péptidos pueden estar en forma de multímeros. Por tanto los multímeros (de 2, 3 o más unidades monoméricas de análogos de quinestatina individuales) están dentro del alcance de la invención.

20 Tales multímeros se pueden usar para preparar un péptido monomérico preparando un péptido multimérico que incluye la unidad monomérica y un sitio escindible (es decir, un sitio enzimáticamente escindible) y posteriormente escindiendo el multímero para producir un monómero deseado.

El uso de multímeros puede aumentar la afinidad de unión por un receptor. Por tanto, en el presente caso, la afinidad de unión de los péptidos de la invención al receptor B₂ de bradiquinina, con frecuencia se puede aumentar usando los multímeros de 2-5, preferentemente 2-3 restos de unión a receptor.

25 Los multímeros pueden ser homómeros o heterómeros. Como se usa en la presente memoria, el término homómero se refiere a un multímero que contiene únicamente polipéptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de los péptidos reivindicados o fragmentos, variantes, variantes de corte y empalme, proteínas de fusión u otros análogos de quinestatina descritos en la presente memoria). Estos homómeros pueden contener péptidos de quinestatina que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. Por ejemplo, los multímeros pueden 30 incluir únicamente péptidos de quinestatina que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica o pueden incluir diferentes secuencias de aminoácidos. El multímero puede ser un homodímero (por ejemplo, que contiene péptidos de quinestatina que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes), homotrímero u homotetrámero.

35 Como se usa en la presente memoria, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (es decir, péptidos no quinestatina) además de los péptidos de quinestatina descritos en la presente memoria.

40 Los multímeros pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden estar enlazados indirectamente, mediante por ejemplo, formación de liposomas. Por tanto, en una realización, los multímeros se forman cuando los péptidos de quinestatina descritos en la presente memoria se ponen en contacto los unos con los otros en solución. En otra realización, los heteromultímeros se forman cuando péptidos de quinestatina y no quinestatina se ponen en contacto con anticuerpos frente a los polipéptidos descritos en la presente memoria (incluyendo anticuerpos frente a la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión descrita en la presente memoria) en solución. En otras realizaciones, los multímeros descritos en la presente memoria se pueden formar mediante asociaciones covalentes con y/o entre los péptidos de quinestatina (y 45 opcionalmente péptidos no quinestatina) descritos en la presente memoria.

50 Tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más restos de aminoácidos contenidos en la secuencia de quinestatina (por ejemplo, la mencionada en SEC ID N°: 1). En una realización, la asociaciones covalentes son la consecuencia de manipulación química o recombinante. Como alternativa, tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más restos de aminoácidos contenidos en la secuencia polipeptídica heteróloga de una proteína de fusión de quinestatina. En un ejemplo, las asociaciones covalentes se producen entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión descrita en la presente memoria (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). En un ejemplo específico, las asociaciones covalentes se producen entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión quinestatina-Fc descrita en la presente memoria. En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de proteínas de fusión descritas en la presente memoria se producen entre 55 secuencia polipeptídica heteróloga de otra proteína que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, por ejemplo, osteoprotegerina (véase, por ejemplo, Publicación Internacional N° WO 98/49305). En otra realización, dos o más polipéptidos descritos en la presente memoria se unen a través de enlazadores peptídicos. Los ejemplos

incluyen los enlazadores peptídicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.073.627. Las proteínas que comprenden péptidos de quinestatina múltiples separados por enlazadores peptídicos se pueden producir usando tecnología de ADN recombinante convencional.

5 Los multímeros también se pueden preparar fusionando los péptidos de quinestatina a una secuencia polipeptídica de cremallera de leucina o de cremallera de isoleucina. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles descritas en la presente memoria son los descritos en la solicitud PCT WO 94/10308. Las proteínas de fusión recombinante que comprenden un polipéptido descrito en la presente memoria fusionado a una secuencia polipeptídica que dimeriza o trimeriza en
10 solución se pueden expresar en células huésped adecuadas y la proteína de fusión multimérica soluble resultante se puede recuperar a partir del sobrenadante de cultivo usando técnicas conocidas en la técnica.

Los multímeros también se pueden generar usando técnicas químicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos que se desea estén contenidos en los multímeros descritos en la presente memoria se pueden entrecruzar químicamente usando moléculas enlazadoras y técnicas de optimización de longitud de molécula enlazadora conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Adicionalmente,
15 los multímeros se pueden generar usando técnicas conocidas en la técnica para formar uno o más entrecruzamientos inter-molécula entre los restos de cisteína localizados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea estén contenidos en el multímero (véase, por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Además, los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden modificar de manera rutinaria mediante la adición de cisteína o biotina al extremo C o al extremo N del polipéptido y técnicas conocidas en la técnica se
20 pueden aplicar para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Adicionalmente, se pueden usar técnicas conocidas en la técnica para preparar liposomas que contienen dos o más péptidos de quinestatina que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925).

25 Como alternativa, se pueden formar multímeros que incluyen únicamente aminoácidos de origen natural usando técnicas de ingeniería genética conocidas en la técnica. Como alternativa, los que incluyen modificaciones postraduccionales o de otro tipo se pueden preparar mediante una combinación de técnicas recombinantes y modificaciones químicas. En una realización, los péptidos de quinestatina se producen de forma recombinante usando tecnología de proteína de fusión descrita en la presente memoria o conocida de otra manera en la técnica
30 (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Por ejemplo, polinucleótidos que codifican un homodímero descrito en la presente memoria se pueden generar ligando una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido de quinestatina descrito en la presente memoria a una secuencia que codifica un polipéptido enlazador y después adicionalmente a una secuencia polinucleotídica sintética que codifica el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa desde el extremo C original hasta el extremo N (que carece de secuencia líder) (véase, por
35 ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Las técnicas recombinantes descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica se pueden aplicar para generar péptidos de quinestatina recombinantes que contienen un dominio transmembrana (o péptido hidrófobo o señal) y que se pueden incorporar mediante técnicas de reconstitución de membrana en liposomas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925).

Profármacos

40 Los péptidos descritos en la presente memoria tienen por objeto, al menos en algunas realizaciones, administrarse a un ser humano u otro mamífero para tratar o prevenir un trastorno mediado por liberación de bradiquinina. Los péptidos se administran típicamente por vía parenteral y se pueden metabolizar fácilmente mediante proteasas plasmáticas. La administración oral, que es quizás la vía de administración más atractiva, puede ser incluso más problemática. En el estómago, el ácido degrada y las enzimas desnaturalizan los péptidos. Los péptidos que
45 sobreviven la entrada al intestino intactos se someten a proteólisis adicional a medida que ellos son atacados continuamente por una diversidad de enzimas, incluyendo enzimas gástricas y pancreáticas, exo y endopeptidasas y peptidasas del borde cuticular. Como resultado, el paso de los péptidos desde el lumen del intestino hacia el torrente sanguíneo puede estar gravemente limitado. Sin embargo, se han desarrollado diversos profármacos que posibilitan la administración parenteral y oral de péptidos terapéuticos.

50 Los péptidos se pueden conjugar a diversos restos, tales como restos poliméricos, para modificar las propiedades físico químicas de los fármacos peptídicos, por ejemplo, para aumentar la resistencia a degradación ácida y enzimática y para mejorar la penetración de tales fármacos a través de las membranas mucosas. Por ejemplo, Abuchowski y Davis han descrito diversos métodos para derivatizar enzimas para proporcionar productos estabilizados *in vivo* solubles en agua no inmunogénicos ("Soluble polymers-Enzyme adducts", Enzymes as Drugs,
55 Eds. Holcenberg y Roberts, J. Wiley and Sons, New York, N. Y. (1981)). Abuchowski y Davis describen diversas formas de conjugar enzimas con materiales poliméricos, tales como dextranos, polivinilpirrolidonas, glicopéptidos, polietilenglicol y poliaminoácidos. Los polipéptidos conjugados resultantes conservan sus actividades biológicas y solubilidad en agua para aplicaciones parenterales. La Patente de Estados Unidos N° 4.179.337 de Davis, y *col.* describe el acoplamiento de péptidos a polietilenglicol o polipropilenglicol que tienen un peso molecular de 500 a
60 20.000 Dalton para proporcionar una composición polipeptídica soluble en agua no inmunogénica fisiológicamente activa. El polietilenglicol o el polipropilenglicol protege al polipéptido de la pérdida de actividad y la composición se

puede inyectar en el sistema circulatorio del mamífero sin prácticamente ninguna respuesta inmunogénica.

Las Patentes de Estados Unidos N° 5.681.811, 5.438.040 y 5.359.030 describen complejos polipeptídicos conjugados estabilizados que incluyen un agente terapéutico acoplado a un oligómero que incluye restos lipófilos e hidrófilos. Garmen, y col. describen un profármaco de proteína-PEG (Garman, A. J. y Kalindjian, S. B., *FEBS Lett.*, 1987, 223, 361-365). Se puede preparar un profármaco usando esta química, en primer lugar preparando un reactivo de anhídrido maleico a partir de MPEG5000 polidisperso y luego conjugando este reactivo con los péptidos divulgados en la presente memoria. La reacción de aminoácidos con anhídridos maleicos se conoce bien. La hidrólisis del enlace maleil-amida para reformar el fármaco que contiene amina está auxiliada por la presencia del grupo carboxilo libre vecino y la geometría de ataque establecida por el doble enlace. Los péptidos se pueden liberar (por hidrólisis de los profármacos) en condiciones fisiológicas.

Los péptidos también se pueden acoplar a polímeros, tales como PEG polidisperso, a través de un enlace degradable, por ejemplo, el enlace degradable mostrado (con respecto a interferón α -2b pegilado) en Roberts, M. J., y col., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 459-476.

Los péptidos también se pueden enlazar a polímeros tales como PEG usando estrategias de eliminación de 1,6 o 1,4 bencilo (BE) (véanse, por ejemplo, Lee, S., *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, (2001), 12, 163-169; Greenwald, R. B., y col., Patente de Estados Unidos N° 6.180.095, 2001; Greenwald, R. B., y col., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3657-3667); el uso de lactonización de bloqueo de trimetilo (TML) (Greenwald, R. B., y col., *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 475-487); el acoplamiento de PEG ácido carboxílico a un enlazador de ácido carboxílico terminado en hidroxilo (Roberts, M. J., *J. Pharm. Sci.*, 1998, 87(11), 1440-1445) y profármacos de PEG que implican familias de fenil éteres de MPEG y benzamidas de MPEG enlazadas a un fármaco que contiene amina a través de un aril carbamato (Roberts, M. J., y col., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 459-476), incluyendo una estructura de profármaco que implica una relación meta entre el carbamato y la amida o éter de PEG (Patente de Estados Unidos N° 6.413.507 de Bently, y col.); y profármacos que implican un mecanismo de reducción al contrario de un mecanismo de hidrólisis (Zalipsky, S., y col., *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10(5), 703-707).

Los péptidos tienen grupos amino, amido, hidroxilo y/o carboxílicos libres y estos grupos funcionales se pueden usar para convertir los péptidos en profármacos. Los profármacos incluyen compuestos en los que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) restos de aminoácido están unidos covalentemente a través de enlaces peptídicos a grupos amino, hidroxilo o de ácido carboxílico libres de diversos polímeros, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol. Los profármacos también incluyen compuestos en los cuales carbonatos, carbamatos, amidas y alquil ésteres están enlazados covalentemente a los péptidos anteriores a través de los ácidos carboxílicos C terminal.

Algunos enfoques implican el uso de inhibidores de enzima para reducir la velocidad de degradación de proteínas y péptidos en el tracto gastrointestinal; manipulación del pH para inactivar enzimas digestivas locales; uso de potenciadores de permeabilidad para mejorar la absorción de péptidos aumentando sus transportes paracelulares y transcelulares; uso de nanopartículas como vehículos particulados para facilitar absorción intacta mediante el epitelio intestinal, especialmente parches de Peyer y para aumentar la resistencia a la degradación de enzima; emulsiones líquidas para proteger el fármaco de degradación química y enzimática en el lumen intestinal; y formulaciones de micelas para fármacos con mala solubilidad en agua.

En algunos casos, los péptidos se pueden proporcionar en una cápsula o comprimido adecuado con un revestimiento entérico, de forma que el péptido no se libera en el estómago. Como alternativa, o adicionalmente, el péptido se puede proporcionar como un profármaco. En una realización, los péptidos están presentes en estos dispositivos de administración de fármaco como profármacos.

Los profármacos que comprenden los péptidos de la invención o profármacos a partir de los cuales los péptidos de la invención (incluyendo análogos y fragmentos) se liberan o se pueden liberar se considera que son análogos de la invención.

Los péptidos marcados isotópicamente o profármaco peptídico también están incluidos en la invención. Tales péptidos o profármacos peptídicos son idénticos a los péptidos o profármacos peptídicos de la invención, excepto por el hecho de que uno o más átomos se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o número de masa encontrado de forma habitual en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}M , ^{18}O , ^{17}O y ^{35}S , respectivamente. Los péptidos de la presente invención, profármacos de los mismos y/o los profármacos que contienen los isótopos mencionados anteriores y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de la presente invención. Determinados compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución de tejido de fármaco y/o sustrato. Los isótopos tratados con tritio, es decir, ^3H y carbono 14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ^2H , puede producir determinadas ventajas terapéuticas que se producen como resultado de una estabilidad metabólica mayor, por ejemplo semivida *in vivo* aumentada o requerimientos de dosis reducidos y, por lo tanto, se

pueden preferir en algunas circunstancias. Los péptidos marcados isotópicamente y los profármacos de los mismos se pueden preparar de forma general llevando a cabo procedimientos fácilmente conocidos, que incluyen sustituir un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente, por ejemplo, un aminoácido marcado.

5 Péptidomiméticos

Los péptidos miméticos de quinestatina se pueden usar como péptidos terapéuticos. Los péptidos de quinestatina miméticos son péptidos cortos que mimetizan la actividad biológica de quinestatina uniéndose al receptor B₂ de bradiquinina y funcionando como un antagonista en ese receptor. Tales péptidos miméticos se pueden obtener a partir de métodos conocidos en la técnica tales como, pero sin limitación, presentación en fago o química combinatoria. Por ejemplo, el método divulgado por Wrighton, y *col.*, *Science* 273: 458-463 (1996) se puede usar para generar péptidos de quinestatina miméticos.

Ácido nucleico

Como alternativa, los péptidos de y para su uso en la presente invención se pueden producir mediante el uso de ácido nucleico en un sistema de expresión.

15 Por consiguiente, la presente invención también proporciona en diversos aspectos ácido nucleico que codifica péptidos de la invención.

Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona además un polinucleótido aislado que codifica el péptido (que puede ser una quinestatina peptídica inversa) de la presente invención.

En una realización preferida, el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico:

20 CAAATTCCTGGTTTAGGCCCTCTGCGT (SEC ID N°: 5).

En general, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se proporciona como un aislado, en forma aislada y/o purificada o libre o sustancialmente libre de material con el cual el mismo está asociado de forma natural, tal como libre o sustancialmente libre de ácido nucleico que flanquea el gen en el genoma de sapo, con la excepción posiblemente de una o más secuencias reguladoras para expresión. El ácido nucleico puede ser completamente o parcialmente sintético y puede incluir ADN genómico, ADNc o ARN.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido de acuerdo con la presente invención se pueden preparar fácilmente por el experto usando la información y referencias contenidas en la presente memoria y las técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, véase Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Ausubel *et al.*, Short Protocols en Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992).

Se pueden realizar modificaciones a las secuencias, por ejemplo usando mutagénesis dirigida, para conducir la expresión de péptido modificado o para tomar en cuenta la preferencia de codón en células huésped usadas para expresar el ácido nucleico.

35 Con el fin de obtener expresión de las secuencias de ácido nucleico, las secuencias se pueden incorporar en un vector que tiene una o más secuencias de control unidas operativamente al ácido nucleico para controlar su expresión. Los vectores pueden incluir otras secuencias tales como promotores o potenciadores para activar la expresión del ácido nucleico insertado, secuencias de ácido nucleico de forma que el péptido se produce como una fusión y/o ácido nucleico que codifica señales de secreción de forma que el polipéptido producido en la célula huésped se secreta a partir de la célula.

40 Posteriormente se pueden obtener péptidos mediante transformación de los vectores en células huésped en las cuales el vector es funcional, cultivando las células huésped de forma que el péptido se produzca y recuperando el péptido a partir de las células huésped o del medio circundante.

Por tanto, la presente invención también incluye un método para preparar un péptido (como se ha divulgado), incluyendo el método expresión a partir de ácido nucleico que codifica el péptido (generalmente ácido nucleico de acuerdo con la invención). Esto puede conseguirse de forma conveniente cultivando una célula huésped en cultivo, que contiene un vector de este tipo, en condiciones apropiadas que provocan o permiten la expresión del polipéptido.

Se pueden elegir o construir vectores adecuados que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado.

Los vectores pueden ser plásmidos, viral, por ejemplo fago o fagémido, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook y *col.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para manipulación de ácido nucleico, por

ejemplo en preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen con detalle en Current Protocols en Molecular Biology, Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992.

5 Los sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes se conocen bien. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células eucariotas, tales como de mamífero y de levadura y sistemas de baculovirus.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula huésped que contiene ácido nucleico heterólogo como se divulga en la presente memoria.

10 El ácido nucleico de la invención puede estar integrado en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula huésped.

La integración se puede promover mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales. El ácido nucleico puede estar en un vector extracromosómico dentro de la célula o de otra forma heterólogo identificable o ajeno a la célula.

15 La introducción, que en general puede (particularmente para introducción *in vitro*) denominarse sin limitación "transformación", puede emplear cualquier técnica disponible.

20 Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófago. Como una alternativa, se podría emplear la inyección directa del ácido nucleico.

25 Después de la introducción se pueden provocar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo cultivando células huésped (que pueden incluir las propias células transformadas aunque más probablemente las células serán descendientes de las células transformadas) en condiciones para expresión del gen, de forma que se produce el polipéptido (o péptido) codificado. Si el polipéptido se expresa acoplado a un péptido líder señal apropiado el mismo se puede secretar a partir de la célula en el medio de cultivo. A continuación de la producción mediante expresión, un polipéptido o péptido se puede aislar y/o purificar a partir de la célula huésped y/o del medio de cultivo, como puede ser el caso y posteriormente usarse según se desee, por ejemplo en la formulación de una composición que puede incluir uno o más componentes adicionales tales como una composición farmacéutica que incluye uno o más excipientes, vehículos o transportadores farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, véase más adelante).

30

Composiciones farmacéuticas

35 La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido (o análogo o fragmento) de la invención. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser, por ejemplo oral, intravenosa o tópica.

40 La formulación puede ser un líquido, por ejemplo, una solución salina fisiológica que contiene tampón no fosfato a pH 6,8-7,6 o un polvo liofilizado.

Dosis

45 Las composiciones se administran preferentemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada y la velocidad y la evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción de tratamiento, por ejemplo decisiones acerca de la dosificación etc., está en última instancia dentro de la responsabilidad y a discreción del facultativo general y otros médicos y típicamente toma en cuenta el trastorno que se tiene que tratar, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos.

Administración

50 Los péptidos de y para su uso en la presente invención se pueden administrar en solitario pero preferentemente se administrarán como una composición farmacéutica, que generalmente comprende un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado dependiendo de la vía de administración pretendida.

Los péptidos se pueden administrar a un paciente que necesita el tratamiento a través de cualquier vía adecuada. La dosis exacta dependerá de varios factores, incluyendo la naturaleza exacta del péptido.

Algunas vías de administración adecuadas incluyen (pero sin limitación) administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vagina o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural).

5 Para inyección intravenosa o inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia son muy capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

10 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir solución salina fisiológica, solución de dextrosa o de otro sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

15 La composición también se puede administrar a través de microesferas, liposomas, otros sistemas de administración de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en determinados tejidos incluyendo sangre. Los ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos compartidos, por ejemplo supositorios o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919, documento EP-A-0058481) copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al*, Biopolymers 22(1): 547-556, 1985), poli(2-hidroxietil-metacrilato) o etileno vinil acetato (Langer *et al*, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277, 1981 y Langer, Chem. Tech. 12: 98-105, 1982). Los liposomas que contienen los polipéptidos se preparan mediante métodos bien conocidos: documento DE 3.218.121A; Epstein *et al*, PNAS USA, 82: 3688-3692, 1985; Hwang *et al*, PNAS USA, 77: 4030-4034, 1980; documento EP-A-0052522; documento E-A-0036676; documento EP-A-210088046; documento EP-A-0143949; documento EP-A-0142541; documento JP-A-83-11808; Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. De forma ordinaria, los liposomas son de tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los cuales el contenido lipídico es mayor de aproximadamente 30 mol % de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la velocidad óptima de filtración del polipéptido.

25 Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que se pueden usar de acuerdo con la invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A. (ed), 1980.

30 Se pueden usar terapias de dirección para administrar el agente activo, por ejemplo, el péptido más específicamente a músculo liso arterial, mediante el uso de sistemas de dirección tales como anticuerpos o ligandos específicos de células.

Usos terapéuticos

35 Los péptidos de la invención se pueden usar como antagonistas de bradiquinina para el control y/o tratamiento de una amplia diversidad de afecciones clínicas en mamíferos, incluyendo seres humanos. Los péptidos de la invención se pueden usar en el tratamiento de cualquier afección o trastorno para los cuales pueden ser útiles antagonistas de bradiquinina y/o vasoconstrictores.

40 "Tratamiento" o "terapia" incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un ser humano o a un animal no humano. El tratamiento puede ser con respecto a una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, de alivio o profilácticos.

Los péptidos se pueden usar en cualquier afección para la cual el antagonismo de receptores de bradiquinina, la inhibición de la angiogénesis y/o la constricción de vasos pueda ser terapéuticamente útil.

45 En una realización preferida, los péptidos se usan para el tratamiento de trastornos cardiovasculares tales como hipotensión. Otras afecciones para los cuales los péptidos y métodos de la invención pueden ser útiles incluyen alivio del dolor, por ejemplo, como un agente antiinflamatorio.

50 Otras afecciones que se pueden tratar usando los péptidos y métodos de la invención incluyen inflamación y trastornos inflamatorios, trastornos cardiovasculares tales como hipotensión, dolor, resfriado común, alergias y trastornos de inmunología/alergia, asma, pancreatitis, quemaduras y otros trastornos de la piel, infección viral y otras enfermedades infecciosas tales como sepsis, trauma múltiple y similares. Las afecciones específicas incluyen, pero sin limitación, enfermedades respiratorias, diuresis, natriuresis, calciuresis, COPD (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), picor, cistitis, pruritos, artritis reumatoide, osteoartritis, migraña, dolor neuropático, eccema cerebral postraumático y postisquémico, cirrosis hepática y otras enfermedades del hígado/riñón, rinitis, insuficiencia hepatorenal, diabetes y otras enfermedades metabólicas, metástasis, pancreatitis, neovascularización, opacidad corneal, glaucoma, dolor ocular, hipertensión ocular y otras enfermedades oculares, angioedema y similares en mamíferos, especialmente en seres humanos.

55

Además, la activación del receptor B₂ de bradiquinina se cree que está asociada con algunos de los síntomas de enfermedad de Alzheimer. Por tanto los péptidos de la invención se pueden usar como agentes antifonnación de placa en enfermedad neurológica u otra enfermedad degenerativa. Los ejemplos de tales trastornos incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y otros trastornos del sistema nervioso central tales como esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, apoplejía, trauma craneal, edema cerebral postquirúrgico, edema cerebral (general), edema cerebral citotóxico (tal como el asociado con tumores cerebrales, apoplejía, trauma craneal, etc.), edema cerebral asociado con enfermedades metabólicas (insuficiencia renal, enfermedades metabólicas pediátricas, etc.), tumor cerebral y otros cánceres, pseudotumor cerebri, hidrocefalo, trauma de la médula espinal, edema de la médula espinal, enfermedades neurodegenerativas, lesión cerebral postraumática, otras lesiones de cabeza y similares.

Métodos antiangiogénicos de tratamiento

Los péptidos y métodos de la invención se pueden usar para inhibir la angiogénesis. Existen varios métodos para inhibir angiogénesis. La angiogénesis se puede inhibir administrando una cantidad eficaz de un péptido antiangiogénico adecuado de la invención a un paciente que necesita tal tratamiento. Los métodos se pueden usar para tratar tumores, diversos trastornos autoinmunes, trastornos hereditarios, trastornos oculares y otros trastornos mediados por angiogénesis.

Los métodos terapéuticos y de diagnóstico descritos en la presente memoria implican típicamente administrar una cantidad eficaz de los péptidos o composiciones incluyendo los péptidos a un paciente. La dosis exacta que se tiene que administrar variará de acuerdo con el uso de las composiciones y de la edad, sexo y condición del paciente y se puede determinar fácilmente por el médico tratante. Las composiciones se pueden administrar como una dosis única o de una manera continua a lo largo de un periodo de tiempo. Las dosis se pueden repetir según sea apropiado.

Las composiciones se pueden usar para tratar trastornos mediados por angiogénesis incluyendo hemangioma, tumores sólidos, leucemia, metástasis, telangiectasia, psoriasis, escleroderma, granuloma piógeno, angiogénesis miocárdica, enfermedad de Crohn, neovascularización de placa, colaterales coronarios, colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis de extremidad isquémica, enfermedades corneales, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, artritis, neovascularización diabética, degeneración macular, curación de heridas, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con Helicobacter, fracturas, queloides y vasculogénesis. Los trastornos específicos que se pueden tratar y los compuestos y composiciones útiles en estos métodos se describen con más detalle más adelante.

Carcinomas/Tumores

Los carcinomas que se pueden tratar usando los péptidos, compuestos, composiciones y métodos de la invención incluyen carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, de tipo de anillo de sello, carcinoma esofágico, de tipo intestinal, de tipo mucinoso, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón, carcinoma mamario, carcinoma renal, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma testicular, carcinoma ovárico, carcinoma endometrial, carcinoma tiroideo, carcinoma de hígado, carcinoma de laringe, mesotelioma, carcinomas neuroendocrinos, tumores neuroectodérmicos, melanoma, gliomas, neuroblastomas, sarcomas, leiomiomas, MFII, fibrosarcoma, liposarcoma, MPNT, condrosarcoma y linfomas.

Trastornos oculares mediados por angiogénesis

Diversos trastornos oculares están mediados por angiogénesis y se pueden tratar usando los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria. Un ejemplo de una enfermedad mediada por angiogénesis es enfermedad neovascular ocular, que se caracteriza por invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo y es la causa más común de ceguera. En degeneración macular relacionada con la edad, los problemas visuales asociados están causados por un crecimiento interior de capilares coroideos a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular por debajo del epitelio de pigmento retiniano. El daño angiogénico también está asociado con retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental. Otras enfermedades asociadas con neovascularización corneal incluyen, pero sin limitación, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de Vitamina A, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratitis sicca, penfigoide y queratotomía radial. Las enfermedades asociadas con neovascularización retiniana/coroidea incluyen, pero sin limitación, retinopatía diabética, degeneración macular, miopía supuesta, fovea óptica, desprendimiento de retina crónico, síndrome de hiperviscosidad, trauma al ojo y complicaciones postláser. Otras enfermedades incluyen, pero sin limitación, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitrorretinopatía proliferativa.

Inflamación

Los péptidos y la invención también se pueden usar para tratar trastornos mediados por angiogénesis, tales como inflamación, incluyendo diversas formas de artritis, tales como artritis reumatoide y osteoartritis. En estos métodos, el tratamiento con combinaciones de los compuestos descritos en la presente memoria con otros agentes útiles para tratar los trastornos, tales como inhibidores de ciclooxigenasa 2 (COX-2), que se conocen bien por los expertos en la

materia.

- Los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones pueden experimentar angiogénesis. Las células endoteliales forman nuevas redes vasculares y liberan factores y especies de oxígeno reactivo que conducen a crecimiento del pannus y destrucción del cartílago. Estos factores se cree que contribuyen activamente a artritis reumatoide y también a la osteoartritis. La activación de condrocitos mediante factores relacionados con angiogénesis contribuye a la destrucción articular y también promueve nueva formación ósea. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar como una intervención terapéutica para prevenir destrucción ósea y nueva formación ósea.
- La angiogénesis patológica también se cree que está implicada con inflamación crónica. Los ejemplos de trastornos que se pueden tratar usando los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, bartonelosis y aterosclerosis.
- En el tratamiento de una enfermedad específica usando un péptido de la invención, en el tratamiento de una enfermedad específica, los péptidos de la presente invención se pueden combinar con diversos agentes terapéuticos existentes usados para esa enfermedad.
- En algunas realizaciones, el péptido quinestatina puede mostrar más efectos terapéuticos eficaces cuando se usa en combinación con un antagonista de H₁. Por consiguiente, en una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de quinestatina, un análogo de la misma o un profármaco de la misma según se describe en la presente memoria y un antagonista de H₁ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La combinación de un péptido de quinestatina según se describe en la presente memoria con un antihistamínico (antagonista de H₁) puede ser particularmente favorable para su uso en la profilaxis y tratamiento de asma y rinitis. Los ejemplos de antihistamínicos son clorfeniramina, bromfeniramina, clemastina, quetotifeno, azatadina, loratadina, terfenadina, cetiricina, astemizol, tacifilina, levocabastina, difenhidramina, temelastina, etolotifeno, acrivastina, acelastina, ebastina, mequitacina, KA-398, FK-613, mizolastina, MDL-103896, levocetiricina, furoato de mometasona, DF-111301, KC-11404, carebastina, ramatroban, desloratadina, noberastina, selenotifeno, alinastina, E-4716, eflitricina, tritocualina, norastemizol, ZCR-2060, WY-49051, KAA-276, VXJF-K-9015, tagoricina, KC-11425, epinastina, MDL-28163, terfenadina, HSR-609, acrivastina y BMY-25368.
- Los péptidos de quinestatina se pueden emplear provechosamente en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes, incluyendo un fármaco antibiótico, antifúngico, antiviral, antihistamínico, antiinflamatorio no esteroideo o fármaco antirreumático modificador de enfermedad.
- Para tratar artritis reumatoide, los péptidos de quinestatina se pueden combinar con agentes tales como inhibidores de TNF-alfa, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TNF (tales como Remicade, CDP-870 y D₂ E₇) y moléculas de inmunoglobulina receptoras de TNF (tal como Enbrel[®]), inhibidores de COX-2 (tales como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib y etoricoxib), metotrexato de dosis baja, leflunomida, hidroxiclороquina, d-penicilamina, auranofina y oro parenteral u oral.
- Los péptidos de quinestatina también se pueden usar en combinación con agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de osteoartritis. Los agentes que se pueden usar en combinación incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos convencionales (denominados en lo sucesivo en la presente memoria AINE) tales como piroxicam, diclofenaco, ácidos propiónico tales como naproxeno, flubiprofeno, fenoprofeno, quetoprofeno e ibuprofeno, fenamatos tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindac, apazona, pirazolonas tales como fenilbutazona, salicilatos tales como aspirina, inhibidores de COX-2 tales como celecoxib, valdecoxib, rofecoxib y etoricoxib, analgésicos y terapias intraarticulares tales como corticosteroides y ácidos hialurónicos tales como hyalgan y synvisc.
- Los péptidos de quinestatina también se pueden usar en combinación con agentes anticáncer tales como endostetina y angioestatina o fármacos citotóxicos tales como adriamicina, daunomicina, cisplatino, etopósido, taxol, taxotere y alcaloides, tales como vincristina, inhibidores de farnesil transferasa, inhibidores de VEGF y antimetabolitos tales como metotrexato.
- Los péptidos de quinestatina también se pueden usar en combinación con agentes antivirales tales como Viracept, AZT, aciclovir y famciclovir y compuestos antisépticos tales como Zovant, tificogin, NOX-100 y 13R270773.
- Los péptidos de quinestatina también se pueden usar en combinación con agentes cardiovasculares tales como bloqueantes de canal de calcio, agentes reductores de lípidos tales como estatinas, fibratos, beta bloqueantes, inhibidores de Ace, antagonista del receptor de Angiotensina-2 e inhibidores de agregación de plaquetas.
- Los péptidos de quinestatina también se pueden usar en combinación con agentes del SNC tales como antidepresivos (tal como sertralina), fármacos anti-Parkinsonianos (tales como deprenil, L-dopa, Requip, Mirapex, inhibidores de MAOB tales como selegilina y rasagilina, inhibidores de comP tales como Tasmara, inhibidores de A-2, inhibidores de la recaptación de dopamina, antagonistas de NMDA, agonistas de nicotina, agonistas de Dopamina e

inhibidores de sintasa de óxido nítrico neuronal y fármacos anti Alzheimer tales como donepecil, tacrina, inhibidores de COX-2, propentofina o metrifonato.

Los péptidos de quinestatina también se pueden usar en combinación con agentes de osteoporosis tales como roloxifeno, droloxifeno, lasofoxifeno o fosamax y agentes inmunosupresores tales como FK-506 y rapamicina.

- 5 Los péptidos de quinestatina se pueden combinar con una o más de los siguientes: (a) inhibidores de biosíntesis de leucotrienos: inhibidores de 5-lipooxigenasa (5-LO) y antagonista de proteína activadora de 5-lipooxigenasa (FLAP) seleccionados entre el grupo que consiste en zileuton; ABT-23761; fenileuton; tepoxalina; Abbott-79175; Abbott-2985761; N-(5-sustituido-tiofeno-2 alquilsulfonamidas de Fórmula (5.2.8); 2,6-di-terc-butilfenol hidrazonas de Fórmula (5.2.10); la clase de metoxitetrahidropiranos que incluye Zeneca ZD-2138 de Fórmula (5.2.11); el compuesto SB-210661 de Fórmula (5.2.12) y la clase a la cual pertenece; la clase de compuestos de 2-ciano-naftaleno sustituidos con piridinilo a los cuales pertenece L-739,010; la clase de compuestos de 2-cianoquinolina a la cual pertenece L-746,530; las clases de compuestos de indol y quinolina a las cuales pertenece MK-591, MK-886 y BAY X 1005; (b) antagonistas de receptor de leucotrienos LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄ seleccionados entre el grupo que consiste en la clase de compuestos de fenotiazina-3-ona a la cual pertenece L-651,392; la clase de compuestos amidino a la cual pertenece CGS-25019c; la clase de benzoxaolaminas a la cual pertenece ontazolast; la clase de benzenocarboximidamidas a la cual pertenece BIIL 2841260M y las clases de compuestos a las cuales pertenecen zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-2459913, iralukast (CGP 45715A) y BAY X 7195; (c) inhibidores de PDE4 incluyendo inhibidores de la isoforma PDE4D; (d) inhibidores de 5-Lipooxigenasa (5-LO); o antagonistas de la proteína activadora de 5-lipooxigenasa (FLAP); (e) inhibidores dobles de 5-lipooxigenasa (5-LO) y antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF); (f) antagonistas de leucotrienos (LTRA) incluyendo antagonistas de LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄; (g) antagonistas del receptor H₁ antihistamínico incluyendo cetiricina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, astemizol, acelastina y clorfeniramina; (h) antagonista de receptor H₂ gastroprotector; (i) agentes simpatomiméticos vasoconstrictores agonistas del adrenoceptor alfa₁ y alfa₂ administrados por vía oral o por vía tópica para uso de descongestión, incluyendo propilhexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, hidrocloreuro de nafazolina, hidrocloreuro de oximetazolina, hidrocloreuro de tetrahidrozolina, hidrocloreuro de xilometazolina y hidrocloreuro de etilnorepirefrina; (j) agonistas del adrenoceptor alfa₁ y alfa₂ en combinación con inhibidores de 5-lipooxigenasa (5-LO); (k) agentes anticolinérgicos incluyendo bromuro de ipratropio; bromuro de tiotropio; bromuro de oxitropio; pirencepina y telencepina; (l) agonistas de adrenoceptor [3- a beta₄ incluyendo metaproterenol, isoproterenol, isoprenalina, albuterol, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, mesilato de bitolterol y pirbuterol; (m) metilxantinas incluyendo teofilina y aminofilina; (n) cromoglicato de sodio; (o) antagonistas del receptor muscarínico (M1, M2 y M3); (p) inhibidores de COX-1 (NTHE); inhibidores selectivos de COX-2 incluyendo rofecoxib; y NTHE de óxido nítrico; (q) miméticos del factor de crecimiento similar a insulina de tipo I (IGF-1); (r) ciclesonida; (s) glucocorticoides inhalados con efectos secundarios sistémicos reducidos, incluyendo prednisona, prednisolona, flunisolida, triamcinolona acetona, dipropionato de beclometasona, budesonida, propionato de fluticasona y furoato de mometasona; (t) inhibidores de tripsina; (u) antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF); (v) anticuerpos monoclonales activos frente a entidades inflamatorias endógenas; (w) IPL 576; (x) agentes de factor de necrosis antitumoral (TNF-alfa) incluyendo Etanercept, Infliximab y D2E7; (y) DMARD incluyendo Leflunomida; (z) péptidos TCR; (aa) inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina (ICE); (bb) inhibidores de IMPDH; (cc) inhibidores de molécula de adhesión incluyendo antagonistas de VLA-S4; (dd) catepsinas; (ee) inhibidores de MAP quinasa; (ff) inhibidores de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa; (hh) oro en forma de grupo aurotio junto con diversos grupos hidrófilos; (ii) agentes inmunosupresores; por ejemplo, ciclosporina, azatioprina y metotrexato; (jj) agentes antigota, por ejemplo, colchicina; (kk) o inhibidores de xantina oxidasa, por ejemplo, alopurinol; (ll) agentes uricosúricos, por ejemplo, probenecid, sulfipirazona y benzbromarona; (mm) agentes antineoplásicos, especialmente fármacos antimetabólicos incluyendo los alcaloides de vinca tales como vinblastina y vincristina; (nn) secretagogos de la hormona del crecimiento, o inhibidores de metaloproteasas de matriz (MMP), es decir, las estromelinas, las colagenasas y las gelatinasas, así como también agrecanasa; especialmente colagenasa-1 (MMP-1), colagenasa-2 (MMP-8), colagenasa-3 (MMP-13), estromelina-1 (MMP-3), estromelina-2 (MMP-10) y estromelina-3 (MMP-11); (pp) factor de crecimiento transformante (TGFP); (qq) factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (rr); factor de crecimiento de fibroblastos, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); (ss) factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)M (tt) crema de capsaicina; (uu) antagonistas de receptor NK y NK₃ de Tachiquinina seleccionados entre el grupo que consiste en NKP-608C; SB-233412 (talnetant); y D-4418; y (vv) inhibidores de elastasa seleccionados entre el grupo que consiste en UT-77 y ZD-0892.

55 Dirección

Terapias de dirección se pueden usar para administrar el agente activo, por ejemplo, péptido más específicamente a músculo liso arterial, usando sistemas de dirección tales como anticuerpos o ligandos específicos de células. Estos sistemas de dirección se pueden enlazar covalentemente a la secuencia peptídica o a un vehículo de administración de fármaco (tal como liposoma, microesfera, micropartícula, microcápsula y similares). Los péptidos también se pueden dirigir a tejido cardíaco isquémico o a lechos de tumor en crecimiento (los cuales ambos están asociados con lechos capilares unidos) incorporando los péptidos a micropartículas u otros vehículos de administración de fármaco que tienen un tamaño adecuado de forma que los mismos pasen a través de las venas pero se alojan en lechos capilares. Cuando se alojan en los lechos, los péptidos se pueden liberar localmente (en lugar de liberarse

sistémicamente) en un emplazamiento en el cual son más útiles.

Como se ha descrito anteriormente, los métodos de terapia génica se pueden llevar a cabo usando los nucleótidos de la presente invención.

5 La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes. Se hace referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La **Figura 1** ilustra perfil de absorbancia de HPLC de fase inversa fraccionada de secreción de piel de *Bombina maxima*. El tiempo de retención de péptido inhibidor de bradiquinina (quiestatina) se indica mediante una flecha.

10 La **Figura 2** ilustra perfil de fragmentación Q-TOF Ultima EM/EM de quiestatina con secuencia *de novo* tabulada obtenida usando el software incrustado MaxENT™, PepSeq™ y MassSeq™. Los restos de Leu/lie isobáricos no se pueden diferenciar y se asignan como Leu por defecto.

La **Figura 3** ilustra la secuencia de nucleótidos de ADNc de cadena completa que codifica una copia única de quiestatina en el extremo C de la fase de lectura abierta (recuadro). Se indican el péptido señal putativo (subrayado), la secuencia codificante de máximaquinina (subrayado doble) y el codón de parada (asterisco).

15 La **Figura 4** ilustra perfiles de bioactividad comparativos de bradiquinina y quiestatina en la preparación de arteria de la cola de rata. (A) Dosis-respuestas separadas de bradiquinina (▲) y quiestatina (■). (B) Dosis-respuesta de quiestatina (■) en presencia de concentración de relajante de bradiquinina máxima (1×10^{-6} M) (▲). (C) Dosis-respuesta de bradiquinina (▲) y repetida en presencia de quiestatina (1×10^{-6} M) (■). Cada punto representa la media y el error típico de seis réplicas.

20 La **Figura 5** ilustra la caracterización farmacológica de la respuesta de relajación inducida por bradiquinina en la preparación de arteria de la cola de rata constreñida previamente con fenilefrina. PE - fenilefrina (1×10^{-5} M), BK - bradiquinina (1×10^{-6} M) (A), HOE 140 - antagonista de receptor B_2 (3×10^{-7} M) (B), d.Arg HOE 140 - antagonista de receptor de B_1 (3×10^{-7} M) (C). Cada barra representa la media y error típico de seis réplicas.

25 La **Figura 6** ilustra el efecto de quiestatina sobre relajación inducida por bradiquinina de la preparación de arteria de cola de rata pre constreñida con fenilefrina. PE - fenilefrina (1×10^{-5} M), BK - bradiquinina (1×10^{-6} M), KS - quiestatina (1×10^{-8} M). Cada barra representa la media y error típico de seis réplicas.

La **Figura 7** ilustra la caracterización farmacológica de la respuesta inhibitoria de quiestatina en la preparación de arteria de cola de rata. PE - fenilefrina (1×10^{-5} M), BK - bradiquinina (1×10^{-6} M), HOE 140 - antagonista de receptor B_2 (3×10^{-7} M) (A), d.Arg HOE 140 - antagonista de receptor de B_1 (3×10^{-7} M) (B). KS - quiestatina (1×10^{-8} M). Cada barra representa la media y error típico de seis réplicas.

30 La **Figura 8** es un gráfico que compara la capacidad de quiestatina (■) y fumagilina (▲) de inhibir la formación de estructuras de tubo endotelial en placas de matriz de Matrigel.

La **Figura 9** es un gráfico que compara la capacidad de quiestatina (■) y fumagilina (▲) de inhibir la migración de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) en una herida de una manera dependiente de la dosis y del tiempo.

35 La **Figura 10** es una curva de tiempo respuesta que muestra el retardo en el cierre completo de heridas de 1 cm de células endoteliales en presencia de quiestatina (■) y células de control no tratadas (▲).

La **Figura 11** es un gráfico que compara el efecto del control (■), quiestatina (Q-9-R(-7) (▲) y fumagilina (▼) sobre la proliferación de la línea de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1).

40 La **Figura 12** es un gráfico que compara el efecto de quiestatina y fumagilina sobre la proliferación de la línea de célula de adenocarcinoma HT29, en términos de número de células ($\times 10^4$) sobre el tiempo (horas). Los resultados del control se muestran como (■), la CE_{50} de quiestatina se muestra como (▲), la CE_{50} más quiestatina al 10% se muestra como (▼), la concentración de quiestatina óptima se muestra como (◆) y la concentración de fumagilina óptima se muestra como (●).

Ejemplos

45 **Ejemplo 1 identificación, aislamiento, purificación y caracterización de quiestatina**

Materiales y métodos

Adquisición de secreción de piel de sapo

50 Muestra de ensayo de *bombina maxima* (n=3) se obtuvieron a partir de una fuente comercial y se capturaron en medio silvestre en la provincia de Yunnan en la República Popular de China. La secreción de la piel se obtuvo mediante masaje suave de la superficie de la piel dorsal y las glándulas paratiroides y tibial pares durante 2.3 min a

continuación de lo cual la secreción inducida fue obvia como una espuma blanca gruesa. Las secreciones se lavaron de los sapos con agua destilada-desionizada, se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C antes del análisis.

Fraccionamiento cromatográfico

- 5 Cinco miligramos de secreción de piel liofilizados se disolvieron en 0,5 ml de ácido trifluoroacético (TFA)/agua 0,05/99,95 (v/v) y se aclararon de micropartículas mediante centrifugación. El sobrenadante se sometió posteriormente a fraccionamiento de HPLC de fase inversa usando un sistema de HPLC de gradiente Thermoquest equipado con una columna semi-preparatoria C-5 Jupiter (30 x 1 cm). Esto se eluyó con un gradiente lineal formado desde 0,05/99,5 (v/v) TFA/agua a 0,05/19,95/80,0 (v/v/v) TFA/agua/acetonitrilo en 240 min a un caudal de 1 ml/min.
- 10 Se recogieron fracciones (1 ml) en intervalos de minuto y la absorbancia del efluente se supervisó continuamente a λ 214 nm. Las muestras 100 μ l se retiraron de cada fracción por triplicado, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C antes del análisis farmacológico de músculo liso.

Exploración de bioactividad usando músculo liso arterial

- 15 Ratas Wistar albinas macho (200-250g) se sometieron a eutanasia mediante asfixia seguido por dislocación cervical. La arteria de la cola se preparó como se ha descrito previamente (Chen T y col, Peptides. 2002; 23: 1547-1555, Chen T y col, Eur. J. Biochem. 2002; 269: 4693-4700, Hirst y col Br. J. Radiol. 1994; 67: 795-799). Después de perfusión de preparaciones arteriales con 1×10^{-5} M fenilefrina para obtener una meseta de constricción, se registró la relajación relativa como se ha descrito más adelante siguiendo las aplicaciones de alícuotas de 100 μ l reconstituidas de muestras de fracción de HPLC (1-240) de secreción de piel de *B. maxima*. Esto se llevó a cabo para excluir las
- 20 fracciones (25) que contenían actividad relajante de músculo liso arterial directa. A continuación, se emplearon fracciones restantes (215) en un protocolo para la identificación de péptidos potenciadores de bradiquinina. Las preparaciones se perfundieron como anteriormente con fenilefrina (1×10^{-5} M) hasta que se obtuvo la meseta de constricción. A continuación de esto, combinaciones de fenilefrina (1×10^{-5} M) y fracciones no bioactivas reconstituidas se perfundieron a través de preparaciones individuales durante 20 min. Inmediatamente después de
- 25 esto, el perfundido se reemplazó por una combinación de fenilefrina (1×10^{-5} M), bradiquinina (1×10^{-6} M) y fracciones individuales reconstituidas. Los cambios en el tono del músculo liso arterial se midieron mediante un sistema transductor de presión y los porcentajes de relaciones relativas inducidos por bradiquinina en presencia de fracciones reconstituidas se calcularon usando el paquete informático MacLab.

Análisis estructurales

- 30 Péptidos que modulan la bioactividad de bradiquinina, según se determinó mediante el bioensayo anterior, se sometieron a análisis MALDI-TOF usando un instrumento de extracción retardada Perseptive Biosystems Voyager. A continuación de la determinación de la pureza de la muestra y la masa molecular del ion MH^+ , los péptidos se sometieron a fragmentación de EM/EM y análisis de secuencia *de novo* usando un espectrómetro de masa Q-TOF Ultima (Micromass, Manchester, RU).

Identificación de ADNc que codifica el péptido novedoso

- Se extirpó piel dorsal de un sapo adulto *B. maxima* sometido a eutanasia, se congeló en nitrógeno líquido y se trituró posteriormente hasta un polvo fino en este medio. ARNm poliadenilado se aisló usando perlas magnéticas de oligo-dT como se describe por el fabricante (DynaL Biotec, RU). El ARNm aislado se sometió a un procedimiento de
- 40 amplificación rápida 3' de extremos de ADNc (RACE) usando un kit SMART-RACE (Clontech RU) básicamente como se ha descrito por el fabricante. Se empleó una variedad de cebadores para facilitar la selección de subconjuntos de clones y el cebador sentido empleado (5'-AGTTCTCAGTGTCACCTCCAGC-3') se designó a una región (bases 69-90) del dominio no traducido 5' del transcrito de maximaquinina (Nº de acceso de EMBL AJ3154 88). La mezcla heterogénea de transcritos amplificados se clonó usando un sistema de vector pGEM-T (Promega Corporation) y se secuenciaron clones individuales usando un secuenciador automatizado ABI 3100. Este
- 45 procedimiento se llevó a cabo antes del estudio actual como parte de un programa mayor de investigación que implicaba estudios proteómicos y genómicos sistemáticos y paralelos sobre péptidos de piel de anfibio. La secuencia de ADN de cada clon se tradujo en todas las 6 fases de lectura posibles y se archivó en una base de datos personalizada FASTA. Esto facilitó la interrogación con estructuras primarias de péptidos de secreción de piel adquiridas mediante degradación automatizada convencional Edman (Secuenciador de proteína ABI Procise 491) o
- 50 mediante secuenciación *de novo* de fragmentación EM/EM (Q-TOF Última).

Síntesis química del péptido novedoso

El péptido novedoso, denominado quinestatina se sintetizó mediante química fmoc en fase sólida usando un sintetizador de péptido Applied Biosystems 433. El péptido se purificó mediante HPLC de fase inversa y su pureza y masa molecular se confirmaron usando espectroscopía de masas.

Caracterización farmacológica de quinestatina usando músculo liso arterial

Preparaciones de músculo liso arterial se prepararon como se ha descrito previamente y se trataron con fenilefrina

(1×10^{-5} M) hasta que se consiguieron mesetas de constricción. A continuación de esto se realizaron una serie de experimentos para dirigirse a la caracterización farmacológica del péptido novedoso, quinestatina. 1) Se construyeron curvas de dosis respuesta separadas para bradiquinina y quinestatina usando concentraciones de ambos péptidos en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-5} M. 2) Se determinó el efecto antes de la adición de una variedad de concentraciones de quinestatina sobre la actividad observada de bradiquinina añadida posteriormente a esta concentración máximamente eficaz (10^{-6} M). 3) El efecto de adición previa de quinestatina a su concentración máximamente inhibitoria (10^{-8} M) en un estudio de dosis respuesta posterior con bradiquinina. 4) Los efectos de antagonista de receptor B_1 (desArg HOE 140) y receptor B_2 (HOE 140) (Sigma-Aldrich, RU) sobre tanto el efecto de relajación de bradiquinina como el efecto de bradiquinina antagonizada por quinestatina en la preparación de músculo liso arterial. Las preparaciones se prepararon como se ha descrito anteriormente. El segmento de arteria estabilizado se expuso a una concentración 3×10^{-7} M del antagonista de receptor B_1 , desArg HOE 140 o el antagonista del receptor B_2 , HOE 140, durante 20 min. A continuación, se añadió fenilefrina (1×10^{-5} M) a la solución de antagonista y se perfundió durante 10 min para desarrollar contracción del músculo liso arterial. Al obtener la meseta estable de constricción, el perfundido se reemplazó por otro que contenía fenilefrina, antagonista y bradiquinina (1×10^{-6} M). Durante un periodo de perfusión de 20 min, se registraron los cambios en la presión arterial como se ha descrito previamente. En una segunda serie similar de experimentos, se añadió quinestatina (1×10^{-8} M) a cada una de las soluciones de antagonista de subtipo de receptor de bradiquinina específico antes del procedimiento descrito anteriormente. Los datos se analizaron mediante ordenador usando ensayo t de Student disponible en el programa Graph Pad Prism™.

20 Resultados

Cada muestra de ensayo de *B. maxima*, produjo en promedio, 30-35 mg de peso seco de secreción de piel a continuación de estimulación. 5 mg de secreción agrupada se sometieron a fraccionamiento de HPLC de fase inversa que produjo un cromatograma complejo (Figura 1).

La exploración de fracciones cromatográficas (215) que estaban desprovistas de efectos de músculo liso directo, no detectó actividad potenciadora de bradiquinina pero identificó un péptido único que presentaba actividad inhibitoria de bradiquinina. La fracción de HPLC N° 93 (véase la Figura 1), que contenía el péptido activo, se sometió a análisis de MALDI-TOF que detectó un péptido único de m/z 932,57. El análisis posterior del péptido en un espectrómetro de masa Q-TOF Ultima, confirmó la masa molecular de 932,57 Da como la de un ion de carga única $(M+H)^+$ mediante resolución isotópica. La estructura primaria preliminar del péptido purificado se estableció mediante fragmentación de EM/EM usando el software de secuenciación *de novo* como: pGlu-Leu/Ile-Pro-Gly-Leu/Ile-Gly-Pro-Leu/Ile-Arg.amida (Figura 2).

La interrogación de las bases de datos proteína/péptido contemporáneas indicó poca similitud estructural con cualquier péptido conocido o proteína, excepto un grado limitado con nonapéptidos (Tabla 1), ninguno de los cuales están bloqueados en el extremo N o amidados en el extremo C. Debido a la naturaleza de su estructura novedosa y bioactividad, este péptido se denominó quinestatina.

La interrogación de la base de datos traducida personalizada de ADNc de piel de *B. maxima* clonada con la secuencia no modificada postraduccionalmente de quinestatina, localizó esta secuencia en el extremo C de una fase de lectura abierta precursora de 116 restos de aminoácidos (Figura 3). Este hallazgo estableció que el resto de aminoácido 2 era Ile y que los restos 5 y 8 eran Leu. El resto C-terminal de la fase de lectura abierta era Gly. Por tanto, esto puede funcionar como el donador de amida para la generación del resto de argininaamida del péptido maduro. El resto N-terminal era Gln, necesario para la formación del resto de piroglutamilo presente en el péptido maduro mediante modificación postraduccional. Este resto estaba flanqueado cadena arriba por un resto de arginilo único, indicando una escisión probable mediante pro-péptido convertasa en este sitio. De forma idéntica, fases de lectura abierta precursoras de 116 restos de aminoácidos estuvieron presentes en tres clones secuenciados diferentes y cada una contenía además de una copia de quinestatina localizada en el extremo C-terminal única, una copia única del nonadecapéptido relacionado con bradiquinina, maximaquinina (N° de acceso de EMBL AJ440236), localizada cadena arriba. La combinación de los datos de Q-TOF EM/EM con la secuencia traducida a partir del ADNc clonado, establecieron sin lugar a dudas la estructura primaria de quinestatina como pGlu-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.amida.

La síntesis química de quinestatina fue satisfactoria para producir 55 mg de péptido a continuación de la purificación. Esta réplica sintética mostró una masa idéntica y un perfil de fragmentación EM/EM en comparación con el péptido natural.

Los experimentos farmacológicos repetidos usando la réplica sintética de quinestatina y bradiquinina en preparaciones de músculo liso separadas, confirmaron que la misma estaba desprovista de actividad miorelajante en el intervalo de concentración molar eficaz de bradiquinina (Figura 4A). Sin embargo, en una segunda serie de experimentos, en los cuales se trataron previamente preparaciones de músculo liso con quinestatina, antes de la aplicación de bradiquinina a su concentración máxima eficaz (1×10^{-6} M), se observó una inhibición dependiente de la dosis de la relajación inducida por bradiquinina mediante quinestatina en el intervalo de 1×10^{-9} M - 1×10^{-6} M (Figura 4B). La abolición total de hecho de la curva de dosis respuesta de relajación inducida por bradiquinina se consiguió en presencia de quinestatina a 1×10^{-8} M (Figura 4C), un hallazgo que fue indicativo de un mecanismo no

competitivo dentro de este intervalo de concentración. El antagonista de receptor B₂ de bradiquinina altamente específico, HOE-140, inhibió significativamente ($p=0,0247$, $n=6$) la relajación inducida por bradiquinina del músculo liso de arteria de cola de rata, mientras que la misma concentración (3×10^{-7} M), de des Arg HOE 140 (un antagonista de receptor B₁ de bradiquinina específico) no tenía un efecto significativo (Figura 5). Estos datos indicaron, según se esperaba, que la relajación inducida por bradiquinina del músculo liso arterial estaba mediada por receptores B₂. En un experimento similar, llevado a cabo a continuación de la adición de quinestatina (1×10^{-8} M), preparaciones tratadas tanto con HOE 140 como con des Arg HOE 140 mostraron una inhibición significativa de la relajación inducida por bradiquinina ($p=0,0015$ y $p=0,033$, $n=6$, respectivamente) (Figuras 6 y 7). Estos datos indican que la inhibición de efectos de quinestatina de la respuesta de relajación inducida por bradiquinina en esta preparación de músculo liso arterial mediante antagonismo en receptores B₂.

Análisis

Las glándulas granulares dérmicas de la piel dorsal de *Bombina maxima*, sintetizan y secretan una secreción defensiva compleja que incluye un péptido antagonista de receptor B₂ de bradiquinina novedoso, denominado quinestatina. Este péptido puede representar el prototipo de una nueva clase de péptido de piel de anfibio debido a su bioactividad específica y estructura primaria. El sistema quinina/quininógeno es una diana favorecida para determinados componentes de secreción de veneno/defensivos tanto de invertebrados como vertebrados. Los artrópodos y anfibios producen bradiquininas en altas concentraciones y el primer grupo, donde el veneno es inyectado, se cree que estos juegan un papel central en el dolor, enrojecimiento y edema asociado con envenenamiento (Pisano, J.J. (1966). Mem. Inst. Butantan Simp. Internac. 33, 441-446). Los anfibios producen bradiquinina y una amplia serie de péptidos relacionados en sus secreciones de piel defensivas y la evidencia actual puede sugerir que la plétora de formas estructurales refleja que se dirigen a diferentes grupos de depredadores. Por el contrario, los péptidos potenciadores de bradiquinina de venenos de serpiente hemotóxicos (Higuchi y col. (1999) Immunopharmacology 44, 129-135), descubiertos más recientemente en venenos de escorpión (Meki, A.R.M.A., Nassar, A. Y. y Roachat, H. (1995) Peptides 16, 1359-1365), actúan como inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE), una proteasa desactivadora de bradiquinina principal.

El descubrimiento de quinestatina en la secreción de piel defensiva de *Bombina maxima*, refleja por tanto una diana novedosa dentro del mismo sistema quinina/quininógeno de antagonismo de receptor de bradiquinina selectivo. La bradiquinina tiene una actividad relajante máxima en la preparación de músculo liso arterial de cola de rata a una concentración de uno micromolar. Esto se puede bloquear casi totalmente mediante quinestatina diez nanomolar, indicativo de una afinidad más elevada posible por y/o ocupación de receptores de bradiquinina. Posteriormente, experimentos de caracterización farmacológica más específicos que usan preparación de músculo liso arterial de cola de rata, indicaron que el efecto de relajación inducido por bradiquinina y su antagonismo inducido por quinetensina estaban mediados a través de receptores B₂ de una manera no competitiva.

La comparación de las estructuras primarias de quinestatina y aquellas de bradiquininas de piel de anfibio identificadas previamente (Tabla 1) revela una homología estructural limitada. Los restos 4 (Gly), 7 (Pro) y 9 (Arg) están completamente conservados en todos estos péptidos. Los restos 1 (pGlu), 2 (Ile), 5 (Leu) y 6 (Gly) son únicos de quinestatina. El resto 3 (Pro) está conservado en la mayoría de las bradiquininas y Leu en la posición 8 se encuentra en la bradiquinina de piel de rana Pickerel (*Rana palustris*) (Basir, Y. J., Knoop, F. C., Dulka, J. y Conlon, J. M. (2000). Biochim. Biophys. Acta. - Protein Structure and Molecular Enzymology 1543, 95-105).

Estudios farmacológicos previos han demostrado que Leu⁸-bradiquinina está desprovista de actividad agonista de bradiquinina pero que en preparaciones con alto contenido en receptor B₁, tales como la aorta de conejo, es un antagonista potente para tanto bradiquinina como el agonista receptor B₁ selectivo, des-Arg⁹ bradiquinina (Regoli, D. y Barabe, J. (1980) Pharmacol. Rev. 32, 1-46). Estudios de estructura-actividad que usan análogos sustituidos en resto 8 (Phe) indicaron que la actividad antagonista aumentaba con la longitud de la cadena lateral alifática de forma que Ala <<ciclohexilalanina<Leu. Modificaciones adicionales, tales como amidación o esterificación del extremo C del resto leucilo, sustitución por el resto isoleucilo de cadena ramificada o el resto norleucilo de cadena recta, no aumentaron adicionalmente la afinidad (Regoli, D. y Barabe, J. (1980) Pharmacol. Rev. 32, 1-46).

Leu⁸-bradiquinina, aunque se sintetizó químicamente para estudios previos de estructura/actividad de bradiquinina, se ha observado que se produce en la naturaleza de diversas formas. Ornitoquinina, el análogo aviar de bradiquinina, se generó en plasma tanto de pollo como de paloma y su estructura se estableció como (Thr⁶, Leu⁸)-bradiquinina (Kimura M y col Eur. J. Biochem. 1987; 168: 493-501). El receptor autólogo se clonó posteriormente a partir de pollo y se expresó (Schroeder et L, J. Biol. Chera. 1997; 272: 12475-12481). Ensayos de unión a radioreceptor demostraron que la afinidad por ornitoquinina, usando ornitoquinina marcada con yodo radiactivo (Tyr⁰) como ligando de competición, era de tres a cuatro órdenes de magnitud menor ($4,7 \times 10^{-9}$ M frente a $>1 \times 10^{-6}$ M) que bradiquinina. También, Hoe 140, un antagonista de receptor B₂ de mamífero potente, funcionó como un agonista parcial en este receptor expresado de forma recombinante (Lemback y col, Br. J. Pharmacol. 1991; 102: 297-304).

Como se ha descrito anteriormente, la quinestatina es aproximadamente 10 veces más potente como antagonista de bradiquinina que Leu⁸ bradiquinina.

Tabla 1

Alineación de la estructura primaria de quinestatina con bradiquinina y nonapéptidos relacionados a partir de piel de anfibio. Las estructuras primarias de ornitoquinina y del antagonista de receptor B₂ de bradiquinina, HOE-140, se incluyen para comparación.

5	(referencias en paréntesis)
	Quinestatina pGlu-Ile-Pro- Gly -Leu-Gly- Pro -Leu- Arg .NH ₂
	Bradiquinina Arg-Pro-Pro- Gly -Phe-Ser- Pro -Phe- Arg ^[4,9]
10	(Thr-6)-bradiquinina Arg-Pro-Pro- Gly -Phe-Thr- Pro -Phe- Arg ^[5,9]
	(Leu-8)-bradiquinina Arg-Pro-Pro- Gly -Phe-Ser- Pro -Leu- Arg ^[17]
15	(Val-1,Thr-6)-bradiquinina Val-Pro-Pro- Gly -Phe-Thr- Pro -Phe- Arg ^[5]
	(Ala-3, Thr-6)-bradiquinina Arg-Pro-Ala- Gly -Phe-Thr- Pro -Phe- Arg ^[10]
	Ornitoquinina Arg-Pro-Pro- Gly -Phe-Thr- Pro -Leu- Arg ^[19]
20	HOE-140 <u>Arg</u> -Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser- <u>Tic</u> -Oic-Arg ^[22]
	- restos conservados en péptidos naturales en negrita
	- En HOE-140, restos subrayados (Arg ¹ y Tic ⁸) son D-isómeros.
25	- Abreviaturas no convencionales: Hyp-hidroxi prolina, Thi-β-(2-tienil)-L-alanina, Tic-ácido tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, Oic-ácido octahidroindol-2-carboxílico.

Tabla 1 Referencias

- [5] Yasuhara y col, R. Chem. Pharm. Bull. (Tokio) 1979; 27: 486-491.
 [10] Chen T y col, Eur. J. Biochem. 2002; 269: 4693-4700.
 [19] Kimura y col, Eur. J. Biochem. 1987; 168: 493-501.
 [22] Duellman WE, Trueb L. Biology of Amphibians. Johns Hopkins University Press, Baltimore/Londres; 1994

Ejemplo 2: análisis de los efectos anti-angiogénicos de quinestatina

La capacidad anti-angiogénica de quinestatina se comparó a través de los controles no tratados y aquellos tratados con fumagilina, un agente terapéutico anti-angiogénico utilizado ampliamente de origen fúngico.

El experimento 1 demuestra claramente un efecto inhibitorio sobre la formación de tubos en un ensayo de Matrigel clásico que es comparable en magnitud al observado con fumagilina (Figura 8).

El experimento 2 demuestra una inhibición en migración de células endoteliales establecido mediante el tiempo necesario para lograr la mitad del cierre de una herida de 1 cm de ancho inducida en una monocapa de células. El mismo efecto inhibitorio máximo se observó tanto con quinestatina como fumagilina aunque la quinestatina fue más potente en una base molar (Figura 9). La quinestatina prolongó el tiempo de cierre de herida en el 100% desde 7 h (control) hasta 14 h (tratamiento) (Figura 10).

El experimento 3 demostró que tanto quinestatina como fumagilina tenían efectos profundos sobre la inhibición de proliferación celular (Figura 11), un efecto que también fue demostrable en una línea de células de adenocarcinoma epitelial (HT29) (Figura 12).

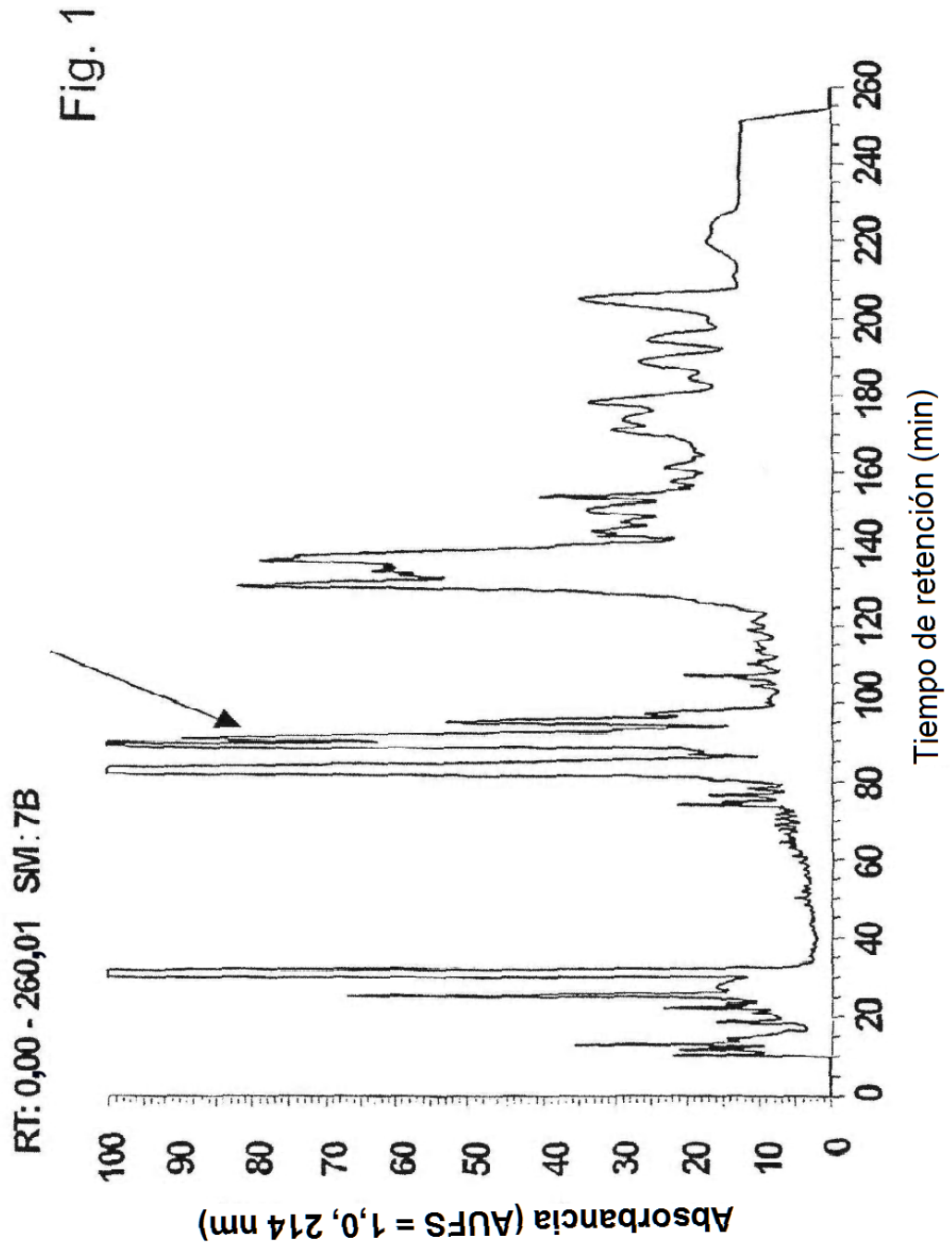
La formación de imágenes de células endoteliales tratadas con quinestatina reveló cambios significativos en la microarquitectura celular. La orientación de estructuras del cicloesqueleto era más evidente cuando las células de control se compararon con células tratadas con quinestatina y se visualizaron a continuación de demostración inmunoquímica de componentes mediante formación de imágenes de láser confocal. La orientación de los microtúbulos estaba completamente alterada dando como resultado un depósito infranuclear en lugar de un alineamiento para facilitar la migración. Igualmente se localizó dineína como un halo nuclear sin redes detectadas en células tratadas. Los filamentos intermedios no presentaron orientación direccional.

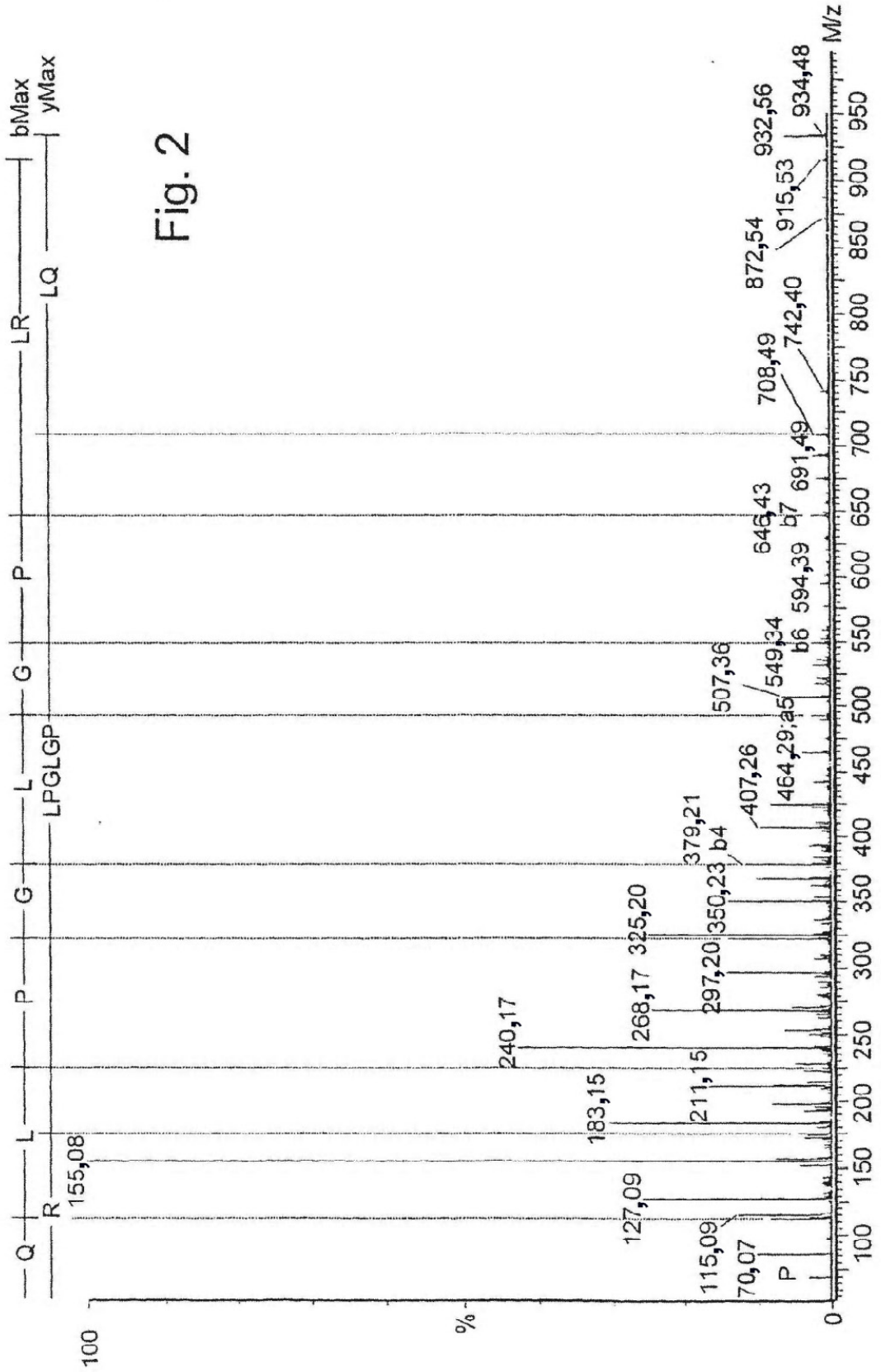
Estas observaciones celulares son consistentes con los datos obtenidos a partir de los experimentos 1 a 3 de este ejemplo, en los cuales la migración y la formación de tubos angiogénicos estuvieron inhibidas de forma implícita a través de desorganización de componentes de citoesqueleto facilitadores.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que tiene actividad antagonista de bradiquinina, en el que dicho péptido comprende la secuencia de aminoácidos:
 - 5 -pGlu-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.NH₂ (ID de Secuencia N°: 3); o
 - Gln-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido comprende la secuencia de aminoácidos pGlu-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.NH₂ (ID de Secuencia N°: 3).
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el péptido es un nonapéptido.
4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho péptido consiste en un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos pGlu-Ile-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg.NH₂ (ID de Secuencia N°: 3).
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido tiene actividad antagonista de receptor B₂ de bradiquinina selectiva.
6. Un péptido multimérico que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. Un profármaco peptídico que tiene actividad antagonista de bradiquinina o que es capaz de tener actividad antagonista de bradiquinina cuando el péptido se libera a continuación de la administración, en el que dicho profármaco se selecciona entre el grupo que consiste en compuestos que tienen un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos unidos covalentemente a través de enlaces peptídicos a grupos libres amino, hidroxilo o de ácido carboxílico de un polímero; compuestos que tienen carbonatos, carbamatos, amidas y alquil ésteres enlazados covalentemente a dichos péptidos a través de los ácidos carboxílicos C-terminales y en el que dicho péptido comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. El profármaco de la reivindicación 7, en el que el profármaco es un conjugado de péptido-polímero, en el que el polímero comprende un resto de polialquilenglicol.
9. El profármaco de la reivindicación 8, en el que el resto de polialquilenglicol comprende un resto de polietilenglicol.
10. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende la secuencia: CAAATTCCTGGTTTAGGCCCTCTGCGT (SEC ID N°: 5).
12. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11.
13. Un anticuerpo que tiene especificidad de unión por el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
14. Un método *in vitro* para antagonizar la actividad de bradiquinina en una célula o tejido, comprendiendo dicho método administrar un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 a dicha célula o tejido.
15. Un método *in vitro* para constreñir músculo liso vascular, comprendiendo dicho método administrar un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 a dicho músculo liso.
16. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en medicina.
17. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una afección asociada con actividad de bradiquinina seleccionada entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, apoplejía, trauma craneal, edema cerebral postquirúrgico, edema cerebral (general), edema cerebral citotóxico, migraña, dolor neuropático, prurito, tumores cerebrales, pseudotumor cerebri, glaucoma, hidrocefalo, trauma de médula espinal, edema de médula espinal, enfermedades neurodegenerativas o lesión cerebral postraumática.

18. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una afección asociada con actividad de bradiquinina de acuerdo con la reivindicación 17 en el que dicha actividad de bradiquinina está mediada a través de receptores B2 de bradiquinina.
19. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
20. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento del cáncer.
21. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, de tipo de anillo de sello, carcinoma esofágico, de tipo intestinal, de tipo mucinoso, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma mamario, carcinoma renal, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma testicular, carcinoma ovárico, carcinoma de endometrio, carcinoma tiroideo, carcinoma de hígado, carcinoma de laringe, mesotelioma, carcinomas neuroendocrinos, tumores neuroectodérmicos, melanoma, glioma, neuroblastomas, sarcomas, leiomioma, MFII, fibrosarcoma, liposarcoma, MPNT, condrosarcoma y linfomas.
22. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en hemangioma, tumores sólidos, leucemia, metástasis, telangiectasia, psoriasis, escleroderma, granuloma piogénico, angiogénesis miocárdica, enfermedad de Crohn, neovascularización de placa, colaterales coronarios, colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis de extremidad isquémica, enfermedades corneales, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, artritis, neovascularización diabética, degeneración macular, curación de heridas, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con Helicobacter, fracturas, queloides y vasculogénesis.
23. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular seleccionado entre el grupo que consiste en enfermedad neovascular ocular, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de Vitamina A, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratitis sicca, penfigoide, queratotomía radial, degeneración macular, miopía supuesta, foseta óptica, desprendimiento de retina crónico, síndrome de hiperviscosidad, trauma al ojo, complicaciones postláser, rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso.
24. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en inflamación, artritis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, bartonellosis y aterosclerosis.
25. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que dicho péptido está presente en o conjugado a un liposoma o micropartícula que es de un tamaño adecuado para administración intravenosa pero que se aloja en los lechos capilares.
26. El péptido para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en el que dicho péptido es para su uso con un inhibidor de COX-2.
27. Un método para preparar un péptido que comprende expresar un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10 u 11.
28. El método de la reivindicación 27 en el que el polinucleótido está comprendido en un vector de acuerdo con la reivindicación 12.
29. Una célula huésped que comprende un polinucleótido heterólogo de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 o un vector de acuerdo con la reivindicación 12.





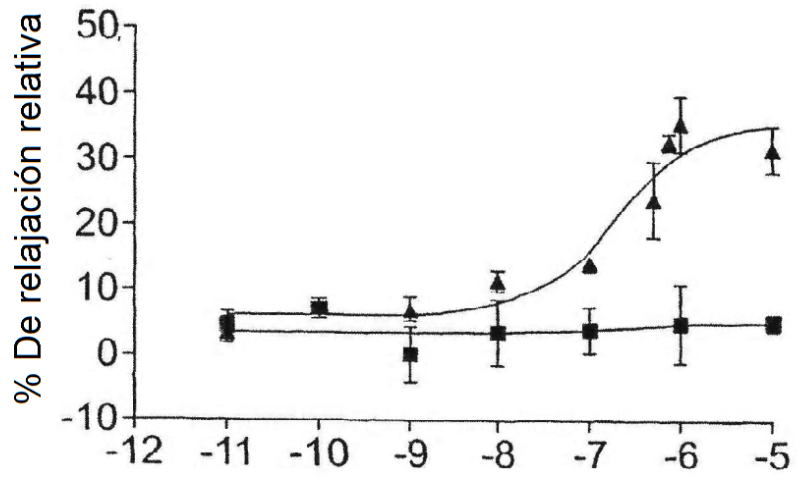


Fig. 4a

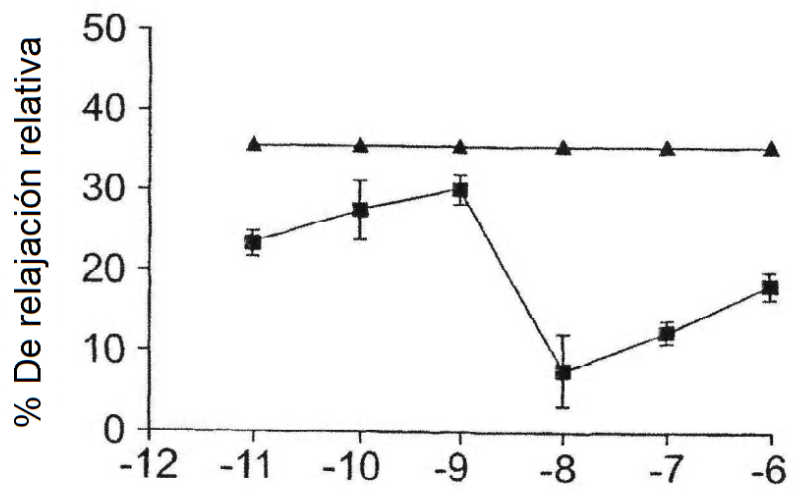


Fig. 4b

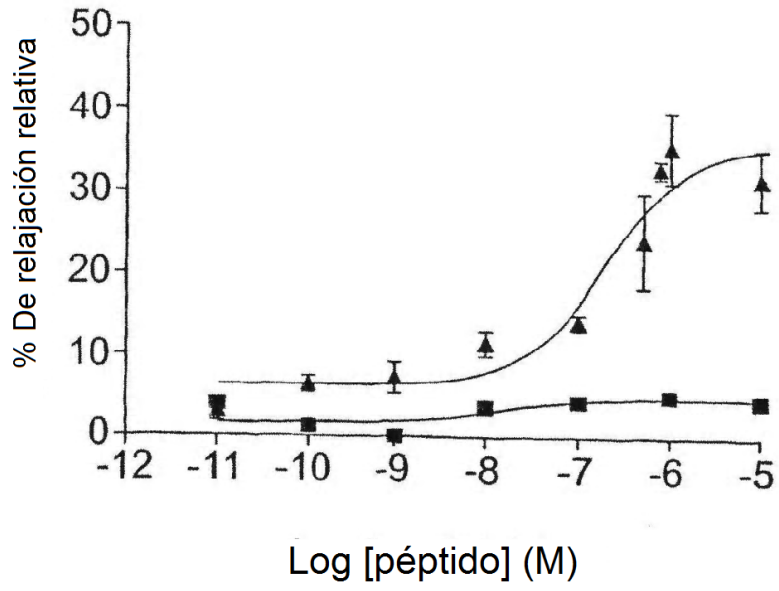


Fig. 4c

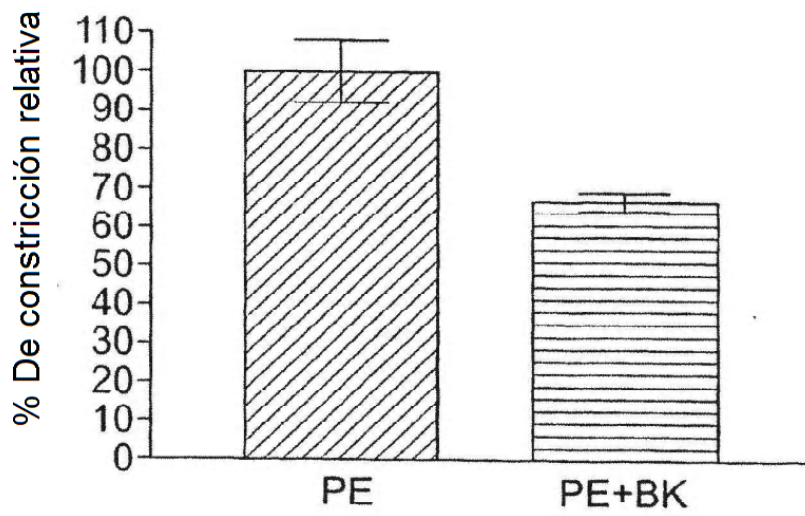


Fig. 5a

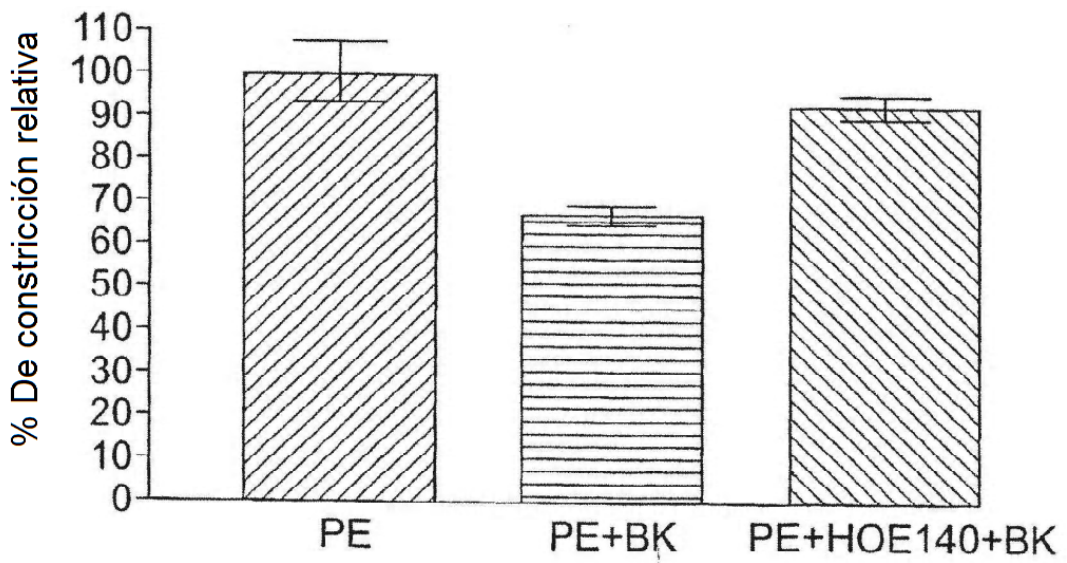


Fig. 5b

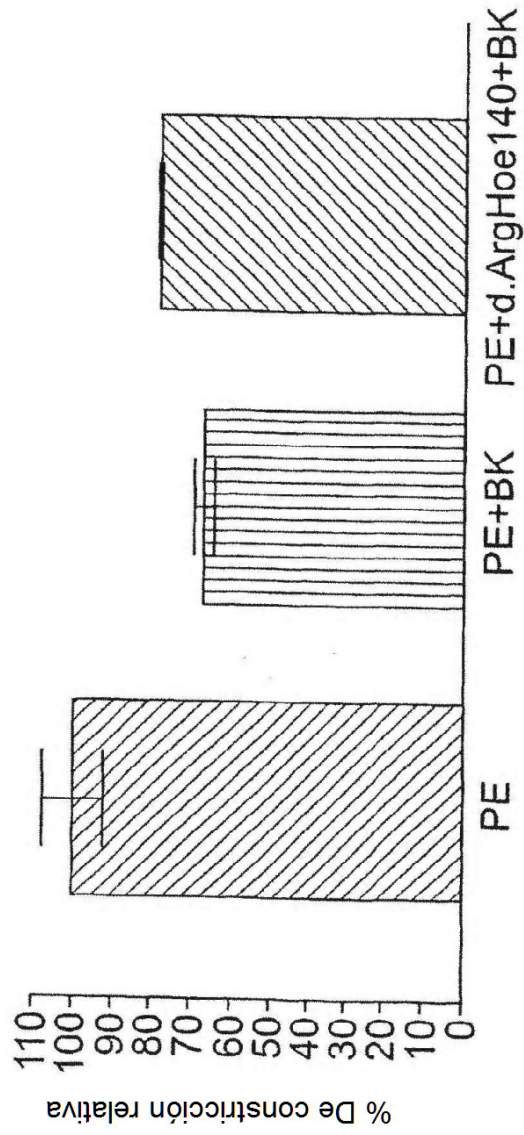


Fig. 5c

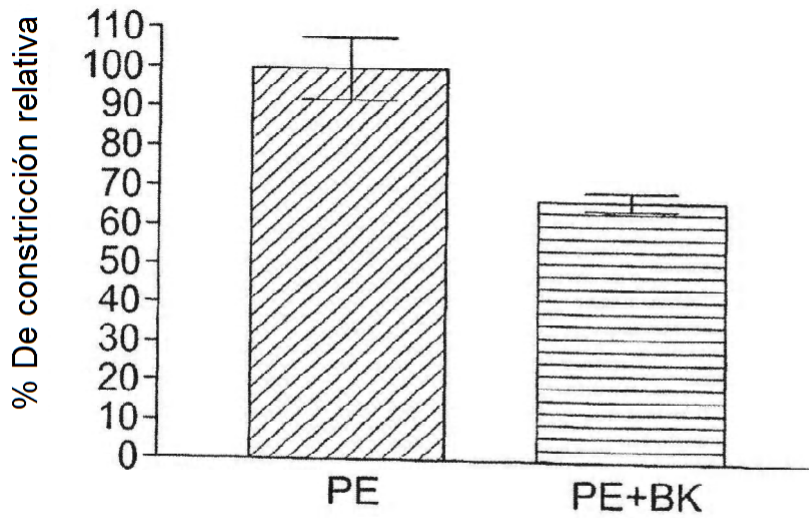


Fig. 6a

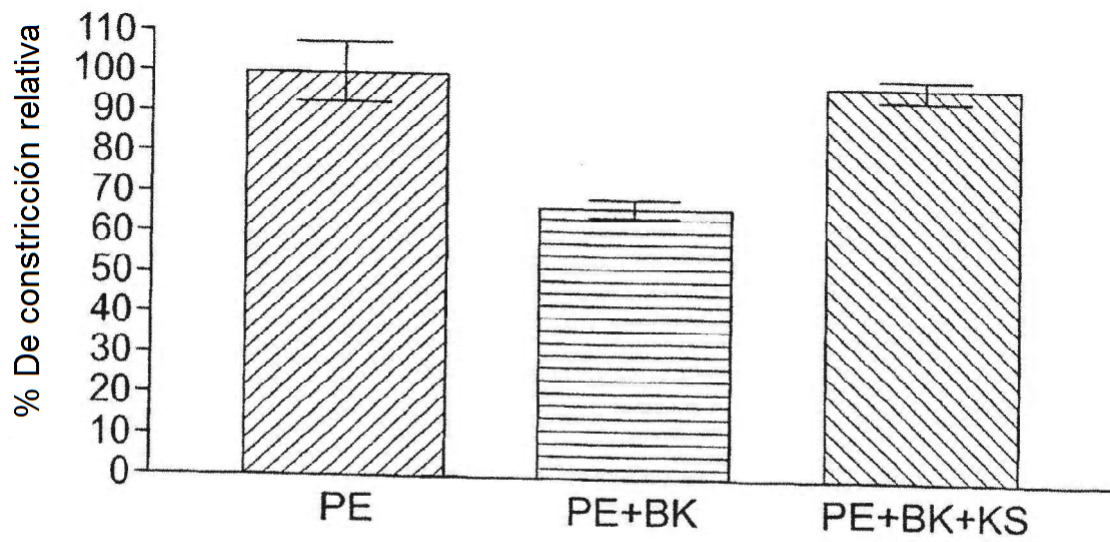


Fig. 6b

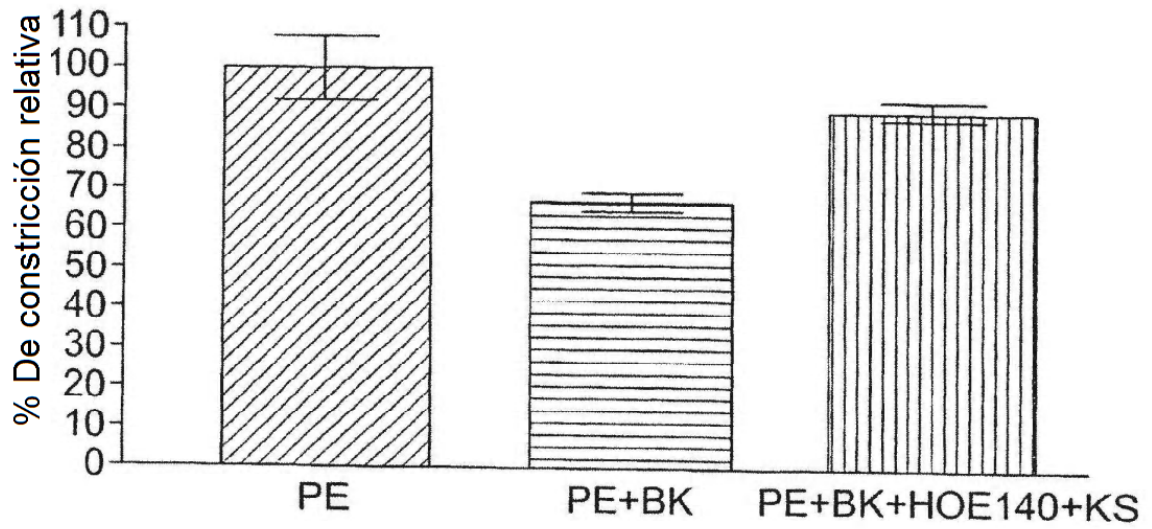


Fig. 7a

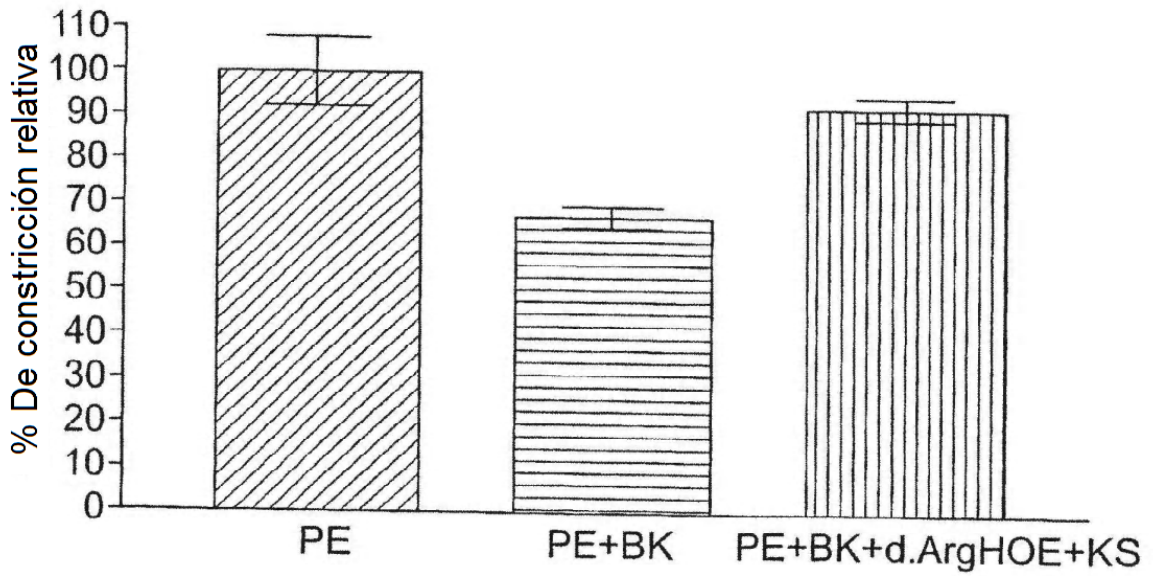


Fig. 7b

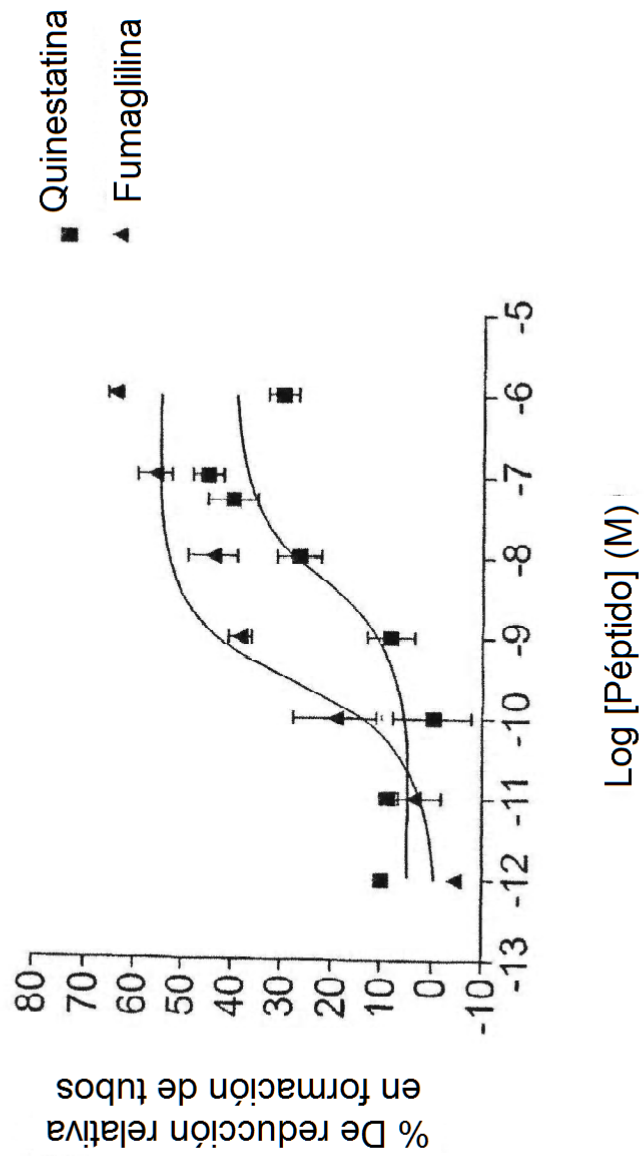


Fig. 8

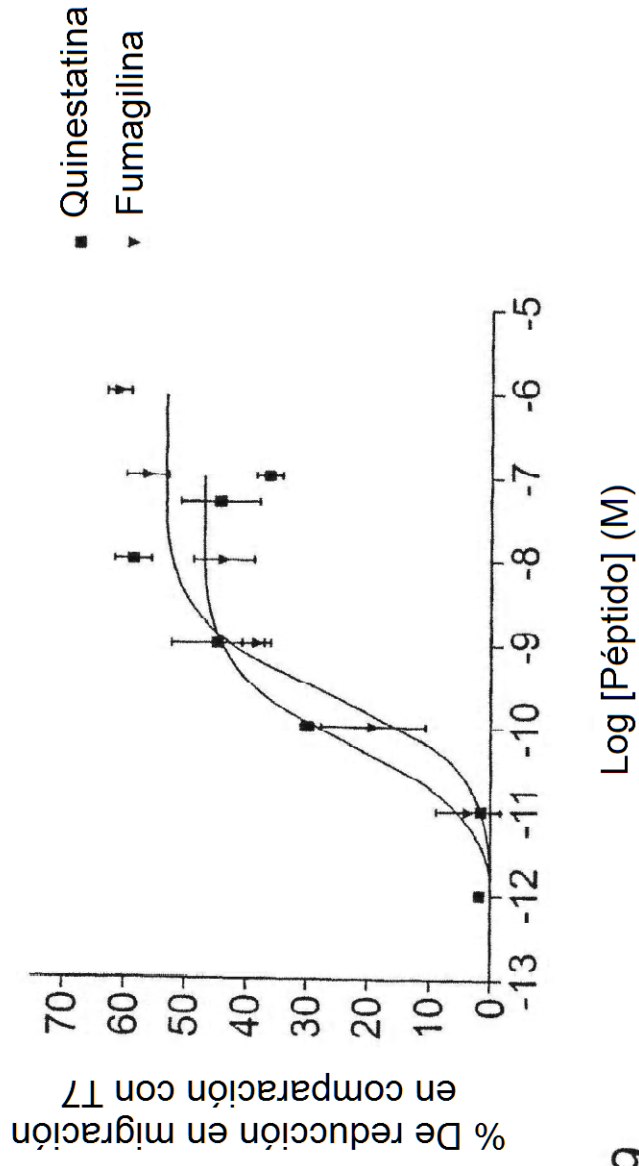


Fig. 9

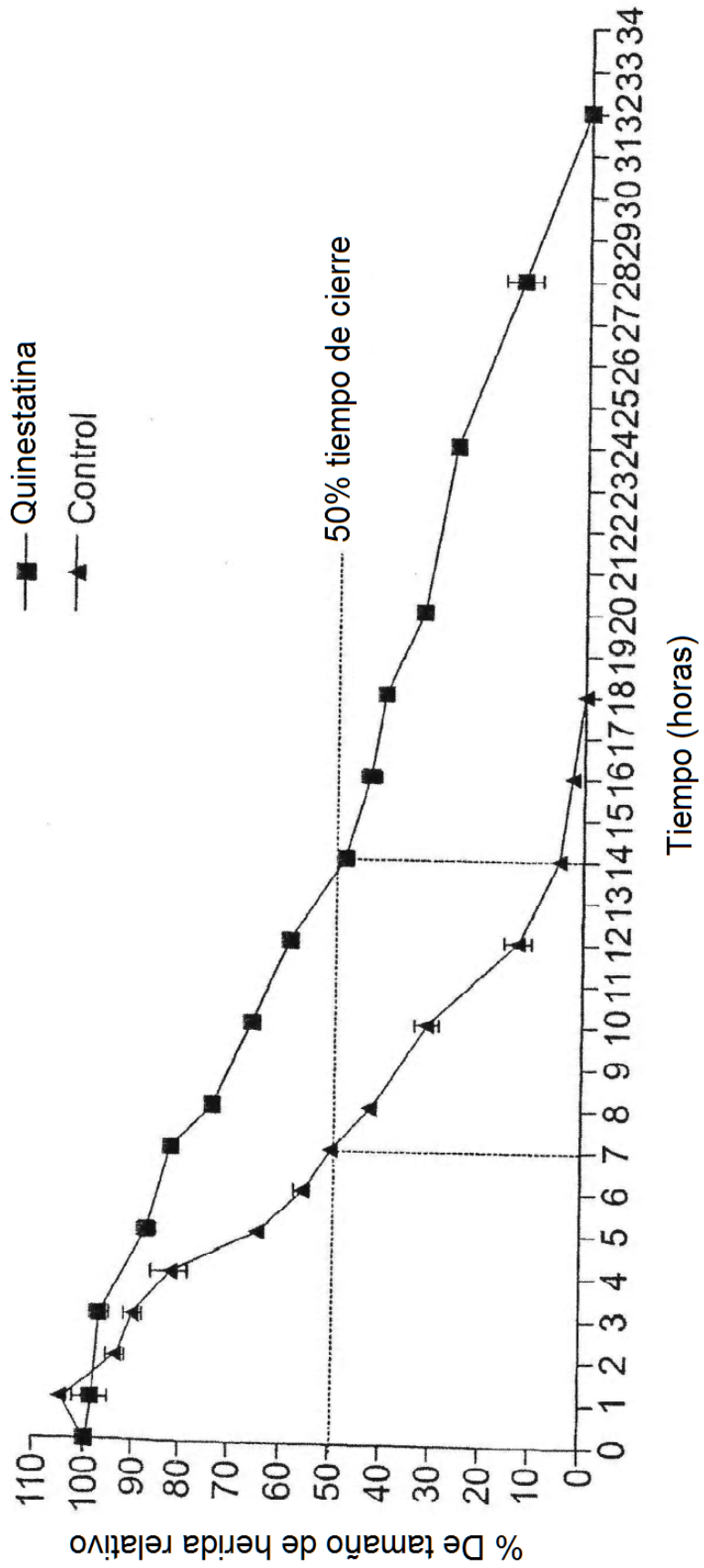


Fig. 10

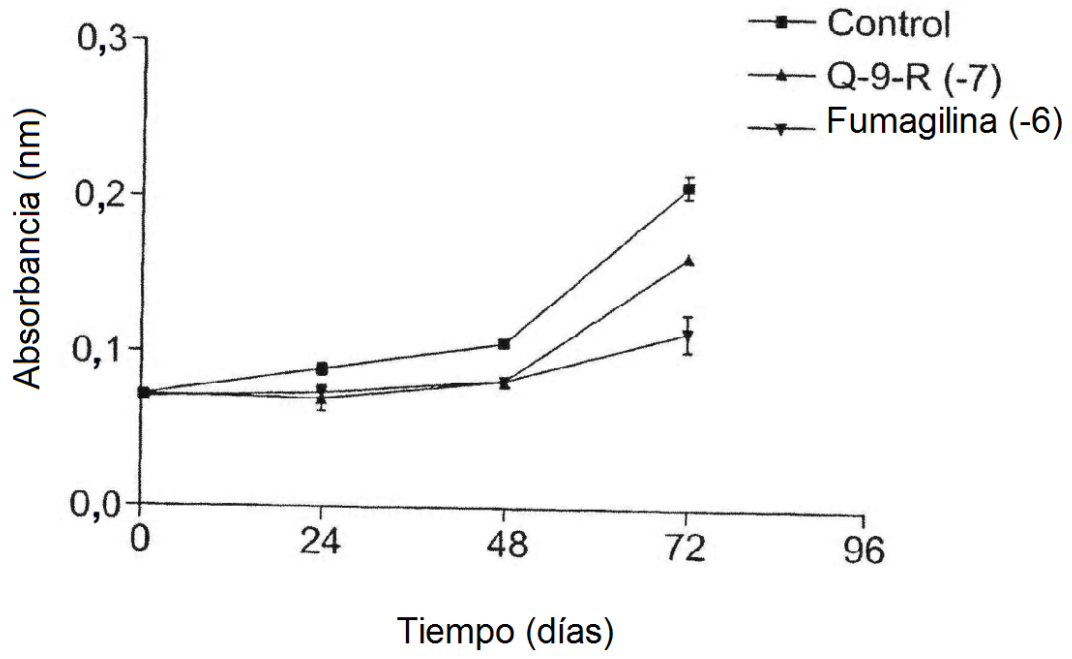


Fig. 11

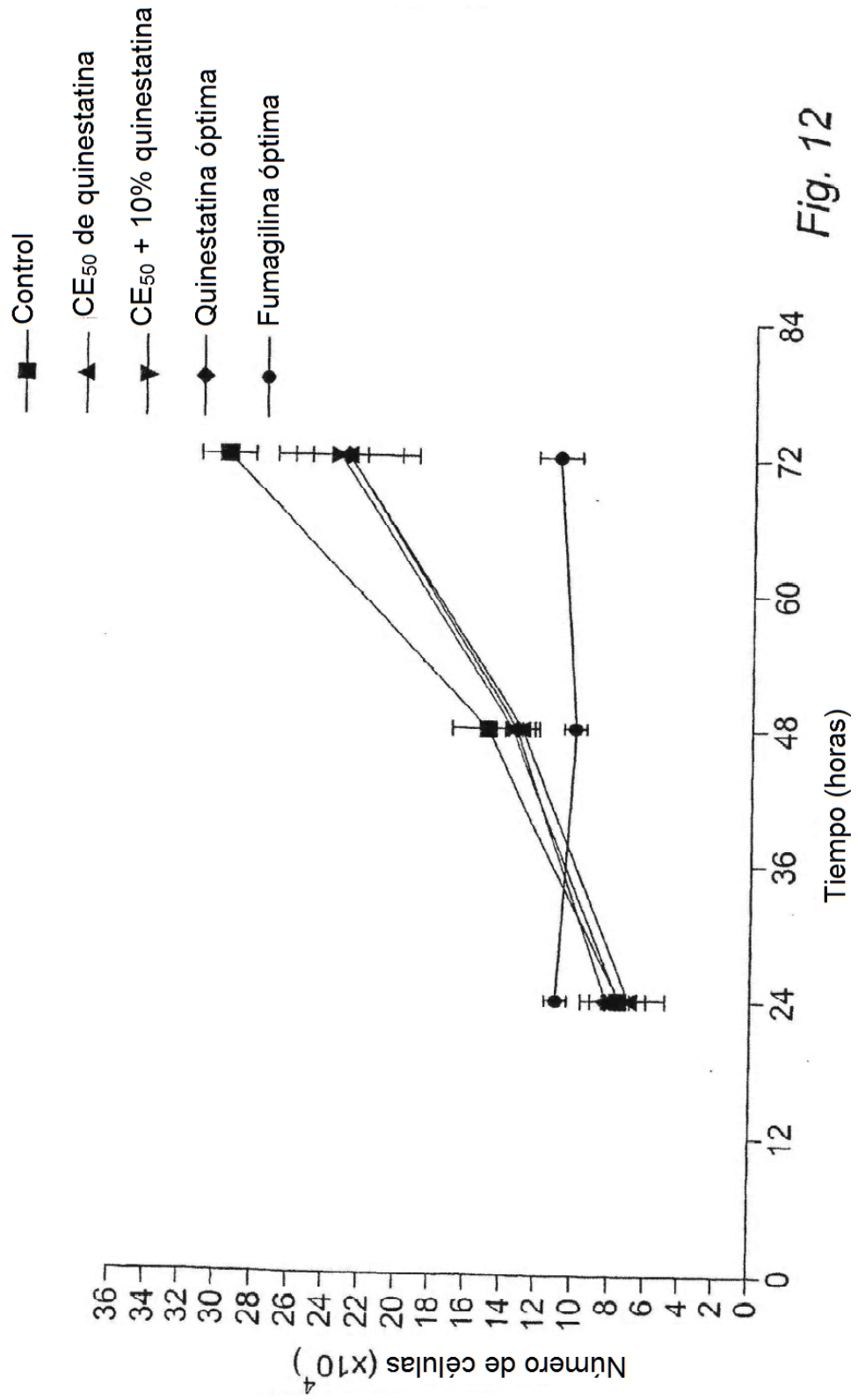


Fig. 12