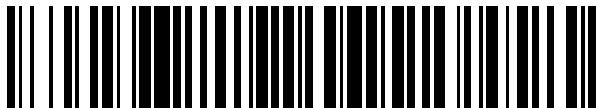


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 923 430**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2011 E 18168598 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 3381462**

(54) Título: **Agente antiangiogénico y método de uso de dicho agente**

(30) Prioridad:

13.07.2010 US 363933 P

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

27.09.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 923 430 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agente antiangiogénico y método de uso de dicho agente

5 Datos de solicitud anteriores relacionados

Esta solicitud reivindica la prioridad para la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 61/363,933, presentada el 13 de julio de 2010.

10 Campo técnico

Esta divulgación se refiere a la inhibición o prevención de la angiogénesis como un medio para controlar o tratar una afección dependiente de angiogénesis, una afección caracterizada por, o dependiente de, la proliferación de vasos sanguíneos. La divulgación se refiere además al uso de un agente antiangiogénico en combinación con un agente quimioterapéutico.

15 La invención se define en las reivindicaciones.

20 Antecedentes

25 La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares existentes, mientras que la vasculogénesis implica el crecimiento de vasos derivados de células progenitoras endoteliales. La angiogénesis es un proceso combinatorio que está regulado por un equilibrio entre moléculas pro y antiangiogénicas. Los estímulos angiogénicos (por ejemplo, hipoxia o citocinas inflamatorias) dan como resultado la expresión y liberación inducidas de factores de crecimiento angiogénico tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estos factores de crecimiento estimulan las células endoteliales (EC) en la vasculatura existente para que proliferen y migren a través del tejido para formar nuevos canales endotelizados. La angiogénesis está involucrada en la proliferación de células endoteliales.

30 La angiogénesis inapropiada o patológica está involucrada en el crecimiento de la placa aterosclerótica, la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa, la fibroplasia retrorenal, la fibrosis pulmonar idiopática, el síndrome de dificultad respiratoria aguda del adulto y el asma. Además, la progresión del tumor está asociada con la neovascularización, que proporciona un mecanismo por el cual los nutrientes se suministran al tejido tumoral en crecimiento progresivo. Si bien el concepto de ralentizar o incluso detener la progresión del cáncer al enfocarse en su 35 suministro de sangre se propuso por primera vez hace más de 30 años, los inhibidores de la angiogénesis recién ahora entran en la corriente principal de la terapéutica del cáncer.

40 En consecuencia, siempre existe la necesidad en la técnica de métodos y agentes para reducir la angiogénesis patológica. Es a esta necesidad, entre otras, a la que se dirige esta divulgación.

45 Breve descripción de las figuras

45 La figura 1A es un dibujo esquemático de un antiangiogénico que muestra las dos hebras cortas de hoja β antiparalela de la proteína.

50 La figura 1B es otro dibujo esquemático de un antiangiogénico que muestra las dos hebras cortas de hoja β antiparalela de la proteína en la que la superficie hidrófoba mira hacia afuera.

55 La figura 1C es otro dibujo esquemático de un antiangiogénico que muestra las dos hebras cortas de hoja β antiparalela de la proteína en la que la superficie hidrófoba mira hacia adentro.

60 La figura 2 muestra el espectro de NMR de un agente antiangiogénico plegado (superior) y desplegado (inferior) y proteína hospedera.

65 La figura 3A muestra un ensayo de proliferación de un agente antiangiogénico frente a un agente de la técnica anterior (Anginex) con células HUVEC.

65 La figura 3B muestra un ensayo de proliferación de un agente antiangiogénico frente a un agente de la técnica anterior (Anginex) con células cancerosas M4A4.

65 La figura 4A muestra gráficamente que el volumen tumoral permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente antiangiogénico cuando el tratamiento se inició después de 8 días.

65 La figura 4B muestra gráficamente que el volumen tumoral permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente antiangiogénico cuando el tratamiento se inició después de 22 días.

La figura 5 muestra gráficamente que hubo diferencias sustanciales en los pesos de los tumores al final del primer tratamiento con un agente antiangiogénico.

5 La figura 6 muestra gráficamente que los tumores crecieron a un ritmo normal en los ratones tratados con tampón y las proteínas hospederas, y sustancialmente lento en los ratones tratados con el agente antiangiogénico.

10 La figura 7 muestra que los resultados de los estudios de densidad de vasos de ratones tratados con un agente antiangiogénico.

15 La figura 8 muestra que no se observaron cambios significativos en la masa corporal de los ratones en ningún grupo de tratamiento.

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

15 La figura 10 muestra la curva de crecimiento del tumor a lo largo de 14 días o más de tratamiento mediante el uso de diferentes dosis del agente antiangiogénico.

20 La figura 11 es la curva de crecimiento tumoral de Avastin® y rProAgio-PEG.

20 La figura 12 muestra una representación gráfica del peso del tumor al final del curso de tratamiento de 14 días

Definiciones

25 Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados en esta especificación.

30 La "angiogénesis" se define como cualquier alteración de un lecho vascular existente o la formación de nueva vasculatura que beneficia la perfusión tisular. Esto incluye la formación de nuevos vasos mediante el brote de células endoteliales de vasos sanguíneos existentes o la remodelación de vasos existentes para alterar el tamaño, la dirección de maduración o las propiedades de flujo para mejorar la perfusión sanguínea del tejido.

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

45 El término "variantes modificadas de manera conservadora" se aplica a secuencias de aminoácidos naturales y no naturales y de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y combinaciones de las mismas. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, "variantes modificadas de manera conservadora" se refiere a aquellos ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico natural y no natural no codifica una secuencia de aminoácidos natural y no natural, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Así, a modo de ejemplo, cada secuencia de ácidos nucleicos natural o no natural en el presente documento que codifica un polipéptido natural o no natural también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico natural o no natural. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita.

65 El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o compuesto que se administra y que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se trata. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o compuesto que se

administra incluye, pero sin limitarse a, un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido de aminoácido no modificado. Las composiciones que contienen dichos polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos naturales no modificados pueden administrarse para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos. Puede determinarse una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual mediante el uso de técnicas, tales como, un estudio de aumento de dosis.

El término "secuencia de ácidos nucleicos", como se usa en el presente documento, se refiere al orden y la identidad de los nucleótidos que comprenden un ácido nucleico.

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o enlaces o residuos de la cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metilribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular también incluye implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse al generar secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina. El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Una secuencia de ácidos nucleicos particular también abarca implícitamente "variantes de corte y empalme". De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico incluye implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de corte y empalme de ese ácido nucleico. Las "variantes de corte y empalme", como sugiere el nombre, son productos de corte y empalme alternativo de un gen. Después de la transcripción, puede cortarse y empalmarse un transcripto de ácido nucleico inicial de manera que diferentes productos de corte y empalme de ácido nucleico (alternativos) codifiquen diferentes polipéptidos. Los mecanismos para la producción de variantes de corte y empalme varían, pero incluyen corte y empalme alternativo de exones. Esta definición también abarca polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico mediante transcripción de lectura completa. Cualquier producto de una reacción de corte y empalme, incluidas las formas recombinantes de los productos de corte y empalme, se incluyen en esta definición.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímero de aminoácidos de origen no natural.

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

El término "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado aplicado profilácticamente a un paciente que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se trata. En dichas aplicaciones profilácticas, dichas cantidades pueden depender del estado de salud, peso del paciente y similares. Se considera bien dentro de la experiencia en la técnica determinar dichas cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación de rutina, que incluye, pero no se limita a, un ensayo clínico de aumento de dosis.

La frase "sustancialmente similar", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 75 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, 95 % o más o cualquier valor integral entre la identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, medida mediante el uso de un algoritmo de comparación de secuencias como los que se describen a continuación, por ejemplo, o mediante inspección visual.

Preferentemente, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10, preferentemente aproximadamente 20, más preferentemente aproximadamente de 40-60 residuos de longitud o cualquier valor integral entre ellos, preferentemente en una región más larga que 60-80 residuos, más preferentemente al menos aproximadamente de 90-100 residuos, y lo más preferible las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como la región codificante de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

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

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales y/o al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales modificado que se administra a un paciente que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o al menos detener parcialmente, o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se trata. La eficacia de dichas composiciones depende de condiciones que incluyen, pero no se limita a, la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, terapia previa, estado de salud del paciente y respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. Solo a modo de ejemplo, las cantidades terapéuticamente eficaces pueden determinarse mediante experimentación de rutina, que incluye, pero no se limita a, un ensayo clínico de aumento de dosis.

Descripción detallada

Esta divulgación proporciona un agente antiangiogénico y un método para inhibir la angiogénesis en el que la afección dependiente en un mamífero se trata mediante la administración de un agente antiangiogénico al mamífero, en una cantidad y frecuencia terapéuticamente eficaz para producir una regresión o detención de la afección sin toxicidad significativa. La afección dependiente de angiogénesis puede seleccionarse del grupo que consiste en neoplasia, incluida una neoplasia de tumor sólido, que incluye carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma de ovario, neuroblastoma, tumor del sistema nervioso central, neuroblastoma, glioblastoma multiforme o melanoma. Si bien ninguna lista puede estar completa, el agente antiangiogénico puede usarse para producir una regresión o detención de la mayoría, sino de todos, los tumores sólidos. El mamífero que recibe el tratamiento puede ser un ser humano.

En una modalidad específica, el agente antiangiogénico incluye una variación de polipéptidos derivados del dominio uno de CD2, que pueden tener su origen en fuentes humanas y no humanas. Más específicamente, se alteraron la estructura y la función del dominio uno de CD2 para preparar nuevos polipéptidos con estabilidad y actividad variadas. En algunos ejemplos, las alteraciones podrían usarse para preparar al menos dos hebras cortas de hoja β antiparalela (por ejemplo, las figuras 1A, 1B y 1C) que imitan el resto activo de varios polipéptidos antiangiogénicos endógenos, tales como PF4, IL8, TSP-1, endostatina y otros péptidos sintéticos. En algunos ejemplos, el agente antiangiogénico o polipéptido puede tener una lámina hoja β formada por dos segmentos, un pliegue antiparalelo, una superficie hidrófoba orientada hacia el interior, una superficie hidrófila orientada hacia el exterior; y los dos segmentos tienen al menos cuatro aminoácidos. En otros ejemplos, se encontró que seis o más aminoácidos constituyan un segmento. En otros ejemplos más, se encontró que ocho o más aminoácidos constituyan un segmento. Los residuos de aminoácidos pueden alternar entre hidrofilia e hidrofobicidad (por ejemplo, hidrófilo-hidrófobo-hidrófilo-hidrófobo o hidrófilo-hidrófobo-hidrófobo).

Los agentes antiangiogénicos tienen muchas utilidades *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*, que incluyen propiedades antiangiogénicas en entornos clínicos y no clínicos. Los métodos para preparar o crear una variación polipeptídica sistemática a través de técnicas de evolución dirigida son conocidos en la técnica. Se contempla y se entiende que los métodos divulgados en el presente documento pueden usarse para preparar otros polipéptidos distintos de CD2 con al menos dos hebras cortas de hoja β antiparalela.

En una modalidad, el agente antiangiogénico puede prepararse mediante el uso de un diseño polipeptídico racional. El diseño racional incluye métodos en los que se identifican los residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica y se predice que tendrán un impacto específico en un polipéptido. Por ejemplo, uno de dichos métodos incluye preparar un conjunto de entrenamiento de variantes de polipéptido en el que los datos proporcionan información sobre la actividad y la secuencia para cada variante de polipéptido en el conjunto de entrenamiento; derivar un modelo de actividad que sea capaz de predecir la actividad en base a alteraciones de aminoácidos específicos; y usar el modelo para identificar uno o más aminoácidos en posiciones específicas en uno o más polipéptidos que tienen actividades y propiedades específicas.

En otra modalidad específica, el agente antiangiogénico puede prepararse mediante la creación de mutaciones dentro del polipéptido hospedero o dominio uno de CD2 (por ejemplo, las secuencias de ID No. 4, 5 y 7).

Un experto en la técnica puede preparar agentes antiangiogénicos específicos mediante el uso de tecnología recombinante. Por ejemplo, puede prepararse el ácido nucleico apreciado de los polipéptidos o los polipéptidos en las SEQ ID NO: 1-11 mediante el uso de métodos ordinarios. Alternativamente, los polipéptidos de las SEQ ID NO: 1-11 pueden generarse mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, para producir un agente antiangiogénico deseado. Cualquier secuencia nucleica que difiera de cualquier secuencia, que incluye las secuencias ID No: 1 a 11,

puede alterarse debido a la degeneración del código genético. A continuación, la secuencia de ácidos nucleicos mutado puede subclonarse en un vector de expresión apropiado y expresarse en un hospedero tal como levadura o *E. coli*. Después de la preparación, las técnicas de purificación son obvias para los expertos en la técnica.

- 5 En una modalidad, el agente antiangiogénico puede incluir glicosilación unida a N. El proceso de glicosilación unida a N ocurre en eucariotas y tiene implicaciones en el plegamiento de polipéptidos, la solubilidad de polipéptidos y la circulación sanguínea prolongada. La glicosilación unida a N puede requerir la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr y ocurre más a menudo cuando esta secuencia consenso se presenta en un lazo en el péptido. En un ejemplo, es decir, en el sistema de expresión de levadura Pichia, los sitios de la glicosilación unida a N estaban en las posiciones N65.
- 10 10 En algunas modalidades específicas, los agentes antiangiogénicos controlan o inhiben la angiogénesis. Generalmente se considera que la inhibición de la angiogénesis es la detención del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, ya sea que se desarrollen por brotación o por la llegada y subseciente diferenciación en células endoteliales de células madre circulantes. Sin embargo, dado que el agente antiangiogénico puede inducir la apoptosis de las células endoteliales activadas, la inhibición de la angiogénesis también debe interpretarse para incluir la destrucción de células, particularmente las células en vasos existentes cerca o dentro de un tumor cuando se activan por factores de angiogénesis tumorales. Por lo tanto, dentro del contexto de la presente invención, la inhibición de la angiogénesis debería interpretarse para incluir la inhibición del desarrollo de nuevos vasos, cuya inhibición puede ir acompañada o no de la destrucción de los vasos cercanos existentes.
- 15 20 20 El agente antiangiogénico parece inhibir o prevenir la angiogénesis al inhibir o controlar la apoptosis. Los polipéptidos desarrollados demostraron una fuerte actividad en la inducción de la apoptosis de las células endoteliales sin efectos sobre las células epiteliales y de fibroblastos en los análisis *in vitro*. Además, los polipéptidos desarrollados ejercieron menos efecto sobre la estructura tubular formada por las células HUVEC, lo que sugiere una menor toxicidad sobre los vasos sanguíneos normales ya existentes. Los factores de supervivencia incluyen factores de crecimiento de células endoteliales vasculares o mitógenos, así como aquellos factores que no parecen tener un efecto estimulador del crecimiento directo, pero permiten que las células se recuperen de la lesión.
- 25 30 30 Estos agentes antiangiogénicos pueden incorporarse en métodos de tratamiento de un mamífero al inhibir la angiogénesis que incluye las etapas de administrar los agentes antiangiogénicos. En ciertas modalidades, el polipéptido antiangiogénico exhibió un tiempo de circulación prolongado en comparación con las moléculas pequeñas y los agentes peptídicos cortos.
- 35 40 40 Las modalidades específicas proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis y métodos para tratar enfermedades asociadas a la angiogénesis. En otras modalidades, la presente invención proporciona métodos para inhibir o reducir el crecimiento tumoral y métodos para tratar a un individuo que padece cáncer. Estos métodos implican administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos como se ha descrito anteriormente. Estos métodos están particularmente destinados a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más particularmente de humanos.
- 45 50 50 Como se describe en el presente documento, las enfermedades asociadas a la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, cáncer dependiente de la angiogénesis, que incluye, por ejemplo, tumores sólidos, tumores hemáticos tales como leucemias y metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piógenos; trastornos inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune; reumatismo articular crónico y psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injertos de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retroental, rubeosis; Síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; y granulación de heridas y cicatrización de heridas; telangiectasia psoriasis esclerodermia, granuloma piógeno, colaterales coronarios, angiogénesis isquémica de extremidades, enfermedades de la córnea, rubeosis, artritis, neovascularización diabética, fracturas, vasculogénesis, hematopoyesis.
- 55 60 60 Un beneficio potencial de la combinación de un agente antiangiogénico y un agente quimioterapéutico puede ser una mejora en el tratamiento y control de una afección dependiente de angiogénesis con dosis reducidas de un agente quimioterapéutico. La combinación puede administrarse durante un período de tiempo prolongado u, opcionalmente, puede administrarse una duración más corta del tratamiento debido a la mayor eficacia de la combinación.
- 65 65 En dependencia de la naturaleza de la terapia combinada, la administración de los agentes terapéuticos polipeptídicos de la invención puede continuarse mientras se administra la otra terapia y/o posteriormente. La administración de los agentes terapéuticos polipeptídicos puede realizarse en una dosis única o en dosis múltiples. En algunos casos, la administración de los agentes terapéuticos polipeptídicos comienza al menos varios días antes de la terapia convencional, mientras que, en otros casos, la administración comienza inmediatamente antes o en el momento de la administración de la terapia convencional.
- 65 En una modalidad, el agente antiangiogénesis puede administrarse en combinación con agentes quimioterapéuticos y otros agentes terapéuticos, así como radioterapias. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que

consiste en alcaloide de la vinca, camptotecano, taxano o análogo de platino, que incluye vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, 5 FU, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán o ciclofosfamida. El agente quimioterapéutico puede administrarse en un régimen de dosis bajas, en combinación con el agente antiangiogénico debido al efecto antitumoral del agente antiangiogénico. El agente quimioterapéutico puede administrarse a una dosis inferior a la máxima tolerada.

Se contempla que el agente antiangiogénico pueda usarse con agentes antineoplásicos, que incluyen los siguientes agentes antineoplásicos: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; AcrQnina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginas; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastato; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crsnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorrubicina; clorhidrato de doxorrubicina; droloxiteno; citrato de droloxiteno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de efomitina; elsamitruicina; enloplatino; epromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; estramustina fosfato de sodio; etanidazol; aceite etiodizado 1 131; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; Oro Au 198; hidroxiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-nl; interferón alfa-n3; interferón beta-1 a; interferón gamma-1 b; iproplatin; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospera; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazina; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; Safmgol; clorhidrato de safingol; semustina; simtraceno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; esteptozocina; cloruro de estroncio Sr 89; sulofenura; talisomicina; taxano; taxoide; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiampirina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; clorhidrato de topotecán; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelin; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredopa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; Vorozol; zeniplatino; zinostatina; corhidrato de zorrubicina.

Otros compuestos antineoplásicos incluyen: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acifulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrrubicina; atrasacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; polipéptido-1 morfogenético antídorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastato; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletilina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calostina C; derivados de camptotecina; IL-2 a la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colimicina A; colimicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crsnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatamo; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelin; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diazicuona; didemmina B; didox; dietilhorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenilespiromustina; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxiteno; dronabinol; duocannicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitin; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; fmasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorúnicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitro de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatina; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfamo; herregulina; hexametilenbisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramontana; ilmofosina; ilomastato; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoenestimulantes; inhibidor del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; irinotecán; iroplacto; irsogladiна; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato

de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstima; sulfato de lentinano; leptolstatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocitario; leuproolido+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipofílico; compuestos de platino lipofílicos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprolol; maspín; inhibidores de matriz; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario no emparejado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + pared celular de miobacterias sk; molidamol; inhibidor del gen de la resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor de tumores múltiples 1; agente anticancerígeno mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular de miobacterias; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafareolina; nagestip; naloxona +pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristone; ondansetrón; ondansetrón; oracin; inductor oral de citocinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato de sodio; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perlílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasomas; inmunomodulador basado en proteína A; inhibidor de proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; santopin; SarCNU; sarcofitol A; sargamostim; miméticos Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermin; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamida; inhibidores de estromelisina; sulfmosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metioduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporina; temozolomida; tenipósito; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; estaño etil etiopurpurina; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topotecán; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelin; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tifostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorbe; estimálámero de zinostatina. Los expertos en la técnica reconocerán también muchos otros compuestos que entran dentro de esta categoría de agentes que son útiles en combinación con el agente antiangiogénico.

Se contempla que el agente antiangiogénico puede usarse con agentes potenciadores complementarios contra el cáncer, que incluye los siguientes agentes potenciadores complementarios: agentes potenciadores complementarios contra el cáncer: fármacos antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, amoxapina y maprotilina); fármacos antidepresivos no tricíclicos (por ejemplo, sertralina, trazodona y citalopram); antagonistas de Ca.sup.++ (por ejemplo, verapamilo, nifedipina, nitrendipina y caroverina); inhibidores de calmodulina (por ejemplo, prenilamina, trifluoroperazina y clomipramina); anfotericina B; análogos de triparanol (por ejemplo, tamoxifeno); fármacos antiarrítmicos (por ejemplo, quinidina); fármacos antihipertensivos (por ejemplo, reserpina); eliminadores de tioles (por ejemplo, butionina y sulfoximina) y agentes reductores de resistencia a múltiples fármacos tales como Cremaphor EL. Los compuestos de la invención también pueden administrarse con citoquinas tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos. Los expertos en la técnica reconocerán también muchos otros compuestos que entran dentro de esta categoría de agentes que son útiles en combinación con el agente antiangiogénico.

Una modalidad también incluye un estuche para tratar una afección dependiente de angiogénesis en un mamífero que comprende un agente antiangiogénico y un agente quimioterapéutico. La combinación de agentes se proporciona para permitir la administración en una cantidad y frecuencia terapéuticamente eficaz para producir una residencia o regresión de la angiogénesis. En ciertas modalidades, el agente antiangiogénico y/o los polinucleótidos se administran solos o en combinación con un agente antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios que pueden administrarse con los agentes antiangiogénicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides (por ejemplo, betametasona, budesonida, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno,

floctafenina, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tenoxicam, ácido tiaprofénico y tolmetina.), así como antihistamínicos, derivados del ácido aminoarilcarboxílico, derivados del ácido arilacético, derivados del ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados del ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazolonas, derivados del ácido salicílico, tiazincarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino4-hidroxibutírico, amixetrina, bendazac, bencidamina, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, orgoteína, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, procuazona, proxazol y tenidap.

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

10 En algunas modalidades, puede desecharse aumentar la solubilidad y el tiempo de circulación sanguínea del agente antiangiogénico. Para aumentar la solubilidad del polipéptido, el tiempo de circulación sanguínea, puede usarse polietilenglicol para derivatizar los polipéptidos de la invención, incluidos, por ejemplo, polí(etylenglicol) (PEG), polí(vinilpirrolidona), polioxómeros, polisorbato y polí(alcohol vinílico), al ser particularmente preferidos los polímeros de PEG. Los polímeros de PEG son polímeros de PEG que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 40 000. Otros polímeros hidrófilos adecuados, además de los ejemplificados anteriormente, serán 15 fácilmente evidentes para un experto en la técnica en base a la presente divulgación. Generalmente, los polímeros usados pueden incluir polímeros que pueden unirse a los polipéptidos de la invención mediante reacciones de alquilación o acilación. En un ejemplo, el agente antiangiogénico se PEGiló con una cadena de PEG de 20 kDa.

20 Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deben unirse al polipéptido al tener en cuenta los efectos sobre los dominios funcionales o antigenicos del polipéptido. Hay una serie de métodos de unión disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el polietilenglicol puede unirse covalentemente a través de residuos de aminoácidos mediante un grupo reactivo, tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula de polietilenglicol activado. Los residuos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácidos N-terminales; aquellos que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido C-terminal. Los grupos sulfhidrilo también pueden usarse como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Se prefiere para fines terapéuticos la unión a un grupo amino, tal como la unión al extremo N-terminal o al grupo lisina. Uno puede desechar específicamente polipéptidos modificados químicamente en el extremo N-terminal. Mediante el uso de polietilenglicol como ilustración de la presente composición, uno puede seleccionar entre una 25 variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol a moléculas de polipéptido (polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación a realizar y el método para obtener el polipéptido pegilado N-terminal seleccionado. Bajo las condiciones de reacción apropiadas, se logra una derivatización sustancialmente selectiva del polipéptido en el extremo N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo.

30 Hay una variedad de vías de administración disponibles. El modo particular seleccionado puede depender del agente antiangiogénico, la afección particular que se trata y la dosificación requerida para la eficacia. Estos métodos pueden practicarse mediante el uso de cualquier modo de administración que sea clínicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente 35 inaceptables. Ciertos modos de administración son rutas parenterales.

40 Ciertas modalidades específicas también proporcionan composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de componente activo (por ejemplo, el agente antiangiogénico, el agente antiangiogénico más quimioterapéutico o el agente antiangiogénico más agente antiinflamatorio) y un portador farmacéuticamente aceptable. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos 45 adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, esteарат de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La 50 composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, esteарат de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente antiangiogénico junto con una cantidad adecuada de portador de forma que proporcione la forma para la adecuada administración al paciente. La formulación 55 debe adaptarse al modo de administración.

55

60

65

- La cantidad del agente antiangiogénico que será eficaz en el tratamiento (véase, por ejemplo, la figura 9), la inhibición y la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o la actividad aberrante de un polipéptido terapéutico puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos in vitro pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y deberá decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba in vitro o en modelos animales.
- Más específicamente, el agente o las composiciones farmacéuticas pueden probarse in vitro y luego in vivo para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de usar en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos in vitro para demostrar la utilidad terapéutica o profiláctica de un compuesto o composición farmacéutica incluyen el efecto de un compuesto en una línea celular o una muestra de tejido de un paciente. El efecto del compuesto o composición sobre la línea celular y/o la muestra de tejido puede determinarse mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limita a, ensayos de formación de rosetas y ensayos de lisis celular. De acuerdo con la invención, los ensayos in vitro que pueden usarse para determinar si es indicada la administración de un compuesto específico, incluyen ensayos de cultivo celular in vitro en los que una muestra de tejido del paciente se cultiva y se expone a un compuesto o de otro modo se le administra y se observa el efecto de dicho compuesto sobre la muestra de tejido.
- Se contempla que el agente antiangiogénico pueda formularse de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como la lignocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o un sobre, que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se mezclen antes de la administración.
- Se conocen varios sistemas de suministro y pueden usarse para administrar un compuesto de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluyen la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular.
- En una modalidad específica, puede ser deseable administrar el agente antiangiogénico localmente en el área que necesita tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y sin limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un suppositorio, o por medio de un implante, al ser dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. Cuando se administra un polipéptido, se debe tener cuidado de usar materiales que no absorban el polipéptido.
- En una modalidad específica en la que el agente antiangiogénico es un ácido nucleico que codifica un polipéptido, el ácido nucleico puede administrarse in vivo para promover la expresión de su polipéptido codificado, al construirlo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarlo de manera que se vuelve intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral, o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas, o recubrir con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrarlo en unión a un péptido similar a caja homeótica que se sabe que entra en el núcleo, etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedera para su expresión, mediante recombinación homóloga.
- Otras modalidades están dirigidas a vectores que contienen un polinucleótido que codifica un agente antiangiogénico, células hospederas y la producción de un agente antiangiogénico mediante técnicas sintéticas y recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En el último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá solo en células hospederas complementarias. Los polinucleótidos que codifican el agente antiangiogénico pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedero. Generalmente, un vector de plásmido se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en

- un complejo con un lípido cargado. El inserto de polinucleótido debe unirse operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. El experto conocerá otros promotores adecuados. Los constructos de expresión contendrán además sitios para el inicio de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresados por los constructos incluirá preferentemente un codón de iniciación de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) posicionado apropiadamente al final del polipéptido a traducir. Como se indica, los vectores de expresión incluirán preferentemente al menos un marcador seleccionable.
- 5 Se contempla que los genes y secuencia reguladoras pueden usarse con la expresión y replicación del agente antiangiogénico. La naturaleza de las secuencias reguladoras para la expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero en general se incluyen, según sea necesario, secuencias 5' no transcriptoras y 5' no traductoras implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de caperuza, secuencia CAAT y similares. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba, según se deseé.
- 10 En una modalidad, los polinucleótidos que codifican el agente antiangiogénico pueden fusionarse con polinucleótidos que codifican secuencias señal que dirigirán la localización de un polipéptido a compartimentos particulares de una célula procariota o eucariota y/o dirigirán la secreción de un polipéptido. Por ejemplo, en *E. coli*, uno puede desear dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásмico. Varios vectores están comercialmente disponibles para la construcción de proteínas de fusión que dirigirán la localización de una proteína.
- 15 Una modalidad específica proporciona endoprótesis, que comprenden una estructura generalmente tubular (que incluye, por ejemplo, formas en espiral), cuya superficie está recubierta con un agente antiangiogénico como se describe anteriormente. Una endoprótesis puede ser un andamiaje, generalmente de forma cilíndrica, que puede insertarse en un pasaje del cuerpo (por ejemplo, conductos biliares) o una parte de un pasaje del cuerpo, que se ha estrechado, contorneado irregularmente, obstruido u ocluido por un proceso patológico (por ejemplo, crecimiento interno de un tumor) con el fin de evitar el cierre o recierre del conducto.
- 20 Una modalidad específica también proporciona el uso de un agente antiangiogénico en una amplia variedad de procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, dentro de un aspecto de la presente invención, puede utilizarse una proteína antiangiogénica (en forma, por ejemplo, de un aerosol o una película) para recubrir o rociar un área antes de la extirpación de un tumor, con el fin de aislar tejidos normales circundantes del tejido maligno, y/o para prevenir la propagación de la enfermedad a los tejidos circundantes. Dentro de otros aspectos más de la presente invención, las mallas quirúrgicas que se han recubierto con proteína antiangiogénica pueden utilizarse en cualquier procedimiento en donde pueda utilizarse una malla quirúrgica.
- 25 Los ejemplos que siguen se exponen para ayudar a comprender la invención, pero no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera ni deben interpretarse como tales.
- 30 Ejemplos
- Ejemplo 1: Expresión de agente antiangiogénico
- 35 El agente antiangiogénico se expresó y purificó a partir de las bacterias *E.coli*. Para ayudar a garantizar que el polipéptido diseñado aún se pliegue correctamente, la estructura se confirmó con análisis de ¹H-NMR. Se compararon el espectro de NMR del agente antiangiogénico (120 µM) y de CD2-D1 (120 µM). Como se muestra en la figura 2, el espectro de NMR del agente antiangiogénico era casi idéntico al de CD2-D1 (arriba), mientras que el polipéptido desplegado (por disolvente orgánico) mostraba un espectro completamente diferente (abajo). El polipéptido resultante exhibió una propiedad estructural muy similar, como lo demuestra la similitud de ¹H-NMR, CD y espectro de fluorescencia tanto de la proteína hospedera como de la proteína desarrollada.
- 40 Ejemplo 2: Células endoteliales y apoptosis
- 45 Para determinar los efectos del agente antiangiogénico sobre las células endoteliales, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular mediante el uso de células HUVEC. Las células se trataron con diversas concentraciones de un ejemplo de agente antiangiogénico desarrollado, anginex y polipéptido hospedero con el que se derivó el agente antiangiogénico. Como se muestra en la figura 3A, el agente antiangiogénico fue más eficaz en la inducción de apoptosis de las células HUVEC (figura 2A). Además, probamos si los efectos eran específicos a las células endoteliales. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular con células HUVEC, M4A4, en presencia de 5 µM o 10 µM de agente antiangiogénico, Anginex y la proteína hospedera. Como se muestra en las figuras 3B y 9, quedó claro que el agente inhibió fuertemente la proliferación celular con células HUVEC, mientras que no se observaron efectos con células epiteliales M4A4. Las observaciones indicaron que los efectos del agente antiangiogénico eran específicos de las células endoteliales.
- 50 Ejemplo 3: Inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjerto de células PC-3
- 55

La fuerte actividad del agente antiangiogénico en inhibir el crecimiento y la inducción de apoptosis en las células HUVEC fue evidente. Se preparó un modelo de xenoinjerto de células PC-3 mediante el uso de ratones con inmunodeficiencia. Los ratones portadores de tumores (6 ratones por grupo) se trataron con agente antiangiogénico (10 mg/kg), agente antiangiogénico PEGilado (10 mg/kg), proteína hospedera (10 mg/kg) y solución salina tamponada durante dos semanas a través de dosis diaria. Los tratamientos se iniciaron 7 días después de la inoculación del tumor. Los tumores se midieron por volumen o por bioluminiscencia de las células tumorales.

Como se muestra en las figuras 4A y 4B, el agente antiangiogénico y el agente antiangiogénico-PEG inhibieron el crecimiento tumoral. La figura 4A muestra gráficamente que el volumen tumoral permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente antiangiogénico cuando el tratamiento se inició después de 8 días. La figura 4B muestra gráficamente el efecto dependiente de la dosis y que el volumen tumoral permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento con un agente antiangiogénico cuando el tratamiento se inició después de 22 días. Mientras que, como controles, los tumores crecieron a un ritmo normal en los ratones tratados con tampón y las proteínas hospederas. Al final del ciclo de tratamiento, se cortaron y pesaron los tumores de cada grupo de tratamiento.

Como se muestra en la figura 5, hubo diferencias sustanciales en los pesos de los tumores al comparar los grupos de agente antiangiogénico y de control. Esta vez los tumores se inicializaron con 2×10^6 células. Los tratamientos se iniciaron a los 22 días después de la implantación del tumor. El agente antiangiogénico inhibió completamente el crecimiento del tumor.

Como se muestra en la figura 6, en los grupos de control, los tumores crecieron a un ritmo normal en los ratones tratados con tampón y las proteínas hospederas (CD2). A partir de las imágenes, puede verse que los tumores permanecieron estables cuando se trataron con los agentes antiangiogénicos del examinador. Solo con fines de referencia, la Proteína M1 WT puede denominarse Angio1 y M1PEG puede denominarse Angio2.

Ejemplo 4: Densidad de vasos después de los tratamientos

La figura 7 muestra que la densidad de los vasos, controlada mediante el uso de tinción con inmunofluorescencia de secciones de tejido tumoral recogidas de ratones tratados, se redujo drásticamente después del tratamiento con agente antiangiogénico con agente antiangiogénico PEGilado en comparación con el grupo de tratamiento con proteína hospedera PEGilada y tampón. Para determinar si los efectos del tratamiento con el agente antiangiogénico eran realmente sobre los vasos sanguíneos del tumor, se recogieron los tumores después de los tratamientos. Se prepararon portaobjetos de tejido a partir de los tumores recogidos. Los portaobjetos se inmunotíñeron con anticuerpos contra CD31, un marcador molecular específico para las células endoteliales. La inmunotinción de los portaobjetos de tejido tumoral se visualizó mediante microscopía confocal. Los resultados indicaron que el agente antiangiogénico tiene efectos específicos sobre la angiogénesis tumoral.

Ejemplo 5: Toxicidad e inmunogenicidad del agente antiangiogénico

La toxicidad de la proteína parental del dominio 1 de CD2 se analizó previamente y no resultó tóxica en ratones. Para ayudar a garantizar que los nuevos diseños no alteraran la toxicidad de la proteína, se examinó la toxicidad del polipéptido antiangiogénesis mediante el uso de ratones CD-1. En primer lugar, se controlaron cuidadosamente los pesos corporales de los ratones desnudos portadores de tumores durante un curso de tratamiento de 14 días. Como se muestra en la figura 8, no se observaron cambios significativos en el peso corporal de los ratones en ningún grupo de tratamiento. Además, se probó la toxicidad en ratones CD-1 normales. A tres grupos de ratones (7 ratones por grupo) se les injectó iv una dosis, dos dosis y tres dosis de 100 μ l del polipéptido (100 mg/kg, 20 veces la dosificación usada) con un intervalo de tres días entre cada inyección. Los animales se devolvieron a sus jaulas durante 30 días. No se observaron muertes entre los ratones probados. Todos los animales se comportaron normalmente (sin cambios en los hábitos alimenticios, sin aumento o pérdida de peso anormales, sin apariencia anormal en el pelaje).

Los estudios de toxicidad mostraron que el agente antiangiogénico y el agente antiangiogénico con PEG no tenían toxicidad aguda para al menos tres dosis que eran aproximadamente 20 veces más altas que la dosificación usada en nuestro tratamiento de ratones con tumores. Además, también probamos si hubo daños hepáticos, renales y cardiovasculares tras el tratamiento con el agente antiangiogénico y el agente antiangiogénico con PEG. Los análisis histológicos no revelaron daños en los órganos de los animales tratados.

Ejemplo 6: glicosilación unida a N

El polipéptido mostrado en la secuencia ID No: 11 se expresó y purificó a partir del sistema de expresión de *Pichia pastoris*. La expresión de este polipéptido en la levadura *Pichia pastoris* se logró tanto por expresión intracelular como por secreción. Este polipéptido se purificó adicionalmente mediante el uso de una columna de intercambio iónico. El polipéptido se expresó como un polipéptido con etiqueta de His. La etiqueta de His se eliminó por escisión con trombina. La proteína glicosilada expresada y purificada a partir de levadura *Pichia pastoris* era un agente

antiangiogénico y se encontró que tenía glicosilación unida a N. Como se muestra en la figura 13, las células tratadas con diversos ejemplos del agente antiangiogénico mostraron una viabilidad robusta.

Ejemplo 7: Secuencias

5 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del dominio uno de CD2 a partir de una rata (rata WT CD2-D1):

RDSGTVWGAL GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL
10 KSGAFEILAN GDLKIKNLTR DDSGTYNVTV YSTNGTRILN KALDLRILE

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos del dominio uno de CD2 a partir de seres humanos (WT Human CD2-D1):

15 KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFK
EKDTYKLFKNGLTLKIKHLKTDDQDIYKVSIYDTKGKVNLEKIFDLKIQER

20 La SEQ ID NO: 3, denominada M1WT o Angiol, es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO1 por mutaciones W7Q, G8M, A9K, D94N, R96K, I97V, L98I y E99I:

RDSGTVQMKL GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL
25 KSGAFEILAN GDLKIKNLTR DDSGTYNVTV YSTNGTRILN KALNLKVII

25 La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 d derivado de la SEQ ID NO1 por mutaciones E41I, K43V, K45L, M46G, K47S, P48V y G53L:

30 RDSGTVKWKA GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL
KSGAFEILAN GDLKIKNLTR DDSGTYNVTV YSTNGTRILN KALSNDVNI

35 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO1 por mutaciones E41N, M46Q y F49S:

RDSGTEVIKA GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL
KSGAFEILAN GDLKIKNLTR DDSGTYNVTV YSTNGTRILN KALKLTAIL

40 La SEQ ID NO: 6, denominada ProAngio-PEG o Angio2, es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO3 por mutaciones M23C:

RDSGTVQMKL GHGINLNIPN FQCTDDIDEV RWERGSTLVA EFKRKMKPFL
45 KSGAFEILAN GDLKIKNLTR DDSGTYNVTV YSTNGTRILN KALNLKVII

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO1 por mutaciones E41I, K43V, K45L, M46G, K47S y F49S:

50 RDSGTVWGAL GHGINLNIPN FQMTDDIDEV RWERGSTLVA IFVRLGSVKM
KPLLKSGAFE ILANGDLKIK NLTRDDSGTY NVTVYSTNGT RILNKALDLR ILE

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2:

55 RDSGTVWGALGHGINLNIPNFQMTDDIDEVRWERGSTLVANFKRKQKPSL
KSGAFEILANGDLKIKNLTRDDSGTYNVTVYSTNGTRILNKALDLRILE

60 La SEQ ID NO: 9, denominada hProAngioB o Angio3, es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO2 por mutaciones E8S, T9V, W10Q, G11M, A12K, D99N, I102V, Q103I y E104I:

KEITNALSVQMKGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFK
65 EKDTYELLKNGALKIKHLKTDDQDIYKVSIADTKGKVNLEKIFNLKVII

La SEQ ID NO: 10, denominada hProAngio o Angio4, es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO: 9 por mutaciones M30C:

5 KEITNALSVQMKLGQDINLDIPSFQCSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFK
KDTYELLKNGALKIKHLKTDDQDIYKVSIADTKGKNVLEKIFNLKVII

La SEQ ID NO: 11, denominada hProAngioY o Angio5, es la secuencia de aminoácidos de un dominio variante uno de CD2 de levadura:

10 KEITNALSVQMKLGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFK
EKDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIADTKGKNVLEKIFNLKVII

15 Ejemplo 7: Supresión del crecimiento tumoral

La figura 10 muestra la curva de crecimiento del tumor a lo largo de 14 días o más de tratamiento. Los resultados muestran que hProAgio o Angio4, desarrollados a partir del polipéptido que codifica la seq. Id. No. 10, fue eficaz para suprimir el crecimiento tumoral. Los experimentos se llevaron a cabo mediante el uso del xenoinjerto PC-3 mediante el uso de hProAgio o Angio4 (10 mg/kg, dosis diaria) y mediante el uso de solución salina tamponada como control. Los tratamientos se iniciaron 8 días después de la inoculación del tumor.

Ejemplo 8: Eficacia contra Avastin®

25 Para probar aún más la eficacia del polipéptido antiangiogénico, se llevaron a cabo y analizaron experimentos con xenoinjertos de PC-3 mediante el uso de rProAgio-PEG o Angio2 (20 mg/k, dosis diaria) y Avastin (20 mg/kg, una dosis cada dos días). Los tratamientos se iniciaron 21 días después de la inoculación del tumor. La figura 11 es la curva de crecimiento tumoral de Avastin® y rProAgio-PEG o Angio2. La figura 12 muestra una representación gráfica del peso del tumor al final del curso de tratamiento de 14 días - se extrajeron y pesaron los tumores en cada grupo de tratamiento. Hubo diferencias significativas en el peso de los tumores y el crecimiento de los grupos de animales que fueron tratados con Angio2 y Avastin®.

Listado de secuencias

35 <110> Georgia State University Research Foundation Georgia State University Research Foundation Liu, Zhi-Ren Yang, Jenny Lu, Yin
<120> Agente antiangiogénico y método de uso de dicho agente

40 <130> 52265-500160
<140> PCTUS1143907
<141> 2011-07-13

45 <150> 61/363933
<151> 2010-07-13
<160> 11

50 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 99
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> la secuencia de aminoácidos del dominio uno de CD2 a partir de una rata

60 <400> 1

ES 2 923 430 T3

Arg Asp Ser Gly Thr Val Trp Gly Ala Leu Gly His Gly Ile Asn Leu
1 5 10 15

Asn Ile Pro Asn Phe Gln Met Thr Asp Asp Ile Asp Glu Val Arg Trp
20 25 30

5

<210> 2

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> dominio uno de CD2 a partir de seres humanos

<400> 2

20

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15

25

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
20 25 30

30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys

ES 2 923 430 T3

50 55 60

5 Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
65 70 75 80

10 Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
10 85 90 95

15 Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg
15 100 105

20 <210> 3
<211> 99
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO1 por mutaciones W7Q, G8M, A9K, D94N,
R96K, I97V, L98I y E99I
25 <400> 3

30 Arg Asp Ser Gly Thr Val Gln Met Lys Leu Gly His Gly Ile Asn Leu
30 1 5 10 15

35 Asn Ile Pro Asn Phe Gln Met Thr Asp Asp Ile Asp Glu Val Arg Trp
35 20 25 30

40 Glu Arg Gly Ser Thr Leu Val Ala Glu Phe Lys Arg Lys Met Lys Pro
40 35 40 45

45 Phe Leu Lys Ser Gly Ala Phe Glu Ile Leu Ala Asn Gly Asp Leu Lys
45 50 55 60

45 Ile Lys Asn Leu Thr Arg Asp Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Val Thr Val

ES 2 923 430 T3

ES 2 923 430 T3

Asn Ile Pro Asn Phe Gln Met Thr Asp Asp Ile Asp Glu Val Arg Trp
20 25 30

5 Glu Arg Gly Ser Thr Leu Val Ala Glu Phe Lys Arg Lys Met Lys Pro
35 40 45

10 Phe Leu Lys Ser Gly Ala Phe Glu Ile Leu Ala Asn Gly Asp Leu Lys
50 55 60

15 Ile Lys Asn Leu Thr Arg Asp Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Val Thr Val
65 70 75 80

20 Tyr Ser Thr Asn Gly Thr Arg Ile Leu Asn Lys Ala Leu Lys Leu Thr
85 90 95

25 Ala Ile Leu

30 <210> 6
<211> 99
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO1 y que varía de la secuencia ID No. 3 por mutación M23C

40 <400> 6

Arg Asp Ser Gly Thr Val Gln Met Lys Leu Gly His Gly Ile Asn Leu
1 5 10 15

45 Asn Ile Pro Asn Phe Gln Cys Thr Asp Asp Ile Asp Glu Val Arg Trp
20 25 30

50 Glu Arg Gly Ser Thr Leu Val Ala Glu Phe Lys Arg Lys Met Lys Pro
35 40 45

55 Phe Leu Lys Ser Gly Ala Phe Glu Ile Leu Ala Asn Gly Asp Leu Lys
50 55 60

60 Ile Lys Asn Leu Thr Arg Asp Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Val Thr Val
65 70 75 80

65 Tyr Ser Thr Asn Gly Thr Arg Ile Leu Asn Lys Ala Leu Asn Leu Lys
85 90 95

Val Ile Ile

ES 2 923 430 T3

5 <210> 7
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Variante del dominio uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO1 por mutaciones E41I, K43V, K45L, M46G, K47S y F49S:

15 <400> 7

Arg Asp Ser Gly Thr Val Trp Gly Ala Leu Gly His Gly Ile Asn Leu
1 5 10 15

20 Asn Ile Pro Asn Phe Gln Met Thr Asp Asp Ile Asp Glu Val Arg Trp
 20 25 30

25 Glu Arg Gly Ser Thr Leu Val Ala Ile Phe Val Arg Leu Gly Ser Val
 35 40 45

30 Lys Met Lys Pro Leu Leu Lys Ser Gly Ala Phe Glu Ile Leu Ala Asn
 50 55 60

35 Gly Asp Leu Lys Ile Lys Asn Leu Thr Arg Asp Asp Ser Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

40 Asn Val Thr Val Tyr Ser Thr Asn Gly Thr Arg Ile Leu Asn Lys Ala
 85 90 95

45 Leu Asp Leu Arg Ile Leu Glu
 100

50 <210> 8
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Una variante del dominio uno de CD2

60 <400> 8

65 Arg Asp Ser Gly Thr Val Trp Gly Ala Leu Gly His Gly Ile Asn Leu
 1 5 10 15

70 Asn Ile Pro Asn Phe Gln Met Thr Asp Asp Ile Asp Glu Val Arg Trp
 20 25 30

75 Glu Arg Gly Ser Thr Leu Val Ala Asn Phe Lys Arg Lys Gln Lys Pro
 35 40 45

ES 2 923 430 T3

Ser Leu Lys Ser Gly Ala Phe Glu Ile Leu Ala Asn Gly Asp Leu Lys
50 55 60

Ile Lys Asn Leu Thr Arg Asp Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Val Thr Val
5 65 70 75 80

Tyr Ser Thr Asn Gly Thr Arg Ile Leu Asn Lys Ala Leu Asp Leu Arg
10 85 90 95

Ile Leu Glu

<210> 9
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Un dominio variante uno de CD2 derivado de la SEQ ID NO2 por mutaciones E8S, T9V, W10Q, G11M, A12K, D99N, I102V, Q103I y E104I

<400> 9

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Ser Val Gln Met Lys Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
30 20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
35 35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Glu Leu Leu Lys
40 50 55 60

Asn Gly Ala Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
45 65 70 75 80

Tyr Lys Val Ser Ile Ala Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
50 85 90 95

Ile Phe Asn Leu Lys Val Ile Ile
55 100

<210> 10
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Un dominio variante de CD2 derivado de la SEQ ID NO:9 por mutaciones M30C:

<400> 10

65

ES 2 923 430 T3

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Ser Val Gln Met Lys Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15

5 Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Cys Ser Asp Asp Ile Asp Asp
20 25 30

10 Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
35 40 45

15 Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Glu Leu Leu Lys
50 55 60

20 Asn Gly Ala Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
65 70 75 80

25 Tyr Lys Val Ser Ile Ala Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
85 90 95

Ile Phe Asn Leu Lys Val Ile Ile
100

30 <210> 11
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Un dominio variante uno de CD2 expresado en levadura:
<400> 11

40 Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Ser Val Gln Met Lys Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15

45 Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
20 25 30

50 Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
35 40 45

55 Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
50 55 60

60 Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Val Ser Ile Ala Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
85 90 95

65 Ile Phe Asn Leu Lys Val Ile Ile
100

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido antiangiogénico adecuado para reducir la angiogénesis en un individuo que necesita reducción de la angiogénesis que comprende una variación del dominio uno del polipéptido CD2, en donde el polipéptido tiene una hoja β formada por dos segmentos que tienen al menos cuatro aminoácidos que alternan entre hidrofilia e hidrofobicidad, un pliegue antiparalelo, una superficie hidrófoba orientada hacia el interior y una superficie hidrófila orientada hacia el exterior, en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia Id. No. 3, la secuencia Id. No. 6, la secuencia Id. No. 9, la secuencia Id. No. 10 y la secuencia Id. No. 11.
2. El polipéptido según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde los segmentos tienen al menos cinco aminoácidos.
3. El polipéptido según lo reivindicado en la reivindicación 1, que comprende además un resto de polietilenglicol (PEG).
4. El polipéptido según lo reivindicado en la reivindicación 1, que comprende además un resto de glicano.
5. El polipéptido según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde el polipéptido CD2 modificado incluye comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con mutaciones E8S, T9V, W10Q, G11M, A12K, D99N, 1102V, Q103I y E104I.
6. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido antiangiogénico de la reivindicación 1.
7. La composición farmacéutica según lo reivindicado en la reivindicación 6 en una forma para la administración sistémica.
8. La composición farmacéutica según lo reivindicado en la reivindicación 6 en la forma de una solución o suspensión inyectable.
9. Un ácido nucleico que codifica un péptido aislado de la reivindicación 1.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, que comprende además un segundo agente activo.

ES 2 923 430 T3

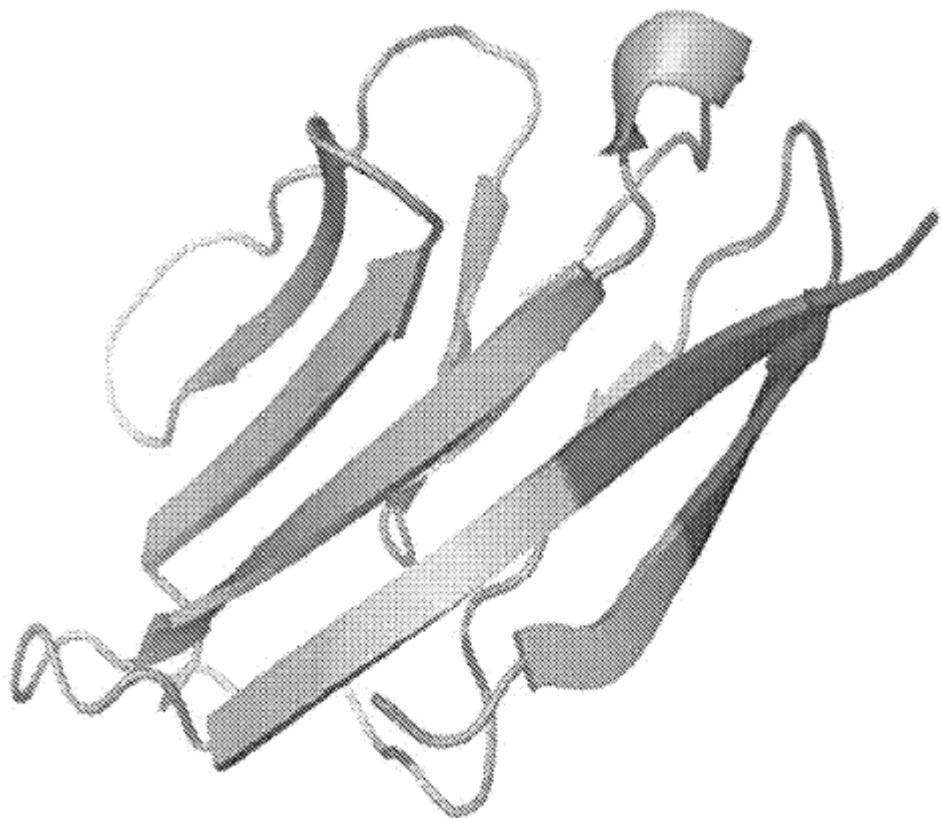


Figura 1A

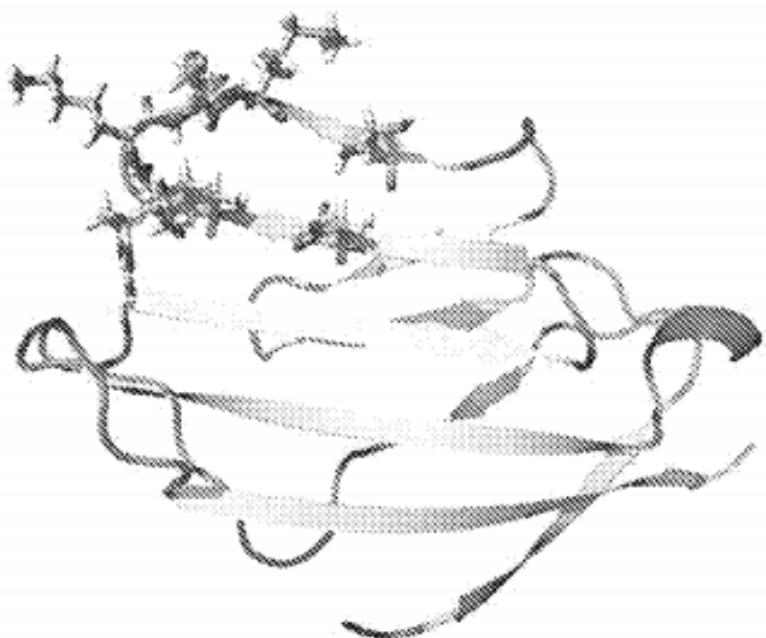


Figura 1C

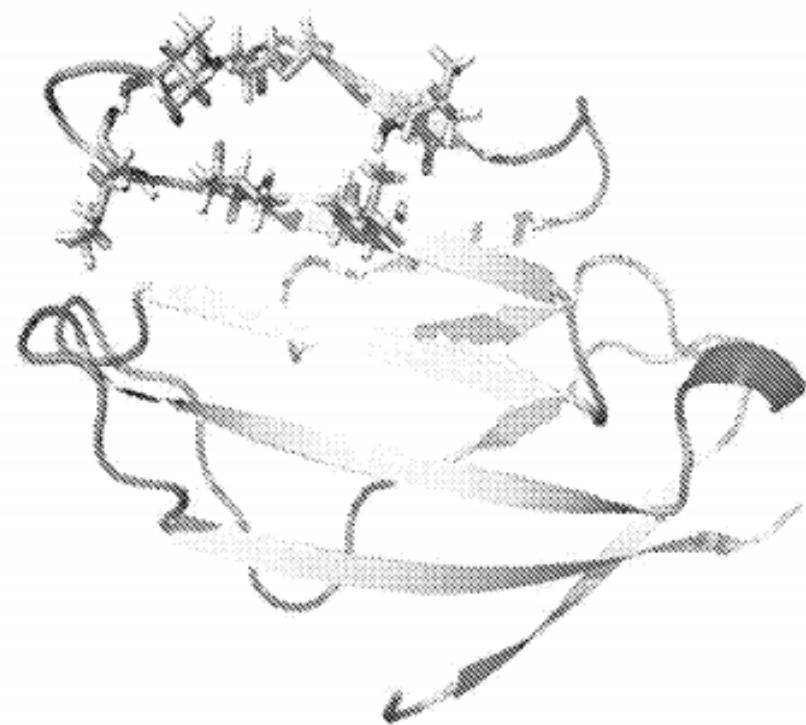


Figura 1B

ES 2 923 430 T3

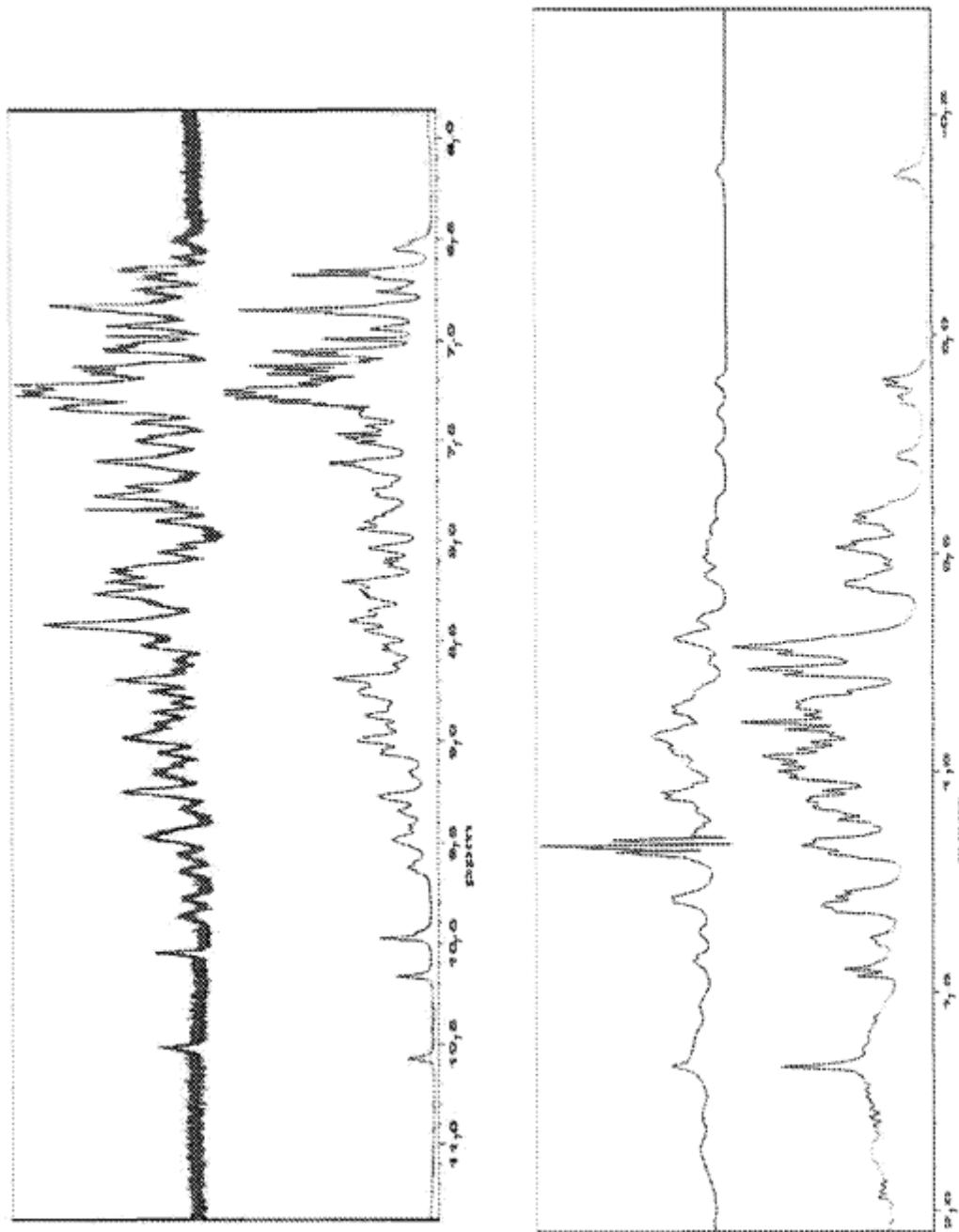


Figura 2

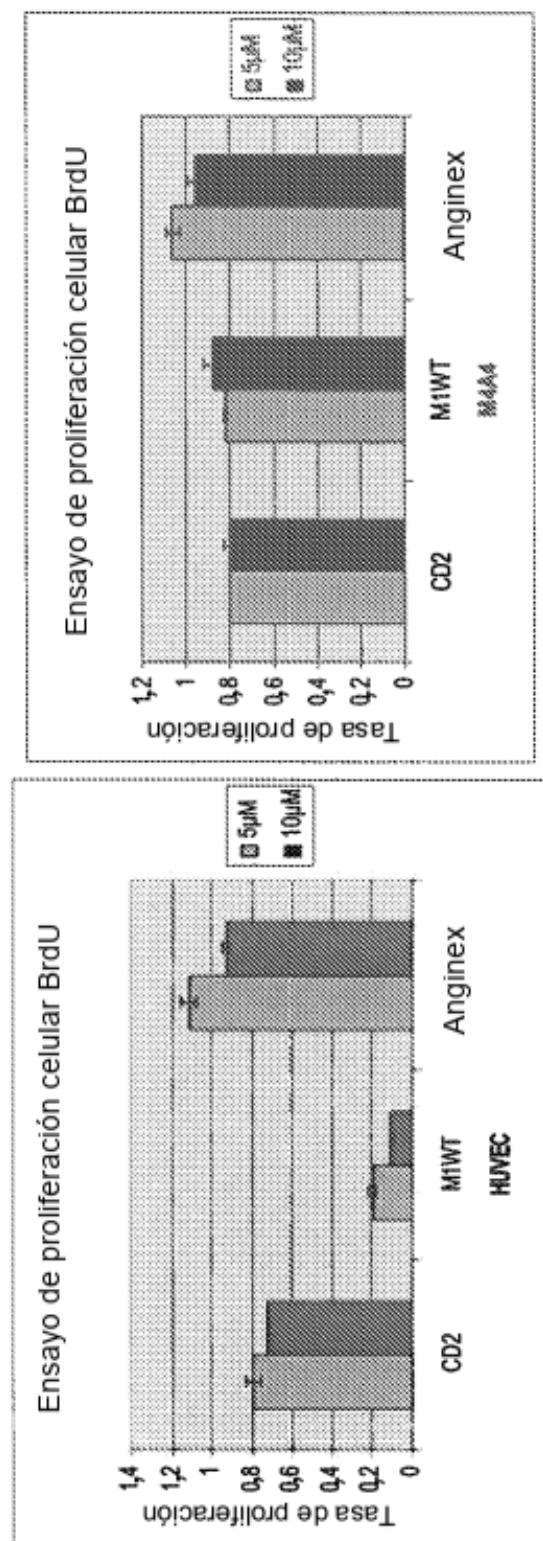
M1WT = Angio1
M4A4 = epitelial

HUVEC = endotelial

CD2 = hospedero

Figura 3B

Figura 3A



Crecimiento tumoral

sc. Xenoinjertos de tumor PC-3 (seis ratones/grupo). Inicio del tumor con 1×10^7 células dosis diaria de 10 mg/kg (ip) por 14 días

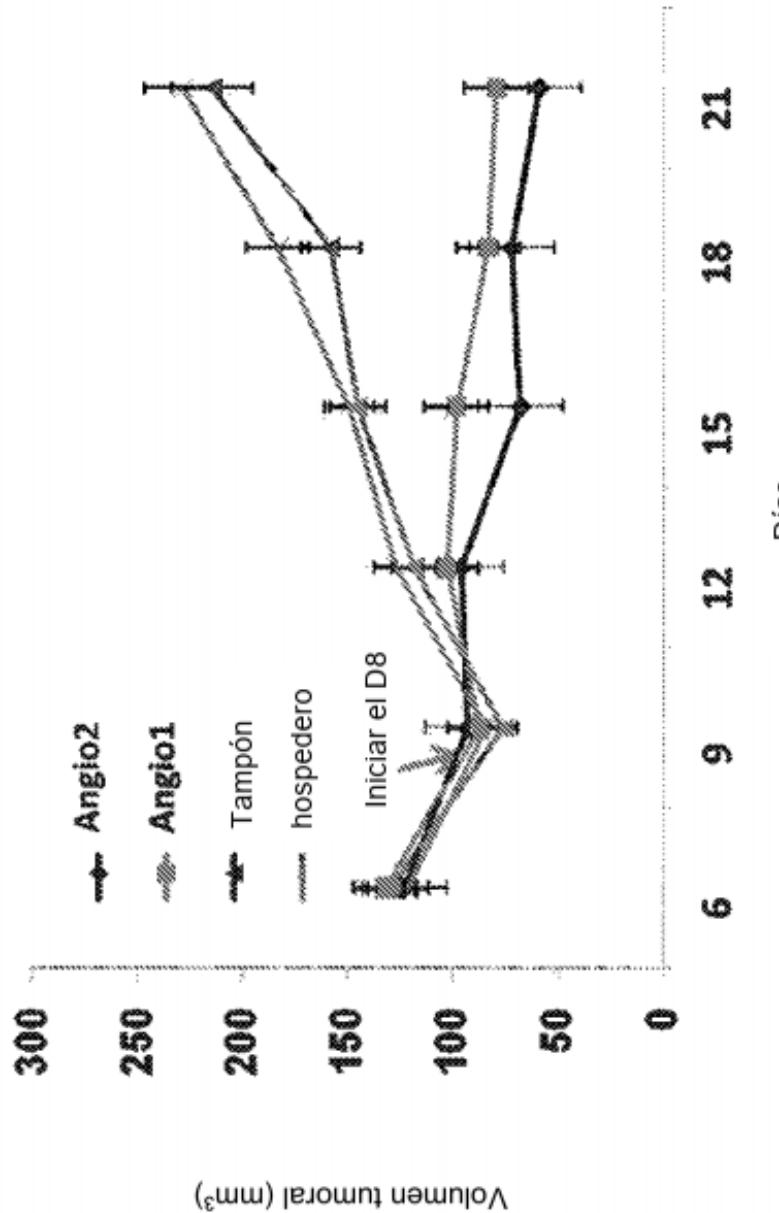


Figura 4A

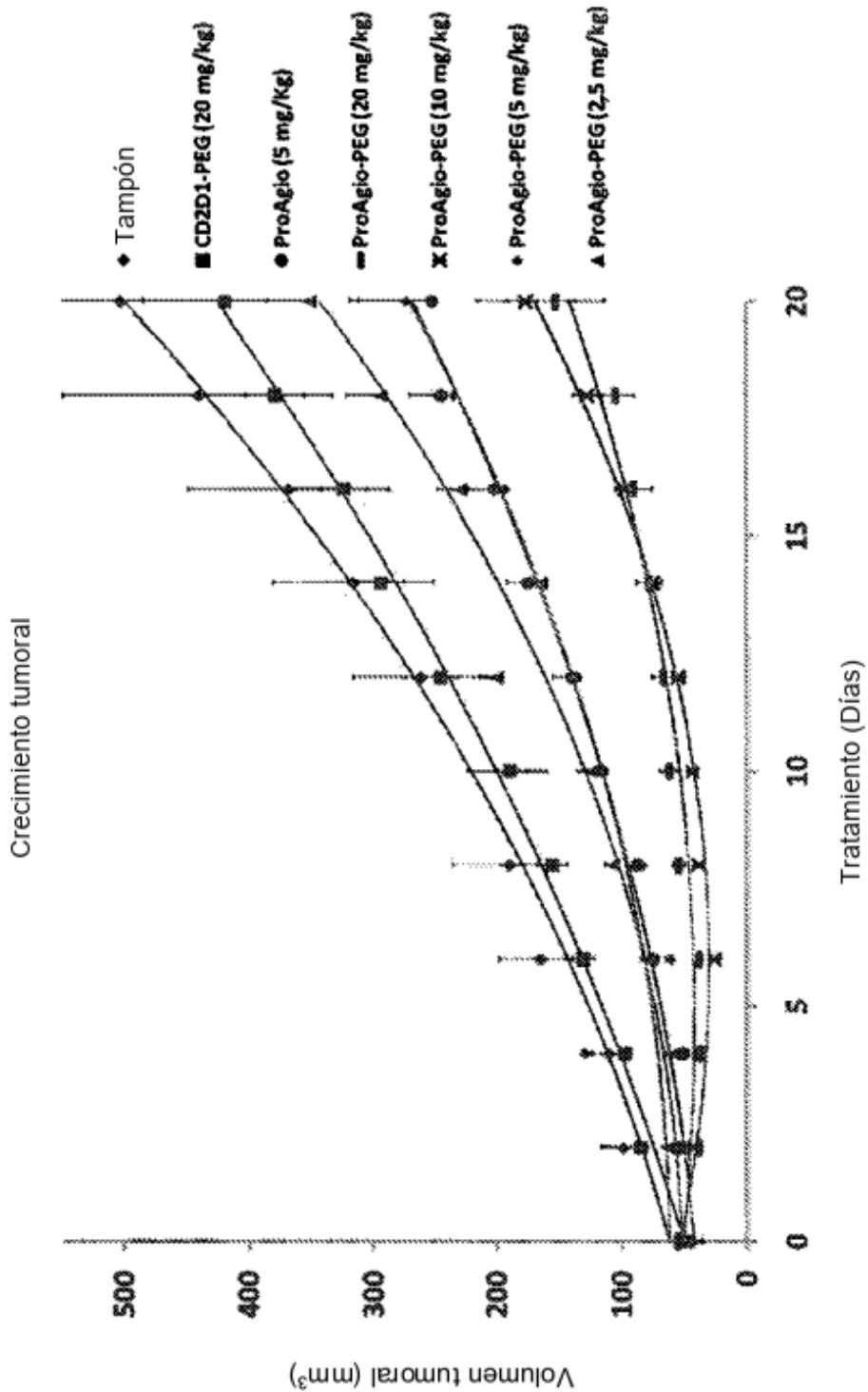


Figura 4B

ProAgio = Angio1

ProAgio-PEG = Angio2

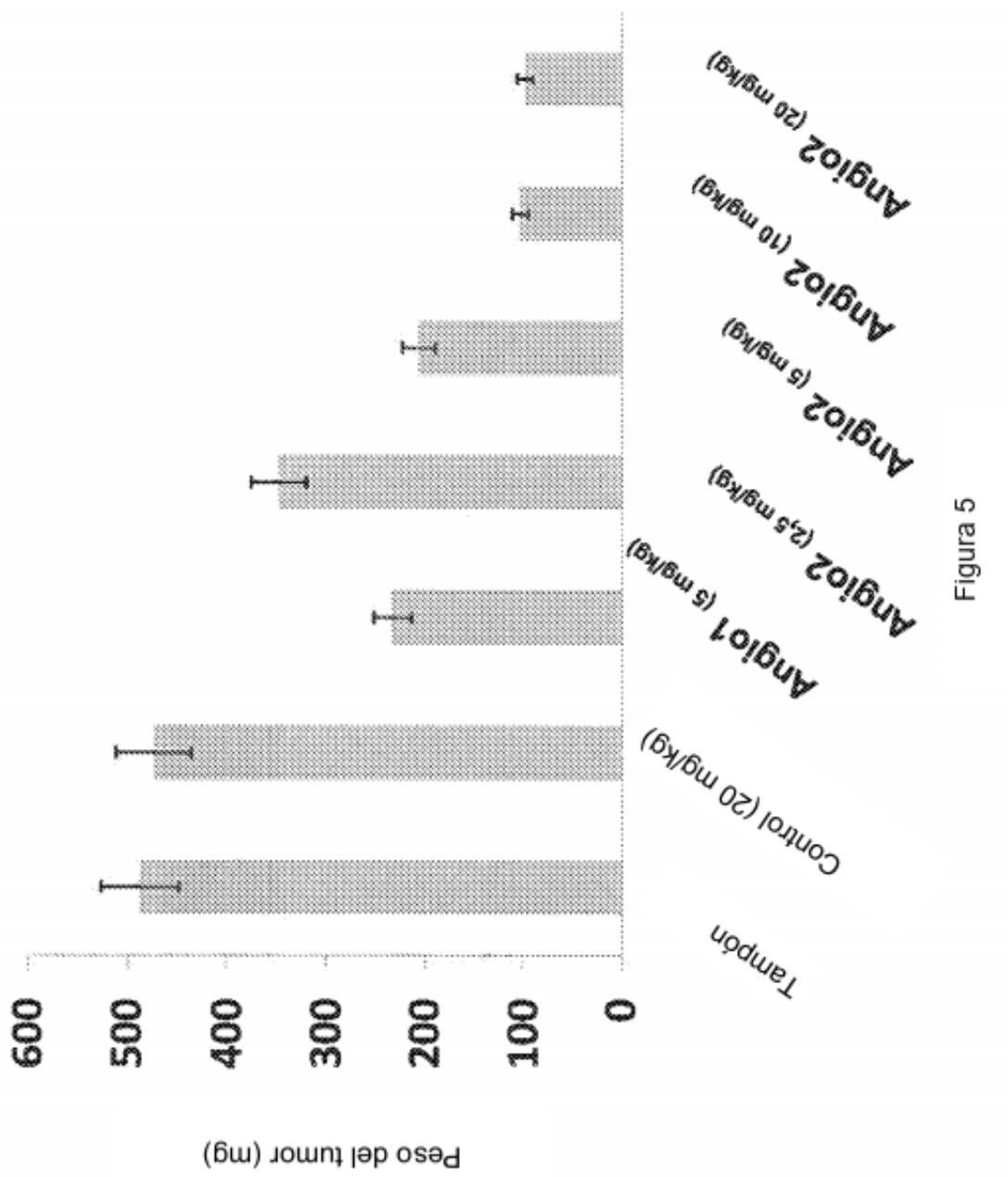
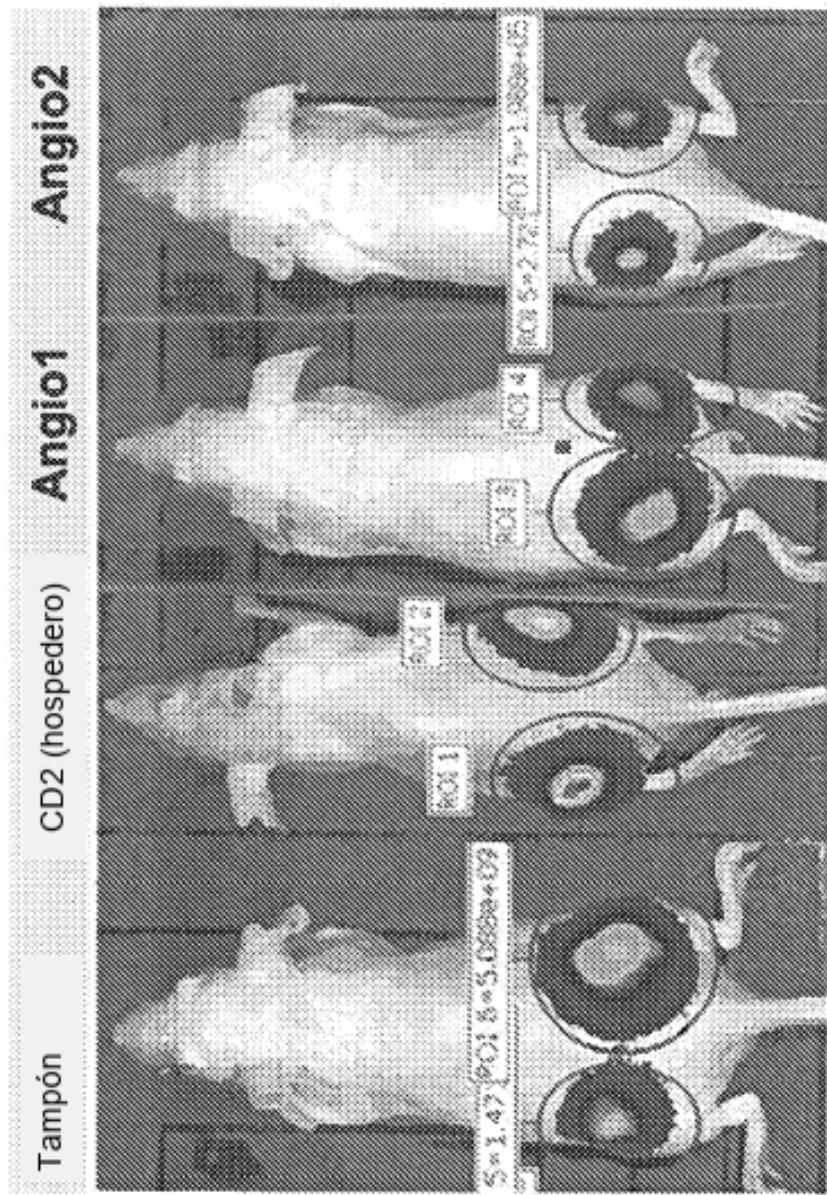


Figura 5

Figura 6



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

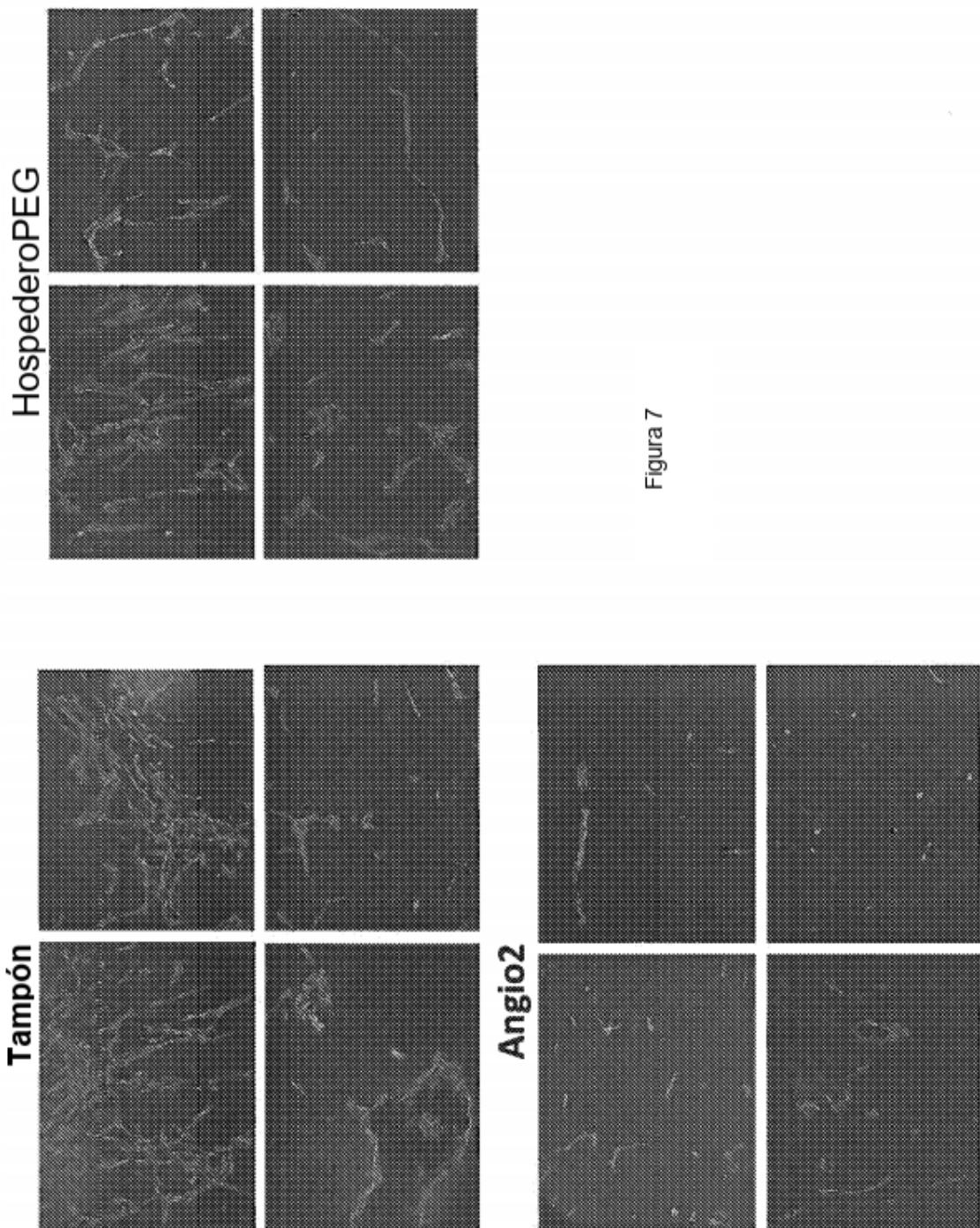


Figura 7

ES 2 923 430 T3

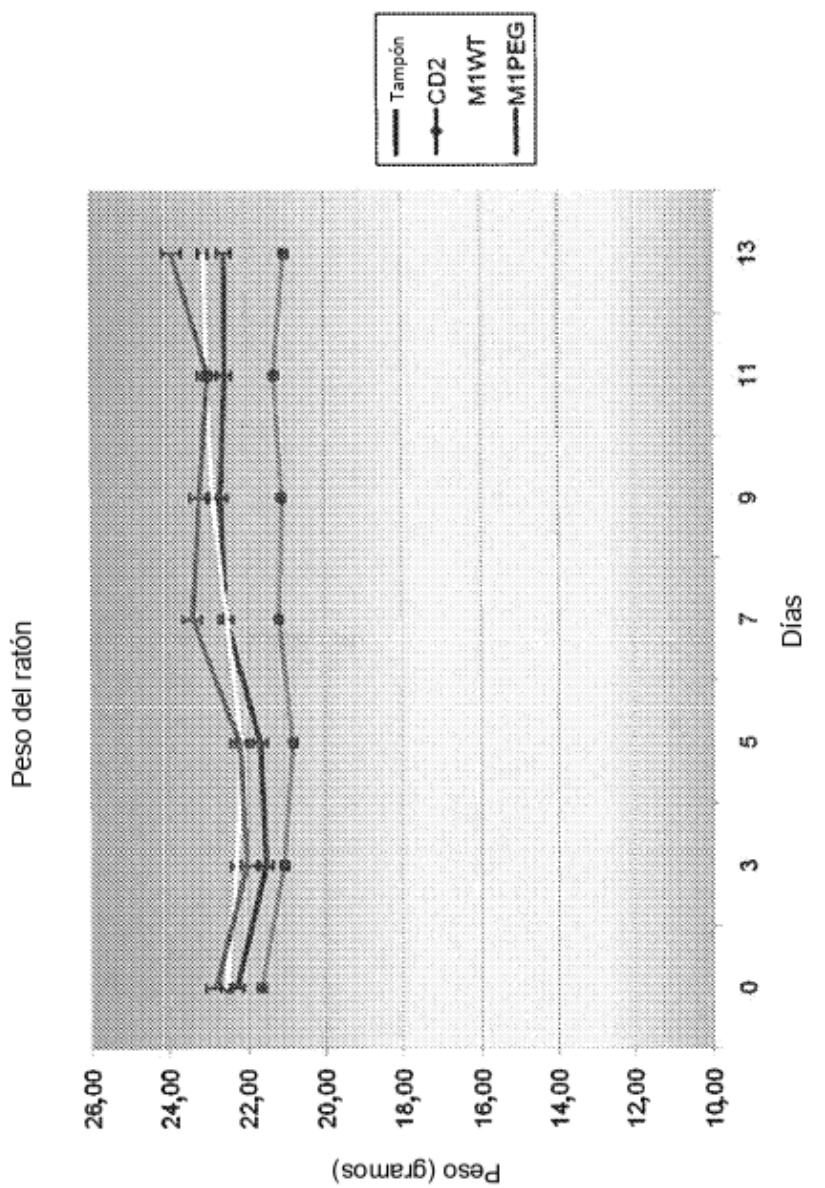


Figura 8

M1PEG = Angio2

M1WT = Angio1

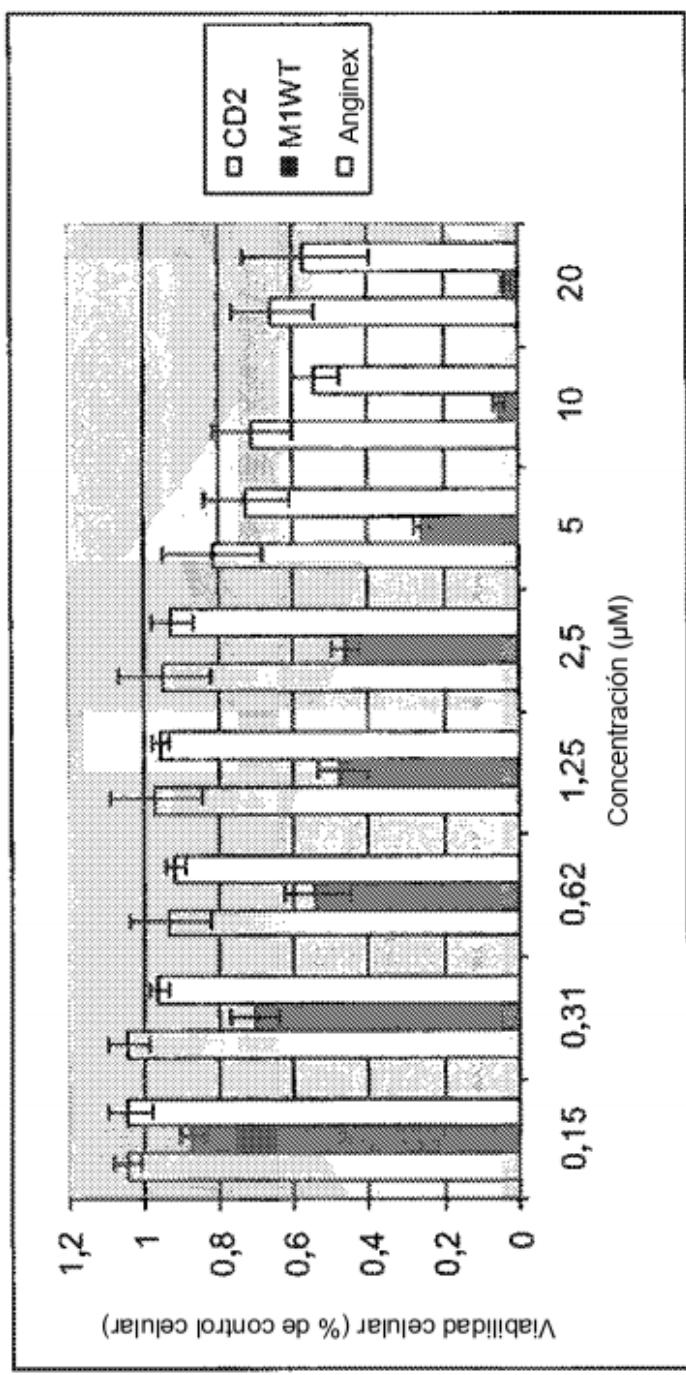


Figura 9

M1WT = Angio1

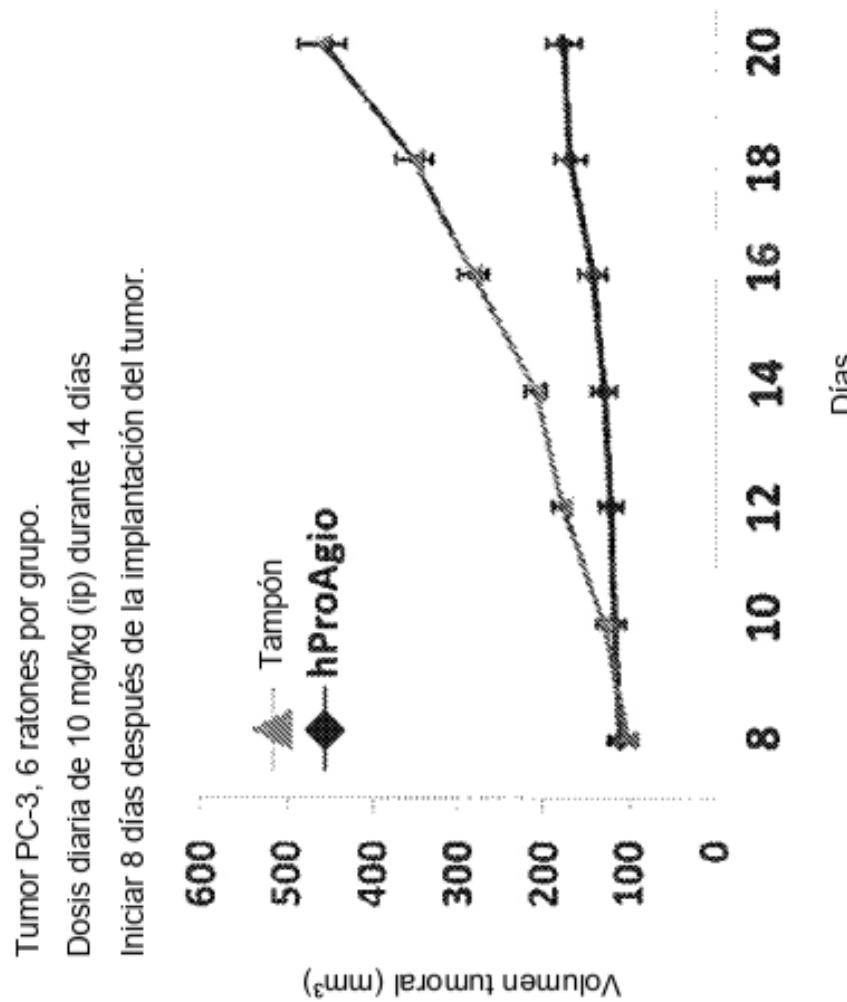


Figura 10

$hProAgio = Angio3$

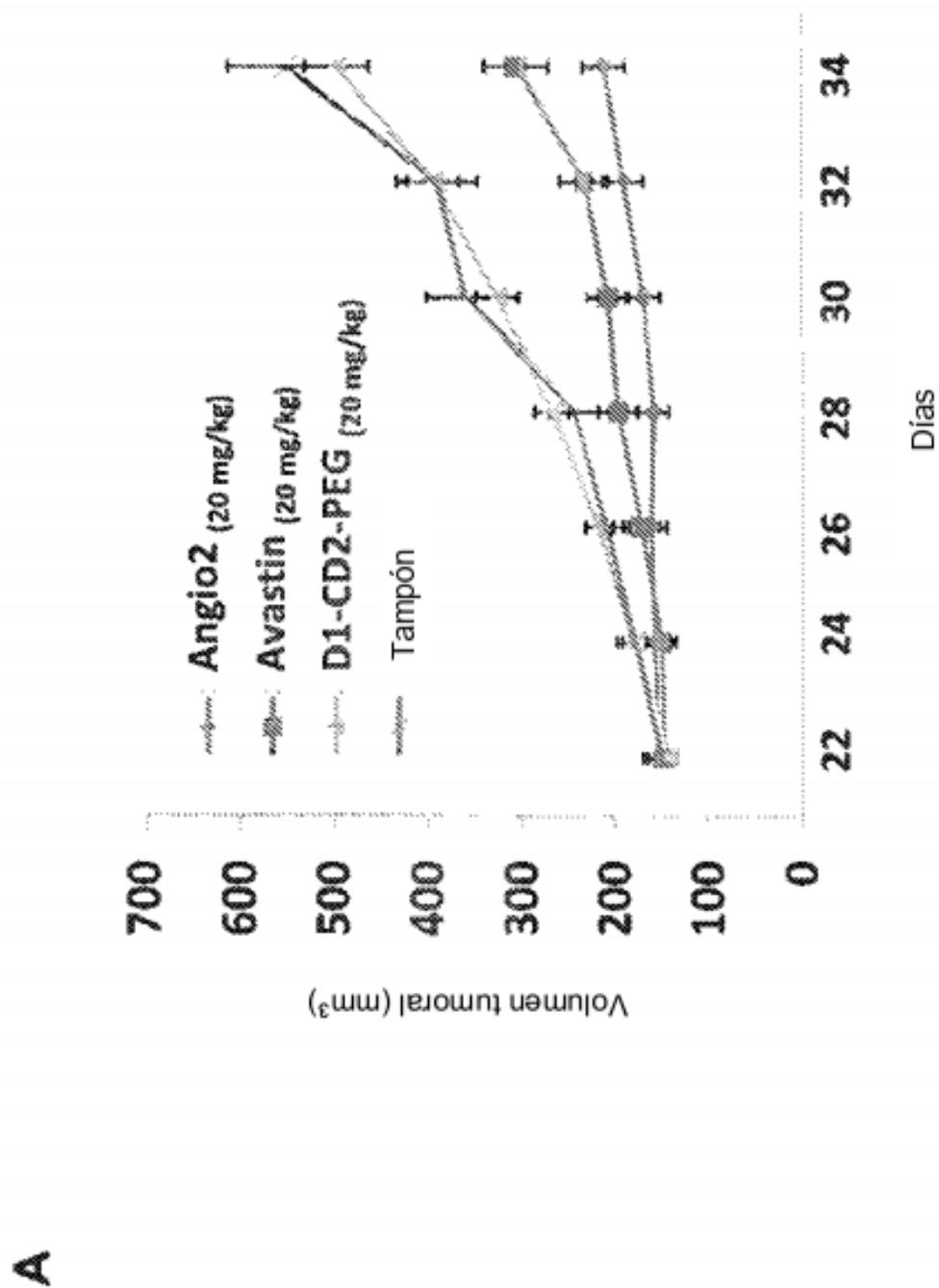


Figura 11

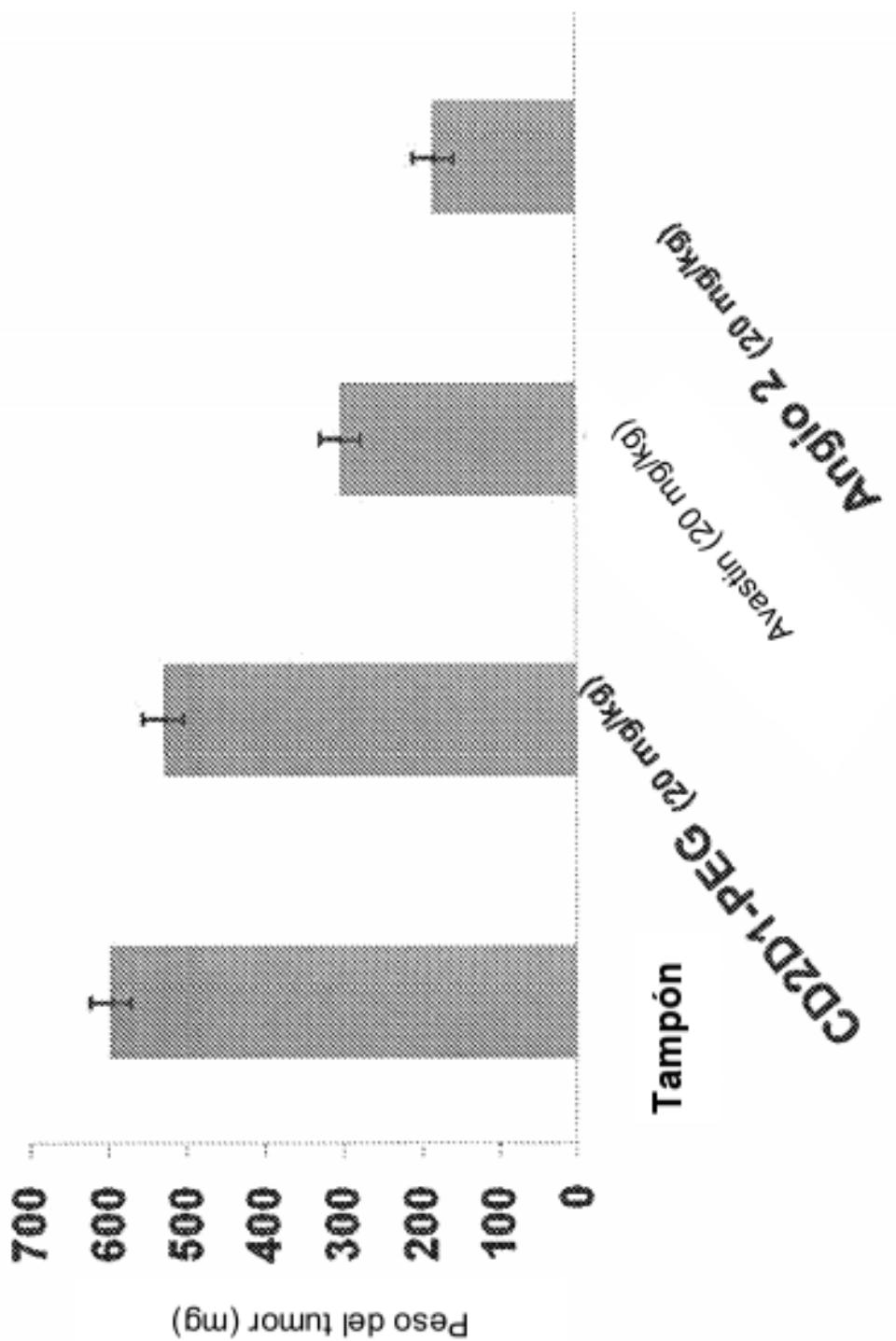


Figura 12

Actividad in vitro para la viabilidad de células endoteliales HUVEC

	EC* ₅₀ (μM)
Angio1	1,47 +/- 0,3
Angio3	0,94 +/- 0,4
Angio5	2,03 +/- 0,4

*EC₅₀ se define como el punto de concentración donde la viabilidad celular es el 50 % de las células tratadas con tampon

#Proteínas expresadas en bacteria E. coli

^Proteínas expresadas en levadura Pichia. La proteína está glicosilada

Figura 13