

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 890 733**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2017 PCT/CN2017/075864**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17173905**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2017 E 17778569 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021 EP 3453716**

(54) Título: **Inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol HM-1 y aplicación del mismo**

(30) Prioridad:

06.04.2016 CN 201610211000

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.01.2022

(73) Titular/es:

**NANJING ANJI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD (100.0%)
Level 6, Building A7, Hongfeng Sci-Tech Park
Kechuang Rd., Eco-Tech Development Zone
Nanjing, Jiangsu 210000, CN**

(72) Inventor/es:

XU, HANMEI

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 890 733 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

Inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol HM-1 y aplicación del mismo

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Esta solicitud es una solicitud en fase nacional de la solicitud internacional número PCT/CN2017/075864, presentada el 7 de marzo de 2017, titulada "INHIBIDOR DE ANGIOGÉNESIS MODIFICADO CON POLIETILENGLICOL HM-1 Y APLICACIÓN DEL MISMO", que reivindica el beneficio prioritario de la solicitud de patente china nº 201610211000.5, presentada el 6 de abril de 2016.

Campo técnico

10 La presente invención se refiere en general al campo de los medicamentos polipeptídicos y, en particular, a un inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol y aplicación del mismo.

Antecedentes

15 La angiogénesis se refiere a la generación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes en forma de brotes o no, mediante la proliferación y migración de células endoteliales vasculares sobre la base de capilares y/o vénulas existentes. La angiogénesis desempeña un papel muy importante en el proceso de formación de la placenta, el desarrollo del embrión y la curación de las heridas. En muchas enfermedades, como los tumores, diversos tipos de inflamación y enfermedades oculares (tal como la Degeneración Macular Relacionada con la Edad (AMD)), la angiogénesis también desempeña un papel fundamental.

20 Los tumores malignos son la principal causa de muerte en la salud humana. En los últimos años, la incidencia y la tasa de mortalidad del cáncer en China han aumentado. El crecimiento infinito, la invasión y la metástasis son signos de malignidad del cáncer y la principal causa de fracaso del tratamiento y de muerte. Por lo tanto, controlar el crecimiento del tumor, la invasión y la metástasis es la principal medida para mejorar el pronóstico y la tasa de supervivencia. En los años 70, Folkman propuso por primera vez en el New England Journal of Medicine que el crecimiento de los tumores depende de la neovascularización. La angiogénesis tumoral es la base morfológica del crecimiento del tumor y de la metástasis. No sólo proporciona nutrición y oxígeno a los tumores, sino que también exporta un gran número de células tumorales al huésped, lo que provoca el crecimiento del tumor y la metástasis. La mayoría de los tumores sólidos malignos, como el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer cervical y el cáncer de mama, son tumores dependientes de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis tumoral es una importante medida contra el cáncer.

25 30 Las enfermedades inflamatorias de la artritis son una de las enfermedades más comunes que ponen en peligro la salud humana. Son enfermedades inflamatorias que se producen en las articulaciones humanas y en los tejidos circundantes. El número de personas que padecen estas enfermedades en China aumenta año tras año. Estas enfermedades incluyen principalmente la artritis reumatoide, la artritis gotosa, la artritis reactiva, la artrosis, la artritis psoriásica, la artritis infecciosa, la artritis traumática y la espondilitis anquilosante. La artritis reumatoide (RA) es una artritis crónica progresiva cuya causa aún no se ha afirmado. Generalmente se considera un trastorno autoinmune y es el resultado de la destrucción fratricida del sistema de defensa del organismo. La genética, la infección, el frío y la humedad, etc., pueden ser factores patógenos. En el proceso patológico de la RA, la angiogénesis es un cambio histológico de referencia. La neovascularización va acompañada de hiperplasia sinovial e infiltración de células inflamatorias, que es la base de la formación de vasospasmos y de la destrucción articular en la RA. Por lo tanto, la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos es la clave para el tratamiento de dichas enfermedades. La inhibición de la angiogénesis no sólo impide el suministro de oxígeno y nutrientes a la membrana sinovial, sino que también conduce directamente a la degeneración de los vasos sanguíneos, inhibiendo así el crecimiento sinovial de la RA.

35 40 45 La patogénesis de las enfermedades oftalmológicas, como la enfermedad ocular neovascular del Iris, la enfermedad ocular neovascular de la coroides, la enfermedad ocular neovascular de la retina y la enfermedad ocular neovascular de la córnea, está relacionada con la formación excesiva de nuevos vasos sanguíneos. Al carecer de la estructura fisiológica normal de los vasos sanguíneos maduros, los nuevos vasos sanguíneos tienen una alta permeabilidad, son fáciles de romper, como resultado la sangre fluye hacia la cavidad vítreo, causando hemorragias en el fondo de ojo, lo que lleva a la visión borrosa o a la pérdida total de la visión en los pacientes, lo que afecta seriamente a la calidad de vida de los mismos. Por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis es la clave para el tratamiento de estas enfermedades, y la proliferación y migración de las células endoteliales es un paso clave en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

50 55 La endostatina (ES) es el fragmento de la región carboxi-terminal sin colágeno del colágeno XVIII macromolecular compuesto por 183 residuos de aminoácidos con una masa molecular relativa de 20 kD. La endostatina es un inhibidor de la angiogénesis que impide el suministro de nutrientes a los tumores al inhibir la neovascularización tumoral. Como puede actuar específicamente sobre las células endoteliales y no tiene un efecto significativo sobre los vasos sanguíneos de los tejidos normales, no tiene efectos tóxicos ni secundarios y no produce resistencia a los fármacos. La endostatina ha demostrado cierto efecto antitumoral en modelos animales *in vivo*, pero no tiene un efecto

antitumoral significativo en los ensayos clínicos. La US Food and Drug Administration (FDA) rechazó finalmente una solicitud de fármaco basada en la endostatina. La literatura relacionada informa de que el péptido formado por los aminoácidos (aa) 6º a 49º y los aminoácidos 134º a 178º de la endostatina puede inhibir la proliferación y la migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana, y la actividad es incluso mayor que la de la propia endostatina.

5 Por lo tanto, el truncamiento de la endostatina y la identificación de posibles fragmentos activos no sólo revelaría el mecanismo de la macromolécula, sino que también reduciría el coste del desarrollo de fármacos y proporcionaría información para el desarrollo de tratamientos basados en péptidos para estas enfermedades.

La integrina es una familia de receptores que reconoce una variedad de componentes de la matriz extracelular. Está ampliamente distribuido en la superficie celular y media en la adhesión de célula a matriz extracelular y de célula a célula. También interviene en la angiogénesis al conectar las proteínas del citoesqueleto intracelular con las moléculas de la matriz extracelular. Estos receptores están compuestos por dos cadenas α y β . Actualmente, se han encontrado 15 cadenas α y 9 cadenas β . La combinación de diferentes cadenas α y β determina la especificidad de los ligandos, las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ están implicadas en la angiogénesis y la migración celular, y $\alpha v\beta 3$ puede afectar a varios procesos clave en la carcinogénesis. La $\alpha \beta 3$ puede expresarse en una variedad 10 de tipos de células, reconoce el Arg-Gly-Asp (RGD) en la molécula ligando, y está implicada en la angiogénesis tumoral, la invasión, la metástasis, la inflamación, la curación de heridas y la fisiología y patología de la coagulación. 15 Por lo tanto, la secuencia RGD puede utilizarse como portadora para dirigir el transporte a las células endoteliales neovasculares, logrando así un tratamiento más eficaz para las enfermedades neovasculares. La solicitud de patente ZL201410324568.9 titulada "polipéptido de fusión multifuncional, procedimiento de preparación y aplicación del mismo", introdujo varios polipéptidos inhibidores de la angiogénesis, uno de los cuales es HM-1, y la secuencia es: 20 Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp. Esta secuencia contiene la secuencia del ligando de la integrina (Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp) y la secuencia de inhibición de la neovascularización (Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala). Este polipéptido ha demostrado tener un buen efecto antitumoral mediante repetidas evaluaciones de actividad 25 *in vitro* e *in vivo*, y puede inhibir significativamente la migración de las células endoteliales, inhibir la angiogénesis tumoral y, por tanto, inhibir el crecimiento del tumor. Sin embargo, los polipéptidos mencionados tienen una semivida corta y deben ser administrados con frecuencia, lo que conlleva dolor y molestias para el paciente.

En el informe de la literatura, la modificación o alteración de la estructura molecular es un procedimiento común para resolver el problema de la semivida corta y la administración continua del fármaco. Entre ellas, la modificación química es la más utilizada. El modificador químico comúnmente utilizado es el polietilenglicol (PEG), el dextrano, el poliaminoácido, el polianhídrido y similares. El PEG no es tóxico, no es inmunógeno y es soluble en agua. Está reconocido por la FDA como material auxiliar y modificador para productos farmacéuticos. Tras la modificación por PEG, los fármacos basados en proteínas o péptidos aumentan su peso molecular y disminuyen la tasa de filtración glomerular. La función de barrera del PEG también protege a las proteínas y los péptidos de la hidrólisis de las enzimas proteolíticas y reduce la producción de anticuerpos neutralizantes. Estos cambios mejoran las deficiencias de los fármacos basados en proteínas o péptidos, como la rápida eliminación del organismo, la alta inmunogenicidad, la corta 30 duración de la concentración efectiva del fármaco en la sangre y la administración frecuente. Se han comercializado diversos fármacos proteicos modificados con PEG. Sin embargo, el éxito de la modificación con PEG es incierto, impredecible y está lejos de ser rutinario, ya que el PEG suele afectar negativamente a la actividad biológica de las proteínas y los péptidos. La magnitud de los efectos está relacionada con el modificador, las condiciones de 35 modificación y la naturaleza de la proteína o del propio péptido. La actividad biológica del producto modificado puede 40 determinarse mediante pruebas farmacodinámicas *in vitro* e *in vivo*.

Los inhibidores de la angiogénesis son una clase de fármacos que han recibido una gran atención en el tratamiento de las enfermedades neovasculares en los últimos años. Entre estos inhibidores de la angiogénesis, la angiotensina y la endostatina son los más destacados. Aunque estos inhibidores vasculares tienen perspectivas muy atractivas, sus defectos son también muy evidentes: las dianas de los inhibidores de la angiogénesis no han quedado claras hasta ahora, y la especificidad y selectividad de los vasos sanguíneos no son lo suficientemente buenas, y el efecto es limitado, lo que da lugar a grandes dosificaciones. Por lo tanto, un buen fármaco antiangiogénico debe ser específico para los marcadores moleculares de la neovascularización para lograr un efecto dirigido a la neovascularización, y para aumentar el efecto inhibidor del fármaco sobre la angiogénesis en su conjunto. Es imprescindible lograr una 45 inhibición eficaz de la angiogénesis con sólo dosis bajas de fármacos puede. Hasta ahora, se ha informado de que Avastin se ha utilizado con éxito en el tratamiento de enfermedades oculares, y todavía no se ha desarrollado un medicamento de este tipo en China. La inhibición de la angiogénesis mediante la diana de integrina de la presente 50 invención sería una nueva opción para el tratamiento de dichas enfermedades oculares.

Zhendong LIU et al informan de que el HM-3 se ha modificado con diferentes polietilenglicoles (PEG) con el fin de 55 reducir la tasa de eliminación plasmática, prolongar la semivida en el organismo, mantener una alta concentración de HM-3 en la sangre y aumentar la eficacia terapéutica (INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 12, no. 4, 19 de abril de 2017, páginas 2650-2663). Beili Zhu et al informan de que el HM-3, un polipéptido derivado de la endostatina modificado con RGD, es un potente inhibidor de la angiogénesis sintetizado. Sus sólidos efectos 60 inhibidores de la migración de las células endoteliales y del crecimiento tumoral se han demostrado mediante ensayos de actividad *in vivo* e *in vitro* (JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 148, no. 3, 1 de septiembre de 2010, páginas 341-347). Shen Hong et al divulga que "la PEGilación mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos polipeptídicos. Después de la PEGilación, el HM-3 modificado (PEG-HM-3) mostró una semivida prolongada 65 en la sangre. En este trabajo, se evaluó el efecto antirreumático del PEG-HM-3 y se investigó el objetivo de la

angiogénesis y la inflamación" (JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY B, vol. 2, nº 7, 1 de enero de 2014, páginas 800-813). Dongqing Yuan et al., investigan la farmacocinética del HM-3 administrado por vía intravítreo en los ojos de ratones como fármaco antiangiogénico para la degeneración macular relacionada con la edad (CURRENT EYE RESEARCH, vol. 39, nº 8, 21 de agosto de 2014 (2014-08-21), páginas 837-844).

- 5 El documento CN 104045718 divulga polipéptidos de fusión multifuncionales y sus procedimientos de preparación y uso. El polipéptido de fusión multifuncional es uno de los seis polipéptidos o cualquier combinación múltiple de los mismos, que puede utilizarse para la prevención y el tratamiento de tumores sólidos, artritis reumatoide y enfermedad ocular neovascular.

SUMARIO

10 Problemas a resolver:

En vista de las deficiencias del polipéptido inhibidor de la angiogénesis HM-1 existente, tal como la corta semivida, la alta tasa de eliminación del plasma, la administración frecuente, etc., la presente invención proporciona un inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol y su aplicación. El HM-1 fue modificado por el PEG, pero durante la modificación del PEG, las condiciones de reacción afectarían inevitablemente al rendimiento del producto modificado, al tipo de producto y a la estabilidad del PEG. El tipo y el peso molecular del PEG también tienen cierto grado de influencia en la actividad biológica del producto modificado. Además, cuando los tipos de PEG son diferentes, las condiciones de reacción pueden producir subproductos, que afectan a la pureza del producto modificado y causan ciertas dificultades para su aislamiento y purificación. Por lo tanto, se exploraron PEG con diferentes pesos moleculares y diferentes condiciones de reacción para modificar el HM-1, y se encontró inesperadamente un producto de modificación único que es estable, de alto rendimiento y eficaz. Los productos modificados se sometieron a diversas pruebas *in vitro* e *in vivo* para comprobar su eficacia farmacológica. Se identifican más productos modificados que tienen una semivida prolongada *in vivo* y conservan una actividad biológica de alto nivel para su uso futuro en la prevención y el tratamiento de tumores, diversos tipos de inflamación y enfermedades oculares neovasculares.

Sin embargo, los productos modificados en estado de solución tienen poca estabilidad y tienden a perder actividad durante el proceso de producción. Para mejorar su estabilidad, la solución del producto modificado se somete a una concentración por evaporación rotativa, se seca por congelación al vacío y se almacena a -70 °C; ya que los productos modificados en estado de solución tienen poca estabilidad, son sensibles a las altas temperaturas, y la temperatura durante la evaporación rotativa puede ser elevada. El tiempo excesivo empleado durante la evaporación rotativa puede acelerar la degradación del producto modificado; si la temperatura se hace demasiado baja durante el proceso de concentración, éste puede prolongarse indebidamente, lo que también puede afectar negativamente a la estabilidad de los productos. Por lo tanto, también exploramos la temperatura y el tiempo de la evaporación rotativa para establecer las condiciones en las que el proceso de concentración puede terminar lo más rápidamente posible sin afectar a la estabilidad del producto.

Soluciones técnicas:

35 Para resolver los problemas anteriores, la solución técnica adoptada por la presente invención es la siguiente:

Un inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol HM-1 que tiene la secuencia de mPEG-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp.

Preferentemente, el mPEG es mPEG-SC (carbonato de monometoxi polietilenglicol succinimida), mPEG₂-NHS (éster succinimidílico de monometoxi polietilenglicol ramificado) mPEG-ALD (polietilenglicol-propionaldehído monometoxilado) o mPEG-bALD (polietilenglicol-butaldehído monometoxilado), en los que el peso molecular que varía de PEG es de 500 a 40.000 daltons.

Preferentemente, las secuencias son:

mPEG-SC_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-SC_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 45 mPEG-SC_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-SC_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG₂-NHS_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG₂-NHS_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG₂-NHS_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 50 mPEG₂-NHS_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-ALD_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-ALD_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-ALD_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-ALD_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 55 mPEG-bALD_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-bALD_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 mPEG-bALD_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp; o

mPEG-bALD_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp.

Un medicamento, medicina o fármaco hecho de, o una aplicación del inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol HM-1 descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento de tumores, inflamación y enfermedades oculares neovasculares mediante la inhibición de la neovascularización.

5 Preferentemente, los tumores comprenden un cáncer primario o secundario, melanoma, hemangiomas y sarcomas originados en la cabeza humana, cuello, cerebro, tiroides, esófago, páncreas, pulmón, hígado, estómago, mama, riñón, vesícula biliar, colon o recto, ovario, cuello uterino, útero, próstata, vejiga y testículos.

Preferentemente, la inflamación comprende la artritis reumatoide, la artritis gotosa, la artritis reactiva, la artrosis, la artritis psoriásica, la artritis infecciosa, la artritis traumática y la espondilitis anquilosante.

10 Preferentemente, las enfermedades oculares neovasculares comprenden la enfermedad ocular neovascular del iris, la enfermedad ocular neovascular de la coroides, la enfermedad ocular neovascular de la retina y la enfermedad ocular neovascular de la córnea.

15 Un medicamento para su uso en el tratamiento de tumores, inflamaciones y enfermedades oculares neovasculares mediante la inhibición de la neovascularización, en el que el medicamento contiene el inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol HM-1 descrito anteriormente, en el que la administración del medicamento es por inyección.

Preferentemente, la administración del medicamento incluye la inyección subcutánea, la inyección intramuscular, la inyección intravenosa, la inyección vítreo intraocular y el goteo intravenoso.

20 25 El procedimiento de preparación del inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol anterior, que incluye los pasos de: (1) sintetizar el péptido con la secuencia Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp; (2) modificar el péptido Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp con mPEG; (3) separar y purificar los productos modificados en el inhibidor de la angiogénesis HM-1 puro modificado con polietilenglicol en estado de solución; (4) La solución de productos modificados obtenida por aislamiento y purificación se sometió a concentración por evaporación rotatoria, seguida de secado por congelación al vacío para obtener un polvo de productos modificados, que se almacenó a -70 °C.

El proceso específico de modificación con mPEG de la HM-1 es el siguiente: se exploraron inicialmente y se reoptimizaron diversas condiciones que pueden afectar a la reacción de modificación, incluyendo: la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, la relación molar entre el mPEG y la HM-1, el tipo de tampón, el pH del tampón, la concentración del tampón (Tabla 2), la concentración del polipéptido y la concentración del agente reductor cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃), y se analizó la tasa de modificación del producto único modificado mediante el procedimiento de normalización de áreas utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento. El análisis se llevó a cabo para seleccionar diversas condiciones de reacción en las que el rendimiento de diversos productos de modificación simple de HM-1 modificados con mPEG fuera alto. Las condiciones cromatográficas específicas son:

Columna analítica: COSMOSIL, 250 mm × 4,6 mm (5 µmresina);

35 Fase móvil: la fase A es agua (más 0,1 % de TFA), la fase B es acetonitrilo (más 0,1 % de TFA);

Cantidad de carga: 20 µl;

Caudal: 1 ml/min;

Longitud de onda de detección: 220 nm;

Gradiente de elución: véase la Tabla 1

40 Tabla 1 Gradiente de elución utilizado para detectar el rendimiento de los productos modificados

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	longitud de onda (nm)
0	1	95	5	220
5	1	88	12	220
17	1	60	40	220
30	1	30	70	220

Tabla 2 Tampones para diversos mPEG

Tipo de PEG	Tipo de tampones	PH del tampón	Concentración del tampón (mol/l)
mPEG-SC	$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	7,5~8,5	0,05
			0,1
			0,2
mPEG ₂ -NHS	$\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	8,0~9,0	0,05
			0,1
			0,2
mPEG-ALDy mPEG-bALD	$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	5,0~6,0	0,05
			0,1
			0,2
	$\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$		0,05
			0,1
			0,2

La exploración inicial de las diversas condiciones de modificación de PEG se realizó de la siguiente manera: la temperatura de reacción se fijó en 4 °C, la relación molar de mPEG a HM-1 se fijó en 1,5:1, y la concentración de polipéptido se fijó en 1 mg/ml, y el tipo y la concentración del tampón de reacción se prueban y seleccionan: (1) selección de la concentración de tampón para la modificación de HM-1 por medio de mPEG-SC: el tiempo de reacción fue de 6 horas, y se preparó $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ con pH de 7,5, 8,0, 8,5 a concentraciones de 0,05 mol/l, 0,1 mol/l y 0,2 mol/l, respectivamente. Las reacciones de modificación se llevaron a cabo con distintas concentraciones de tampón y distintos pH de tampón, y se detectó la tasa de modificación del producto único modificado. Los resultados mostraron que el mPEG-SC con diferentes pesos moleculares tenía el mayor rendimiento de modificación simple a la concentración de 0,1 mol/l y pH 8,5 en tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, hasta el 90,0 %, y la tasa de modificación aumentaba con el incremento del pH. Por lo tanto, se utilizó el tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ de 0,1 mol/l para optimizar las condiciones de modificación del mPEG-SC. (2) Cribado de la concentración del tampón para la modificación de mPEG₂-NHS de HM-1: la concentración del agente reductor NaCNBH_3 fue de 0,05 mol/l, y el tiempo de reacción fue de 10 horas, y los tampones $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ se prepararon a las concentraciones de 0,05 mol/l, 0,1 mol/l y 0,2 mol/l, con pH de 8,0, 8,5 y 9,0. Las reacciones de modificación se llevaron a cabo en tampones de diferentes concentraciones y diferentes pH, y se midió la tasa de modificación de los productos modificados individualmente. Los resultados mostraron que el mPEG₂-NHS con diferentes pesos moleculares tenía el mayor rendimiento de modificación simple en el tampón $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ con una concentración de 0,05 mol/l y pH 8,5, hasta el 58,8 %, pero la producción de subproductos aumentaba con el aumento del pH. Por lo tanto, se utilizó un tampón $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ de 0,05 mol/l para optimizar las condiciones de modificación del mPEG₂-NHS. (3) Cribado de las especies y la concentración de los tampones utilizados en la modificación mPEG-ALD y mPEG-bALD de HM-1: el tiempo de reacción fue de 10 h, y el tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ y el tampón $\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$ se prepararon a las concentraciones de 0,05 mol/l, 0,1 mol/l y 0,2 mol/l, con un pH de 5,0, 5,5 y 6,0, y se midió la tasa de modificación de los productos modificados individuales en las diferentes concentraciones y los diferentes tampones de pH. Los resultados mostraron que el mPEG-ALD y el mPEG-bALD con diferentes pesos moleculares tenían el mayor rendimiento de modificación simple en el tampón $\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$ a una concentración de 0,1 mol/l y pH 5,5, con los mayores rendimientos de 85,6 % y 96,2 %, respectivamente. Como resultado, se realizó una optimización adicional de las condiciones de modificación de mPEG-ALD y mPEG-bALD utilizando un tampón $\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$ de 0,1 mol/l.

La optimización adicional de diversas condiciones de modificación de PEG se realizó de la siguiente manera: basándose en los resultados de la exploración inicial, bajo las concentraciones de tampón seleccionadas y los tipos de tampón para diversas modificaciones de PEG, se optimizaron aún más otros factores clave. (1) Optimización de las condiciones para la modificación mPEG-SC de HM-1: en la condición fija de la temperatura de reacción de 4 °C, una concentración de péptido de 1 mg/ml, y un tampón de 0,1 mol/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, se sometieron a una prueba ortogonal de tres factores la relación molar de mPEG a HM-1, el pH del tampón y el tiempo de reacción (Tabla 3). Los resultados de las pruebas ortogonales se analizaron mediante el análisis de intervalos. El cambio de pH del tampón fue el factor clave que afectó a la reacción. Las tasas medias de modificación a pH 7,5, 8,0 y 8,5 fueron del 50,88 %, 74,55 % y 81,68 %, respectivamente. El efecto es significativo, y el pH del tampón puede ser reoptimizado. (2) Optimización de las condiciones para la modificación por mPEG₂-NHS de la HM-1: a una temperatura de reacción fija de 4 °C, una concentración de péptido de 1 mg/ml, y un tampón de 0,05 mol/l de $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, se sometieron tres factores que incluían la proporción molar de mPEG a HM-1, el pH del tampón y el tiempo de reacción a una prueba ortogonal de tres factores (Tabla 4). Los resultados de las pruebas ortogonales se analizaron mediante el análisis de intervalos. El cambio de pH del tampón fue el factor clave que afectó a la reacción. Las tasas medias de modificación a pH 8,0, 8,5 y 9,0 fueron del 37,40 %, 50,72 % y 25,63 %, respectivamente. El efecto es significativo, y a medida que

aumenta el pH, se incrementa el contenido de subproductos, lo que no favorece el aislamiento y la purificación del producto modificado, por lo que se puede reoptimizar el pH del tampón. (3) Optimización de las condiciones para la modificación mPEG-ALD y mPEG-bALD de HM-1: a una temperatura de reacción fija de 4 °C, una concentración de péptido de 1 mg/ml y un tampón $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ de 0,05 mol/l, se analizaron cuatro factores que incluían la relación molar pf mPEG y HM-1, el pH del tampón, el tiempo de reacción y la concentración del agente reductor NaCNBH₃ en un ensayo ortogonal de cuatro factores y tres niveles (Tabla 5). Los resultados de las pruebas ortogonales se analizaron mediante el análisis de intervalos. El pH del tampón fue el factor clave que afectó a la modificación de HM-1 por mPEG-ALD. Las tasas medias de modificación a pH 5,0, 5,5 y 6,0 fueron del 66,40 %, 75,00 % y 85,32 %, respectivamente. El efecto sobre la tasa de modificación fue significativo. La relación molar entre el PEG y el péptido fue el factor clave que influyó en la modificación mPEG-ALD de la HM-1. Las tasas medias de modificación en la relación molar de 1,1:1, 1,3:1 y 1,5:1 son del 86,18 %, 87,63 % y 95,23 %, respectivamente. El efecto sobre la tasa de modificación fue significativo. Además, como el agente reductor NaCNBH₃ tiene cierta citotoxicidad, su dosis debe reducirse al máximo. Por lo tanto, el pH del tampón y la concentración de NaCNBH₃ pueden volver a optimizarse durante la modificación mPEG-ALD de HM-1, la proporción molar de PEG a péptido y la concentración de NaCNBH₃ pueden volver a optimizarse durante la modificación mPEG-bALD de HM-1.

Reoptimización de diversas condiciones de modificación de PEG: los factores clave de las diferentes modificaciones de PEG se reoptimizaron de acuerdo con los resultados de optimización de las condiciones de modificación. (1) Reoptimización de las condiciones para la modificación mPEG-SC de HM-1: bajo la condición de que la temperatura de la reacción fuera de 4 °C, la concentración del péptido fuera de 1 mg/ml, la proporción molar de mPEG a HM-1 fuera de 1,5:1, y el tiempo de reacción fuera de 3 horas, el pH del tampón se reoptimizó en el tampón 0,1 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ a pH 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6 y 8,7, respectivamente. Los resultados mostraron que el rendimiento de la modificación simple aumentaba con el pH a 8,2-8,5. Cuando el pH era superior a 8,5, se producían subproductos de la reacción, y el rendimiento de los subproductos aumentaba con el incremento del pH, lo que no favorecía el aislamiento y la purificación de los productos modificados. Por lo tanto, el pH debe controlarse estrictamente a 8,5. (2) Reoptimización de las condiciones para la modificación por mPEG₂-NHS de HM-1. Bajo la condición de que la temperatura de la reacción fuera de 4 °C, la concentración del péptido fuera de 1 mg/ml, la relación molar de mPEG a HM-1 fuera de 1,5:1, y el tiempo de reacción fuera de 10 h, el pH del tampón se reoptimizó en un tampón $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ de 0,05 mol/l a pH 8,3, 8,4, 8,5, 8,6 y 8,7, respectivamente. Los resultados mostraron que el rendimiento de la modificación simple aumentaba con el incremento del pH a pH 8,2-8,5. Cuando el pH era superior a 8,5, el rendimiento del subproducto aumentaba con el aumento del pH y mostraba un patrón de pico en forma de hombro con el producto objetivo, lo que no era propicio para el aislamiento y la purificación del producto modificado, por lo que el pH debía controlarse estrictamente a 8,5. (3) Reoptimización de las condiciones para la modificación con mPEG-ALD de la HM-1: 1) Reoptimización del pH del tampón: bajo las condiciones de temperatura de reacción fue de 4 °C, la concentración de péptido fue de 1 mg/ml, la relación molar de mPEG a HM-1 fue de 1,5:1, la concentración de NaCNBH₃ fue de 0,05 mol/l, y el tiempo de reacción fue de 10 horas, el pH del tampón se reoptimiza en tampón $\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$ de 0,1 mol/l con pH de 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 y 6,2, respectivamente. Los resultados mostraron que el rendimiento de la modificación simple aumentó ligeramente con el aumento del pH a pH 5,8-6,0. Cuando el pH era superior a 6,0, aparecían subproductos, lo que no favorecía el aislamiento y la purificación del producto modificado, por lo que se controló el pH a 5,8-6,0. 2) Reoptimización de la concentración de NaCNBH₃: bajo las condiciones de temperatura de reacción de 4 °C, concentración de péptido de 1 mg/ml, relación molar de mPEG a HM-1 de 1,5:1, pH del tampón $\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$ de 6,0, tiempo de reacción de 10 horas, la concentración de NaCNBH₃ se reoptimizó cuando la concentración de NaCNBH₃ fue de 0,02 mol/l, 0,03 mol/l, 0,04 mol/l y 0,05 mol/l, respectivamente. Los resultados mostraron que cuando la concentración de NaCNBH₃ se redujo a 0,03 mol/l, la tasa de modificación fue equivalente a cuando el NaCNBH₃ era de 0,05 mol/l. Cuando la concentración se redujo a 0,02 mol/l, la tasa de modificación disminuyó significativamente. Por lo tanto, la concentración de NaCNBH₃ se redujo a 0,03 mol/l. (4) Reoptimización de las condiciones para la modificación mPEG-bALD de HM-1: 1) Reoptimización de la relación molar entre el mPEG y el HM-1: bajo las condiciones de temperatura de reacción de 4 °C, concentración de péptido de 1 mg/ml, concentración de NaCNBH₃ de 0,05 mol/l, y pH del tampón $\text{CH}_3\text{COOH-NaCH}_2\text{COOH}$ de 6,0, se reoptimizó la relación molar entre el mPEG y el HM-1 a una relación molar entre el mPEG y el HM-1 de 1,3:1, 1,4:1 y 1,5:1. Los resultados mostraron que la tasa de modificación del producto aumentaba con el incremento de la proporción molar de mPEG y HM-1, pero la diferencia no era evidente cuando la proporción molar era de 1,4:1 y 1,5:1. Para ahorrar costes, la relación molar se fijó en 1,4:1. 2) Reoptimización de la concentración de NaCNBH₃: el procedimiento de reoptimización y los resultados son los mismos que los de la modificación mPEG-ALD de HM-1.

Tabla 3 Protocolo de prueba ortogonal para la modificación mPEG-SC de HM-1

Grupo de prueba	Relación molar de mPEG a HM-1	pH del tampón	Tiempo de reacción (h)
1	1,1:1	7,5	1
2	1,1:1	8,0	2

ES 2 890 733 T3

(continuación)

Grupo de prueba	Relación molar de mPEG a HM-1	PH del tampón	Tiempo de reacción (h)
3	1,1:1	8,5	3
4	1,3:1	7,5	2
5	1,3:1	8,0	3
6	1,3:1	8,5	1
7	1,5:1	7,5	3
8	1,5:1	8,0	1
9	1,5:1	8,5	2

Tabla 4 Protocolo de prueba ortogonal para la modificación mPEG₂-NHS de HM-1

Grupo de prueba	Ración molar de mPEG aHM-1	PH del tampón	Tiempo de reacción (h)
1	1,1:1	8,0	8
2	1,1:1	8,5	10
3	1,1:1	9,0	12
4	1,3:1	8,0	10
5	1,3:1	8,5	12
6	1,3:1	9,0	8
7	1,5:1	8,0	12
8	1,5:1	8,5	8
9	1,5:1	9,0	10

Tabla 5 Protocolo de prueba ortogonal para la modificación mPEG-ALD y mPEG-bALD de HM-1

Grupo de prueba	Relación molar de mPEG a HM-1	PH del tampón	Tiempo de reacción (h)	Concentración del reductor (mol/l)
1	1,1:1	5,0	6	0,03
2	1,1:1	5,5	8	0,04
3	1,1:1	6,0	10	0,05
4	1,3:1	5,0	8	0,05
5	1,3:1	5,5	10	0,03

(continuación)

Grupo de prueba	Relación molar de mPEG a HM-1	pH del tampón	Tiempo de reacción (h)	Concentración del reductor (mol/l)
6	1,3:1	6,0	6	0,04
7	1,5:1	5,0	10	0,04
8	1,5:1	5,5	6	0,05
9	1,5:1	6,0	8	0,03

La exploración de las condiciones de evaporación rotativa: El objetivo principal de la evaporación rotativa es eliminar el disolvente orgánico de la solución y concentrarla. Los dos factores principales que afectan a la tasa de evaporación rotativa y a la estabilidad de la muestra son la temperatura y el tiempo, y la duración del tiempo también se ve afectada por la temperatura. Así, se exploraron estos dos factores para aumentar la eficacia del paso de concentración en condiciones que garanticen la estabilidad de la muestra. Dado que el producto modificado en estado de solución es sensible a la temperatura, cuando la temperatura es superior a 40 °C, se produce una degradación significativa, por lo que la temperatura se fija en 30-38 °C, y la solución se concentra a 1/3 de la cantidad original a diferentes temperaturas. El tiempo requerido y la estabilidad de la muestra se muestran en la Tabla 6. Los resultados mostraron que el tiempo requerido para la concentración a 37 °C era más corto (40 min) y la estabilidad de la muestra era mayor, por lo que se seleccionó realizar el paso de concentración por evaporación rotativa a 37 °C.

Tabla 6 Exploración de condiciones de evaporación rotativa

Grupo de prueba	Temperatura (°C)	Tiempo de concentración (min)	Pureza de la muestra antes de la concentración (%)	Pureza de la muestra tras la concentración (%)
1	30	132	98,9	98,2
2	31	125	99,1	98,4
3	32	115	99,0	98,5
4	33	100	98,8	98,2
5	34	85	98,9	98,2
6	35	70	98,5	98,2
7	36	55	98,8	98,6
8	37	40	99,0	98,9
9	38	30	98,7	97,8

El estudio encontró que el péptido con la secuencia de Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala tiene el efecto de inhibir la angiogénesis tumoral. La secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD) es un importante ligando para la integrina, por lo que el péptido Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp que contiene la secuencia RGD también puede reconocer específicamente la integrina. El polipéptido inhibidor de la angiogénesis de la presente invención es una conjunción del péptido Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala, que puede inhibir la angiogénesis, y el péptido Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp, que contiene Arg-Gly-Asp (RGD) que tiene afinidad hacia la familia de las integrinas y se une específicamente a ellas, en el que la conjunción está en el C-terminal del péptido Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala. La conjunción crea un polipéptido que tiene afinidad hacia las integrinas y capacidad de unión a las mismas, y efecto inhibidor sobre la angiogénesis. Mientras tanto, el N-terminal del polipéptido inhibidor de la angiogénesis con la capacidad de dirigirse a la integrina se optimizó específicamente mediante la modificación con polietilenglicol, y la secuencia final optimizada fue: mPEG-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp, que contiene PEG y un polipéptido de 13 aminoácidos. El objetivo de la secuencia RGD en el polipéptido modificado es la integrina $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_5\beta_3$, pero el principal objetivo de unión sigue siendo la integrina $\alpha_5\beta_3$. En

- combinación con la secuencia de inhibición de la neovascularización Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala, los polipéptidos inhiben eficazmente la angiogénesis tumoral y, por tanto, el crecimiento del tumor y la metástasis. El polietilenglicol (PEG) es un tipo de polímero macromolecular con propiedades fisicoquímicas únicas. Es biocompatible, no tóxico y no antigenico. La principal función biológica de los fármacos proteicos o peptídicos tras la modificación con PEG permanece inalterada, y la modificación con PEG puede conferir a la proteína una serie de propiedades deseables: (1) aumento de la estabilidad, prolongación de la semivida plasmática; (2) reducción de la inmunogenicidad y la antigenicidad; (3) reducción de los efectos secundarios tóxicos; (4) reducción de la posibilidad de degradación por la hidrolasa, reducción de la tasa de eliminación por el riñón; (5) mejora de la distribución del fármaco y del comportamiento cinético, etc.
- 5 10 El polipéptido HM-1 se modifica con polietilenglicol y el objetivo no se modifica. Al mismo tiempo, la semivida *in vivo* se prolonga, la tasa de eliminación se reduce, la inmunogenicidad y la antigenicidad se reducen, mientras que la actividad antitumoral permanece inalterada. Como resultado, la frecuencia de la administración del fármaco se reduce, de una vez al día a una vez cada 2-3 días para el HM-1 modificado con PEG.
- 15 Los inventores han descubierto y divulgado a través de extensos experimentos que el inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol, es de cir, el polipéptido, puede inhibir significativamente la proliferación y la migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUEVC), y puede inhibir significativamente la proliferación de las células HeLa de cáncer cervical humano, las células HCT 116 de cáncer de colon humano, las células U87 de tumores cerebrales humanos, las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano y otras células cancerosas.
- 20 25 Los inventores han descubierto y divulgado a través de extensos experimentos que el inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol puede tratar eficazmente la inflamación por angiogénesis. Los experimentos y las pruebas demuestran que la presente invención puede dirigirse al endotelio neovascular en el proceso de formación del vasoespasio en la RA, inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos y, por lo tanto, lograr el efecto de prevenir o tratar la artritis reumatoide. Además, la presente invención demuestra, mediante el modelo de artritis reumatoide de rata de tipo adyuvante y de artritis reumatoide de tipo colágeno de ratón DBA/1, que la presente invención tiene efectos notables de tratamiento de la artritis reumatoide con menos efectos secundarios, baja dosificación y bajo coste.
- 30 35 Los inventores han descubierto y divulgado a través de extensos experimentos que el inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol puede inhibir la proliferación de las células endoteliales vasculares de la retina humana (HRCEC) de manera dependiente de la dosis dentro de un intervalo. El efecto del polipéptido inhibidor de la angiogénesis sobre la neovascularización de la córnea de ratón y la neovascularización del iris de conejo indica que el inhibidor de la angiogénesis modificado con PEG de la presente invención puede inhibir el crecimiento de la neovascularización de la córnea y del iris y tiene el potencial de convertirse en un fármaco para tratar la enfermedad ocular neovascular de la córnea y la enfermedad ocular neovascular del iris, con el potencial de tratar otras enfermedades oculares neovasculares.
- 40 45 La coroides está situada en la parte posterior del ojo. Las pruebas de los inventores han demostrado que los inhibidores de la angiogénesis aquí divulgados pueden mejorar el flujo sanguíneo coroideo, lo que indica que la coroides puede ser alcanzada actualmente tras la circulación sistémica o la vía escleral-úvea-nerviosa óptica tras la administración del fármaco, por lo que los inhibidores de la angiogénesis pueden ser utilizados para la prevención o el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y otras enfermedades neovasculares coroideas. Al mismo tiempo, al inhibir la formación de neovascularización coroidea en ratas, puede tener cierto efecto terapéutico en las enfermedades neovasculares coroideas, incluida la degeneración macular relacionada con la edad.
- El inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol diseñado por la invención es científico, razonable, factible y eficaz, y puede utilizarse como fármaco terapéutico para tratar tumores humanos, diversos tipos de inflamación y enfermedades oculares neovasculares, y amplía en gran medida el espectro de enfermedades tratables por esta clase de inhibidor de la angiogénesis, proporcionando nuevas ideas y perspectivas para el desarrollo futuro de fármacos.
- 45 La semivida del polipéptido modificado HM-1 fue de 0,34 horas. La semivida del mPEG-HM-1 modificado por el polietilenglicol se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7 Comparación de la semivida de mPEG-HM-1 y HM-1 ($T_{1/2}\beta$ es la semivida)

Fármaco	$T_{1/2}\beta$ (h)	CL (L/h/kg)	$AUC_{0-\infty}$ (mg/l/h)	$MRT_{0-\infty}$ (h)
HM-1	0,34±0,13	1..47±0,31	32,79±8,23	0,067±0,01 3
mPEG-SC _{5k} -HM-1	8,31±0,12	0,0598±0,0108	4391,72±12,85	7,68±2,97
mPEG-SC _{10k} -HM-1	15,18±0,11	0,0273±0,0056	4671,86±10,76	12,67±5,84

(continuación)

Fármaco	T _{1/2β} (h)	CL (L/h/kg)	AUC _{0-∞} (mg/l/h)	MRT _{0-∞} (h)
mPEG-SC _{20k} -HM-1	21,46±0,24	0,0135±0,0093	4310,23±12,98	17,64±12,6
mPEG-SC _{40k} -HM-1	42,19±0,32	0,0068±0,0047	4365,64±11,06	16,36±10,28
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	8,85±0,10	0,0527±0,0112	4789,25±12,08	8,02±5,04
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	15,27±0,11	0,0259±0,0062	4858,62±10,62	13,08±3,66
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	22,38±0,34	0,0131±0,0102	4682,53±15,01	18,16±10,22
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	42,25±0,27	0,0066±0,0053	4579,47±13,52	15,27±9,37
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	9,13±0,11	0,0506±0,0094	4986,29±10,16	8,15±4,21
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	16,46±0,10	0,0255±0,0073	5067,98±9,79	11,05±7,68
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	22,65±0,21	00129±0,0106	5899,46±6,68	18,65±2,57
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	43,31±0,22	0,0065±0,0058	5276,69±9,84	16,52±3,06
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	9,35±0,12	0,0498±0,0097	4782,29±11,37	8,46±6,95
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	16,83±0,13	0,0250±0,0105	5108,42±9,98	11,97±8,86
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	22,94±0,24	0,0127±0,0093	5872,56±8,72	18,32±2,99
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	43,88±0,20	0,0066±0,0066	5065,72±9,56	16,75±3,29

Efectos beneficiosos:

- 5 En comparación con la técnica anterior, los efectos beneficiosos de la presente invención son:
- (1) En el caso de las moléculas polipeptídicas de las proteínas, cada cambio de aminoácido constituye una nueva molécula, lo cual es una característica de las macromoléculas biológicas. Por lo tanto, para las biomacromoléculas, incluidas las moléculas peptídicas, ninguna de las tecnologías es universal. Es necesario explorar y probar para averiguar si es adecuado para esta nueva molécula; el polipéptido de la presente invención es una molécula totalmente nueva diseñada por el inventor, y es la primera modificación por polietilenglicol, que requiere un gran número de experimentos para obtener el efecto deseado, y no se puede realizar por especulación. El producto modificado por polietilenglicol (PEG) de la presente invención también pertenece a una molécula novedosa, y tiene efectos diferentes sobre la actividad de la molécula antes de la modificación;
- (2) En el caso de los polipéptidos, debido a su menor peso molecular relativo, la modificación con PEG macromolecular tiende a cubrir su sitio activo, lo que da lugar a una pérdida reducida o completa de su actividad; además, cuando el polipéptido se modifica con PEG, es imprevisible que se produzca el problema de la baja tasa de modificación o la formación de subproductos. Una molécula de fármaco ideal o adecuada, con actividad intacta y semivida prolongada, sólo puede adquirirse mediante la selección de diferentes moléculas de PEG, y la optimización y el cribado de diferentes condiciones de modificación. La presente invención utiliza PEG con pesos moleculares de 5.000, 10.000, 20.000 y 40.000, respectivamente, para modificar el polipéptido, y se optimizan gradualmente diversas condiciones que afectan a la modificación del mismo, entre ellas: la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, la relación molar entre el mPEG y el HM-1, el tipo de tampón, el pH del tampón, la concentración del tampón, etc., y se seleccionan las condiciones de reacción de modificación con una alta tasa de modificación y pocos subproductos.
- (3) Los tipos de PEG utilizados para modificar el polipéptido HM-1 en la presente invención son el mPEG-SC y el mPEG₂-NHS utilizados para la acilación del grupo amino modificado, y el mPEG-ALD y el mPEG-bALD utilizados para la alquilación del grupo amino modificado. Los estudios han demostrado que la actividad biológica de los polipéptidos se redujo significativamente por la modificación de PEG en general, y la semivida no fue

necesariamente prolongada. Diferentes tipos y diferentes pesos moleculares de PEG tuvieron diferentes efectos sobre la semivida y la actividad biológica del HM-1. No es previsible obtener el resultado de la presente invención, en la que el polipéptido HM-1 fue tratado con PEG y después de la modificación, el producto modificado tiene una semivida muy prolongada y el polipéptido HM-1 modificado conserva su actividad biológica original, como lo demuestran las extensas pruebas farmacodinámicas *in vitro* e *in vivo*.

(4) La presente invención divulga las moléculas novedosas mPEG-HM-1, que es el polipéptido HM-1 modificado con PEG. Se realizaron amplios estudios de actividad *in vitro* e *in vivo* de los cuatro tipos mencionados de inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol mPEG-HM-1. En el tratamiento de diversas enfermedades, se comprobó que diversos productos modificados mantenían, a veces incluso superaban, la actividad del HM-1, ampliando su valor social y económico.

Descripción detallada

La invención se describe adicionalmente a continuación en relación con realizaciones específicas.

Ejemplo 1: Preparación y prueba del polipéptido inhibidor de la angiogénesis HM-1

El polipéptido HM-1 se sintetizó por síntesis en fase sólida, se aisló y purificó por HPLC preparativa, y su pureza se determinó por RP-HPLC analítica.

El procedimiento de síntesis en fase sólida del polipéptido HM-1 se basa en la resina Fmoc-wang o en la resina Fmoc-CTC como material de partida, posteriormente se añadieron secuencialmente aminoácidos protegidos para formar el dipéptido, el tripeptido,... hasta llegar al péptido de trece aminoácidos. Una vez completada la elongación del péptido, éste se lavó completamente, se escindió y se sometió a un post-procesamiento para obtener un producto crudo inhibidor de la angiogénesis. El producto crudo del inhibidor de la angiogénesis se disolvió, se purificó por fase líquida preparatoria de alto rendimiento dos veces, se concentró por liofilización para obtener un producto puro, y finalmente se purificó por una tercera purificación hasta obtener un producto polipeptídico refinado. Este procedimiento no sólo garantiza la eficacia de la síntesis, sino que también mejora la pureza del producto.

1. Los pasos para la adición secuencial de aminoácidos son los siguientes:

25 Se pesan la cantidad adecuada de resina Fmoc-wang o de resina Fmoc-CTC, verterla en la columna de reacción con núcleo de arena de vidrio y añadir CH_2Cl_2 para que la resina se expanda completamente.

30 a. Desprotección: añadir una cantidad adecuada de solución de desprotección de hexahidropiridina/DMF, dejar reaccionar durante un periodo de tiempo, drenar la solución de desprotección, lavar una vez con DMF, y añadir una cantidad adecuada de la solución de desprotección por segunda vez para que reaccione, eliminar el grupo protector Fmoc;

b. Lavado: drenar la solución de desprotección, lavar la resina varias veces con DMF y lavar a fondo los subproductos;

35 c. conexión: el aminoácido protegido y el reactivo activador utilizado para la adición del aminoácido se disolvieron en DMF y en un agente condensador, se mezclaron bien, la temperatura se controló a unos 34 °C, y se reaccionó completamente en el recipiente de reacción;

d. Lavado: La solución de reacción se drenó, la resina se lavó a fondo con DMF y se lavó el subproducto.

2. Los pasos para escindir o cortar el péptido son los siguientes:

40 La resina seca se colocó en un matraz de fondo redondo, se añadió el lisado para escindir completamente el péptido intermedio de 13 aminoácidos sintetizado, y se separó el polipéptido escindido de la resina mediante un embudo con núcleo de arena. La composición volumétrica del lisado fue: ácido trifluoroacético: Fenol: agua: Sulfuro de bencilo: EDT=90:3:3:2:2.

3. Los pasos para el post-procesamiento son los siguientes:

El polipéptido se precipitó primero añadiendo éter anhidro a la solución de escisión, luego se centrifugó, se vertió el sobrenadante, se lavó el polipéptido con éter dietílico anhidro y se secó para obtener un polipéptido crudo.

45 4. Los pasos para la purificación son los siguientes: a. Disolución: pesar con precisión el producto crudo HM-1, añadir agua purificada adecuada para preparar una solución de 5-20g/L, agitar con ultrasonidos hasta obtener una solución clara no granulada; b. Filtración: La solución cruda de HM-1 se filtró a través de un filtro mixto de arena de 0,45 µm; c. Preparación: primera purificación, segunda purificación y tercera purificación por HPLC semipreparativa para obtener un producto peptídico purificado, fase móvil: la fase A era acetonitrilo, la fase B era TFA al 0,1 % en agua.

① Depuración de una sola vez: La columna se preparó con un 10 % de acetonitrilo y un 90 % de agua (más un 0,1 % de TFA) a un caudal de 60 ml/min, se enjuagó durante 10 minutos y se cargó con una bomba de infusión. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 8.

- 5 La primera purificación: La columna se preparó con un 10 % de acetonitrilo y un 90 % de agua (más un 0,1 % de TFA) a un caudal de 60 ml/min, se enjuagó durante 10 minutos y se cargó con una bomba de infusión. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 Gradiente de elución de la primera purificación

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda (nm)
0	60	10	90	220
40	60	20	80	220

- 10 Recoger la solución que tenga un valor de absorción superior a 200 mV a la longitud de onda ultravioleta de 220 nm, combinar alícuotas con una pureza superior al 95 % para utilizarla como pico superior, que se someterá a la segunda purificación.

- 15 ② Segunda purificación: el pico superior se evaporó por rotación para eliminar el disolvente orgánico, equilibrar una columna preparativa con una solución de 5 % de acetonitrilo y 95 % de agua (más 0,1 % de TFA) a un caudal de 60 ml/minutos, lavar durante 10 minutos, utilizar la bomba de infusión para cargar. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9 Gradiente de elución de la segunda purificación

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda (nm)
0	60	5	95	220
40	60	15	85	220

- 20 Recoger la solución que tenga un valor de absorción superior a 200 mV a una longitud de onda ultravioleta de 220 nm, combinar las alícuotas con una pureza superior al 98,5 % como solución de producto calificado. d. Concentración, filtración, liofilización: La solución de producto calificado se concentró bajo presión reducida a 37 °C utilizando un evaporador rotatorio para eliminar el disolvente residual y parte del agua. Por último, la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, el filtrado se colocó en una bandeja de liofilizado y se liofilizó mediante un liofilizador para obtener un producto puro.

Ejemplo 2: Paso de la modificación del polietilenglicol a HM-1

- 25 1), modificación mPEG-SC de los pasos HM-1

1. Reacción de mPEG-SC_{5k} con HM-1

Se pesan 0,25 g de mPEG-SC_{5k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1), colocar en 40 ml-100 ml de solución tampón PBS con pH 8,0-8,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar.

2. Reacción de mPEG-SC_{10k} con HM-1

- 30 Se pesan 0,5 g de mPEG-SC_{10k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1), colocar en 40 ml-100 ml de solución tampón PBS de pH 8,0-8,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar.

3. Reacción de mPEG-SC_{20k} con HM-1

Se pesan 1 g de mPEG-SC_{20k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1), colocar en 40 ml-100 ml de solución tampón PBS de pH 8,0-8,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar.

- 35 4. Reacción de mPEG-SC_{40k} con HM-1

Se pesan 2 g de mPEG-SC_{40k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1), se colocan en 40 ml-100 ml de solución tampón PBS con pH 8,0-8,5, durante la noche a 4 °C, y se dejan reaccionar. El mPEG-SC que tiene un peso molecular que

oscila entre 500 y 40.000 puede someterse a la reacción de ligadura para sintetizar un polipéptido modificado según la presente realización.

2), modificación mPEG₂-NHS de los pasos de HM-1

1. Reacción de mPEG₂-NHS_{5k} con HM-1

- 5 Se pesan 0,25 g de mPEG₂-NHS_{5k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) en 40 ml-100 ml de una solución tampón de ácido bórico de pH 8,5-9,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar.

2. Reacción de mPEG₂-NHS_{10k} con HM-1

Se pesan 0,5 g de mPEG₂-NHS_{10k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y colocarlos en 40 ml-100 ml de solución tampón de ácido bórico con pH 8,5-9,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar.

10 **3. Reacción de mPEG₂-NHS_{20k} con HM-1**

Se pesan 1 g de mPEG₂-NHS_{20k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y colocarlos en 40 ml-100 ml de solución tampón de ácido bórico con pH 8,5-9,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar.

4. Reacción de mPEG₂-NHS_{40k} con HM-1

- 15 Se pesan 2 g de mPEG₂-NHS_{40k} y 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y colocarlos en 40 ml-100 ml de solución tampón de ácido bórico con pH 8,5-9,5, durante la noche a 4 °C, dejar reaccionar. El mPEG₂-NHS que tiene un peso molecular que oscila entre 500 y 40.000 puede someterse a una reacción de ligadura para sintetizar un polipéptido modificado según la presente realización.

3), modificación mPEG-ALD de los pasos de HM-1

1. Reacción de mPEG-ALD_{5k} con HM-1

- 20 Se pesan 0,25 g de mPEG-ALD_{5k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado a pH 5,0-6,0. La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche.

2. Reacción de mPEG-ALD_{10k} con HM-1

- 25 Se pesan 0,5 g de mPEG-ALD_{10k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de NaCNBH₃ en 40 ml-100 ml de solución tampón PBS a pH 5,0-6,0 a 4 °C. Dejar toda la noche y permitir que reaccione adecuadamente.

3. Reacción de mPEG-ALD_{20k} con HM-1

Se pesan 1 g de mPEG-ALD_{20k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado con pH 5,0-6,0. La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche.

30 **4. Reacción de mPEG-ALD_{40k} con HM-1**

Se pesan 2 g de mPEG-ALD_{40k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado con pH 5,0-6,0. La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche. El mPEG-ALD que tiene un peso molecular en el intervalo de 500 a 40.000 puede ser sometido a una reacción de ligación para sintetizar un polipéptido modificado según la presente realización.

35 **4), modificación mPEG-bALD de los pasos de HM-1**

1. Reacción de mPEG-bALD_{5k} con HM-1

Se pesan 0,25 g de mPEG-bALD_{5k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado con pH 5,0-6,0. La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche.

40 **2. Reacción de mPEG-bALD_{10k} con HM-1**

Se pesan 0,5 g de mPEG-bALD_{10k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado con pH 5,0-6,0. La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche.

3. Reacción de mPEG-bALD_{20k} con HM-1

Se pesan 1 g de mPEG-bALD_{20k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:10 y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado con pH 5,0-6,0 La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche.

4. Reacción de mPEG-bALD_{40k} con HM-1

- 5 Se pesan 2 g de mPEG-bALD_{40k}, 40 mg de HM-1 (relación molar 1,5:1) y 126,2 mg de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) en 40 ml-100 ml de PBS tamponado con pH 5,0-6,0. La solución se dejó reaccionar suficientemente a 4 °C durante la noche. El mPEG-bALD que tiene un peso molecular que oscila entre 500 y 40.000 puede someterse a una reacción de ligadura para sintetizar un polipéptido modificado según la presente realización.

Ejemplo 3: Pasos de separación y purificación del HM-1 modificado con polietilenglicol

10 1), separación o aislamiento

La muestra después de la reacción se purificó mediante cromatografía líquida semipreparativa de alto rendimiento (HPLC, Beijing Chuangxintongheng). Las condiciones de purificación fueron las siguientes:

Columna semipreparativa: YMC, 250 mm × 20 mm (embalaje de 5 µm);

Fase móvil: la fase A es acetonitrilo y la fase B es agua;

15 Cantidad de carga: 5 ml;

Caudal: 15 ml/min;

Longitud de onda de detección: 220 nm;

Gradiante de elución: los gradiantes de elución de mPEG-SC_{5k}-HM-1, mPEG₂-NHS_{5k}-HM-1, mPEG-ALD_{5k}-HM-1 y mPEG-bALD_{5k}-HM-1 se muestran en el gradiante de elución 1 (Tabla 10); los gradiantes de elución de mPEG-SC_{10k}-HM-1, mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1, mPEG-ALD_{10k}-HM-1 y mPEG-bALD_{10k}-HM-1 se muestran en el gradiante de elución 2 (Tabla 11); Los gradiantes de elución de mPEG-SC_{20k}-HM-1, mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1, mPEG-ALD_{20k}-HM-1 y mPEG-bALD_{20k}-HM-1 se muestran en el gradiante de elución 3 (Tabla 12); los gradiantes de elución de mPEG-SC_{40k}-HM-1, mPEG₂-NHS_{40k}-HM-1, mPEG-ALD_{40k}-HM-1 y mPEG-bALD_{40k}-HM-1 se muestran en el gradiante de elución 4 (Tabla 13).

25 Tabla 10 Gradiante de elución 1

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda (nm)
0	15	5	95	220
10	15	10	90	220
30	15	55	45	220

Tabla 11 Gradiante de elución 2

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda (nm)
0	15	5	95	220
10	15	10	90	220
30	15	65	35	220

Tabla 12 Gradiante de elución 3

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda (nm)
0	15	5	95	220
10	15	10	90	220
30	15	75	25	220

Tabla 13 Gradiente de elución 4

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda (nm)
0	15	5	95	220
10	15	10	90	220
30	15	85	15	220

Cuando se eluyó el pico objetivo, se recogió el producto utilizando un tubo de centrífuga.

2), purificación

- 5 El producto recogido por HPLC semipreparativa se precongeló primero durante una noche en un congelador a baja temperatura de 70 °C, y luego se liofilizó en un secador por congelación preenfriado hasta que se observó visualmente todo el polvo blanco (unas 30 horas). Se recolectó el producto liofilizado, se pesó y registró el peso del producto y se almacenó en un refrigerador a -20 °C y se identificó.

1. Análisis de la pureza del producto

- 10 Se analizó la pureza del producto después de la liofilización mediante HPLC analítica, y las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Columna analítica: COSMOSIL, 250 mm × 4,6 mm (embalaje de 5 µm);

Fase móvil: la fase A era agua (más 0,1 % de TFA), la fase B era acetonitrilo (más 0,1 % de TFA);

Cantidad de carga: 20 µl;

Caudal: 1 ml/min;

- 15 Longitud de onda de detección: 220 nm;

Gradiente de elución: ver Tabla 14.

Tabla 14 Gradiente de elución en el análisis de pureza

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	A %	B %	Longitud de onda nm
0	1	80	20	220
40	1	15	85	220

2. Análisis por SDS-PAGE de los productos modificados

- 20 Para las operaciones básicas, consulte Molecular Cloning (Segunda Edición). La concentración del gel concentrado fue del 5 %, la concentración del gel de separación fue del 15 %, la tensión de concentración fue de 80 voltios y la tensión de separación fue de 120 voltios. Tras la electroforesis, la tira de muestras se tiñó primero con Coomassie Brilliant Blue R250. Tras la tinción, se colocó en la solución decolorante hasta que el fondo fuera transparente, y luego se cribó y analizó. A continuación, la parte que contenía PEG se tiñó con Bal₂, y se completó la tinción y se decoloró en agua. El fondo es transparente y se criba para su análisis.

Ejemplo 4: Prueba de inhibición de la proliferación del polipéptido inhibidor de la angiogénesis modificado con polietilenglicol (mPEG-HM-1) en diversas células tumorales

- 30 La actividad del mPEG-HM-1 para inhibir el crecimiento de diversas células tumorales se examinó mediante el ensayo MTT. Las células tumorales se cultivaron hasta una concentración del 90 % o más en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂ y se recogieron por tripsinización. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo y se contaron bajo el microscopio para ajustar la concentración celular a 2 × 10⁴ células/ml, la suspensión celular se inoculó en una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se incubó durante toda la noche a 37 °C en un incubador al 5 % de CO₂. El mPEG-HM-1 se diluyó con la solución de cultivo a cada concentración predeterminada. El docetaxel se diluye hasta la concentración final con el medio de cultivo. Una vez que las células estaban completamente adheridas, se añadió cada dilución a una placa de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Se añadió la dilución de mPEG-HM-1 como grupo de administración de fármacos, y se añadió docetaxel como grupo de control positivo, y se utilizó una solución de cultivo sin ningún fármaco como grupo de control negativo. Incubar durante 48 h a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂. Se añadieron 5 mg/ml de MTT en una placa de 96 pocillos a 20 µl por pocillo, y se continuó la incubación durante 4 horas. Se aspiró el medio, se disolvió en 150 µl de DMSO por pocillo y se mezcló suavemente agitando durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de medición de 570 nm y una longitud de referencia

de 630 nm utilizando un lector de microplacas, y se calculó la tasa de inhibición del crecimiento (inhibición de la proliferación, PI). La fórmula es la siguiente:

$$\text{PI} (\%) = \frac{1 - \text{grupo de administración}}{\text{grupo negativo}} \times 100$$

- 5 La prueba se repitió 3 veces de forma independiente, y los resultados obtenidos por la prueba se expresaron como media±SD, y los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 15 a la Tabla 18.

Tabla 15 Tasa de inhibición del crecimiento de mPEG-SC-HM-1 en diversas células tumorales (%)

Fuente de células tumorales	mPEG-SC _{5k} -HM-1	mPEG-SC _{10k} -HM-1	mPEG-SC _{20k} -HM-1	mPEG-SC _{40k} -HM-1	Docetaxel
Cáncer de cabeza y cuello	40,27±11,36	45,61±11,12	49,26±10,32	43,22±10,25	49,23±10,01
Tumor cerebral	42,18±12,29	50,21±12,19	55,56±12,13	52,89±15,41	59,23±16,21
Cáncer de tiroides	39,23±13,18	46,23±13,05	50,78±13,46	50,13±14,21	56,21±14,28
Cáncer de esófago	44,38±10,72	52,18±10,25	55,51±16,22	52,12±12,35	60,18±17,02
Cáncer de páncreas	51,37±16,23	60,53±17,16	62,63±18,13	60,45±17,25	71,13±20,13
Cáncer de pulmón	45,33±12,67	50,29±13,18	53,87±15,66	51,32±16,29	68,23±18,32
Cáncer de hígado	51,34±11,25	57,18±12,35	61,09±14,09	60,37±14,74	66,70±17,25
Cáncer gástrico	52,12±13,22	56,22±16,19	66,14±20,08	55,13±10,32	77,34±22,18
Cáncer de mama	48,13±12,17	50,16±13,27	52,18±18,28	50,12±18,09	65,31±21,44
Cáncer de riñón	51,07±12,45	60,07±14,24	67,29±18,16	62,23±16,51	72,93±18,31
Cáncer colorrectal	55,35±12,82	61,35±16,88	66,19±20,58	62,45±19,22	74,59±20,33
Cáncer de ovario	60,81±20,27	65,89±23,37	70,94±20,65	68,46±13,19	85,12±19,39
Cáncer cervical	51,11±16,20	57,17±18,40	62,93±20,09	61,52±15,11	80,21±19,54
Cáncer de útero	60,25±16,09	65,29±19,06	76,93±23,14	70,27±21,37	80,25±22,18
Cáncer de próstata	38,37±15,61	45,39±12,63	49,35±10,04	45,93±12,72	45,62±14,03
Cáncer de vejiga	35,72±11,52	42,76±10,06	50,39±11,73	48,69±11,61	46,72±13,65
Melanoma	61,27±18,13	70,62±20,17	72,14±20,69	68,73±21,25	83,49±23,27
Hemangioma	43,68±12,53	52,88±13,66	55,63±18,30	53,36±15,09	56,92±16,76
sarcoma	39,42±11,15	45,49±11,89	48,93±10,53	45,26±11,61	51,31±10,49

- 10 Resultados: En comparación con el control negativo, el mPEG-SC-HM-1 inhibió significativamente la proliferación de diversas células tumorales . Entre ellos, el mPEG-SC_{20k}-HM-1 tuvo el mejor efecto e inhibió la proliferación de algunas células tumorales a un nivel cercano al del fármaco positivo. Estos resultados también proporcionaron una base para desarrollar fármacos antitumorales aún más eficaces.

Tabla 16 Tasa de inhibición del crecimiento de mPEG₂-NHS-HM-1 en diversas células tumorales (%)

Fuente de células tumorales	mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	Docetaxel
Cáncer de cabeza y cuello	37,13±11,32	43,52±11,16	46,18±11,22	40,36±10,53	49,23±10,01
Tumor cerebral	40,35±10,29	47,62±11,11	45,51±10,15	42,56±11,38	59,23±16,21
Cáncer de tiroides	36,23±12,15	40,47±12,03	43,68±13,61	45,19±14,07	56,21±14,28
Cáncer de esófago	41,35±11,32	48,12±12,85	50,79±14,37	48,65±12,64	60,18±17,02
Cáncer de páncreas	46,58±13,12	50,23±14,26	52,13±13,32	51,49±16,28	71,13±20,13
Cáncer de pulmón	42,83±12,58	45,28±13,96	50,82±12,68	49,39±16,55	68,23±18,32
Cáncer de hígado	50,92±11,66	54,19±12,80	55,03±14,19	53,77±13,64	66,70±17,25
Cáncer gástrico	50,31±13,29	55,67±13,53	60,90±20,14	56,39±11,58	77,34±22, 18
Cáncer de mama	45,69±12,10	50,92±13,97	52,68±17,25	49,12±16,19	65,31±21,44
Cáncer de riñón	47,52±11,48	52,09±14,91	55,20±15,43	58,73±14,31	72,93±18,31
Cáncer colorrectal	52,37±12,24	55,78±15,77	58,16±20,36	54,40±18,29	74,59±20,33
Cáncer de ovario	56,88±21,07	60,69±21,24	63,55±19,60	61,59±13,61	85,12±19,39
Cáncer cervical	49,15±14,23	54,82±17,10	60,63±19,39	57,33±14,28	80,21±19,54
Cáncer de útero	55,20±15,63	60,49±18,05	65,99±22,07	62,25±20,39	80,25±22,18
Cáncer de próstata	39,33±12,01	42,39±12,65	47,75±10,14	45,91±11,74	45,62±14,03
Cáncer de vejiga	38,64±12,72	43,78±10,16	49,79±12,73	45,60±10,11	46,72±13,65
Melanoma	59,21±18,93	65,89±20,57	69,11±21,79	66,72±20,85	83,49±23,27
Hemangioma	42,78±12,50	48,81±12,46	55,38±16,23	50,64±15,89	56,92±16,76
sarcoma	38,41±11,10	43,59±12,39	48,91±10,57	46,46±11,54	51,31±10,49

Resultados: En comparación con el control negativo, mPEG₂-NHS-HM-1 inhibió la proliferación de diversas células tumorales . Entre ellos, el mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1 tuvo el mejor efecto, pero para la mayoría de las células tumorales probadas aquí, el efecto inhibitorio del mPEG-SC_{20k}-HM-1 es superior al del mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1, lo que proporciona una referencia para el desarrollo posterior de fármacos antitumorales.

5 Tabla 17 Índice de inhibición del crecimiento de mPEG-ALD-HM-1 en diversas células tumorales (%)

Fuente de células tumorales	mPEG-ALD _{5k} -HM-1	mPEGALD _{10k} -HM-1	mPEG-ALD _{20k} -HM-1	mPEG-ALD _{40k} -HM-1	Docetaxel
Cáncer de cabeza y cuello	40,71±11,33	48,93±12,14	47,61±10,68	42,18±10,01	49,23±10,01
Tumor cerebral	42,15±12,89	58,25±14,02	56,89±15,41	50,69±14,41	59,23±16,21
Cáncer de tiroides	40,23±10,05	55,30±13,10	50,35±15,23	49,03±13,08	56,21±14,28
Cáncer de esófago	44,63±10,86	65,18±15,16	60,18±15,32	58,11±14,67	60,18±17,02
Cáncer de páncreas	52,19±12,64	79,21±19,14	70,65±20,29	65,31±19,81	71,13±20,13
Cáncer de pulmón	45,76±13,20	65,73±16,20	66,38±17,16	55,44±16,13	68,23±18,32
Cáncer de hígado	52,98±11,55	70,55±20,09	65,31±18,18	60,78±10,88	66,70±17,25
Cáncer gástrico	58,77±15,49	80,01±18,26	75,23±20,62	70,66±18,72	77,34±22,18
Cáncer de mama	49,22±11,87	70,19±17,07	65,17±18,20	60,17±19,24	65,31±21,44
Cáncer de riñón	55,43±14,04	75,23±19,11	70,23±20,58	68,46±20,98	72,93±18,31
Cáncer colorrectal	57,30+15,82	80,22±20,03	72,43±19,32	70,92±16,52	74,59±20,33
Cáncer de ovario	65,81±20,42	85,73±22,17	80,68±21,69	74,61±20,09	85,12±19,39
Cáncer cervical	61,12±18,39	83,04±18,74	75,66±20,10	70,62±19,14	80,21±19,54
Cáncer de útero	65,99±17,72	90,79±22,19	89,37±23,47	82,59±21,37	80,25±22,18
Cáncer de próstata	38,47±11,52	51,09±11,78	43,99±12,77	42,91±11,65	45,62±14,03
Cáncer de vejiga	35,93±10,29	52,68±13,12	45,29±11,63	43,22±10,31	46,72±13,65
Melanoma	63,61±21,30	88,39±22,38	80,71±23,46	75,18±21,75	83,49±23,27
Hemangioma	43,89±14,14	60,25±14,33	53,30±16,06	50,67±14,02	56,92±16,76
sarcoma	38,41±12,53	53,01±11,42	50,96±11,68	45,93±10,77	51,31±10,49

10 Resultados: En comparación con el control negativo, el mPEG-ALD-HM-1 inhibió significativamente la proliferación de diversas células tumorales , de las cuales el mPEG-ALD_{10k}-HM-1 tuvo el mejor efecto y fue superior al mPEG-SC-HM-1 y al mPEG₂-NHS-HM-1. El mPEG-ALD_{10k}-HM-1 tiene efectos inhibitorios más potentes sobre la proliferación de algunas células tumorales en comparación con el control positivo, lo que proporciona una buena perspectiva para el desarrollo de un fármaco antitumoral eficaz.

Tabla 18 Tasa de inhibición del crecimiento de mPEG-bALD-HM-1 en diversas células tumorales (%)

Fuente de células tumorales	mPEG-bALD _{5k} -HM-1	mPEG-bALD _{10k} -HM-1	mPEG-bALD _{20k} -HM-1	mPEG-bALD _{40k} -HM-1	Docetaxel
Cáncer de cabeza y cuello	39,92±11,33	49,01±12,14	45,13±12,38	40,09±12,02	49,23±10,01
Tumor cerebral	45,11±12,09	59,37±14,52	54,77±13,43	51,89±11,91	59,23±16,21
Cáncer de tiroides	42,19±10,35	55,74±13,13	49,38±13,20	45,53±12,98	56,21±14,28
Cáncer de esófago	45,03±11,46	64,92±12,17	60,56±14,72	57,19±12,07	60,18±17,02
Cáncer de páncreas	53,14±10,34	75,23±16,41	69,54±18,37	62,85±18,74	71,13±20,13
Cáncer de pulmón	47,56±12,22	66,72±14,42	65,31±15,54	56,47±14,15	68,23±18,32
Cáncer de hígado	55,63±10,27	68,59±20,19	62,49±16,14	58,72±10,80	66,70±17,25
Cáncer gástrico	56,87±14,41	75,01±16,20	70,21±18,32	68,65±16,93	77,34±22,18
Cáncer de mama	50,02±10,47	68,15±15,87	60,97±16,29	62,45±19,04	65,31±21,44
Cáncer de riñón	57,63±12,09	70,19±18,11	66,81±19,48	60,06±18,88	72,93±18,31
Cáncer colorrectal	59,35±12,64	75,62±18,03	70,73±16,92	66,90±16,27	74,59±20,33
Cáncer de ovario	66,76±18,59	80,35±20,53	75,65±20,09	72,66±19,03	85,12±19,39
Cáncer cervical	64,52±16,88	80,08±18,34	78,57±20,11	70,34±19,04	80,21±19,54
Cáncer de útero	65,46±18,52	79,79±20,45	75,97±22,67	70,51±20,22	80,25±22,18
Cáncer de próstata	39,27±12,50	50,02±10,65	46,90±11,54	40,82±11,75	45,62±14,03
Cáncer de vejiga	36,03±10,12	49,61±12,12	45,24±10,69	43,82±10,31	46,72±13,65
Melanoma	65,62±20,35	82,33±20,08	80,75±22,94	73,10±20,55	83,49±23,27
Hemangioma	40,29±12,16	55,28±12,30	50,31±14,00	48,69±12,72	56,92±16,76
sarcoma	41,42±10,03	52,01±12,32	50,91±10,64	47,90±10,70	51,31±10,49

Resultados: en comparación con el control negativo, mPEG-bALD-HM-1 inhibió significativamente la proliferación de diversas células tumorales . Entre ellos, el mPEG-bALD_{10k}-HM-1 tuvo el mejor efecto, y su inhibición fue comparable a la del mPEG-ALD_{10k}-HM-1. Estos resultados también proporcionaron una buena perspectiva para el desarrollo de un fármaco antitumoral para la presente invención.

Ejemplo 5: Inhibición de la migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) por mPEG-HM-1

Se diluyó Matriigel de 10 mg/ml con medio específico para HUVEC, se extendió sobre una membrana de cámara transwell y se secó al aire a temperatura ambiente. Las células HUVEC cultivadas en fase de crecimiento logarítmico se digirieron con tripsina, se recogieron, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio específico para HUVECs. Las células se contaron bajo el microscopio y la concentración celular se ajustó a 1×10^5 /ml. Se prepararon las soluciones de prueba de cada grupo y se diluyeron a 100 µl con un medio específico para HUVECs en blanco. Las células se sembraron en una cámara transwell a razón de 100 µl por pocillo, y se añadió a la cámara cada conjunto de solución de prueba. El cultivo celular se estimuló añadiendo 0,6 ml de medio de cultivo de células endoteliales que contenía 5 % de suero bovino fetal y 1 % de ECGS en una placa de 24 pocillos, y se cultivó al 5 % de CO₂ durante 24 horas a 37 °C. Se desecha el medio de cultivo en el pocillo, se fija con alcohol al 90 % a temperatura ambiente durante 30 minutos, violeta de cristal al 0,1 % durante 10 minutos a temperatura ambiente, se enjuaga con agua, se limpian

suavemente las células no rociadas en la capa superior con un hisopo de algodón, se observan al microscopio y se seleccionan cuatro campos para tomar fotografías . Calcular la inhibición de la migración (IM) según la fórmula:

$$MI \ (\%) = 1 - \frac{N_{prueba}}{N_{control}} \times 100 \ \%$$

5 N_{prueba} fue el número de migración celular en el grupo de prueba, y $N_{control}$ fue el número de migración celular en el grupo de control en blanco.

La prueba se repitió 3 veces de forma independiente. Los resultados obtenidos de la prueba se calcularon como media±SD, y se realizó una prueba estadística T. *P<0,05 es una diferencia significativa, y **P<0,01 es una diferencia muy significativa. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 19 a 22.

Tabla 19 Inhibición del mPEG-SC-HM-1 de la migración de las HUVEC

Grupos	Dosis (μ g/ml)	número de migración celular (Media±SD)	tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	30	617,03±60,97	41,83 %*
	40	517,43±50,39	51,22 %**
	50	469,59±48,95	55,73 %**
	60	601,65±60,73	43,28 %*
	50	612,15±50,34	42,49 %*
mPEG-SC _{10k} -HM-1	60	527,08±48,30	50,31 %**
	70	439,89±48,08	58,53 %**
	80	580,33±58,20	45,29 %*
	70	596,77±50,58	43,74 %*
mPEG-SC _{20k} -HM-1	80	499,29±50,26	52,93 %**
	90	415,07±46,74	60,87 %**
	100	559,75±52,94	47,23 %*
mPEG-SC _{40k} -HM-1	90	632,63±58,69	40,36 %*
	100	501,84±62,84	52,69 %**
	110	464,50±48,47	56,21 %**
Una vastina	120	542,89±49,29	48,82 %*
	10	564,53±60,36	46,78 %*
control	-	1060,74±32,65	0,00 %

10 Resultados: Bajo la acción del mPEG-SC-HM-1, el número de células endoteliales migradas se redujo significativamente. En comparación con el grupo de control en blanco, inhibió la migración de HUVEC inducida por suero bovino fetal al 5 % y ECGS al 1 %. La inhibición de la migración celular por mPEG-SC_{5k}-HM-1 a 40 μ g/ml y 50 μ g/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (**P<0,01), y la tasa de inhibición alcanzó el 51,22 % y 55,73 %; la inhibición de la migración celular por mPEG-SC_{10k}-HM-1 a 60 μ g/ml y 70 μ g/ml fue significativamente

15

diferente de la del control en blanco (**P<0,01). Las tasas de inhibición alcanzaron el 50,31 % y el 58,53 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG-SC_{20k}-HM-1 a 80 µg/ml y 90 µg/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (** P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 52,93 % y el 60,87 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG-SC_{40k}-HM-1 a 100 µg/ml y 110 µg/ml fue extremadamente significativa en comparación con el control en blanco. Diferencias sexuales (**P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 52,69 % y el 56,21 %, respectivamente.

Tabla 20 Inhibición de la migración de HUVEC por mPEG₂-NHS-HM-1

Grupos	Dosis (µg/ml)	número de migración celular (Media±SD)	tasa de inhibición (%)
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	30	611,33±58,92	41,03 %*
	40	516,16±48,34	50,21 %**
	50	475,01±50,90	54,18 %**
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	60	590,29±50,72	43,06 %*
	50	603,97±40,36	41,74 %*
	60	506,83±46,25	51,11 %**
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	70	410,53±48,64	60,40 %**
	80	563,02±56,22	45,69 %*
	70	618,48±47,53	40,34 %*
	80	512,85±40,86	50,53 %**
	90	434,68±42,64	58,07 %**
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	100	562,61±62,34	45,73 %*
	90	640,05±50,70	38,26 %*
	100	516,99±60,04	50,13 %**
	110	464,43±46,48	55,20 %**
	120	584,48±52,28	43,62 %*
Una vastina	10	560,64±62,06	45,92 %*
control	-	1036,68±30,32	0,00 %

Resultados: El número de células endoteliales migradas se redujo significativamente por la acción de mPEG₂-NHS-HM-1. En comparación con el grupo de control en blanco, inhibió la migración de HUVEC inducida por suero bovino fetal al 5 % y ECGS al 1 %. La inhibición de la migración celular por mPEG₂-NHS_{5k}-HM-1 a 40 µg/ml y 50 µg/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (**P<0,01), y la tasa de inhibición alcanzó el 50,21 % y el 54,18 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 a 60 µg/ml y 70 µg/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (**P<0,01). Las tasas de inhibición alcanzaron el 51,11 % y el 60,40 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1 a 80 µg/ml y 90 µg/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (** P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 50,53 % y el 58,07 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG₂-NHS_{40k}-HM-1 a 100 µg/ml y 110 µg/ml fue extremadamente significativa en comparación con el control en blanco. Diferencias sexuales (**P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 50,13 % y el 55,20 %, respectivamente.

Tabla 21 Inhibición del mPEG-ALD-HM-1 de la migración de las HUVEC

Grupos	Dosis (μ g/ml)	número de migración celular (Media \pm SD)	tasa de inhibición (%)
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	30	606,88 \pm 58,90	41,02 %*
	40	494,52 \pm 52,69	51,94 %**
	50	415,39 \pm 44,92	59,63 %**
	60	578,69 \pm 66,03	43,76 %*
	50	604,31 \pm 52,14	41,27 %*
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	60	514,38 \pm 42,38	50,01 %**
	70	417,96 \pm 50,48	59,38 %**
	80	548,54 \pm 56,22	46,69 %*
	70	611,92 \pm 52,08	40,53 %*
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	80	507,07 \pm 40,74	50,72 %**
	90	403,15 \pm 48,80	60,82 %**
	100	564,59 \pm 50,42	45,13 %*
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	90	534,34 \pm 56,62	48,07 %*
	100	510,47 \pm 60,56	50,39 %**
	110	471,88 \pm 46,27	54,14 %**
	120	565,31 \pm 50,34	45,06 %*
Una vastina control	10	532,80 \pm 60,06	48,22 %*
	-	1028,96 \pm 36,42	0,00 %

Resultados: El número de células endoteliales migradas se redujo significativamente por la acción del mPEG-ALD-HM-1. En comparación con el grupo de control en blanco, inhibió la migración de HUVEC inducida por suero bovino fetal al 5 % y ECGS al 1 %. La inhibición de la migración celular por mPEG-ALD_{5k}-HM-1 a 40 μ g/ml y 50 μ g/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (**P<0,01), y la tasa de inhibición alcanzó el 51,94. % y 59,63 %; la inhibición de la migración celular por mPEG-ALD_{10k}-HM-1 a 60 μ g/ml y 70 μ g/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (**P<0,01). Las tasas de inhibición alcanzaron el 50,01 % y el 59,38 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG-ALD_{20k}-HM-1 a 80 μ g/ml y 90 μ g/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (** P<0,01), la tasa de inhibición alcanzó el 50,72 % y 60,82 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG-ALD_{40k}-HM-1 a 100 μ g/ml y 110 μ g/ml fue extremadamente significativa en comparación con el control en blanco (**P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 50,39 % y el 54,14 %, respectivamente.

Tabla 22 Inhibición del mPEG-bALD-HM-1 de la migración de las HUVEC

Grupos	Dosis (μ g/ml)	Número de migración celular (Media \pm SD)	Tasa de inhibición (%)
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	30	654,96 \pm 52,07	40,03 %*
	40	545,96 \pm 45,32	50,01 %**
	50	489,28 \pm 46,98	55,20 %**
	60	577,96 \pm 58,76	47,08 %*
	50	589,97 \pm 56,24	45,98 %*
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	60	483,16 \pm 50,26	55,76 %**
	70	432,71 \pm 50,04	60,38 %**
	80	581,13 \pm 60,76	46,79 %*
	70	614,44 \pm 49,28	43,74 %*
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	80	484,04 \pm 52,74	55,68 %**
	90	504,35 \pm 48,36	53,82 %**
	100	568,57 \pm 56,90	47,94 %*

(continuación)

Grupos	Dosis (μ g/ml)	Número de migración celular (Media \pm SD)	Tasa de inhibición (%)
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	90	652,01 \pm 52,63	40,30 %*
	100	523,03 \pm 60,52	52,11 %**
	110	545,63 \pm 46,84	50,04 %**
	120	596,64 \pm 50,46	45,37 %*
Una vastina	10	572,06 \pm 48,92	47,62 %*
control	-	1092,14 \pm 30,72	0,00 %

5 Resultados: Bajo la acción de mPEG-bALD-HM-1, el número de células endoteliales migradas se redujo significativamente. En comparación con el grupo de control en blanco, inhibió la migración de HUVEC inducida por suero bovino fetal al 5 % y ECGS al 1 %. La inhibición de la migración celular por mPEG-bALD_{5k}-HM-1 a 40 μ g/ml y 10

10 50 μ g/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (**P<0,01), y la tasa de inhibición alcanzó el 50,01 % y 55,20 %; mPEG-bALD_{10k}-HM-1 inhibió la migración celular a 60 μ g/ml y 70 μ g/ml, y hubo una diferencia significativa (**P<0,01) en comparación con el control en blanco. Las tasas de inhibición alcanzaron el 55,76 % y el 60,38 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG-bALD_{20k}-HM-1 a 80 μ g/ml y 90 μ g/ml fue significativamente diferente de la del control en blanco (** P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 55,68 % y el 53,82 %, respectivamente; la inhibición de la migración celular por mPEG-bALD_{40k}-HM-1 a 100 μ g/ml y 110 μ g/ml fue significativamente mayor que la del control en blanco. Las diferencias sexuales (**P<0,01), las tasas de inhibición alcanzaron el 52,11 % y el 50,04 %, respectivamente.

15 Ejemplo 6: Efecto del mPEG-HM-1 en la proliferación de los linfocitos del bazo de ratón

Se extrajo el bazo de los ratones en condiciones asépticas, se lavó 3 veces en medio 1640 vacío, se trituró en un núcleo de jeringa de 5 ml, se filtró a través de un tamiz de 200 mallas y se convirtió en una suspensión celular única, se centrifugó (1000 rpm x 5 min) y se descartó el sobrenadante. Se utilizó Tris-NH₄Cl para romper los glóbulos rojos y se dejaron reposar las células en un baño de agua helada durante 4 minutos, se centrífugaron (1000 rpm x 5 min), 20 se desechó el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con PBS estéril. Por último, las células se suspendieron en medio RPMI 1640 (5 ml) suplementado con suero de ternera al 10 %, se contaron, se ajustaron a una concentración celular de 5×10^6 /ml y se cultivaron en una placa de cultivo de 96 pocillos.

El grupo de prueba consistió en el grupo de control en blanco, el grupo de concanavalina A (ConA), el grupo de dexametasona (Dex) (0,02 mg/ml) y el grupo de mPEG-HM-1. Despues de añadir a cada grupo 100 μ l/pocillo de 25 suspensión de linfocitos de bazo, el grupo de control en blanco se añadió con 100 μ l de medio 1640 vacío, el grupo de ConA se añadió con ConA (concentración final de 5 μ g/ml), el grupo de Dex se añadió con Dex, y el grupo experimental se añadió con diferentes ConA a la concentración final fue de 5 μ g/ml, además de añadir mPEG-HM-1. 30 Las células se cultivaron en una cámara de cultivo celular a 37 °C durante 48 h. Una vez finalizado el cultivo, se añadieron 20 μ l de MTT a cada pocillo, y se continuó el cultivo durante 4 h. Finalmente, se descartaron todas las soluciones de cada pocillo, se añadieron 100 μ l de DMSO a cada pocillo, y se agitó la mezcla y se detectó mediante un lector de microplacas el valor de DO a 570 nm, 5 paralelos por orificio. Los resultados se muestran en las Tablas 23 a 26.

Tabla 23 Efecto del mPEG-SC-HM-1 en la proliferación de linfocitos del bazo de ratón

Grupos	Dosis (μ g/ml)	A570nm/ A630nm	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	5	0,6253 \pm 0,0947	9,32 %
	10	0,5480 \pm 0,1081	20,54 %
	20	0,4954 \pm 0,1219	28,16 %
	10	0,6234 \pm 0,0976	9,60 %

(continuación)

Grupos	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	A570nm/ A630nm	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{10k} - HM-1	20	0,5488 \pm 0,1052	20,42 %
	40	0,4788 \pm 0,1282	30,57 %
mPEG-SC _{20k} -HM-1	20	0,6213 \pm 0,0996	9,91 %
	40	0,5444 \pm 0,1120	21,06 %
mPEG-SC _{40k} - HM-1	80	0,4741 \pm 0,1270	31,25 %
	40	0,6212 \pm 0,0972	9,92 %
ConA	80	0,5493 \pm 0,1056	20,34 %
	160	0,4794 \pm 0,1214	30,48 %
Dex	-	0,6896 \pm 0,0249	-
Negativo	20	0,3809 \pm 0,1036	44,76 %
	-	0,6082 \pm 0,0398	-

Resultados: mPEG-SC-HM-1 con diferente peso molecular inhibió la proliferación de linfocitos de bazo de ratón en cierta medida. La tasa de inhibición de mPEG-SC_{10k}-HM-1 a 40 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó el 30,57 %, la dosis de mPEG-SC_{20k}-HM-1 a 80 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó el 31,25 %, la dosis de mPEG-SC_{40k}-HM-1 a 160 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó el 30,48 %; y la inhibición de cada grupo de fármacos muestra una relación dependiente de la dosis.

Tabla 24 Efecto del mPEG-NHS-HM-1 en la proliferación de linfocitos del bazo de ratón

Grupos	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	A570nm/ A630nm	Tasa de inhibición (%)
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	5	0,6304 \pm 0,0983	8,96 %
	10	0,5624 \pm 0,1098	18,78 %
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	20	0,4873 \pm 0,1126	29,62 %
	10	0,6239 \pm 0,1086	9,90 %
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	20	0,5533 \pm 0,1067	20,09 %
	40	0,4747 \pm 0,1174	31,44 %
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	20	0,6082 \pm 0,0990	12,16 %
	40	0,4879 \pm 0,1156	29,53 %
mPEG ₂ -NHS _{80k} -HM-1	80	0,4375 \pm 0,1095	36,82 %
	40	0,6191 \pm 0,0984	10,59 %
mPEG ₂ -NHS _{160k} -HM-1	80	0,4985 \pm 0,1248	28,01 %
	160	0,4827 \pm 0,1136	30,28 %

(continuación)

Grupos	Dosis (μg/ml)	A570nm/ A630nm	Tasa de inhibición (%)
ConA	-	0,6924±0,0292	-
Dex	20	0,3832±0,1042	44,66 %
Negativo	-	0,6140±0,0362	-

5 Resultados: mPEG₂-NHS-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió la proliferación de linfocitos de bazo de ratón hasta cierto punto. La tasa de inhibición de mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 a 40 μg/ml alcanzó el 31,44 %, mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1 a 80 μg/ml alcanzó el 36,82 %, mPEG₂-NHS_{40k}-HM-1 a 160 μg/ml alcanzó el 30,28 %; y la inhibición de cada grupo de fármacos mostró cierta relación dependiente de la dosis.

Tabla 25 Efecto de mPE-ALD-HM-1 en la proliferación de linfocitos del bazo de ratón

Grupos	Dosis (μg/ml)	A570nm/ A630nm	Tasa de inhibición (%)
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	5	0,6241±0,0917	9,14 %
	10	0,5448±0,1072	20,68 %
	20	0,4779±0,1178	30,42 %
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	10	0,6116±0,1046	10,96 %
	20	0,5352±0,1022	22,08 %
mPEG- ALD _{20k} -HM-1	40	0,4651±0,1086	32,29 %
	80	0,4406±0,1074	35,85 %
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	40	0,4876±0,1259	29,02 %
	80	0,5040±0,1239	26,63 %
ConA	-	0,6869±0,0294	-
Dex	20	0,3715±0,1266	45,92 %
Negativo	-	0,6298±0,0442	-

10 Resultados: mPEG-ALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió la proliferación de linfocitos de bazo de ratón en cierta medida. Cuando la dosis de mPEG-ALD_{5k}-HM-1 fue de 20 μg/ml, la tasa de inhibición alcanzó el 30,42 %, se administró mPEG-ALD_{10k}-HM-1 a una dosis de 40 μg/ml, y la tasa de inhibición fue del 32,29 %. La dosis de mPEG-ALD_{20k}-HM-1 fue de 80 μg/ml, y la tasa de inhibición fue del 35,85 %. La dosis de mPEG-ALD_{40k}-HM-1 fue de 160 μg/ml y la tasa de inhibición alcanzó el 30,56 %; y la inhibición de cada grupo de administración mostró una relación dependiente de la dosis.

Tabla 26 Efecto del mPEG-bALD-HM-1 en la proliferación de linfocitos del bazo de ratón

Grupos	Dosis (μg/ml)	A570nm/ A630nm	Tasa de inhibición (%)
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	5	0,6257±0,1022	9,82 %
	10	0,5645±0,1114	18,64 %
	20	0,4957±0,1286	28,56 %
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	10	0,6179±0,1049	10,94 %
	20	0,5469±0,1122	21,18 %
	40	0,4666±0,1040	32,75 %
mPEG- bALD _{20k} - HM-1	20	0,6104±0,1005	12,02 %
	40	0,4988±0,1173	28,10 %
	80	0,4453±0,1054	35,82 %
mPEG- bALD _{40k} - HM-1	40	0,6191±0,0986	10,77 %
	80	0,5089±0,1230	26,65 %
	160	0,4848±0,1146	30,12 %
ConA	-	0,6938±0,0308	-
Dex	20	0,3905±0,1094	43,72 %
Negativo	-	0,6316±0,0392	-

Resultados: mPEG-bALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió la proliferación de linfocitos de bazo de ratón en cierta medida. La dosis de mPEG-bALD_{10k}-HM-1 fue de 40 μg/ml, y la tasa de inhibición alcanzó el 32,75 %. La tasa de inhibición de mPEG-bALD_{20k}-HM-1 fue del 35,82 % a 80 μg/ml, y la tasa de inhibición de mPEG-bALD_{40k}-HM-1 fue del 30,12 % a 160 μg/ml. y la inhibición de cada grupo de administración mostró una relación dependiente de la dosis.

Ejemplo 7: Efecto del mPEG-HM-1 en la producción de IL-1β por macrófagos peritoneales de ratón

(1) Producción de IL-1β: los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1 ml de caldo (que contenía 6 %) de almidón, y tres días después, se tomaron asépticamente los macrófagos peritoneales de ratón, se lavaron dos veces con medio 1640, y se ajustó la concentración celular a 2×10^6 células/ml, se inyectaron en una placa de cultivo de 24 pocillos, 1 ml por pocillo, se incubaron durante 3 horas en una incubadora de cultivo celular, se agitaron una vez cada 30 minutos, y se permitió que las células se adhirieran completamente. A continuación, se lavó dos veces con la solución de cultivo para eliminar las células no adheridas. Al grupo blanco se le añadió PBS, al grupo positivo se le añadió el fármaco positivo dexametasona (Dex), al grupo modelo no se le administró, al grupo experimental se le añadieron tres concentraciones bajas, medias y altas de mPEG-HM-1, y el cultivo se continuó durante 48 horas después de la administración, 1000 r/min. Centrifugar durante 15 min. El sobrenadante se tomó como muestra para analizar la actividad de la IL-1β.

(2) Determinación del contenido de IL-1β: utilizando el kit de ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas IL-1β de ratón de R&D, de acuerdo con las instrucciones del kit como sigue: respectivamente, las muestras analizadas y diferentes concentraciones de productos estándar, se selló con cinta de sellado el pocillo de reacción y se incubó a 37 °C durante 90 min; se lavó la placa cuatro veces; se añadió la solución de trabajo de anticuerpos biotinilados (100 μl/pocillo), y se selló el pocillo de reacción con papel de sellado, se incubó a 37 °C durante 60 min; se lavó la placa cuatro veces; se añadió la solución de trabajo de conjugado enzimático (100 μl/pocillo), se selló el pocillo de reacción con papel de sellado, se incubó a 37 °C durante 30 min; se lavó la placa cuatro veces; se añadió el reactivo de color (100 μl/pocillo), se incubó a 37 °C 10-20 min, se añadió la solución de parada (100 μl/pocillo), se mezcló y se midió el valor OD450. Los resultados se muestran en las Tablas 27 a 30.

Tabla 27 Efecto del mPEG-SC-HM-1 sobre la producción de IL-1 β de los macrófagos peritoneales de ratón

Grupos	dosis (μ g/ml)	IL-1 β (pg/ml)	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	5	762,83±15,46**	18,59 %
	10	678,12±12,09**	27,63 %
	20	561,18±13,21**	40,11 %
mPEG-SC _{10k} -HM-1	10	758,05±15,18**	19,10 %
	20	666,50±11,93**	28,87 %
	40	553,03±14,12**	40,98 %
mPEG-SC _{20k} -HM-1	20	761,42±16,96**	18,74 %
	40	653,20±18,59**	30,29 %
	80	512,27±10,50**	45,33 %
mPEG-SC _{40k} -HM-1	40	774,07±15,32**	17,39 %
	80	670,72±16,71**	28,42 %
	160	553,22±10,82**	40,96 %
Dex	20	361,03±18,27**	61,47 %
Grupo de modelos	-	937,02±4,16	-
Control negativo	-	9,75±0,62	-

Resultados: mPEG-SC-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió significativamente la proliferación de linfocitos de bazo de ratón, y hubo una diferencia significativa en comparación con el grupo negativo. Cuando la dosis de mPEG-SC_{20k}-HM-1 se administró a 80 μ g/ml, la tasa de inhibición alcanzó el 45,33 % y mostró una relación dependiente de la dosis.

5

Tabla 28 Efecto del mPEG₂-NHS-HM-1 sobre la producción de IL-1 β de los macrófagos peritoneales de ratón

Grupos	dosis (μ g/ml)	IL-1 β (pg/ml)	Tasa de inhibición (%)
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	5	763,97±15,46**	17,51 %
	10	681,45±12,09**	26,42 %
	20	563,37±13,21**	39,17 %
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	10	758,32±15,18**	18,12 %
	20	675,25±11,93**	27,09 %
	40	546,79±14,12**	40,96 %
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	20	759,06±16,96**	18,04 %
	40	655,24±18,59**	29,25 %
	80	552,35±10,50**	40,36 %

(continuación)

Grupos	dosis (μg/ml)	IL-1β (pg/ml)	Tasa de inhibición (%)
	40	756,84±15,32**	18,28 %
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	80	673,30±16,71**	27,30 %
	160	568,00±10,82**	38,67 %
Dex	20	368,23±18,27**	60,24 %
Grupo de modelos	-	926,14±3,98	-
Control negativo	-	9,48±0,59	-

5 Resultados: mPEG₂-NHS-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió significativamente la proliferación de linfocitos de bazo de ratón, y hubo una diferencia significativa en comparación con el grupo negativo. cuando la dosis de mPEG-SC_{20k}-HM-1 se administró a 80 μg/ml, la tasa de inhibición alcanzó el 45,33 % y mostró una relación dependiente de la dosis.

Tabla 29 Efecto del mPEG-ALD-HM-1 sobre la producción de IL-1β de los macrófagos peritoneales de ratón

Grupos	dosis (μg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	Tasa de inhibición (%)
	5	734,73±16,59**	19,87 %
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	10	654,50±18,43**	28,62 %
	20	516,13±10,95**	43,71 %
	10	724,09±16,59**	21,03 %
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	20	620,94±18,43**	32,28 %
	40	455,16±10,95**	50,36 %
	20	729,13±13,12**	20,48 %
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	40	628,18±15,34**	31,49 %
	80	438,93±12,56**	52,13 %
	40	742,06±16,59**	19,07 %
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	80	664,40±18,43**	27,54 %
	160	495,96±10,95**	45,91 %
Dex	20	361,45±19,17**	60,58 %
Grupo de modelos	-	916,92±3,09	-
Negativo	-	9,06±0,65	-

Tabla 30 Efecto del mPEG-bALD-HM-1 sobre la producción de IL-1 β de los macrófagos peritoneales de ratón

Grupos	dosis (μ g/ml)	IL-1 β (pg/ml)	Tasa de inhibición (%)
mPEG-bALD _{5k} - HM-1	5	729,25±18,34**	20,92 %
	10	659,63±16,52**	28,47 %
	20	533,11±10,87**	42,19 %
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	10	720,77±16,65**	21,84 %
	20	633,90±14,73**	31,26 %
	40	460,53±10,42**	50,06 %
mPEG- bALD _{20k} - HM-1	20	738,66±12,81**	19,90 %
	40	640,26±14,28**	30,57 %
	80	487,37±12,06**	47,15 %
mPEG- bALD _{40k} - HM-1	40	740,78±16,79**	19,67 %
	80	648,10±14,55**	29,72 %
	160	518,91±12,90**	43,73 %
Dex	20	359,92±19,17**	60,97 %
Grupo de modelos	-	922,17±4,15	-
Negativo	-	9,84±0,59	-

Los resultados mostraron que el mPEG-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió la proliferación de linfocitos de bazo de ratón, y el mPEG-ALD_{10k}-HM-1 y el mPEG-bALD_{10k}-HM-1, a la dosis de 40 μ g/ml, alcanzaron la tasa de inhibición que es superior al 50 %.

5 Ejemplo 8: Efecto del mPEG-HM-1 en la inflamación del oído inducida por el xileno en ratones

Se utilizaron ratones Kunming. El grupo de solución salina se utilizó como grupo de control en blanco, el grupo de aspirina (200 mg/kg) como grupo de control positivo y el grupo de administración de mPEG-HM-1 como grupo experimental. Se administró a los ratones una vez al día durante 5 días consecutivos. El grupo de control en blanco recibió un volumen igual de solución salina fisiológica. Una hora después de la última administración, se aplicaron 0,05 ml de xileno a ambos lados de la oreja derecha de los ratones para provocar la inflamación, y la oreja izquierda no se recubrió como las normales. Después de 2 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación, y las orejas fueron cortadas a lo largo del pabellón auricular. Se tomaron trozos de oreja con un perforador, se pesaron y se calcularon el grado de hinchamiento y la tasa de hinchamiento. Grado de hinchamiento = peso del auricular derecho - peso del auricular izquierdo, índice de hinchamiento = (grado de hinchamiento/peso del auricular izquierdo) × 100 %. Se realizó una prueba estadística t sobre los resultados de la prueba, *P<0,05 era una diferencia significativa, y **P<0,01 era una diferencia muy significativa. Véanse los resultados en las Tablas 31 a 34.

Tabla 31 Efecto del mPEG-SC-HM-1 en el hinchamiento de las orejas de los ratones causada por el p-xileno

Grupos	dosificación (mg/kg)	hinchamiento (mg)	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	5	5,55±0,21	9,57 %
	10	4,90±0,35*	20,13 %
	20	4,17±0,19**	32,10 %

(continuación)

Grupos	dosificación (mg/kg)	hinchamiento (mg)	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{10k} -HM-1	10	5,49±0,23	10,55 %
	20	4,83±0,32*	21,37 %
	40	3,98±0,21**	35,20 %
mPEG-SC _{20k} -HM-1	20	5,38±0,17	12,36 %
	40	4,69±0,79*	23,67 %
	80	3,77±0,33**	38,58 %
mPEG-SC _{40k} -HM-1	40	5,51±0,13	10,27 %
	80	4,76±0,72*	22,42 %
	160	3,87±0,27**	37,01 %
Aspirina	200	3,07±0,31**	50,02 %
control	-	6,14±0,29	

5 Resultados: mPEG-SC-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió el hinchamiento de la oreja de ratón inducida por el xileno. La tasa de inhibición de mPEG-SC_{5k}-HM-1 fue del 32,10 % cuando la dosis fue de 20 mg/kg. Cuando se administró mPEG-SC_{10k}-HM-1 a una dosis de 40 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 35,20 %, y cuando la dosis de mPEG-SC_{20k}-HM-1 fue de 80 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 38,58 %. Cuando se administró mPEG-SC_{40k}-HM-1 a una dosis de 160 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 37,01 %, y mostró una relación dependiente de la dosis.

Tabla 32 mPEG₂-NHS-HM-1 Efecto sobre el hinchamiento de las orejas de los ratones causada por el p-xileno

Grupos	dosisificación (mg/kg)	hinchamiento (mg)	Tasa de inhibición (%)
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	5	5,56±0,19	10,02 %
	10	4,94±0,28*	20,05 %
	20	4,31±0,20**	30,23 %
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	10	5,39±0,14	12,76 %
	20	4,72±0,72*	23,57 %
	40	4,13±0,35**	33,19 %
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	20	5,52±0,16	10,65 %
	40	4,80±0,29*	22,37 %
	80	3,96±0,22**	35,92 %
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	40	5,47±0,12	11,52 %
	80	4,83±0,67*	21,88 %
	160	4,19±0,34**	32,26 %

(continuación)

Grupos	dosificación (mg/kg)	hinchamiento (mg)	Tasa de inhibición (%)
Aspirina	200	3,02±0,41**	51,11 %
control	-	6,18±0,51	

- 5 Resultados: mPEG₂-NHS-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió el hinchamiento de la oreja de ratón inducida por el xileno. La tasa de inhibición de mPEG₂-NHS_{5k}-HM-1 fue del 30,23 % cuando la dosificación fue de 20 mg/kg. La tasa de inhibición de mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 fue del 33,19 % cuando la dosis fue de 40 mg/kg, y la tasa de inhibición fue del 35,92 % cuando se administró mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1 a 80 mg/kg. A una dosis de 160 mg/kg la tasa de inhibición de mPEG₂-NHS_{40k}-HM-1 alcanzó el 32,26 % y mostró una relación dependiente de la dosis.

Tabla 33 Efecto del mPEG-ALD-HM-1 en el hinchamiento de las orejas de los ratones causada por el p-xileno

Grupos	dosis (mg/kg)	hinchamiento (mg)	Tasa de inhibición (%)
	5	5,50±0,21	10,17 %
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	10	4,80±0,35*	21,52 %
	20	4,16±0,14**	32,10 %
	10	5,36±0,12	12,36 %
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	20	4,67±0,79*	23,67 %
	40	3,58±0,33**	41,58 %
	20	4,89±0,20	20,10 %
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	40	4,52±0,32*	26,19 %
	80	3,70±0,20**	39,47 %
	40	5,41±0,16	11,53 %
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	80	4,77±0,62*	22,02 %
	160	4,16±0,25**	32,09 %
Aspirina	200	3,01±0,53**	50,87 %
control	-	6,12±0,43	

- 10 Resultados: mPEG-ALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió el hinchamiento de la oreja de ratón inducida por el xileno. La tasa de inhibición de mPEG-ALD_{5k}-HM-1 alcanzó el 32,10 % a una dosificación de 20 mg/kg; la tasa de inhibición alcanzó el 41,58 % cuando la dosis de mPEG-ALD_{10k}-HM-1 fue de 40 mg/kg, y la tasa de inhibición alcanzó el 39,47 % cuando la dosis de mPEG-ALD_{20k}-HM-1 fue de 80 mg/kg. La tasa de inhibición de mPEG-ALD_{40k}-HM-1 administrada a una dosis de 160 mg/kg alcanzó el 32,09 % y mostró una relación dependiente de la dosis.

Tabla 34 Efecto del mPEG-bALD-HM-1 en el hinchamiento de las orejas de los ratones causada por el p-xileno

Grupos	dosisificación (mg/kg)	hinchamiento (mg)	Tasa de inhibición (%)
	5	5,44±0,19	10,36 %
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	10	4,83±0,30*	20,47 %
	20	4,18±0,25**	31,08 %
	10	5,37±0,14	11,54 %
mPEG-bALDiok-HM-1	20	4,64±0,72*	23,63 %
	40	3,59±0,35**	40,88 %
	20	5,03±0,18	17,13 %
mPEG- bALD _{20k} - HM-1	40	4,64±0,34*	23,62 %
	80	3,78±0,27**	37,76 %
	40	5,25±0,12	13,45 %
mPEG- bALD _{40k} - HM-1	80	4,68±0,72*	22,94 %
	160	4,06±0,26**	33,09 %
	200	2,98±0,53**	50,93 %
Aspirina	-	6,07±0,32	
controlar	-	6,07±0,32	

Resultados: el mPEG-bALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares inhibió significativamente el hinchamiento de la oreja del ratón causada por el xileno. Cuando la dosis de mPEG-bALD_{5k}-HM-1 fue de 20 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 31,08 %, cuando la dosis de mPEG-bALD_{10k}-HM-1 fue de 40 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 40,88 %, cuando la dosis de mPEG-ALD_{20k}-HM-1 fue de 80 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 37,76 %, y cuando la dosis de mPEG-bALD_{40k}-HM-1 fue de 160 mg/kg, la tasa de inhibición alcanzó el 33,09 %, y mostró una relación dependiente de la dosis.

Ejemplo 9: Efecto inmunoprotector del mPEG-HM-1 en el modelo animal de artritis de ratón inducida por colágeno

Se construyó un modelo animal de artritis de ratón con colágeno para estudiar el efecto terapéutico del mPEG-HM-1 en la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones. Se utilizaron ratones como animales de prueba, ratones DBA/1 de grado SPF, machos, de 7-8 semanas de edad, con un peso de 18-22 g, se dividieron aleatoriamente en grupo de control normal, grupo de control de modelo, grupo de mPEG-HM-1, y grupo de control positivo de fármacos (metotrexato 1 mg/kg). El día 0, excepto para el grupo normal, se estableció el modelo de CIA de ratón mediante el procedimiento de disolver el colágeno de tipo III del cartílago de pollo (cIII) en una solución de 4 mg/ml con ácido acético de 0,1 mol/l y dejarlo toda la noche a 4 °C en un refrigerador. El día del experimento, el colágeno de tipo III se emulsionó completamente con un adyuvante completo de Freund (CFA) que contenía 4 mg/ml de la cepa H37Rv de Mycobacterium tuberculosis. Tras anestesiar a los ratones DBA/1, se inyectaron 50 µL de emulsionante en la piel de la cola para sensibilizar al ratón. Después de 21 días, se emulsionaron completamente 4 mg/ml de colágeno de tipo III (cIII) e igual volumen de adyuvante incompleto de Freund (IFA), y los ratones se volvieron a inmunizar con la misma dosis de emulsionante en la cola. Inyección subcutánea a partir del 30º día de modelado: grupo mPEG-HM-1: una vez cada tres días; grupo de control positivo de fármacos (metotrexato 1 mg/kg): una vez cada 5 días, 3 veces seguidas; grupo de control normal y grupo de control modelo (solución salina): 10 días consecutivos. Se midieron el peso corporal y la puntuación de las articulaciones cada 3 días desde el día 21 hasta el 70 después del modelado, y se midieron los diámetros del tobillo de la pata trasera izquierda y derecha para observar el efecto del fármaco en la artritis inducida por el colágeno en los ratones. A los 70 días, los ratones fueron sometidos a eutanasia por dislocación.

Los índices de evaluación de la artritis son los siguientes: (1) Puntuación conjunta: extremidades: se puntúa en el nivel 0-4 con cinco grados: 0 = sin eritema o enrojecimiento; 1 = eritema o hinchamiento leve, uno de los cuales presenta

eritema o hinchamiento de la articulación anterior/posterior; 2 = más de un dedo con eritema o hinchamiento; 3 = hinchamiento de las patas por debajo del tobillo o la muñeca; 4 = hinchamiento de todas las patas, incluido el tobillo. Las cuatro patas de los ratones se calificaron por separado, con una puntuación máxima de 16 puntos. La puntuación conjunta se realizó cada 3 días antes del modelado, y del día 21 al día 70 después del modelado, y se registraron los resultados. (2) Medición del diámetro de los tobillos: los diámetros del interior al exterior de los tobillos izquierdo y derecho de los ratones, y el grosor de las patas, se midieron con calibradores de vernier antes del modelado y cada tres días entre los días 21 y 70 después del modelado, y se registraron los resultados.

La prueba se repitió 3 veces de forma independiente. Los resultados obtenidos por la prueba se expresaron como media \pm SD, y se realizó una prueba estadística T. *P<0,05 se consideró una diferencia significativa, y **P<0,01 fue una diferencia muy significativa.

Tabla 35 Efecto inmunoprotector de mPEG-SC-HM-1 en el modelo animal de artritis de ratón inducida por colágeno

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,18 \pm 0,07	0,16 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00
Grupo de control del modelo	10	-	2,29 \pm 0,39	2,00 \pm 0,47	15,65 \pm 1,90
Grupo de control positivo	10	1	0,70 \pm 0,12**	0,73 \pm 0,12**	8,32 \pm 1,35**
mPEG-SC _{5k} -HM-1	10	10	0,79 \pm 0,11**	0,81 \pm 0,12**	9,10 \pm 1,27**
mPEG-SC _{10k} -HM-1	10	20	0,77 \pm 0,12**	0,79 \pm 0,13**	9,06 \pm 1,24**
mPEG-SC _{20k} -HM-1	10	40	0,72 \pm 0,15**	0,76 \pm 0,12**	9,00 \pm 1,25**
mPEG-SC _{40k} -HM-1	10	80	0,80 \pm 0,16**	0,80 \pm 0,16**	9,09 \pm 1,33**

Resultados: En comparación con los ratones normales, las colas de los ratones se inyectaron por vía intradérmica con adyuvante de Freund completo inactivado de M. tuberculosis y colágeno en un volumen igual de emulsionante. Despues de 21 días, se inyectó la cola por vía intradérmica mezclada con emulsionante del adyuvante de Freund incompleto e igual volumen de colágeno en la izquierda, en el día 27 después de la inmunización, las patas de los ratones de la CIA estaban hinchadas y el índice de artritis estaba aumentado. En el grupo modelo, el hinchamiento alcanza su punto máximo entre los días 45 y 60. A los 35 días, el peso en el grupo modelo no aumentó en absoluto, y hubo una ligera disminución en el período posterior. El mPEG-SC-HM-1 de diferentes pesos moleculares ejerció efectos inmunoprotectores en modelos animales de artritis de ratón inducida por colágeno. El grupo de control positivo y el grupo de mPEG-SC-HM-1 presentan diferencias muy significativas en comparación con el grupo modelo. (p**<0,01); la puntuación de las extremidades del grupo mPEG-SC_{20k}-HM-1 fue significativamente menor que la del grupo de control del modelo, y el efecto protector fue el más significativo.

Tabla 36 Efecto inmunoprotector de mPEG₂-NHS-HM-1 en el modelo animal de artritis de ratón inducida por colágeno

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,17 \pm 0,08	0,15 \pm 0,06	0,00 \pm 0,00
Grupo de control del modelo	10	-	2,23 \pm 0,35	2,05 \pm 0,42	15,78 \pm 1,87

(continuación)

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control positivo	10	1	0,71±0,13**	0,72±0,13**	8,41±1,25**
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	10	10	0,76±0,11**	0,78±0,12**	9,01±1,28**
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	10	20	0,74±0,14**	0,75±0,15**	8,83±1,32**
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	10	40	0,75±0,12**	0,72±0,16**	8,67±1,35**
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	10	80	0,79±0,15**	0,76±0,14**	8,98±1,30**

Resultados: En comparación con los ratones normales, las colas de los ratones se inyectaron por vía intradérmica con adyuvante de Freund completo inactivado de M. tuberculosis y colágeno en un volumen igual de emulsionante. Despues de 21 días, se inyectó la cola por vía intradérmica mezclada con emulsionante del adyuvante de Freund incompleto e igual volumen de colágeno en la izquierda, en el día 27 despues de la inmunización, las patas de los ratones de la CIA estaban hinchadas y el índice de artritis estaba aumentado. En el grupo modelo, el hinchamiento alcanza su punto máximo entre los días 45 y 60. A los 35 días, el peso en el grupo modelo no aumentó en absoluto, y hubo una ligera disminución en el período posterior. El mPEG₂-NHS-HM-1 de diferentes pesos moleculares ejerció efectos inmunoprotectores en modelos animales de artritis de ratón inducida por colágeno. El grupo de control positivo y el grupo mPEG₂-NHS-HM-1 presentan diferencias muy significativas en comparación con el grupo modelo. (p**<0,01); la puntuación de los miembros del grupo mPEG₂-NHS_{20k}-HM-1 fue significativamente menor que la del grupo de control del modelo, y el efecto protector fue el más significativo.

Tabla 37 Efecto inmunoprotector de mPEG-ALD-HM-1 en el modelo animal de artritis de ratón inducida por colágeno

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,15±0,06	0,14±0,06	0,00±0,00
Grupo de control del modelo	10	-	2,19±0,32	1,98±0,45	15,45±1,86
Grupo de control positivo	10	1	0,68±0,14**	0,67±0,13**	8,21±1,42**
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	10	10	0,72±0,15**	0,74±0,14**	8,93±1,27**
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	10	20	0,70±0,14**	0,73±0,15**	8,65±1,33**
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	10	40	0,74±0,13**	0,72±0,16**	8,66±1,38**
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	10	80	0,79±0,12**	0,77±0,14**	8,97±1,42**

Resultados: En comparación con los ratones normales, las colas de los ratones se inyectaron por vía intradérmica con adyuvante de Freund completo inactivado de M. tuberculosis y colágeno en un volumen igual de emulsionante.

Después de 21 días, se inyectó la cola por vía intradérmica mezclada con emulsionante del adyuvante de Freund incompleto e igual volumen de colágeno en la izquierda, en el día 27 después de la inmunización, las patas de los ratones de la CIA estaban hinchadas y el índice de artritis estaba aumentado. En el grupo modelo, el hinchamiento alcanza su punto máximo entre los días 45 y 60. A los 35 días, el peso en el grupo modelo no aumentó en absoluto, y hubo una ligera disminución en el período posterior. El mPEG-ALD-HM-1 de diferentes pesos moleculares ejerció efectos inmunoprotectores en modelos animales de artritis de ratón inducida por colágeno. El grupo de control positivo y el grupo de mPEG-ALD-HM-1 presentan diferencias muy significativas en comparación con el grupo modelo. ($p^{**}<0,01$); la puntuación de las extremidades del grupo mPEG-ALD_{10k}-HM-1 fue significativamente menor que la del grupo de control del modelo, y el efecto protector fue el más significativo.

10 Tabla 38 Efecto inmunoprotector de mPEG-bALD-HM-1 en el modelo animal de artritis de ratón inducida por colágeno

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,17±0,05	0,15±0,07	0,00±0,00
Grupo de control del modelo	10	-	2,21±0,35	1,99±0,42	15,36±1,83
Grupo de control positivo	10	1	0,69±0,15**	0,68±0,12**	8,23±1,47**
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	10	10	0,74±0,13**	0,73±0,15**	8,98±1,25**
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	10	20	0,71±0,12**	0,74±0,12**	8,69±1,38**
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	10	40	0,75±0,11**	0,73±0,15**	8,67±1,32**
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	10	80	0,79±0,13**	0,78±0,16**	9,01±1,45**

Resultados: En comparación con los ratones normales, las colas de los ratones se inyectaron por vía intradérmica con adyuvante de Freund completo inactivado de M. tuberculosis y colágeno en un volumen igual de emulsionante. Despues de 21 días, se inyectó la cola por vía intradérmica mezclada con emulsionante del adyuvante de Freund incompleto e igual volumen de colágeno en la izquierda, en el día 27 después de la inmunización, las patas de los ratones de la CIA estaban hinchadas y el índice de artritis estaba aumentado. En el grupo modelo, el hinchamiento alcanza su punto máximo entre los días 45 y 60. A los 35 días, el peso en el grupo modelo no aumentó en absoluto, y hubo una ligera disminución en el período posterior. El mPEG-bALD-HM-1 de diferentes pesos moleculares ejerció efectos inmunoprotectores en modelos animales de artritis de ratón inducida por colágeno. El grupo de control positivo y el grupo de mPEG-bALD-HM-1 presentan diferencias muy significativas en comparación con el grupo modelo. ($p^{**}<0,01$); la puntuación de las extremidades del grupo mPEG-bALD_{10k}-HM-1 fue significativamente menor que la del grupo de control del modelo, y el efecto protector fue el más significativo.

Ejemplo 10: Efecto inmunoprotector *in vivo* del mPEG-HM-1 en un modelo de rata con artritis adyuvante

25 Se construyó un modelo de artritis adyuvante en ratas para estudiar el efecto terapéutico del mPEG-HM-1 en ratas con artritis adyuvante (AA). Se utilizaron ratas como animales de prueba, ratas SD de grado SPF, machos, con un peso de 140-160 g, se dividieron aleatoriamente en el grupo de control normal, el grupo de control del modelo, el grupo de mPEG-HM-1 y el grupo de control positivo de fármacos (metotrexato 1 mg/kg). A excepción del grupo normal, en todas las ratas de los grupos de prueba se estableció el modelo de artritis por adyuvante el día 0, inyectando el Mycobacterium tuberculosis inactivado (H37RA, 10 mg/ml) y adyuvante de Freund completo (0,08 ml) en la pata trasera izquierda de la rata. 10 días después de establecer el modelo, se iniciaron las inyecciones subcutáneas: mPEG-HM-1: una vez cada tres días; grupo de control farmacológico positivo (metotrexato 1 mg/kg): una vez cada cinco días, tres veces seguidas; grupo de control normal y grupo de control modelo (solución salina): 10 días consecutivos. Al 8°, 11°, 14°, 17°, 20°, 23° y 26° día después del modelado, se puntuaron las articulaciones y se examinaron los diámetros del tobillo de la pata trasera izquierda y del tobillo de la pata trasera derecha para observar el efecto del fármaco en la artritis adyuvante de las ratas.

Los índices de evaluación de la artritis son los siguientes: (1) Puntuaciones conjuntas de las extremidades: puntuadas en el nivel 0-4 con cinco grados: 0 = sin eritema o enrojecimiento; 1 = eritema o hinchamiento leve, uno de los cuales presenta eritema o hinchamiento de la articulación anterior/posterior; 2 = más de un dedo con eritema o hinchamiento; 3 = hinchamiento de las patas por debajo del tobillo o la muñeca; 4 = hinchamiento de todas las patas, incluido el tobillo. Las cuatro patas de las ratas se puntuaron por separado, con una puntuación máxima de 16 puntos. Las puntuaciones de las articulaciones se tomaron a los 8, 11, 14, 17, 20, 23 y 26 días después del modelado, y se registraron los resultados. (2) Medición del diámetro de los tobillos: los diámetros de dentro a fuera de los tobillos izquierdo y derecho de la rata, y el grosor de las patas, se midieron con calibradores vernier antes del modelado y 8, 11, 14, 17, 20, 23 y 26 días después del modelado, y se registraron los resultados. La prueba se repitió 3 veces de forma independiente. Los resultados obtenidos por la prueba se expresaron como media \pm SD, y se realizó una prueba estadística T. *P<0,05 se consideró una diferencia significativa, y **P<0,01 fue una diferencia muy significativa.

Tabla 39 Efecto inmunoprotector de mPEG-SC-HM-1 en modelos animales adyuvantes de artritis en ratas

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,93 \pm 0,14	0,30 \pm 0,15	0,00 \pm 0,00
Grupo de control del modelo	10	-	6,98 \pm 1,27	3,74 \pm 0,72	13,86 \pm 1,65
Grupo de control positivo	10	1	3,26 \pm 0,45**	0,63 \pm 0,13**	5,04 \pm 1,19**
mPEG-SC _{5k} -HM-1	10	10	3,96 \pm 0,71**	0,74 \pm 0,18**	5,95 \pm 1,07**
mPEG-SC _{10k} -HM-1	10	20	3,81 \pm 0,71**	0,70 \pm 0,18**	5,52 \pm 1,07**
mPEG-SC _{20k} -HM-1	10	40	3,75 \pm 0,67**	0,81 \pm 0,20**	5,83 \pm 1,01**
mPEG-SC _{40k} -HM-1	10	80	3,83 \pm 0,62**	0,71 \pm 0,11**	5,88 \pm 1,08**

Resultados: Una vez establecido el modelo, las ratas modelo, con la pata trasera izquierda inyectada con el adyuvante de Freund completo inactivado de M. tuberculosis, desarrollaron rápidamente artritis primaria en la pata trasera izquierda. Se produjeron hinchamiento y ulceración significativas; la artritis secundaria comenzó a aparecer en la pata trasera derecha unos 10 días después, el valor de la puntuación aumentó gradualmente; al mismo tiempo, la hiperplasia vascular de la oreja era obvia, el enrojecimiento y el hinchamiento eran evidentes; la articulación de la cola mostró hinchamiento, en comparación con el grupo modelo, el grupo de mPEG-SC-HM-1 con diferente peso molecular puede ejercer ciertos efectos de protección inmunológica *in vivo* en el modelo animal de artritis adyuvante, y mPEG-SC_{10k}-HM-1 tiene el efecto más significativo.

Tabla 40 Efecto inmunoprotector de mPEG₂-NHS-HM-1 en modelos animales adyuvantes de artritis en ratas

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,90 \pm 0,13	0,31 \pm 0,14	0,00 \pm 0,00
Grupo de control del modelo	10	-	6,96 \pm 1,24	3,72 \pm 0,71	13,94 \pm 1,62
Grupo de control positivo	10	1	3,22 \pm 0,43**	0,62 \pm 0,15**	5,02 \pm 1,17**

(continuación)

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	10	10	3,91±0,73**	0,73±0,16**	5,92±1,04**
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	10	20	3,80±0,73**	0,69±0,19**	5,53±1,09**
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	10	40	3,77±0,66**	0,80±0,21**	5,82±1,03**
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	10	80	3,81±0,63**	0,73±0,14**	5,89±1,07**

Resultados: Una vez establecido el modelo, las ratas modelo, con la pata trasera izquierda inyectada con el adyuvante de Freund completo inactivado de *M. tuberculosis*, desarrollaron rápidamente artritis primaria en la pata trasera izquierda. Se produjeron hinchamiento y ulceración significativas; la artritis secundaria comenzó a aparecer en la pata trasera derecha unos 10 días después, el valor de la puntuación aumentó gradualmente; al mismo tiempo, la hiperplasia vascular de la oreja era obvia, el enrojecimiento y el hinchamiento eran evidentes; la articulación de la cola mostró hinchamiento, en comparación con el grupo modelo, el grupo mPEG₂-NHS-HM-1 con diferente peso molecular puede ejercer ciertos efectos de protección inmunológica *in vivo* en el modelo animal de artritis adyuvante, y mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 tiene el efecto más significativo.

Tabla 41. Efecto inmunoprotector de mPEG-ALD-HM-1 en modelos animales adyuvantes de artritis en ratas

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,91±0,15	0,33±0,14	0,00±0,00
Grupo de control del modelo	10	-	7,03±1,21	3,72±0,65	13,45±1,49
Grupo de control positivo	10	1	3,21±0,42**	0,61±0,14**	5,03±1,16**
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	10	10	3,92±0,67**	0,72±0,17**	5,91±1,09**
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	10	20	3,72±0,54**	0,68±0,15**	5,39±1,10**
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	10	40	3,77±0,62**	0,76±0,21**	5,67±1,08**
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	10	80	3,80±0,65**	0,73±0,17**	5,76±1,03**

Resultados: Una vez establecido el modelo, las ratas modelo, con la pata trasera izquierda inyectada con el adyuvante de Freund completo inactivado de *M. tuberculosis*, desarrollaron rápidamente artritis primaria en la pata trasera izquierda. Se produjeron hinchamiento y ulceración significativas; la artritis secundaria comenzó a aparecer en la pata trasera derecha unos 10 días después, el valor de la puntuación aumentó gradualmente; al mismo tiempo, la hiperplasia vascular de la oreja era obvia, el enrojecimiento y el hinchamiento eran evidentes; la articulación de la cola mostró hinchamiento, en comparación con el grupo modelo, el grupo de mPEG-ALD-HM-1 con diferente peso molecular puede ejercer ciertos efectos de protección inmunológica *in vivo* en el modelo animal de artritis adyuvante, y mPEG-ALD_{10k}-HM-1 tiene el efecto más significativo.

Tabla 42 Efecto inmunoprotector del mPEG-bALD-HM-1 en modelos animales adyuvantes de artritis en ratas

Grupo	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Hinchamiento de la pata izquierda y derecha (mm)	Hinchamiento articular (mm)	Puntuación clínica
Grupo de control normal	10	-	0,95±0,13	0,32±0,15	0,00±0,00
Grupo de control del modelo	10	-	7,06±1,23	3,75±0,67	13,47±1,42
Grupo de control positivo	10	1	3,23±0,43**	0,64±0,12**	5,04±1,13**
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	10	10	3,94±0,65**	0,73±0,18**	5,92±1,11**
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	10	20	3,73±0,52**	0,69±0,13**	5,40±1,09**
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	10	40	3,78±0,63**	0,77±0,23**	5,68±1,10**
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	10	80	3,81±0,62**	0,74±0,18**	5,78±1,05**

Resultados: Una vez establecido el modelo, las ratas modelo, con la pata trasera izquierda inyectada con el adyuvante de Freund completo inactivado de M. tuberculosis, desarrollaron rápidamente artritis primaria en la pata trasera izquierda. Se produjeron hinchamiento y ulceración significativas; la artritis secundaria comenzó a aparecer en la pata trasera derecha unos 10 días después, el valor de la puntuación aumentó gradualmente; al mismo tiempo, la hiperplasia vascular de la oreja era obvia, el enrojecimiento y el hinchamiento eran evidentes; la articulación de la cola mostró hinchamiento, en comparación con el grupo modelo, el grupo de mPEG-bALD-HM-1 con diferente peso molecular puede ejercer ciertos efectos de protección inmunológica *in vivo* en el modelo animal de artritis adyuvante, y mPEG-bALD_{10k}-HM-1 tiene el efecto más significativo.

5

10 Ejemplo 11: Efecto del mPEG-HM-1 en la inflamación aguda inducida por carragenina de hinchazón de los dedos de la pata en ratas.

Las ratas SD se dividieron en el grupo modelo en blanco, el grupo positivo a la dexametasona (5 mg/kg) y el grupo de prueba mPEG-HM-1. El fármaco se administró una vez al día, y el grupo modelo recibió el mismo volumen de solución salina normal durante 3 días y se alimentó normalmente. A la primera hora de la última administración, se inyectaron 0,1 ml de carragenina al 1 % por vía subcutánea en la pata trasera derecha de las ratas para inducir la inflamación. El volumen de la pata se midió a 1 h, 3 h, 5 h y 7 h después de la inflamación. El grado de inflamación de la pata se calculó según la siguiente fórmula: el grado de inflamación de la pata (ml) = el volumen de la pata después de la inflamación - el volumen antes de la inflamación. Registrar el número de mililitros de líquido rebosado (procedimiento: utilizar el bolígrafo para hacer un círculo como marca de medición en el punto que sobresale de la articulación derecha, y luego poner la pata trasera derecha de cada ratón en el dispositivo de medición de volumen, de modo que la extremidad trasera quede expuesta fuera del cilindro, y la profundidad de la inmersión se determinó haciendo coincidir el círculo con la superficie del líquido. Después de que la pata entre en el líquido, el nivel del líquido se eleva, y el volumen del líquido de desbordamiento es el volumen de la pata trasero derecho de la rata, y se determina secuencialmente el volumen normal de la pata trasero derecho de cada ratón).

25 Tabla 43 Efecto del mPEG-SC-HM-1 en la inflamación aguda inducida por carragenina de el hinchamiento del dedo de la pata de rata

grupo	dosis (mg/kg)	Hinchamiento (mg)			
		1 h	3 h	5 h	7 h
mPEG-SC _{5k} -HM-1	10	0,24±0,12	0,37±0,14	0,42±0,16	0,32±0,13*
	20	0,23±0,10*	0,33±0,20	0,38±0,13**	0,34±0,15*
mPEG-SC _{10k} -HM-1	20	0,25±0,11	0,38±0,15	0,43±0,17	0,31±0,11*
	40	0,22±0,09*	0,32±0,19	0,37±0,12**	0,34±0,13*

(continuación)

grupo	dosis (mg/kg)	Hinchamiento (mg)			
		1 h	3 h	5 h	7 h
mPEG-SC _{20k} -HM-1	40	0,28±0,14*	0,35±0,17	0,42±0,15*	0,37±0,16*
	80	0,26±0,10*	0,33±0,12	0,40±0,13*	0,32±0,17*
mPEG-SC _{40k} -HM-1	80	0,25±0,13*	0,34±0,12	0,44±0,15*	0,34±0,16*
	160	0,24±0,12*	0,33±0,13	0,43±0,12*	0,33±0,13*
Dex	10	0,21±0,10**	0,25±0,11**	0,28±0,11**	0,24±0,08*
control	-	0,25±0,18	0,43±0,19	0,55±0,05	0,36±0,20

5 Resultados: Los dedos de las patas de las ratas de cada grupo se hincharon rápidamente después del modelado. El pico de hinchamiento se alcanzó a unos 3~5 h y desapareció a las 7 h. El grupo de mPEG-SC-HM-1 con diferentes pesos moleculares pudo inhibir significativamente el hinchamiento del dedo de la pata de la rata inducida por la carragenina, y el grupo de dosis alta fue mejor que el grupo de dosis baja, de los cuales el mPEG-SC_{20k}-HM-1 a la dosis de 80 mg/kg fue más eficaz.

Tabla 44 Efecto del mPEG₂-NHS-HM-1 en la inflamación aguda inducida por carragenina del hinchamiento del dedo de la pata de rata

grupo	dosis (mg/kg)	Hinchamiento (mg)			
		1 h 3	h 5 h	7 h	
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	10	0,25±0,13	0,36±0,12	0,43±0,17	0,31±0,15*
	20	0,22±0,11*	0,32±0,21	0,36±0,12**	0,32±0,16*
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	20	0,24±0,12	0,37±0,16	0,42±0,16	0,30±0,12*
	40	0,21±0,10*	0,31±0,17	0,35±0,11**	0,33±0,15*
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	40	0,26±0,15*	0,34±0,14	0,43±0,17*	0,36±0,12*
	80	0,25±0,11*	0,32±0,13	0,41±0,11*	0,34±0,14*
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	80	0,26±0,12*	0,32±0,11	0,42±0,14*	0,35±0,17*
	160	0,27±0,10*	0,35±0,18	0,41±0,13*	0,34±0,19*
Dex	10	0,22±0,11**	0,26±0,10**	0,29±0,12**	0,25±0,09*
Control	-	0,24±0,16	0,44±0,17	0,53±0,0	90,35±0,21

10 Resultados: Los dedos de las patas de las ratas de cada grupo se hincharon rápidamente después del modelado. El pico de hinchamiento se alcanzó a unos 3~5 h y desapareció a las 7 h. El grupo de mPEG₂-NHS-HM-1 con diferentes pesos moleculares pudo inhibir significativamente el hinchamiento del dedo de la pata de la rata inducida por la carragenina, y el grupo de dosis alta fue mejor que el grupo de dosis baja, de los cuales mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 a la dosis de 40 mg/kg fue el más eficaz.

15

Tabla 45 Efecto del mPEG-ALD-HM-1 en la inflamación aguda inducida por carragenina del hinchamiento del dedo de la pata de rata

grupo	dosis (mg/kg)	Hinchamiento (mg)			
		1 h	3 h	5 h	7 h
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	10	0,22±0,10	0,35±0,13	0,41±0,15	0,31±0,12*
	20	0,21±0,11*	0,34±0,19	0,37±0,11**	0,35±0,13*
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	20	0,24±0,12	0,36±0,13	0,42±0,15	0,32±0,10*
	40	0,21±0,10*	0,31±0,20	0,36±0,13**	0,33±0,12*
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	40	0,27±0,13*	0,34±0,16	0,41±0,14 *	0,35±0,13*
	80	0,25±0,09*	0,32±0,11	0,40±0,15*	0,32±0,16*
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	80	0,26±0,14*	0,35±0,13	0,43±0,14*	0,33±0,17*
	160	0,24±0,13*	0,34±0,14	0,44±0,15*	0,34±0,15*
Dex	10	0,22±0,11**	0,24±0,13**	0,27±0,14**	0,23±0,09*
control	-	0,24±0,17	0,44±0,17	0,54±0,06	0,37±0,21

Resultados: Los dedos de las patas de las ratas de cada grupo se hincharon rápidamente después del modelado. El pico de hinchamiento se alcanzó a unos 3~5 h y desapareció a las 7 h. El grupo de mPEG₂-ALD-1 con diferentes pesos moleculares pudo inhibir significativamente el hinchamiento del dedo de la pata de la rata inducida por la carragenina, y el grupo de dosis alta fue mejor que el grupo de dosis baja, de los cuales el mPEG₂-ALD_{10k}-HM-1 a la

5 dosis de 40 mg/kg fue más eficaz.

Tabla 46 Efecto del mPEG-bALD-HM-1 en la inflamación aguda inducida por carragenina del hinchamiento del dedo de la pata de rata

Grupo	dosis (mg/kg)	Hinchamiento (mg)			
		1 h	3 h	5 h	7 h
mPEG-bALD _{5k} - HM-1	10	0,23±0,11	0,34±0,12	0,40±0,140,32±0,11*	
	20	0,22±0,13*	0,33±0,18	0,36±0,15**	0,34±0,12*
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	20	0,22±0,14	0,32±0,15	0,41±0,17	0,31±0,12*
	40	0,20±0,12*	0,32±0,22	0,38±0,14**	0,32±0,11*
mPEG- bALD _{20k} -HM-1	40	0,25±0,15*	0,35±0,14	0,42±0,15*	0,36±0,18*
	80	0,27±0,11*	0,34±0,10	0,41±0,12*	0,33±0,17*
mPEG- bALD _{40k} -HM-1	80	0,28±0,15*	0,33±0,12	0,45±0,16*	0,37±0,18*
	160	0,25±0,12*	0,36±0,13	0,46±0,17*	0,36±0,19*
Dex	10	0,21±0,10**	0,23±0,12**	0,28±0,12**	0,24±0,10*
control	-	0,23±0,16	0,45±0,16	0,55±0,07	0,38±0,20

Resultados: Los dedos de las patas de las ratas de cada grupo se hincharon rápidamente después del modelado. El pico de hinchamiento se alcanzó a unos 3~5 h y desapareció a las 7 h. El grupo de mPEG-bALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares pudo inhibir significativamente el hinchamiento del dedo de la pata de la rata inducida por la carragenina, y el grupo de dosis alta fue mejor que el grupo de dosis baja, de los cuales el mPEG-bALD_{10k}-HM-1 a la dosis de 40 mg/kg fue más eficaz.

Ejemplo 12: Efecto inhibidor del mPEG-HM-1 sobre la proliferación de las células endoteliales vasculares de la retina humana (HRCEC)

La actividad del polipéptido inhibidor de la angiogénesis para inhibir la proliferación de las células endoteliales vasculares de la retina humana se examinó mediante el ensayo MTT. Las células HRCEC se cultivaron en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta alcanzar una densidad del 90 % o más, y se recogieron por tripsinización. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo y se contaron bajo el microscopio para ajustar la concentración celular a 3,0×10⁴ células/ml. La suspensión celular se inoculó en una placa de 96 pocillos a razón de 100 µl por pocillo y se cultivó durante toda la noche a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO₂. Después de que las células estuvieran completamente adheridas, se añadió el polipéptido inhibidor de la angiogénesis como grupo de administración, y se utilizó Avastin como grupo de control positivo, y el medio de cultivo sin ningún fármaco se utilizó como grupo de control en blanco, y los medios de cultivo se diluyeron a cada concentración predeterminada. Cada dilución se añadió por separado a una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo y se incubó durante 48 h a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO₂. Se añadieron 20 µl de 5 mg/ml de MTT a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se continuó la incubación durante 4 h. Se aspiró el medio y se disolvió en 100 µl de DMSO por pocillo. La absorbancia se midió con un lector de microplacas a una longitud de onda de detección de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm, y se calculó la tasa de inhibición de la proliferación (PI). La fórmula es la siguiente:

$$\text{PI (\%)} = 1 - \text{grupo de administración} / \text{grupo negativo}$$

La prueba se repitió 3 veces de forma independiente. Los resultados obtenidos por la prueba se expresaron como media±SD, y se realizó una prueba estadística T. *P<0,05 es una diferencia significativa, y **P<0,01 es una diferencia muy significativa. Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 47.

Tabla 47 Efecto inhibidor de mPEG-SC-HM-1 sobre la proliferación de células endoteliales vasculares de la retina humana (HRCEC)

Grupo	Dosis (µg/ml)	A570nm-A630nm	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{5k} - HM-1	20	0,7573±0,09088	42,22 %*
	40	0,6323±0,08797	51,76 %**
	60	0,4968±0,08679	62,10 %*
	40	0,7020±0,07964	46,44 %*
mPEG-SC _{10k} -HM-1	60	0,5847±0,07356	55,39 %**
	80	0,4084±0,07298	68,84 %*
	60	0,7116±0,07539	45,71 %*
mPEG-SC _{20k} -HM-1	80	0,6040±0,06996	53,92 %**
	100	0,4372±0,07210	66,64 %*
	80	0,7567±0,07109	42,27 %*
mPEG-SC _{40k} - HM-1	100	0,6139±0,07120	53,16 %**
	120	0,4760±0,07009	63,68 %*
Una vastina	10	0,4479±0,08104	65,83 %**
control	-	1,3107±0,09405	0,00 %

ES 2 890 733 T3

Resultados: mPEG-SC-HM-1 con diferentes pesos moleculares podía inhibir significativamente la proliferación de HRCEC y mostraba una relación dependiente de la dosis. La tasa de inhibición del grupo de dosis alta fue cercana a la del control Avastin, y el mPEG-SC_{10k}-HM-1 en la dosificación de 80 µg/ml alcanzó una tasa de inhibición del 68,84 %, que fue ligeramente superior a la del control positivo Avastin.

5

Tabla 48 Efecto inhibidor del mPEG₂-NHS-HM-1 sobre la proliferación de las células endoteliales vasculares de la retina humana (HRCEC)

Grupo	Dosis (µg/ml)	A570nm-A630nm	Tasa de inhibición (%)
	20	0,7807±0,09103	40,94 %*
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	40	0,6523±0,08688	50,65 %**
	60	0,5144±0,08531	61,08 %*
	40	0,7160±0,07829	45,83 %*
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	60	0,5985±0,07472	54,72 %**
	80	0,4609±0,07165	65,13 %*
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	60	0,7401±0,07482	44,01 %*
	80	0,6056±0,07003	54,18 %**
	100	0,4677±0,07601	64,62 %*
	80	0,7598±0,07143	42,52 %*
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	100	0,6363±0,07532	51,86 %**
	120	0,4920±0,07953	62,78 %*
Avastin	10	0,4636±0,08322	64,93 %**
control	-	1,3218±0,08917	0,00 %

10 Resultados: mPEG₂-NHS-HM-1 con diferentes pesos moleculares podía inhibir significativamente la proliferación de HRCEC y mostraba una relación dependiente de la dosis. La tasa de inhibición del grupo de dosis alta fue cercana a la del control Avastin, y el mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 en la dosificación de 80 µg/ml alcanzó una tasa de inhibición del 65,13 %, que fue ligeramente superior a la del control positivo Avastin.

Tabla 49 Efecto inhibidor del mPEG-ALD-HM-1 sobre la proliferación de las células endoteliales vasculares de la retina humana (HRCEC)

Grupo	Dosis (µg/ml)	A570nm-A630nm	Tasa de inhibición (%)
	20	0,7599±0,08933	42,02 %*
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	40	0,6301±0,08011	51,93 %**
	60	05042±0,08135	61,53 %*
	40	0,6771±0,07904	48,34 %*
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	60	0,5424±0,07508	58,62 %**

ES 2 890 733 T3

(continuación)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	A570nm-A630nm	Tasa de inhibición (%)
	80	0,3422±0,07412	73,89 %*
	60	0,7050±0,07965	46,21 %*
mPEG- ALD _{20k} - HM-1	80	0,5780±0,06987	55,90 %**
	100	0,4175±0,07301	68,15 %*
	80	0,7457±0,07094	43,11 %*
mPEG-ALD _{40k} - HM-1	100	0,5999±0,07138	54,23 %**
	120	0,4970±0,07653	62,08 %*
Una vastina	10	0,4494±0,08132	65,71 %**
control	-	1,3107±0,09314	0,00 %

5 Resultados: mPEG-ALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares podía inhibir significativamente la proliferación de HRCEC y mostraba una relación dependiente de la dosis. La tasa de inhibición del grupo de dosis alta fue cercana a la del control Avastin, mPEG-ALD_{10k}-HM-1 en la dosificación de 80 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó una tasa de inhibición del 73,89 %, mPEG-ALD_{20k}-HM-1 en la dosificación de 100 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó una tasa de inhibición del 68,15 %, que fueron superiores a la del control positivo Avastin.

Tabla 50 Efecto inhibidor del mPEG-bALD-HM-1 sobre la proliferación de las células endoteliales vasculares de la retina humana (HRCEC)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	A570nm-A630nm	Tasa de inhibición (%)
	20	0,7747±0,08752	41,82 %*
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	40	0,6594±0,08003	50,48 %**
	60	04958±0,07902	62,77 %*
	40	0,6931±0,07754	47,95 %*
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	60	0,5669±0,07609	57,43 %**
	80	0,3304±0,07354	75,19 %*
	60	0,6987±0,07838	47,53 %*
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	80	0,5683±0,07055	57,32 %**
	100	0,4112±0,07405	69,12 %*
	80	0,7349±0,07082	44,81 %*
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	100	0,5988±0,07291	55,03 %**
	120	0,4911±0,07534	63,12 %*

(continuación)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	A570nm-A630nm	Tasa de inhibición (%)
Avastin	10	0,4518±0,08013	66,07 %**
control	-	1,3316±0,09051	0,00 %

5 Resultados: mPEG-bALD-HM-1 con diferentes pesos moleculares podía inhibir significativamente la proliferación de HRCEC y mostraba una relación dependiente de la dosis. La tasa de inhibición del grupo de dosis alta fue cercana a la del control Avastin, mPEG-bALD_{10k}-HM-1 en la dosificación de 80 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó una tasa de inhibición del 75,19 %, mPEG-ALD_{20k}-HM-1 en la dosificación de 100 $\mu\text{g/ml}$ alcanzó una tasa de inhibición del 69,12 %, que fueron superiores a la del control positivo Avastin.

Ejemplo 13: Efecto del mPEG-HM-1 en la neovascularización corneal en ratones BALB/c

- 10 (1) Preparación del modelo de neovascularización corneal inducida por quemadura con ácali en ratones BALB/c: los ratones fueron agrupados aleatoriamente y etiquetados como grupo experimental mPEG-HM-1 y grupo de control, 5 ratas en cada grupo, respectivamente, se les administró mPEG-HM-1 y solución salina por inyección intravítreo después de la quemadura con ácali, una vez al día durante 1 semana. La reacción inflamatoria y la neovascularización de la córnea se observaron bajo el microscopio de lámpara de hendidura a los 1, 7 y 14 días después de la quemadura con ácali. En el día 14 después de la quemadura con ácali, se registró la neovascularización corneal bajo el microscopio de lámpara de hendidura en el segmento anterior del ojo. Todos los ratones fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical y los globos oculares se extrajeron, se lavaron con solución salina para eliminar la sangre y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 1,5 horas, se deshidrataron en PBS con un 30 % de sacarosa durante la noche, se incrustaron en un agente de incrustación de secciones congeladas de OCT, se almacenaron en un frigorífico a -80 °C, se congelaron en secciones de 8 μm y se sometieron a la detección inmunocitoquímica de la expresión de CD31.
- 15 (2) Medición cuantitativa de la densidad de los microvasos del tejido corneal: La densidad de microvasos (MVD) es un indicador para evaluar la angiogénesis. Las células endoteliales vasculares se marcaron con el anticuerpo anti-CD31 mediante inmunohistoquímica, y se contó el número de microvasos por unidad de superficie para medir el grado de neovascularización. Normas para el recuento de microvasos: Microscópicamente, se cuentan en la neovascularización las células endoteliales o los grupos de células que están claramente delimitados de los tejidos adyacentes en el tejido corneal y que se tiñen de color marrón o pardo. El número de nuevos vasos sanguíneos en toda la sección se contó bajo un microscopio 10x20. Después de fotografiar el tejido corneal, se calculó el área total del tejido corneal mediante el software de procesamiento de imágenes Image J, y se determinó la densidad neovascular de toda la sección.
- 20 30 La prueba se repitió 3 veces de forma independiente. Los resultados obtenidos por la prueba se expresaron como media±SD, y se realizó una prueba estadística T. *P<0,05 es una diferencia significativa, y **P<0,01 es una diferencia muy significativa. Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 51.

Tabla 51 Efecto del mPEG-HM-1 sobre la neovascularización corneal en ratones

Grupo	MVD	Tasa de inhibición (%)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	39,69±3,527*	40,52 %
mPEG-SC _{10k} -HM-1	31,92±3,648**	52,17 %
mPEG-SC _{20k} -HM-1	35,68±4,842**	46,53 %
mPEG-SC _{40k} -HM-1	37,72±4,153**	43,48 %
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	39,95±3,985*	40,13 %
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	33,32±3,871**	50,07 %
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	38,46±4,528**	42,37 %

(continuación)

Grupo	MVD	Tasa de inhibición (%)
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	37,91±4,273**	43,19 %
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	36,64±3,909*	45,09 %
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	30,81±5,465**	53,83 %
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	34,67±6,953**	48,04 %
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	35,96±6,862**	46,11 %
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	37,97±3,914*	43,10 %
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	32,01±5,738**	52,03 %
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	34,81±6,817**	47,84 %
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	36,52±6,537**	45,27 %
control	66,73±8,324	0,00 %

5 Los resultados mostraron que el mPEG-HM-1 con diferente composición molecular y diferentes pesos moleculares podían inhibir significativamente el crecimiento de la neovascularización corneal, y la tasa de inhibición del mPEG-SC_{10k}-HM-1 alcanzó el 52,17 %, y la tasa de inhibición del mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 alcanzó el 50,07 %, la tasa de inhibición del mPEG-ALD_{10k}-HM-1 alcanzó el 53,83 %, y la tasa de inhibición del mPEG-bALD_{10k}-HM-1 alcanzó el 52,03 %.

Ejemplo 14: Efecto del mPEG-HM-1 en la neovascularización del iris en conejos

10 La rama principal de la retina de conejo se condensó con un láser de iones de argón de 577 nm. La oclusión venosa se confirmó mediante una angiografía con fluoresceína del fondo de ojo (FFA). Tras 5-12 días, la angiografía con fluoresceína del iris (IFA) mostró que la fuga de fluoresceína era evidente en los vasos del iris en comparación con el grupo de control normal, lo que confirmó la formación del modelo animal de neovascularización del iris (NVI).

15 51 ojos con modelado exitoso fueron divididos al azar en grupos de 3 cada uno. Se etiquetaron como grupo de control negativo, grupo de tratamiento mPEG-SC-HM-1, grupo de tratamiento mPEG₂-NHS-HM-1, grupo de tratamiento mPEG-ALD-HM-1 y grupo de tratamiento mPEG-bALD-HM-1, respectivamente. Se administró solución salina, mPEG-HM-1 (véase la tabla 52 para la dosificación) por vía intravítreas, una vez al día durante 2 semanas. En la tercera semana se observaron los ojos mediante microscopía óptica y electrónica.

Tabla 52 dosis del grupo de tratamiento con mPEG-HM-1

Grupo	Dosis (μg)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	25
mPEG-SC _{10k} -HM-1	50
grupo de tratamiento con mPEG-SC-HM-1	
mPEG-SC _{20k} -HM-1	100
mPEG-SC _{40k} -HM-1	200

(continuación)

	Grupo	Dosis (μ g)
grupo de tratamiento mPEG ₂ -NHS-HM-1	mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	25
	mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	50
	mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	100
	mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	200
grupo de tratamiento mPEG-ALD-HM- 1	mPEG-ALD _{5k} -HM-1	25
	mPEG-ALD _{10k} -HM- 1	50
	mPEG-ALD _{20k} -HM-1	100
	mPEG-ALD _{40k} -HM-1	200
grupo de tratamiento mPEG-bALD-HM- 1	mPEG-bALD _{5k} -HM-1	25
	mPEG-bALD _{10k} -HM-1	50
	mPEG-bALD _{20k} -HM-1	100
	mPEG- bALD _{40k} -HM-1	200

Resultados: Bajo el microscopio óptico, se observó que la superficie anterior del iris estaba compuesta principalmente por residuos de membranas vasculares fibrosas compuesto de tejido fibroso, y había pocos lúmenes vasculares abiertos. En la matriz del iris pueden verse restos vasculares, que son células necróticas y restos celulares. En la superficie del iris del ojo de control, bajo el microscopio óptico, se puede observar la membrana vascular fibrosa con rama y lumen potencial; la ultraestructura del iris en el grupo de tratamiento tiene una serie de cambios degenerativos: las células endoteliales de los grandes vasos sanguíneos del centro de la matriz del iris tienen el núcleo, el citoplasma y las uniones celulares normales, se encontraron restos de capilares en la matriz del iris y en la superficie anterior del iris, rodeados de restos celulares e infiltración de macrófagos, no hay capilares con lumen potencial y las células de la pared están degeneradas, lo que indica que la neovascularización ha remitido.

Los resultados mostraron que el mPEG-HM-1 puede inhibir la formación de la neovascularización del iris en conejos y hacer que los vasos sanguíneos formados se degeneren.

Ejemplo 15: Efecto del mPEG-HM-1 en la neovascularización coroidea en ratas

Las ratas BN macho de 6-8 semanas de edad fueron anestesiadas con un anestésico compuesto 846 de 0,5 ml/kg administrado por vía intraperitoneal. Las gotas oculares de los ojos compuestos de tropamida se utilizaron 5 minutos antes de la fotocoagulación con láser, y las pupilas de ambos ojos se dispersaron completamente. En los animales fijos, con la ayuda de lentes de contacto de -53,00D, alrededor del disco óptico y a lo largo de la misma distancia del disco óptico 2PD, se realizó la fotocoagulación con rayo láser para realizar un total de 8 puntos de fotocondensación, con una longitud de onda láser de 647,1 nm, una potencia de 350 mW, el diámetro del punto de fotocoagulación y el tiempo fueron de 50 μ m y 0,05s, respectivamente. Inmediatamente después de la fotocoagulación, se realizó una fotografía del fondo de ojo. Se realizó la FFA, la histopatología y la microscopía electrónica de transmisión a los 3, 7, 14, 21 y 28 días después de la fotocoagulación.

Se confirmó por medio de la fotografía del fondo de ojo y el examen de la FFA que la fuga de fluoresceína de la fotocoagulación alcanzó su punto máximo el día 21 después de la fotocoagulación, y se realizó un examen histopatológico al mismo tiempo. Tras 21 días de fotocoagulación, la CNV mostró una proliferación fibrovascular significativa bajo microscopía óptica. Se observó un gran número de vasos neovasculares y se vieron glóbulos rojos en el lumen. Microscópicamente, las células capilares de los melanocitos de la coroides estaban cohesivamente alteradas y las células endoteliales agregadas. Estos mostraron que se formó un modelo neovascular coroideo de rata 21 días después.

Las ratas que fueron modeladas con éxito fueron divididas al azar en grupos de 5 ratas cada uno. Se etiquetaron como grupo de control negativo, grupo de tratamiento mPEG-SC-HM-1, grupo de tratamiento mPEG₂-NHS-HM-1, grupo de

tratamiento mPEG-ALD-HM-1 y grupo de tratamiento mPEG-bALD-HM-1, respectivamente. Se administró solución salina, mPEG-HM-1 (véase la Tabla 53 para la dosificación) por vía intravítreos, una vez al día durante 1 semana. Los exámenes de FFA se realizaron 3 días, 7 días, 14 días y 28 días después de la administración de los péptidos modificados. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 54 a 57.

5

Tabla 53 Dosificación del grupo de tratamiento con mPEG-HM-1

grupo	dosis (μg)
mPEG-SC _{5k} -HM-1	25
grupo de tratamiento con mPEG-SC-HM-1	
mPEG-SC _{10k} -HM-1	50
mPEG-SC _{20k} -HM-1	100
mPEG-SC _{40k} -HM-1	200
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	25
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	50
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	100
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	200
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	25
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	50
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	100
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	200
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	25
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	50
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	100
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	200
grupo de tratamiento con mPEG-ALD-HM-1	
grupo de tratamiento con mPEG-bALD-HM-1	

Tabla 54 Efecto del mPEG-SC-HM-1 sobre la neovascularización coroidea en ratas

grupo	Tiempo de prueba							
	Día 3 El número total de puntos es de 296		Día 7 El número total de puntos es de 188		Día 14 El número total de puntos es de 135		Día 28 El número total de puntos es de 67	
	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)
control	246	83,11 %	142	75,53 %	89	65,93 %	40	59,70 %
mPEG-SC _{5k} -HM-1	162	54,73 %	100	53,19 %	65	48,15 %	32	47,76 %
mPEG-SC _{10k} -HM-1	147	49,66 %	86	45,74 %	58	42,96 %	26	38,81 %

(continuación)

grupo	Tiempo de prueba							
	Día 3 El número total de puntos es de 296		Día 7 El número total de puntos es de 188		Día 14 El número total de puntos es de 135		Día 28 El número total de puntos es de 67	
	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)
mPEG-SC _{20k} -HM-1	152	51,35 %	92	48,94 %	62	45,93 %	28	41,79 %
mPEG-SC _{40k} -HM-1	150	50,68 %	94	50,00 %	60	44,44 %	29	43,28 %

5 Resultados: La detección de FFA, 3 días después de la administración, la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento con mPEG-SC-HM-1 fue significativamente diferente a la de antes de la administración; la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento se redujo gradualmente 7 y 14 días después de la administración de los péptidos en comparación con antes de la administración; la fuga de fluoresceína fue incluso menor en 28 días después de la administración en comparación con 14 días después de la administración. Los resultados indicaron que el mPEG-SC-HM-1 podía tratar la neovascularización coroidea en ratas. El efecto del mPEG-SC_{10k}-HM-1 fue el más evidente. La incidencia de CNV fue la más baja, con un 38,81 % a los 28 días de la administración.

Tabla 55 Efecto del mPEG₂-NHS-HM-1 sobre la neovascularización coroidea en ratas

grupo	Tiempo de prueba					
	Día 3 El número total de puntos es de 294	Día 7 El número total de puntos es de 182	Día 14 El número total de puntos es de 137	Día 28 El número total de puntos es de 68	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)
	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)
control	249	84,69 %	144	79,12 %	88	64,23 %
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	165	56,12 %	101	55,49 %	63	45,99 %
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	148	50,34 %	88	48,35 %	59	43,07 %
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	155	52,72 %	95	52,20 %	63	45,99 %
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	150	51,02 %	93	51,10 %	61	44,53 %

5 Resultados: La detección de FFA, 3 días después de la administración, la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento con mPEG₂-NHS-HM-1 fue significativamente diferente a la de antes de la administración; la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento se redujo gradualmente 7 y 14 días después de la administración de los péptidos en comparación con antes de la administración; la fuga de fluoresceína fue incluso menor en 28 días después de la administración en comparación con 14 días después de la administración. Los resultados indicaron que el mPEG₂-NHS-HM-1 podía tratar la neovascularización coroidea en ratas. El efecto de mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1 fue el más evidente. La incidencia de CNV fue la más baja, con un 39,71 % a los 28 días de la administración.

Tabla 56 Efecto del mPEG-ALD-HM-1 sobre la neovascularización coroidea en ratas

grupo	Tiempo de prueba							
	Día 3 El número total de puntos es de 290		Día 7 El número total de puntos es de 182		Día 14 El número total de puntos es de 132		Día 28 El número total de puntos es de 71	
	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)
control	242	83,45 %	140	76,92 %	87	65,91 %	42	59,15 %
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	160	55,17 %	96	52,75 %	62	46,97 %	33	46,48 %
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	141	48,62 %	84	46,15 %	55	41,67 %	28	39,44 %
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	150	51,72 %	89	48,90 %	60	45,45 %	29	40,85 %
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	152	52,41 %	92	50,55 %	62	46,97 %	30	42,25 %

10 Resultados: La detección de FFA, 3 días después de la administración, la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento con mPEG-ALD-HM-1 fue significativamente diferente a la de antes de la administración; la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento se redujo gradualmente 7 y 14 días después de la administración de los péptidos en comparación con antes de la administración; la fuga de fluoresceína fue incluso menor en 28 días después de la administración en comparación con 14 días después de la administración. Los resultados indicaron que el mPEG-ALD-HM-1 podía tratar la neovascularización coroidea en ratas. El efecto de mPEG-ALD_{10k}-HM-1 fue el más evidente. La incidencia de CNV fue la más baja, con un 39,44 % a los 28 días de la administración.

15

Tabla 57 Efecto del mPEG-bALD-HM-1 sobre la neovascularización coroidea en ratas

grupo	Tiempo de prueba					
	Día 3 El número total de puntos es de 293	Día 7 El número total de puntos es de 185	Día 14 El número total de puntos es de 138	Día 28 El número total de puntos es de 69	Puntos de fuga #	Tasa de incidencia de la CNV (%)
control	243	82,94 %	142	76,76 %	90	65,22 %
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	162	55,29 %	97	52,43 %	65	47,10 %
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	142	48,46 %	86	46,49 %	58	42,03 %
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	151	51,54 %	91	49,19 %	63	45,65 %
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	153	52,22 %	94	50,81 %	65	47,10 %

5 Resultados: La detección de FFA, 3 días después de la administración, la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento con mPEG-bALD-HM-1 fue significativamente diferente a la de antes de la administración; la fuga de fluoresceína en el grupo de tratamiento se redujo gradualmente 7 y 14 días después de la administración de los péptidos en comparación con antes de la administración; la fuga de fluoresceína fue incluso menor en 28 días después de la administración en comparación con 14 días después de la administración. Los resultados indicaron que el mPEG-bALD-HM-1 podía tratar la neovascularización coroidea en ratas. El efecto de mPEG-ALD_{10k}-HM-1 fue el más evidente. La incidencia de CNV fue la más baja, con un 39,13 % a los 28 días de la administración.

Ejemplo 16: Efecto del mPEG-HM-1 en los vasos sanguíneos de la retina en ratones con OIR

10 Establecimiento del modelo OIR: La exposición de los ratones jóvenes y de sus madres a un entorno hiperóxico del 75 % desde el día 7 al 12 después del nacimiento de los ratones C57/B16 provocó una rápida desaparición de los capilares en la retina central. Al volver al aire interior el día 12, los vasos sanguíneos de la retina, al exponerse a la hiperoxia, desaparecieron rápidamente, provocando una extensa neovascularización anormal, y la parte central de la retina permaneció en gran medida avascular durante mucho tiempo. Despues de que los vasos sanguíneos desaparecieran por completo, el día 13, se administró solución salina fisiológica (grupo de control negativo), mPEG-SC-HM-1, mPEG₂-NHS-HM-1, mPEG-ALD_{10k}-HM-1 y mPEG-bALD-HM-1, mediante inyección intravítreas, y se evaluaron los vasos retinianos el día 17 (para marcar los vasos no cerrados, se inyectaron 50 µl de lectina de tomate marcada con Texas Red en el ventrículo izquierdo y se hicieron circular durante 5 minutos). Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 58.

15

Tabla 58 Efecto del mPEG-HM-1 sobre los vasos sanguíneos de la retina en los ratones OIR

Grupo	dosis (µg)	Área de racimos neovasculares (mm ²)	Tasa de inhibición (%)
control	-	0,221±0,006	0,00 %
mPEG-SC _{5k} -HM-1	25	0,116±0,012	47,42 %*
mPEG-SC _{10k} -HM-1	50	0,096±0,008	56,56 %**
mPEG-SC _{20k} -HM-1	100	0,110±0,010	50,23 %**
mPEG-SC _{40k} -HM-1	200	0,119±0,005	46,18 %*
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	25	0,119±0,007	46,35 %*
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	50	0,100±0,006	54,63 %**
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	100	0,112±0,011	49,27 %**
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	200	0,120±0,008	45,92 %*
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	25	0,108±0,006	50,98 %**
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	50	0,085±0,007	61,75 %**
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	100	0,095±0,009	57,03 %**
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	200	0,106±0,010	52,02 %**
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	25	0,108±0,008	51,17 %**
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	50	0,083±0,006	62,35 %**
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	100	0,097±0,011	56,22 %**
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	200	0,110±0,012	50,31 %**

En comparación con el control negativo, los grupos neovasculares en la retina de los ratones OIR tratados con mPEG-SC-HM-1, mPEG₂-NHS-HM-1, mPEG-ALD_{10k}-HM-1 y mPEG-bALD-HM-1 se redujeron significativamente. Entre ellos, mPEG-SC_{10k}-HM-1 fue el mejor en el grupo de administración de mPEG-SC-HM-1, y la tasa de inhibición fue del 56,56

5 % cuando la dosificación fue de 50 µg. Entre el grupo de administración de mPEG₂-NHS-HM-1, el más eficaz es mPEG₂-NHS_{10k}-HM-1, en el que la tasa de inhibición es de 1 54,63 % cuando la dosificación es de 50 µg; mPEG-ALD_{10k}-HM-1 es el mejor entre el grupo de administración de mPEG-ALD-HM-1. La tasa de inhibición alcanzó el 61,75 % a 50 µg; el mPEG-bALD_{10k}-HM-1 es el mejor en el grupo de administración del mPEG-bALD-HM-1, y la tasa de inhibición alcanzó el 62,35 % cuando la dosis fue de 50 µg.

Ejemplo 17: Efecto del mPEG-HM-1 sobre la neovascularización en modelos de rata de retinopatía prematura

10 Se utilizó un modelo animal inducido por oxígeno fluctuante para dividir aleatoriamente a las ratas recién nacidas que dieron a luz naturalmente en el mismo día (dentro de las 12 horas) en tres grupos: el grupo del modelo oxigenado, el grupo de tratamiento oxigenado y el grupo de control normal. El grupo del modelo oxigenado se subdividió en tres subgrupos y, junto con el grupo de tratamiento oxigenado, se colocó en una cámara de oxígeno semicerrada hecha de plexiglás. La cámara se conectó al oxígeno médico y el analizador de oxígeno se ajustó a una concentración del 80 % ± 2 %. Despues de 24 horas, se introdujo gas nitrógeno en la cámara de oxígeno, y la concentración de oxígeno se ajustó al 10 % ± 2 % y se mantuvo durante 24 horas. La concentración de oxígeno se controló 8 veces al día, y la temperatura ambiente en la cabina de control fue de 23 °C ± 2 °C. El cambio de lecho, la adición de comida, el cambio de agua y la sustitución de las ratas madre se realizaron una vez al día. El grupo de control normal fue colocado en un entorno de instalaciones para animales. En comparación con el grupo de control, el modelado se consideraba exitoso si la tinción de la enzima ADP del parche retiniano mostraba cambios vasculares evidentes, el número de células endoteliales vasculares que atravesaban la membrana interna de la retina hacia el vítreo aumentaba, y la diferencia era estadísticamente significativa.

15 20 Los componentes terapéuticos oxigenados fueron divididos en cuatro subgrupos, y en el 7º día de modelado, mPEG-SC-HM-1, mPEG₂-NHS-HM-1, mPEG-ALD_{10k}-HM-1, y mPEG-bALD-HM-1 fueron respectivamente administrados por inyección intravítrea. Sólo se administró solución salina normal al grupo del modelo de oxígeno y al grupo de control. Las administraciones continuaron durante una semana. El 14º día, tras la eutanasia con anestesia de éter, se extrajeron los globos oculares, se fijaron en una solución de paraformaldehído de 40 g/l durante 24 horas, se deshidrataron con alcohol de gradiente y se decoloraron con xileno. Tras la inmersión en cera, se realizó una sección en serie con un grosor de 4 µm, en la que las secciones se mantuvieron alejadas del disco óptico. Las secciones son paralelas al plano sagital de la córnea al disco óptico. Se seleccionaron al azar diez secciones por globo ocular para teñirlas con hematoxilina y eosina, y se contó el número de células endoteliales vasculares que atravesaban la membrana interna de la retina (sólo se contó el núcleo endotelial vascular estrechamente relacionado con la membrana interna de la retina), y se contó el número promedio de células endoteliales por globo ocular y por corte.

25 30 Resultados: en el grupo de control, no se encontró ninguna o muy pocas láminas en las que los núcleos endoteliales vasculares hubieran atravesado la membrana interna de la retina hacia el cuerpo vítreo. En el grupo modelo, había muchos núcleos endoteliales vasculares que habían atravesado la membrana interna de la retina, algunos de los cuales estaban aislados y otros agrupados. Al mismo tiempo, estos núcleos endoteliales vasculares también se observaron en algunas secciones adyacentes a los vasos profundos de la retina, lo que confirma que se originaron en la retina en lugar de en el vítreo u otros tejidos del ojo. En las secciones del grupo de tratamiento sólo se observaron algunos de los núcleos endoteliales vasculares que atravesaron la membrana de la retina. Los resultados experimentales se muestran en la tabla 59.

Tabla 59 Recuento de núcleos de células endoteliales vasculares de la retina

Grupo	Dosis (µg)	Recuento de núcleos celulares
mPEG-SC _{5k} -HM-1	25	9,104±3,087
mPEG-SC _{10k} -HM-1	50	8,528±3,109
mPEG-SC _{20k} -HM-1	100	7,372±2,078
mPEG-SC _{40k} -HM-1	200	8,089±2,935
mPEG ₂ -NHS _{5k} -HM-1	25	9,212±3,134
mPEG ₂ -NHS _{10k} -HM-1	50	8,786±3,072
mPEG ₂ -NHS _{20k} -HM-1	100	7,683±2,914
mPEG ₂ -NHS _{40k} -HM-1	200	8,495±3,036

(continuación)

Grupo	Dosis (μg)	Recuento de núcleos celulares
mPEG-ALD _{5k} -HM-1	25	8,927±2,902
mPEG-ALD _{10k} -HM-1	50	7,581±1,903
mPEG-ALD _{20k} -HM-1	100	7,036±1,315
mPEG-ALD _{40k} -HM-1	200	8,673±2,756
mPEG-bALD _{5k} -HM-1	25	8,852±2,933
mPEG-bALD _{10k} -HM-1	50	7,627±1,892
mPEG-bALD _{20k} -HM-1	100	7,158±1,724
mPEG-bALD _{40k} -HM-1	200	8,539±2,218
Grupo de modelos	-	26,397±2,104
control	-	1,317±0,262

Los resultados mostraron que, en comparación con los del grupo del modelo oxigenado (26,397±2,104), los grupos de tratamiento con mPEG-HM-1 tenían recuentos de núcleos de células endoteliales vasculares significativamente menores, lo que demostró que el mPEG-HM-1 puede inhibir la neovascularización del modelo de retinopatía inducida por oxígeno en ratas neonatales hasta cierto punto. El mejor efecto fue generado por mPEG-ALD_{20k}-HM-1, y el recuento de células fue de 7,036±1,315 cuando la dosis fue de 100 μg.

Listado de secuencias

- 5 <110> NANJING ANJI BIOLOGICALTECHNOLOGYCO.,LTD
- 10 <120> INHIBIDOR DE LA ANGIOGÉNESIS MODIFICADO CON POLIETILENGLICOL HM-1 Y SU
APLICACIÓN
- <160> 16
- <170> Patente En la versión 3.3
- <210> 1
- <211> 14
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencias artificiales
- <400>1
- mPEG-SC5k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10
- <210> 2
- 20 <211> 14
- <212> PRT
- <213> Secuencias artificiales
- <400>2
- mPEG-SC10k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10
- 25 <210> 3

<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>3

5 mPEG-SC20k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
 1 5 10

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
10 <400>4

10 mPEG-SC40k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
 1 5 10

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
15 <213> Secuencias artificiales
<400>5

15 mPEG2-NHS5k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
 1 5 10

<210> 6
<211> 14
20 <212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>6

20 mPEG2-NHS10k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
 1 5 10

<210> 7
25 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>7

25 mPEG2-NHS20k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
 1 5 10

<210> 8
30 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>8

mPEG2-NHS40k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Secuencias artificiales
<400>9

mPEG-ALD5k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

<210> 10
<211> 14
10 <212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>10

mPEG-ALD10k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

<210> 11
15 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>11

mPEG-ALD20k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

20 <210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
<400>12

mPEG-ALD40k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

25 <210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencias artificiales
30 <400>13

mPEG-bALD5k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

<210> 14
<211> 14
<212> PRT

<213> Secuencias artificiales

<400>14

mPEG-bALD10k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

<210> 15

5

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencias artificiales

<400>15

mPEG-bALD20k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

10

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencias artificiales

<400>16

15

mPEG-bALD40k- Arg Gly Ala Asp Arg Ala Gly Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol, que comprende la secuencia de mPEG-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Arg-Asp.
- 5 2. Un inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol según la reivindicación 1, en el que el mPEG se selecciona del grupo de mPEG-SC, mPEG₂-NHS, mPEG-ALD o mPEG-bALD, con un peso molecular que oscila entre 500 y 40.000 Dalton.
3. Un inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol según la reivindicación 2, que comprende al menos una de las siguientes secuencias:
 - 10 mPEG-SC_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-SC_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-SC_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-SC_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG₂-NHS_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG₂-NHS_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - 15 mPEG₂-NHS_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG₂-NHS_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-ALD_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-ALD_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - 20 mPEG-ALD_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-ALD_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-bALD_{5k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-bALD_{10k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp;
 - mPEG-bALD_{20k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp; o
 - mPEG-bALD_{40k}-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp.
- 25 4. El inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol según las reivindicaciones 1, 2 o 3 para su uso en el tratamiento de tumores, inflamación de la artritis y enfermedades oculares neovasculares mediante la inhibición de la neovascularización.
5. El inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol para su uso según la reivindicación 4, en el que los tumores comprenden un cáncer primario o secundario, melanoma, hemangiomas y sarcomas originados en la cabeza, cuello, cerebro, tiroides, esófago, páncreas, pulmón, hígado, estómago, mama, riñón, vesícula biliar, colon o recto, ovario, cérvix, útero, próstata, vejiga y testículos humanos.
- 30 6. El inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol para su uso según la reivindicación 4, en el que la inflamación de la artritis comprende artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis reactiva, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis infecciosa, artritis traumática y espondilitis anquilosante.
- 35 7. El inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol para su uso según la reivindicación 4, en el que las enfermedades oculares neovasculares comprenden la enfermedad ocular neovascular del iris, la enfermedad ocular neovascular de la coroides, la enfermedad ocular neovascular de la retina y la enfermedad ocular neovascular de la córnea.
- 40 8. El inhibidor de la angiogénesis HM-1 modificado con polietilenglicol según las reivindicaciones 1, 2 o 3 para su uso como medicamento para el tratamiento de tumores, inflamación de la artritis o enfermedades oculares neovasculares mediante la inhibición de la neovascularización, en el que el medicamento se administra por inyección.
9. El medicamento para su uso según la reivindicación 8, en el que la inyección incluye inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección vítreo intraocular y goteo intravenoso.