

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.06.06	(73) Titular(es): THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE 10550 NORTH TORREY PINES ROAD LA JOLLA, CA 92037 US
(30) Prioridade(s): 2004.06.04 US 577156 P 2004.07.01 US 585273 P 2005.02.24 US 655801 P	(72) Inventor(es): MARTIN FRIEDLANDER US MICHAEL I. DORRELL US HILDA EDITH AGUILAR US
(43) Data de publicação do pedido: 2007.03.28	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.03.28 107/2012	

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS NEOVASCULARES**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO DISPONIBILIZA COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS NEOVASCULARES, COMO AS DOENÇAS NEOVASCULARES DA RETINA E OS TUMORES, MEDIANTE ADMINISTRAÇÃO A UM DOENTE QUE SOFRE DE UMA DOENÇA NEOVASCULAR OU DE UM TUMOR DE UMA QUANTIDADE INIBIDORA DO DESENVOLVIMENTO VASCULAR DE UMA COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS SUPRESSORES DA ANGIOGÉNESE COMPREENDENDO UM FRAGMENTO ANGIOSTÁTICO DE TRIPTOFANIL-ARNTSINTETASE (TRPRS) E PELO MENOS UM COMPOSTO SELECIONADO ENTRE O GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR DA SINALIZAÇÃO VIA O FACTOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) E UM INIBIDOR DA SINALIZAÇÃO VIA INTEGRINAS. AS COMPOSIÇÕES DESTINADAS A UTILIZAÇÃO NOS MÉTODOS INCLUEM UMA COMBINAÇÃO DE UM FRAGMENTO ANGIOSTÁTICO DE TRIPTOFANIL-ARNT-SINTETASE (TRPRS) E PELO MENOS UM COMPOSTO ENTRE UM INIBIDOR DA SINALIZAÇÃO VIA O FACTOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) E UM INIBIDOR DA SINALIZAÇÃO VIA INTEGRINAS, JUNTAMENTE COM UM EXCIPIENTE FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL.

RESUMO**"Composições e métodos para o tratamento de doenças neovasculares"**

T2-TrpRS (SEQ ID NO: 1)

MSAKGIDYDKLIVRFSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPSSEAM
 HVGHLIPFIFTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYSYAVENAKDIACGFDINKTFIFSDLDYMGMSG
 FYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTDSDCIGKISFPALQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDV
 APRIGYPKALLHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTDTAKQIKTKVNKHAFSGGRDTIEEHRQFGNCDVDVSF
 MYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFO

T2-TrpRS-GD (SEQ ID NO: 2)

MSAKGIDYDKLIVRFSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPSSEAM
 HVGHLIPFIFTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYGD AVENAKDIACGFDINKTFIFSDLDYMGMSG
 FYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTDSDCIGKISFPALQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDV
 APRIGYPKALLHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTDTAKQIKTKVNKHAFSGGRDTIEEHRQFGNCDVDVSF
 MYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFO

O presente invento disponibiliza composições e métodos para o tratamento de doenças neovasculares, como as doenças neovasculares da retina e os tumores, mediante administração a um doente que sofre de uma doença neovascular ou de um tumor de uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de fármacos supressores da angiogénese compreendendo um fragmento angiostático de triptofanil-ARnt-sintetase (TrpRS) e pelo menos um composto seleccionado entre o grupo que consiste em um inibidor da sinalização via o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e um inibidor da sinalização via integrinas. As composições destinadas a utilização nos métodos incluem uma combinação de um fragmento angiostático de triptofanil-ARnt-sintetase (TrpRS) e pelo menos um composto entre um inibidor da sinalização via o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e um inibidor da sinalização via integrinas, juntamente com um excipiente farmacologicamente aceitável.

DESCRIÇÃO

"Composições e métodos para o tratamento de doenças neovasculares"

Campo do invento

Este invento refere-se a composições compreendendo uma combinação de fármacos angiostáticos e antiangiogénicos, em que as referidas composições são úteis no tratamento de doenças neovasculares, tais como as doenças neovasculares da retina.

Antecedentes do invento

A grande maioria das doenças que causa perda catastrófica da visão fá-lo em resultado da neovascularização ocular. Por exemplo, a degenerescência macular relacionada com a idade (DMI) afecta 12 a 15 milhões de americanos acima dos 65 anos e provoca perda da visão em 10-15% deles como efeito directo da neovascularização coroideia (sub-retiniana). A causa principal de perda da visão para os americanos abaixo dos 65 anos é a diabetes; 16 milhões de indivíduos nos Estados Unidos são diabéticos e 40.000 deles por ano sofrem complicações oculares da doença, muitas vezes um resultado da neovascularização retiniana. Embora a fotocoagulação por laser tenha sido eficaz na prevenção da perda grave da visão em subgrupos de doentes diabéticos de alto risco, a incidência global de retinopatia a 10 anos permanece praticamente inalterada. Para os doentes com neovascularização coroideia devido a DMI ou doença inflamatória ocular como histoplasiose ocular, a fotocoagulação, com algumas excepções, é ineficaz na prevenção da perda da visão. Apesar de as terapias fotodinâmicas não destrutivas, recentemente desenvolvidas, parecerem promissoras para reduzir temporariamente a perda individual em doentes com neovascularização coroideia previamente não tratável, somente 61,4% dos doentes tratados a intervalos de 3-4 meses apresentaram visão melhorada ou estabilizada em comparação com 45,9% do grupo tratado com placebo.

A DMI e a retinopatia diabética são as principais causas de perda da visão nas nações industrializadas e são-no em resultado de uma neovascularização anómala da retina. Como a retina consiste em camadas bem definidas de elementos neuronais, gliais e vasculares, perturbações relativamente pequenas como as observadas no edema ou na proliferação vascular podem conduzir a uma perda significativa da função visual. As degenerescências hereditárias retinianas, como a retinite pigmentar (RP), também estão associadas a anomalias vasculares como o estreitamento arteriolar e a atrofia vascular. Embora tenha sido feito um progresso significativo na identificação dos factores que promovem e inibem a angiogénese, não existe actualmente nenhum tratamento para tratar especificamente a doença vascular ocular.

As degenerescências hereditárias da retina afectam cerca de 1 em 3.500 indivíduos e são caracterizadas por cegueira nocturna progressiva, perda do campo visual, atrofia do nervo óptico, atenuação arteriolar, permeabilidade vascular alterada e perda da visão central progredindo frequentemente para cegueira completa (Heckenlively, J. R., editor, 1988; *Retinitis Pigmentosa*, Philadelphia: JB Lippincott Co.). A análise genética molecular destas doenças identificou mutações em mais de 110 genes diferentes, explicando apenas uma percentagem relativamente pequena dos indivíduos afectados conhecidos (Humphries *et al.*, 1992, *Science* **256**:804-808; Farrar *et al.* 2002, *EMBO J.* **21**:857-864.). Muitas destas mutações estão associadas a componentes enzimáticos e estruturais da maquinaria de fototransdução, incluindo a rodopsina, a cGMP-fosfodiesterase, a periferina/*rds* e o gene RPE65. Apesar destas observações, ainda não há tratamentos eficazes para retardar ou inverter a progressão destas doenças degenerativas da retina. Avanços recentes no campo da terapia génica conduziram a uma inversão com êxito dos fenótipos *rds* (Ali *et al.* 2000, *Nat. Genet.* **25**:306-310) e *rd* (Takahashi *et al.* 1999, *J. Virol.* **73**:7812-7816) em ratinhos e do fenótipo RPE65 em cães (Acland *et al.* 2001, *Nat. Genet.* **28**:92-95), quando o transgene do tipo selvagem é entregue a fotorreceptores ou ao epitélio pigmentar da retina (EPR) em animais com uma mutação específica.

A angiogénese é o processo através do qual se formam novos vasos sanguíneos. Em resposta a sinais químicos específicos, nascem capilares a partir de vasos existentes, que eventualmente aumentam de tamanho conforme as necessidades do organismo. Inicialmente as células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos, dividem-se numa direcção ortogonal ao vaso existente, formando um rebento novo. As células endoteliais adjacentes formam depois vacúolos grandes, rearranjando-se de modo a que os vacúolos se orientem de um extremo ao outro e, eventualmente, se fundam para formar o lúmen de um novo capilar (formação do tubo).

A angiogénese é estimulada por várias condições, por exemplo em resposta a um ferimento, e acompanha virtualmente todo o crescimento dos tecidos nos organismos vertebrados como os mamíferos. A angiogénese também desempenha um papel em determinados estados de enfermidade como certos cancros. O crescimento de tumores, por exemplo, requer o crescimento dos vasos sanguíneos para fornecer oxigénio e nutrientes ao tecido tumoral em crescimento. Além disso, a neovascularização ocular está associada à grande maioria das doenças oftalmológicas que conduzem a perda catastrófica da visão.

A angiogénese poderá ser contida ou inibida através de interferência com os sinais químicos que estimulam o processo angiogénico. Por exemplo, as células endoteliais angiogénicas produzem proteases para digerir a lâmina basal que rodeia os vasos sanguíneos, abrindo assim um caminho para o novo capilar. A inibição destas proteases, ou da sua formação, pode evitar a formação de novos vasos. De modo idêntico, as células endoteliais proliferam em resposta a sinais químicos. Sinais de proliferação particularmente importantes incluem as famílias de proteínas do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF de "vascular endothelial growth factor") e do factor de crescimento dos fibroblastos (FGF de "fibroblast growth factor"). O envolvimento do VEGF na vascularização de determinados tumores já foi demonstrado. A interferência com estes processos de sinalização da proliferação também pode inibir a angiogénese.

A angiogénese envolve vários factores. As moléculas do factor de crescimento dos fibroblastos ácido e básico são mitogénios para as células endoteliais e outros tipos de células. Um mitogénio extremamente selectivo para as células endoteliais vasculares é o VEGF.

No adulto normal, a angiogénese é fortemente regulada e está limitada à cicatrização de feridas, à gravidez e ao ciclo uterino. A angiogénese é activada por moléculas angiogénicas específicas como o factor de crescimento dos fibroblastos básico e ácido (FGF), o VEGF, a angiogenina, o factor de crescimento transformante (TGF de "transforming growth factor"), o factor de necrose tumoral α (TNF- α de "tumor necrosis factor- α ") e o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF de "platelet derived growth factor"). A angiogénese pode ser suprimida por moléculas inibidoras como o interferão α , a trombospondina 1, a angiostatina e a endostatina. É o equilíbrio entre estes estimuladores e inibidores naturais que controla a vasculatura capilar normalmente quiescente. Quando este equilíbrio é perturbado, como acontece em determinados estados de enfermidade, as células endoteliais dos capilares são induzidas a proliferar, migrar e, no final, a diferenciarem-se.

A angiogénese desempenha um papel central numa variedade de doenças, incluindo o cancro e a neovascularização ocular. Também foi demonstrado que o crescimento e a metástase sustentados de uma variedade de tumores estão dependentes do crescimento de novos vasos sanguíneos do hospedeiro para o tumor em resposta a factores angiogénicos derivados do tumor. A proliferação de novos vasos sanguíneos em resposta a uma variedade de estímulos é a característica dominante na maioria das doenças oftalmológicas, incluindo a retinopatia diabética proliferativa, a DMI, o glaucoma neovascular, a queratite intersticial e a retinopatia da prematuridade. Nestas doenças, as lesões dos tecidos podem estimular a libertação de factores angiogénicos, resultando numa proliferação dos capilares. O VEGF desempenha um papel dominante na neovascularização da íris e nas retinopatias neovasculares. Embora os relatórios mostrem claramente uma correlação entre os níveis de VEGF intra-ocular e a neovascularização ocular retinopática isquémica, o FGF

provavelmente também tem um papel. Sabe-se que o FGF básico e ácido está presente na retina do adulto normal, apesar de não existir uma correlação consistente entre os seus níveis detectáveis e a neovascularização. Isto poderá dever-se, em grande medida, ao facto de o FGF se ligar muito fortemente a componentes carregados da matriz extracelular, podendo não estar prontamente disponível numa forma de difusão livre que seria detectada pelos ensaios padrão de fluidos intra-oculares.

Uma via comum final na resposta angiogénica envolve a troca de informações mediada por integrinas entre uma célula endotelial vascular proliferativa e a matriz extracelular. Esta classe de receptores de adesão, denominados integrinas, é expressa como heterodímeros que possuem uma subunidade α e β em todas as células. Uma destas integrinas, $\alpha_v\beta_3$, é o membro mais promíscuo desta família e permite que as células endoteliais interajam com uma ampla variedade de componentes da matriz extracelular. Os antagonistas peptídicos e do tipo anticorpo desta integrina inibem a angiogénese mediante uma indução selectiva da apoptose das células endoteliais vasculares proliferativas. Existem duas vias de angiogénese dependentes de citocinas e estas poderão ser definidas pela sua dependência de diferentes integrinas das células vasculares, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$. Especificamente, a angiogénese induzida por FGF básico e a angiogénese induzida por VEGF dependem, respectivamente, da integrina $\alpha_v\beta_3$ e da integrina $\alpha_v\beta_5$, uma vez que antagonistas do tipo anticorpo de cada integrina bloqueiam selectivamente uma destas vias angiogénicas nos modelos de córnea de coelho e de membrana corioalantóide (CAM) de pintainho. Os antagonistas peptídicos que bloqueiam todas as integrinas α_v inibem a angiogénese estimulada por FGF e por VEGF. Embora os vasos sanguíneos oculares do ser humano normal não apresentem nenhuma das integrinas, as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ são selectivamente apresentadas nos vasos sanguíneos de tecidos de doentes com uma doença oftalmológica neovascular activa. Apesar de apenas a $\alpha_v\beta_3$ ter sido observada de forma consistente no tecido de doentes com DMI, ambas as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ estavam presentes nos tecidos de doentes com retinopatia diabética proliferativa. Antagonistas peptídicos das integrinas, administrados de forma sistémica, bloquearam a formação de

novos vasos sanguíneos num modelo de vasculogénese da retina em ratinho.

Por esse motivo, os agentes antiangiogénicos desempenham um papel no tratamento da degeneração retiniana, para evitar os efeitos prejudiciais destes factores tróficos e de crescimento. Os agentes angiogénicos também desempenham um papel na promoção de uma vascularização desejável para atrasar a degeneração retiniana, através do aumento do fluxo sanguíneo para as células.

Amplos esforços de pesquisa têm contribuído para a nossa compreensão dos mecanismos da angiogénese durante a progressão da doença e, em resultado destes estudos, um grande número de moléculas angiostáticas tem sido, ou está actualmente a ser, testado em ensaios clínicos. Contudo, até ao momento, os resultados destes ensaios clínicos têm sido decepcionantes e os benefícios destes tratamentos antiangiogénicos em doentes têm sido, na melhor das hipóteses, mínimos.

Poderá ser necessário considerar muitos factores antes de as terapias angiostáticas serem finalmente bem-sucedidas. Os mecanismos compensatórios naturais poderão, no final, tornar as monoterapias angiogénicas obsoletas. Os fármacos angiostáticos geralmente visam uma única citocina ou uma via angiogénica intracelular isolada. *In vivo*, a angiogénese é provavelmente iniciada pela sinalização combinada de múltiplas vias. Assim, o bloqueio de uma via singular poderá ser insuficiente para prevenir a angiogénese durante o tratamento das doenças neovasculares. Complicando ainda mais a questão, também é provável que o bloqueio de uma via isolada induza uma compensação e papéis acrescidos por parte das outras vias angiogénicas.

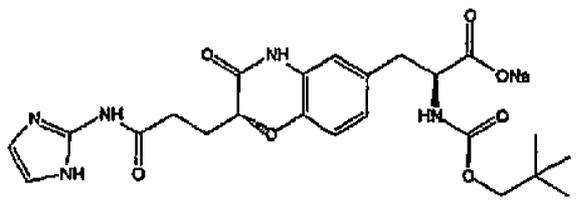
WO 03/080648 refere-se a composições de vectores virais adeno-associados recombinantes (rAAV) compreendendo segmentos de ácido nucleico que codificam produtos génicos terapêuticos e à sua utilização no fabrico de medicamentos para o tratamento de várias perturbações do olho, incluindo, por exemplo, a neovascularização retiniana, ocular ou coróideia (CNV).

Constatou-se agora que uma administração concomitante de uma combinação de compostos angiostáticos que visam diferentes vias reforça a potência angiostática e interfere também com o mecanismo compensador natural.

Sumário do invento

O presente invento refere-se a composições que são úteis num método de tratamento de uma doença neovascular, como seja uma doença neovascular retiniana, mediante administração a um mamífero que sofre de uma doença neovascular de uma determinada quantidade de uma combinação de fármacos supressores da angiogénese que é suficiente para inibir a formação de novos vasos sanguíneos.

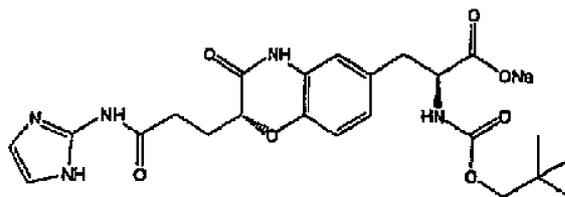
Num primeiro aspecto, o presente invento disponibiliza uma composição compreendendo (i) um fragmento angiostático de triptofanil-ARNt-sintetase (TrpRS), em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) o Composto 1 possuindo a fórmula:



O fragmento angiostático de TrpRS possui preferencialmente a sequência de resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 1. A composição poderá compreender ainda pelo menos um agente terapêutico seleccionado entre o grupo que consiste em um esteróide angiostático, um agente antineoplásico, um agente antibacteriano, um agente antiviral e um agente anti-inflamatório. Preferencialmente, o fragmento angiostático de TrpRS é um dímero.

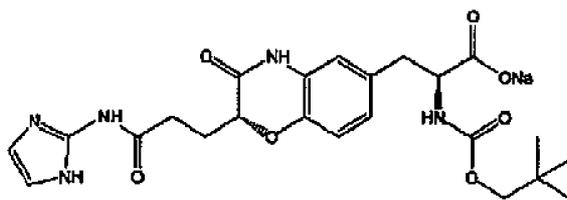
Numa concretização, a composição do primeiro aspecto do presente invento destina-se ao tratamento de uma doença neovascular.

Num segundo aspecto, o presente invento disponibiliza a utilização de (i) um fragmento angiostático de TrpRS, em que o fragmento angiostático da TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) o Composto 1 possuindo a fórmula



para a preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento de uma doença neovascular num mamífero através da administração de uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de fármacos compreendendo (i) um fragmento angiostático de TrpRS, em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) o Composto 1. A doença poderá ser uma doença neovascular retiniana. Preferencialmente, a combinação de fármacos destina-se a ser administrada por injeção intravítrea no olho de um mamífero que sofre de uma doença neovascular retiniana, de preferência seleccionada entre o grupo que consiste em uma retinopatia isquémica, uma hemorragia vascular, uma fuga vascular, uma coroidopatia, uma degenerescência macular relacionada com a idade, uma retinopatia diabética, uma pseudo-histoplasmose ocular, uma retinopatia da prematuridade, uma anemia das células falciformes e uma retinite pigmentar.

Num terceiro aspecto, o presente invento disponibiliza a utilização de (i) um fragmento angiostático de TrpRS, em que o fragmento angiostático da TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) o Composto 1 possuindo a fórmula:



para a preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento de um tumor num mamífero através da administração de uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de fármacos compreendendo (i) um fragmento angiostático de TrpRS, em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) o Composto 1. Numa concretização, o mamífero é um ser humano. Preferencialmente, o fragmento angiostático de TrpRS possui a sequência de resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

Num quarto aspecto, o presente invento disponibiliza uma composição farmacêutica compreendendo uma composição do primeiro aspecto do presente invento e um veículo farmacologicamente aceitável para ela.

As doenças neovasculares que podem ser tratadas pelas composições do presente invento incluem, sem limitação, doenças oculares como as doenças degenerativas da retina, as doenças degenerativas vasculares da retina, as retinopatias isquémicas, as hemorragias vasculares, a fuga vascular e as coroidopatias em mamíferos neonatos, juvenis ou totalmente maduros. As composições do presente invento também podem ser utilizadas para tratar, por exemplo, doenças neovasculares como os cancros do tipo tumor sólido (por exemplo, o cancro do pulmão, o cancro da mama e o cancro da próstata) e a artrite reumatóide.

Breve descrição das figuras

A Figura 1 representa as sequências de aminoácidos dos fragmentos angiostáticos de triptofanil-ARNt-sintetase designados por T2-TrpRS, SEQ ID NO: 1, e T2-TrpRS-GD, SEQ ID NO: 2 (um mutante desta).

A Figura 2 representa a sequência de aminoácidos dos fragmentos angiostáticos de triptofanil-ARNT-sintetase designados por mini-TrpRS, SEQ ID NO: 3, e T1-TrpRS, SEQ ID NO: 4.

A Figura 3 representa a sequência de aminoácidos da TrpRS completa (SEQ ID NO: 5) e indica a posição dos seus fragmentos T1, T2 e Mini.

A Figura 4 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 1, injectados por via intravítrea com PBS.

A Figura 5 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 1, injectados por via intravítrea com (A) uma concentração 0,5x (10 mg/ml) do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas; (B) uma concentração 1x (2 mg/ml) do Composto (2) aptâmero de VEGF; e (C) uma combinação do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas e do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 6 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 2, injectados por via intravítrea com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

A Figura 7 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 2, injectados por via intravítrea com uma concentração 0,1x (0,05 mg/ml) de T2-TrpRS.

A Figura 8 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 2, injectados por via intravítrea com uma concentração 0,1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 9 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 2, injectados por via intravítrea com uma combinação

de uma concentração 0,1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 10 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 3, injectados por via intravítrea com PBS.

A Figura 11 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 3, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS.

A Figura 12 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 3, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 13 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 3, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 14 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 4, injectados por via intravítrea com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

A Figura 15 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 4, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS.

A Figura 16 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 4, injectados por via intravítrea com uma concentração 0,5x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 17 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 4, injectados por via intravítrea com uma combinação

de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,5x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 18 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 5, injectados por via intravítrea com PBS.

A Figura 19 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 5, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS.

A Figura 20 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 5, injectados por via intravítrea com uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 21 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 5, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 22 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com PBS.

A Figura 23 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS

A Figura 24 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 25 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 26 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 27 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 28 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 6, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas e uma concentração normal do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 29 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 7, injectados por via intravítrea com PBS.

A Figura 30 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 7, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS.

A Figura 31 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 7, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 32 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 7, injectados por via intravítrea com uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 33 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 7, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas e uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 34 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 7, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas e uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 35 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos de controlo do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com PBS.

A Figura 36 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x do Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 37 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 38 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de T2-TrpRS.

A Figura 39 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de cada um dos compostos T2-TrpRS e Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

A Figura 40 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma concentração 1x de cada um dos compostos (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas e (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 41 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de cada um dos compostos T2-TrpRS e Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 42 representa fotomicrografias das camadas vasculares primária e secundária das retinas dos ratinhos do Exemplo 9, injectados por via intravítrea com uma combinação de uma concentração 1x de cada um dos inibidores T2-TrpRS, Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas e Composto (2) aptâmero de VEGF.

A Figura 43 é uma representação gráfica dos resultados de uma experiência de doseamento de T2-TrpRS

A Figura 44 é uma representação gráfica dos resultados de uma experiência de doseamento do aptâmero de VEGF.

A Figura 45 é uma representação gráfica de resultados que mostra a inibição da formação do plexo vascular profundo como uma função da concentração óptima administrada de aptâmero de VEGF e de composto T2-TrpRS, isoladamente e em combinação.

A Figura 46 é uma representação gráfica dos resultados de uma experiência de doseamento de um antagonista das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$.

A Figura 47 é uma representação gráfica de resultados que mostra a inibição da formação do plexo vascular profundo como uma função da concentração óptima administrada de um antagonista das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ do tipo pequena molécula e de T2-TrpRS, isoladamente e em combinação.

A Figura 48 é um resumo gráfico de resultados que mostra a inibição da formação do plexo vascular profundo com diversas combinações de terapias.

A Figura 49 é uma representação gráfica de resultados que mostra o grau de inibição da formação do plexo vascular profundo com diversas combinações de terapias.

A Figura 50 consiste numa série de fotomicrografias das camadas vasculares primária e profunda (secundária) com diversas terapias e combinações destas, aos níveis de doseamento indicados na Figura 49.

A Figura 51 é uma representação gráfica dos níveis de inibição da formação do plexo vascular com terapia de combinação tripla, a diversos níveis de doseamento.

A Figura 52 é uma representação gráfica semelhante à Figura 51, mas mostrando inibição >75%, >90% e igual a 100%.

A Figura 53 é uma representação gráfica dos níveis de inibição da formação do plexo vascular, que compara monoterapias versus terapias de combinação a diversos níveis de doseamento.

A Figura 54 é uma representação gráfica de níveis de inibição >75%, >90% e iguais a 100% da formação do plexo vascular, que compara monoterapias versus terapias de combinação a diversos níveis de doseamento.

A Figura 55 é uma representação gráfica de resultados que mostra uma área de tufos neovasculares como uma função de diversas monoterapias, bem como de uma terapia de combinação tripla, utilizando uma injeção única de um agente ou agentes terapêutico(s).

A Figura 56 é semelhante à Figura 55, mas apresenta os resultados de uma injeção dupla de um agente ou agentes terapêutico(s).

A Figura 57 é uma representação gráfica de resultados que mostra áreas de tufos neovasculares como uma função de várias monoterapias, terapias duplas e uma terapia tripla.

A Figura 58 consiste numa série de fotomicrografias que mostra as retinas de ratinhos tratadas com compostos angiostáticos isoladamente e em combinação.

A Figura 59 ilustra a estrutura do Composto (2) aptâmero de VEGF (SEQ ID NO: 6), o pegaptanib sódico.

A Figura 60 representa um gráfico de sobrevivência para ratos portadores de tumores tratados com uma composição do invento (quadrados) versus ratos de controlo tratados apenas com PBS (triângulos).

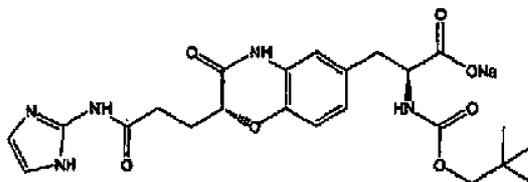
Descrição detalhada das concretizações preferidas

Os fragmentos angiostáticos de TrpRS são um fragmento de 43 kDa (isto é, o fragmento T2, "T2-TrpRS", SEQ ID NO: 1, ou um mutante de T2-TrpRS, "T2-TrpRS-GD", SEQ ID NO: 2; ambos apresentados na Figura 1), o fragmento de 48 kDa conhecido como mini-TrpRS (SEQ ID NO: 3, apresentado na Figura 2) e o fragmento de 46 kDa conhecido como T1-TrpRS (SEQ ID NO: 4, apresentado na Figura 2). A sequência de resíduos de aminoácidos de T2-TrpRS-GD (SEQ ID NO: 2) difere da SEQ ID NO: 1 ao nível de duas substituições de resíduos de aminoácidos (ou seja, S121G e Y122D). A sequência de resíduos de aminoácidos da TrpRS humana completa (SEQ ID NO: 5) está apresentada na Figura 3, juntamente com uma indicação da posição dos seus fragmentos T1, T2 e mini. Sem se ser limitado por aspectos teóricos, crê-se que os fragmentos angiostáticos de TrpRS podem formar dímeros não covalentes (ver, por exemplo, Yu *et al. J. Biol. Chem.* 2004, **279**: 8378-8388), que poderão contribuir para a actividade biológica dos fragmentos. Por conseguinte, qualquer referência a um fragmento angiostático de TrpRS (por exemplo, T1-TRpRS, T2-TrpRS, mini-TrpRS), aqui e nas reivindicações anexas, deve ser

interpretada como uma referência à forma monomérica, à forma dimérica ou a uma sua mistura.

O composto que possui a fórmula do Composto (1) está disponível através de Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) como EMD 472523 e é um inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas.

Composto (1)



O inibidor da sinalização via VEGF pegaptanib sódico [Composto (2)] é um aptâmero à base de ARN contendo 2'-fluoropirimidinas, resistente a nucleases e específico para VEGF-165 e é um oligonucleótido polietoxilado possuindo a seguinte fórmula [SEQ ID NO: 6; Figura 59, R na Figure 59 é uma cadeia de polietilenoglicol (PEG) de 40 quilodalton]:

5'-PEG 40K-elemento de ligação (C5)amino-CfGmGmArArUfCfAmGm-UfGmAmAmUfGmCfUfUfAmUfAmCfAmUfCfCfCm3'-3'dT

em que:

Cf = 2'fluoro C	Ar = 2'OH (ribo) A
Uf = 2'fluoro U	3' - 3'dT = desoxiT invertido
Am = 2'OMe A	elemento de ligação (C5)amino = elemento de ligação pentilamino
Gm = 2'OMe G	PEG 40K = amida de polietilenoglicol de 40K

Um oligonucleótido polietoxilado de SEQ ID NO: 6 é comercializado sob a designação comercial MACUGEN® por Eyetech Pharmaceuticals, Inc. e é também conhecido como NX1838 ou pegaptanib sódico.

Numa concretização, a combinação de fármacos também inclui pelo menos um agente terapêutico adicional tal como um esteróide angiostático, um agente antineoplásico, um agente antibacteriano, um agente antiviral, um agente anti-inflamatório e similares.

Os exemplos de esteróides angiostáticos adequados incluem o acetato de anecortave e o acetato de triancinolona.

Os exemplos de agentes antineoplásicos adequados incluem aclarrubicina; cloridrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutatimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginase; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; cloridrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; bussulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero, carboplatina; carmustina; cloridrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatina; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; cloridrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatina; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorrubicina; cloridrato de doxorrubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; cloridrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; empromato; epipropidina; cloridrato de epirubicina; erbulozol; cloridrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; óleo etiodado ¹³¹I; etoposido; fosfato de etoposido; etoprine; cloridrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gencitabina; cloridrato de gencitabina; ouro ¹⁹⁸Au; hidroxíureia; cloridrato de idarrubicina; ifosfamida; imofosine; interferão alfa-2a; interferão alfa-2b; interferão alfa-n1; interferão alfa-n3; interferão beta-1a; interferão gama-1b; iproplatino; cloridrato de irinotecano; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; cloridrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; cloridrato de

losoxantrona; masoprocol; maitansina; cloridrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprine; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospero; mitotano; cloridrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargase; peliomicina; pentamustine; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipossulfano; cloridrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; cloridrato de procarbazona; puromicina; cloridrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; cloridrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; cloridrato de espirogermânio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; cloreto de estrôncio ⁸⁹Sr; sulofenur; talisomicina; taxano; taxóide; tecogalan sódico; tegafur; cloridrato de teloxantrona; temoporfina; teniposido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; cloridrato de topotecano; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; cloridrato de tubulozol; mostarda de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartarato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina e cloridrato de zorrubicina.

Os exemplos de agentes antibacterianos apropriados incluem, embora não estejam limitados a estes, penicilinas, aminoglicósidos, macrólidos, monobactamas, rifamicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, imipenem, ácido fusídico, novobiocina, fosfomicina, fusidato de sódio, neomicina, polimixina, capreomicina, colistimetato, colistina, gramacidina, minociclina, doxiciclina, vanomicina, bacitracina, canamicina, gentamicina, eritromicina e cefalosporinas.

Os exemplos de agentes anti-inflamatórios adequados incluem, embora não estejam limitados a estes, aspirina (ácido acetilsalicílico), indometacina, indometacina de sódio tri-hidratada, salicilamida, naproxeno, colchicina, fenoprofeno, sulindac, diflunisal, diclofenac, indoprofeno e salicilamida de sódio.

Os exemplos de agentes antivirais apropriados incluem, embora não estejam limitados a estes, alfa-metil-p-adamantanometilamina, 1-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida, 9-(2-hidroxi-etoxi)metilguanina, adamantanamina, 5-iodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferão, adenina arabinosídeo, CD4, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 9-(2-hidroxietoximetil)guanina (aciclovir), ácido fosfonofórmico, 1-adamantanamina, péptido T e 2',3'-didesoxicitidina.

As doenças neovasculares que podem ser tratadas pelas composições do presente invento incluem, sem limitação, as doenças neovasculares do olho (por exemplo, as doenças neovasculares retiniana e coróideia), o glaucoma neovascular, o pterígio, os cânceros do tipo tumor sólido (por exemplo, o cancro do pulmão, o cancro da mama e o cancro da próstata), a osteoartrite, a artrite reumatóide, as anomalias e malformações vasculares (por exemplo, hemangiomas, linfangiomas e similares) e a psoríase.

As composições do presente invento poderão ser utilizadas num método para o tratamento de doenças neovasculares retinianas num mamífero. Preferencialmente, o método compreende a injeção por via intravítrea, no olho de um mamífero que sofre de uma doença neovascular, de uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de composições antiangiogénicas e angiostáticas que fornecem um fragmento angiostático de TrpRS como descrito acima, o inibidor da sinalização via VEGF pegaptanib sódico e o Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas.

Este método pode ser utilizado para tratar doenças oculares como sejam as doenças degenerativas vasculares, as retinopatias isquémicas, as hemorragias vasculares, a fuga vascular e as coroidopatias em mamíferos neonatos, juvenis ou

totalmente maduros. Os exemplos destas doenças incluem a degenerescência macular relacionada com a idade, a retinopatia diabética, a pseudo-histoplasmose ocular, a retinopatia da prematuridade, a anemia das células falciformes, o hemangioma, o pterígio, a oclusão isquémica da veia central da retina, a oclusão de ramo da veia retiniana, o melanoma ocular, o blastoma da retina e a retinite pigmentar, assim como lesões da retina.

Outro aspecto do presente invento consiste numa composição terapêutica útil para o tratamento de doenças neovasculares, que compreende um fragmento angiostático de TrpRS como descrito acima, o inibidor da sinalização via VEGF pegaptanib sódico e o Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas, juntamente com um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis.

Numa concretização preferida, a composição compreende ainda pelo menos um agente terapêutico adicional, tal como um esteróide angiostático, um agente antineoplásico, um agente antibacteriano, um agente antiviral, um agente anti-inflamatório e similares.

As composições do presente invento poderão ser utilizadas num método para o tratamento de uma doença neovascular, que compreende administrar a um mamífero que sofre de uma doença neovascular uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de fármacos que compreendem um fragmento angiostático de triptofanil-ARNT-sintetase (TrpRS) como descrito acima, o inibidor da sinalização via o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pegaptanib sódico e o Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas.

Geralmente, uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma composição do presente invento é pelo menos igual a cerca de 10 µg/kg de peso corporal e, na maioria dos casos, não ultrapassa cerca de 8 mg/kg de peso corporal por dia para os tratamentos sistémicos. Preferencialmente, a dose encontra-se compreendida no intervalo entre cerca de 10 µg/kg de peso corporal e cerca de 1 mg/kg de peso corporal por dia. Para o tratamento ocular por via intravítrea de doentes

humanos, a dose preferida encontra-se compreendida no intervalo entre cerca de 0,1 e cerca de 5 miligramas por olho para um dado tratamento. As composições poderão ser administradas numa dose única ou em doses múltiplas ao longo do tempo. Um perito no campo médico será capaz de determinar a dose terapêutica eficaz óptima de uma composição do presente invento, tendo em consideração o doente particular, os fármacos presentes na composição, o estado da doença e outros factores que são bem conhecidos no campo médico.

As composições terapêuticas deste invento podem ser concretizadas sob uma variedade de formas físicas. Estas formas incluem, por exemplo, formas farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas, tais como comprimidos, pílulas, pós, soluções ou suspensões líquidas, aerossóis, lipossomas, supositórios, soluções injectáveis e para infusão e formas de libertação controlada. Um perito no campo médico seleccionará uma forma farmacêutica adequada dependendo do modo de administração pretendido e da doença que deseja tratar, utilizando princípios farmacológicos bem conhecidos na técnica.

Uma composição terapêutica de acordo com este invento pode ser administrada utilizando vias de administração convencionais, tais como a via parentérica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intralesional, intra-esternal, intravítrea, intracraniana ou em aerossol. Também é possível usar vias de administração tópicas, com aplicação das composições localmente numa parte particular do corpo (por exemplo, olho, pele, tracto intestinal inferior, vagina, recto) conforme apropriado. As composições terapêuticas também incluem veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis convencionais que são conhecidos pelos peritos na técnica.

Geralmente, as composições terapêuticas do presente invento podem ser formuladas e administradas utilizando métodos e composições similares aqueles utilizados para as classes individuais de ingredientes activos presentes nas composições. Os peritos na técnica compreenderão que as doses convencionais podem variar dependendo dos ingredientes activos particulares na composição, bem como da saúde, peso,

idade, sexo e condição ou doença do doente e do modo de administração pretendido.

As composições terapêuticas deste invento incluem veículos, excipientes e transportadores farmacologicamente apropriados e farmacêuticamente aceitáveis. Em geral, estes veículos incluem soluções, emulsões ou suspensões aquosas ou alcoólicas/aquosas, incluindo solução salina e meios tamponados como a solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os veículos parentéricos podem incluir solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, solução de lactato de Ringer ou óleos fixos. Adicionalmente, os veículos intravenosos podem incluir reabastecedores de fluidos e de nutrientes e reabastecedores de electrólitos, como aqueles à base de dextrose de Ringer. Também podem estar presentes excipientes como conservantes e outros aditivos, tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes. Os adjuvantes de formulação, veículos e outros excipientes adequados, bem como os métodos de formulação de composições farmacêuticas estão descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 14th Ed., Mack Publishing Co., 1970, particularmente em Part VIII, "Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture", pp. 1461 - 1762.

As composições terapêuticas do presente invento podem ser embaladas em garrafas ou frascos adequadamente esterilizados, em formas multidoses ou de dose unitária. Os recipientes são preferencialmente selados de modo hermético após serem cheios com a composição do invento. De preferência, as composições são embaladas num recipiente contendo uma etiqueta aposta, em que a etiqueta identifica os fármacos presentes na composição e contém um aviso numa forma prescrita por uma agência governamental, como seja a Food and Drug Administration dos Estados Unidos, que reflecte a aprovação da composição ao abrigo das leis apropriadas, informações posológicas e similares. A etiqueta contém preferencialmente informações sobre a composição que são úteis para um profissional de cuidados de saúde que vai administrar a composição a um doente. De preferência, a embalagem também contém materiais informativos impressos

relacionados com a administração da composição, instruções, indicações e quaisquer avisos exigidos necessários.

MÉTODOS

Modelo de angiogênese retiniana em ratinho neonato

Descrição do modelo. Imediatamente após o nascimento (dia zero pós-natal; "P0"), a vasculatura retiniana está virtualmente ausente no ratinho. Às quatro semanas após o nascimento (P28), a retina atingiu um padrão adulto de vasos sanguíneos retinianos coincidente com o início da visão. A neovascularização fisiológica da retina ocorre durante este período através de um padrão de desenvolvimento bifásico e estereotípico de angiogênese. Durante a fase primária do desenvolvimento vascular retiniano, os vasos peripapilares semelhantes a raios de uma roda crescem radialmente a partir da artéria e da veia retiniana central, ficando progressivamente interligados por um plexo capilar que se forma entre eles. Este "plexo retiniano interno" cresce em área, volume e complexidade, de forma centrífuga, como uma monocamada no interior da camada de fibras nervosas durante os primeiros sete a dez dias após o nascimento.

A segunda fase de formação de vasos sanguíneos retinianos começa entre os dias 7 (P7) e 10 (P10) pós-natais, quando ramificações colaterais brotam dos capilares do plexo superficial e penetram na retina, onde as suas pontas se ramificam e anastomosam lateralmente para formar um "plexo vascular profundo" plano. Embora o plexo vascular profundo esteja em posição por volta do dia P14, ele sofre uma remodelação extensa desde o dia P14 até ao dia P21. É interessante salientar que a formação destas redes vasculares no ratinho neonato é inegavelmente similar aos eventos que ocorrem no feto humano do terceiro trimestre.

Vantagens e quantificação do modelo. A reprodutibilidade do processo de desenvolvimento retiniano murino e a sua fácil acessibilidade em animais neonatos proporciona uma oportunidade para avaliar a eficácia de compostos antiangiogénicos num modelo de angiogênese fisiologicamente relevante. As vantagens adicionais do modelo de ratinho

neonato são a capacidade de avaliar qualitativa e quantitativamente o efeito angiostático de antagonistas putativos da angiogénese. A actividade angiostática foi avaliada com base no grau de angiogénese na camada vascular retiniana externa profunda (camada secundária) que se desenvolve entre os dias P8 e P12. O aparecimento da rede de vasos sanguíneos interna (camada primária) foi avaliado relativamente ao desenvolvimento normal e a sinais de toxicidade. Não foram observadas quaisquer anomalias na camada vascular interna em nenhum dos ensaios aqui efectuados e descritos. A avaliação qualitativa da vascularização da camada secundária pode ser efectuada mediante fotografia microscópica das camadas superficial e profunda, coradas de modo apropriado, de retinas excisadas e determinação da percentagem de olhos em que a formação da camada vascular profunda é total ou parcialmente inibida. Todos os resultados aqui apresentados baseiam-se numa análise qualitativa da percentagem de olhos que demonstraram uma inibição de 75 a 100% da formação da rede vascular retiniana profunda após o tratamento. Na maioria dos casos, é também apresentada a percentagem de ratinhos que exibiu uma inibição >95% e igual a 100% da formação da rede vascular retiniana profunda.

Preparação de composições. O Composto (1) inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas foi solubilizado em PBS a uma concentração de cerca de 20 mg/ml em PBS (concentração 1x). O T2-TrpRS foi solubilizado em PBS a uma concentração de cerca de 0,5 mg/ml (concentração 1x). O aptâmero de VEGF (pegaptanib sódico; Composto (2)) foi solubilizado em PBS a uma concentração de cerca de 2 mg/ml (concentração 1x) para obter uma injeção de aproximadamente 1 µg/olho à concentração 1x. Para todos os ensaios de combinação, os compostos foram preparados a 2 ou 3 vezes a concentração 1x de cada material e depois combinados para produzir uma solução final contendo cada composto individual à mesma concentração em que foi utilizado sozinho (por exemplo, 1x; 0,5x; 0,25x ou 0,1x consoante os casos). Para todos os ensaios, administrou-se por via intravítrea uma injeção única de 0,5 µl das soluções de PBS dos fármacos, independentemente do número de compostos injectados. Tal como aqui utilizado, o termo "0,1x" refere-se a um décimo da concentração 1x de um dado material; "0,25x" refere-se a um

quarto da concentração 1x de um dado material; "0,5x" refere-se a metade da concentração 1x de um dado material e assim por diante para designações similares.

Modelo de retinopatia induzida por oxigénio (RIO) em ratinho. Este modelo é descrito por Smith, L., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 101-111 (1994). Os ratinhos são colocados em hiperóxia (75% de O₂) de P7 a P12, seguida de retorno a normóxia. Enquanto estão sob hiperóxia, os vasos retinianos centrais sofrem obliteração e a vasculatura profunda não se pode formar. Ao voltarem a normóxia, a retina torna-se hipóxica e ocorre uma neovascularização patológica.

A quantificação da neovascularização no modelo RIO envolveu a quantificação da formação de tufos neovasculares, bem como a quantificação da obliteração. Prepararam-se montagens totais das retinas e os seus vasos sanguíneos foram corados com isolectina GS-IB₄. Utilizou-se um sistema de imagiologia confocal, com focagem imediatamente acima do plexo vascular superficial, e efectuou-se uma montagem de quatro quadrantes. Identificaram-se os tufos neovasculares (Adobe PHOTOSHOP®) e quantificou-se a área de pixelação. Adicionalmente, traçaram-se as áreas de obliteração (Adobe PHOTOSHOP®) e a área de pixelação foi quantificada. Aplicou-se depois um factor de conversão baseado na aquisição das imagens (resolução, tamanho, etc.) para obter um valor em μm^2 .

Procedimento geral do ensaio de angiogénese.

Utilizou-se um ensaio de angiogénese *in vivo* no ratinho neonato (Balb/C, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) para avaliar a actividade angiostática do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas, de T2-TrpRS e do Composto (2) aptâmico de VEGF. A injeção intravítrea e o isolamento da retina foram efectuados com um microscópio de dissecação (SMZ 645, Nikon, Japão). Criou-se uma fissura na pálpebra com um bisturi fino no dia 7 pós-natal (P7), para expor o globo para a injeção. As amostras (0,5 μl) foram injectadas com uma seringa de Hamilton equipada com uma agulha de calibre 32 (Hamilton Company, Reno, Nevada). A injeção foi aplicada entre o equador e o limbo da córnea.

Durante a injeção, a localização da ponta da agulha foi monitorizada por visualização directa para determinar que se encontrava na cavidade vítrea. Os olhos com danos no cristalino ou na retina induzidos pela agulha foram excluídos do estudo. Após a injeção, as pálpebras foram reposicionadas para fechar a fissura.

No dia 12 pós-natal (P12), os animais foram submetidos a eutanásia e os olhos foram enucleados. Após cerca de 10 minutos em paraformaldeído (PFA) a 4%, a córnea, o cristalino, a esclerótica e o vítreo foram excisados através de uma incisão límbica. A retina isolada foi preparada para coloração através de imersão em metanol durante cerca de 10 minutos em gelo, seguida de bloqueio em soro fetal de bovino a 50% (Gibco, Grand Island, Nova Iorque) com soro normal de cabra a 20% (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) em PBS durante cerca de uma hora em gelo. Os vasos sanguíneos foram especificamente visualizados por coloração da retina durante aproximadamente 18 horas, a cerca de 4°C, com um anticorpo de coelho anti-colagénio IV de ratinho (Chemicon, Temecula, Califórnia) diluído de 1:200 em tampão de bloqueio ou com uma isolectina conjugada de forma fluorescente (*Griffonia simplicifolia*, Molecular Probes). Um anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com um corante ALEXA FLUOR® 594 (Alexa) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) (diluição de 1:200 em tampão de bloqueio) foi incubado com a retina durante aproximadamente 2 horas a cerca de 4°C. As retinas foram depois montadas para avaliação microscópica com meio de montagem "Slow-Fade" (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Exemplo 1. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um inibidor peptidomimético da sinalização via integrinas e um inibidor da sinalização via VEGF.

De acordo com o procedimento geral do ensaio de angiogénese ("procedimento geral") descrito acima, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia 8 pós-natal (P8) com uma concentração 0,25x do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas (cinco ratinhos), uma concentração 0,5x do Composto (2) aptâmero de VEGF (cinco ratinhos) ou uma combinação de uma

concentração 0,25x do Composto (1) e uma concentração 0,5x do Composto (2) (seis ratinhos). Como controlo, outro grupo de seis ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 4 e 5.

Tabela 1.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%
PBS	100	0	0	0	0
Composto (2) 0,5x	20	20	20	20	40
Composto (1) 0,1x	40	0,5	20	20	20
Combinação	0	17	0	0	83

Exemplo 2. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS e um inibidor da sinalização via VEGF.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 0,1x de T2-TrpRS (oito ratinhos), uma concentração 0,1x do Composto (2) aptâmero de VEGF (oito ratinhos) ou uma combinação de uma concentração 0,1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,1x do Composto (2) (dez ratinhos). Como controlo, outro grupo de oito ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

Tabela 2.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100,0	0	0	0	0	0	0
Comp. (2) 0,1x	87,5	12,5	0	0	0	0	0
T2-TrpRS 0,1x	50	37,5	12,5	0	0	0	0
Combinação	10	30	20	20	20	0	0

Exemplo 3. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS e um inibidor da sinalização via VEGF.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS (oito ratinhos), uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF (oito ratinhos) ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 1x do Composto (2) (dez ratinhos). Como controlo, outro grupo de seis ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

Tabela 3.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
Comp. (2) 1x	37,5	12,5	12,5	12,5	25	0	0
T2-TrpRS 1x	12,5	12,5	0	12,5	62,5	12,5	12,5
Combinação	0	0	10	10	80	40	20

Exemplo 4. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS e um inibidor da sinalização via VEGF.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS (oito ratinhos), uma concentração 0,5x do Composto (2) aptâmero de VEGF (dez ratinhos) ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,5x do Composto (2) (dez ratinhos). Como controlo, outro grupo de seis ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4 e nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

Tabela 4.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	66,6	16,7	16,7	0	0	0	0
Comp. (2) 0,5x	60	30	0	0	10	0	0
T2-TrpRS 1x	12,5	37,5	12,5	12,5	25	0	0
Combinação	0	0	10	10	70	30	20

Exemplo 5. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS e um inibidor da sinalização via integrinas.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,5x do Composto (1), em grupos de seis ratinhos para cada regime de tratamento. Como controlo, outro grupo de quatro ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de

PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e nas Figuras 18, 19, 20 e 21.

Tabela 5.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	50	25	25	0	0	0	0
Comp. (1) 0,5x	50	33,3	16,7	0	0	0	0
T2-TrpRS 1x	33,3	16,7	33,3	0	16,7	16,7	0
Combinação	0	33,3	16,7	0	50	16,7	0

Exemplo 6. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS, um inibidor da sinalização via VEGF e um inibidor da sinalização via integrinas.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas, uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF, uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,5x do Composto (1), uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 1x do Composto (2) ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) e uma concentração 1x do Composto (2), em grupos de oito ratinhos para cada regime de tratamento. Como controlo, outro grupo de oito ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os

resultados estão apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28.

Tabela 6.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
Comp. (1) 0,5x	50	12,5	12,5	12,5	12,5	0	0
Comp. (2) 1x	37,5	25	12,5	25	0	0	0
T2-TrpRS 1x	50	25	12,5	12,5	0	0	0
T2-TrpRS + Comp. (2)	25	25	25	0	25	25	12,5
T2-TrpRS + Comp. (1)	50	0	0	0	50	37,5	25
T2-TrpRS + (1) + (2)	0	0	0	0	100	87,5	75

Exemplo 7. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS, um inibidor da sinalização via VEGF e um inibidor da sinalização via integrinas.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas, uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF, uma combinação de uma concentração 0,5x do Composto (1) e uma concentração 1x do Composto (2) ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 0,5x do Composto (1) e uma concentração 1x do Composto (2), em grupos de oito ratinhos para cada regime de tratamento. Como controlo, outro grupo de seis ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 7 e nas Figuras 29, 30, 31, 32, 33 e 34.

Tabela 7.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
Comp. (1) 0,5x	12,5	25	12,5	12,5	37,5	0	0
Comp. (2) 1x	25	25	0	12,5	37,5	0	0
T2-TrpRS 1x	25	12,5	12,5	0	50	12,5	0
Comp. (1) + (2)	0	12,5	12,5	25	50	25	25
T2-TrpRS + (1) + (2)	0	0	0	0	100	62,5	50

Exemplo 8. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS e um inibidor da sinalização via VEGF.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS (dez ratinhos), uma concentração 0,25x do Composto (2) aptâmico de VEGF (onze ratinhos) ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 0,25x do Composto (2) (onze ratinhos). Como controlo, outro grupo de oito ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	100	0	0	0	0	0	0
Comp. (2) 0,25x	54,5	36,4	0	0	9,1	0	0
T2-TrpRS 1x	30	30	20	10	10	0	0
Combinação	18,2	18,2	9,1	18,2	27,3	0	0

Exemplo 9. Tratamento de olhos de ratinho neonato com uma combinação de um fragmento angiostático de TrpRS, um inibidor da sinalização via VEGF e um inibidor da sinalização via integrinas.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos (em grupos de oito ratinhos cada) foram injectados por via intravítrea no dia P4 com uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 1x do Composto (1) inibidor da sinalização via integrinas, uma concentração 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF, uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS e uma concentração 1x do Composto (1), uma combinação de uma concentração 1x do Composto (1) e uma concentração 1x do Composto (2) ou uma combinação de uma concentração 1x de T2-TrpRS, uma concentração 1x do Composto (1) e uma concentração 1x do Composto (2). Como controlo, outro grupo de oito ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 9 e nas Figuras 35-42.

Tabela 9.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS	75	25	0	0	0	0	0
Comp. (1) 1x	25	12,5	12,5	37,5	12,5	0	0
Comp. (2) 1x	25	0	12,5	12,5	50	25	12,5
T2-TrpRS 1x	12,5	0	25	12,5	50	12,5	0
Comp. (1) + T2-TrpRS	0	12,5	12,5	25	50	25	12,5
Comp. (1) + (2)	12,5	12,5	0	12,5	62,5	62,5	50
T2-TrpRS + Comp. (2)	0	12,5	12,5	12,5	62,5	37,5	25
T2-TrpRS + (1) + (2)	0	25	0	0	75	75	62,5

Exemplo 10. Tratamento de olhos de ratinho neonato com doses variáveis de um fragmento angiostático de TrpRS.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos (em grupos de oito a doze ratinhos cada) foram injectados por via intravítrea no dia P4 com T2-TrpRS, a concentrações de 0,1x (8 ratinhos), 0,3x (12 ratinhos), 1x (12 ratinhos), 2x (12 ratinhos) e 3x (12 ratinhos). Como controlo, outro grupo de 10 ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%
PBS	100	0	0	0	0
T2-TrpRS 0,1x	75	25	0	0	0
T2-TrpRS 0,3x	33,3	16,7	8,3	16,7	25
T2-TrpRS 1x	8,3	16,7	25	8,7	41,7
T2-TrpRS 2x	8,3	25	0	16,7	41,7
T2-TrpRS 3x	66,7	25	8,7	0	0

Exemplo 11. Tratamento de olhos de ratinho neonato com doses variáveis de um fragmento angiostático de TrpRS.

De acordo com o procedimento geral, os olhos de ratinhos Balb/C neonatos (em grupos de seis a catorze ratinhos cada) foram injectados por via intravítrea no dia P4 com T2-TrpRS, a concentrações de 0,3x (6 ratinhos), 1x (14 ratinhos), 2x (8 ratinhos), 3x (7 ratinhos) e 5x (6 ratinhos). Como controlo, outro grupo de 10 ratinhos recebeu apenas uma injeção intravítrea de PBS. No dia P12, os ratinhos foram submetidos a eutanásia e as retinas foram removidas dos olhos injectados, coradas, montadas e avaliadas microscopicamente

conforme descrito no procedimento geral. A vascularidade da camada secundária (vascular retiniana externa) foi avaliada com base na percentagem de vascularização em comparação com os olhos de controlo. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11.

% de inibição:	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%
PBS	60	40	0	0	0
T2-TrpRS 0,3x	33,3	16,7	0	0	50
T2-TrpRS 1x	14,3	14,3	7,1	14,3	50
T2-TrpRS 2x	12,5	12,5	12,5	12,5	50
T2-TrpRS 3x	14,3	14,3	14,3	28,5	28,5
T2-TrpRS 5x	16,6	33,3	33,3	16,6	0

Os resultados para os ratinhos que apresentam inibição >95% e igual a 100% nos Exemplos anteriores demonstram que mesmo as composições que compreendem pelo menos dois materiais seleccionados entre o grupo que consiste em um fragmento angiostático de TrpRS, um inibidor da sinalização via VEGF e um inibidor da sinalização via integrinas obtêm inesperadamente maior eficácia na inibição da neovascularização no modelo de olho de ratinho neonato que os níveis esperados de inibição a partir dos efeitos aditivos simples da combinação dos componentes individuais. Isto também é evidente quando os resultados dos vários exemplos são combinados como na Tabela 12, que compila os resultados dos Exemplos a concentrações de 1x a 2x do Composto (1) inibidor das integrinas; 0,5x a 1x do Composto (2) aptâmero de VEGF; e 1x de T2-TrpRS, bem como as composições (valores de inibição em negrito na Tabela 12) que compreendem combinações de pelo menos dois elementos entre o Composto (1), o Composto (2) e T2-TrpRS. O número de ratinhos em cada grupo está indicado entre parêntesis para cada agrupamento. Os resultados na Tabela 12 mostram claramente um nível inesperadamente mais alto de inibição da formação de vasos sanguíneos na camada vascular profunda para olhos de ratinho tratados com as composições que compreendem combinações de pelo menos dois elementos entre o Composto (1), o Composto

(2) e T2-TrpRS em comparação com os níveis de inibição dos tratamentos com os inibidores individuais isolados ou a sua soma numérica.

Tabela 12. Resultados combinados dos Exemplos

% de inibição:	0-10%	16-15%	15-50%	50-75%	75-100%	>95%	100%
PBS (38 ratinhos)	84,2	10,5	5,3	0	0	0	0
Comp. (1) 1x-2x (30 ratinhos)	33,3	20	13,3	16,7	16,7	0	0
Comp. (2) 1x (30 ratinhos)	39,1	20	7,6	11,9	21,4	4,7	2,4
T2-TrpRS 1x (46 ratinhos)	23,9	17,4	15,2	8,7	34,8	8,7	2,2
Comp. (1) + T2-TrpRS (22 ratinhos)	18,2	13,6	9,1	9,1	50	27,3	13,6
Comp. (1) + (2) (16 ratinhos)	6,3	12,5	6,3	18,8	56,3	43,7	37,5
T2-TrpRS + Comp. (2) (36 ratinhos)	5,6	11,1	13,9	8,3	61,1	33,3	19,4
T2-TtpRS + (1) + (2) (24 ratinhos)	0	8,3	0	0	91,7	79,2	62,5

Os resultados dos Exemplos 10 e 11 (Tabelas 10 e 11) mostram que a eficácia de T2-TrpRS atingiu um valor máximo a uma concentração de cerca de 1x a 2x e não permitiu que mais de 50% dos ratinhos apresentassem uma inibição de 75-100% na camada vascular profunda. A eficácia começou a diminuir a uma concentração de 2x e superior. Assim, mesmo com doses crescentes, T2 não proporcionou uma eficácia superior a cerca de 50% ao nível de inibição de 95-100%.

Exemplo 12. Efeitos sinérgicos da administração do fragmento angiostático T2-TrpRS, do aptâmero de VEGF e do inibidor peptidomimético da sinalização via as integrina $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$.

Para estudar o efeito da combinação de diferentes moléculas angiostáticas, utilizaram-se três compostos angiostáticos conhecidos por visarem vias angiogénicas

críticas, mas separadas: um antagonista das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ do tipo pequena molécula (Composto (1); "EMD 472523" obtido de Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), um antagonista do VEGF₁₆₅ (Composto (2); pegaptanib sódico) e uma forma truncada da triptofano-ARNT-sintetase (T2-TrpRS, obtida de Angiosyn Inc., La Jolla, Califórnia). Embora o mecanismo exacto de acção para T2-TrpRS não tenha sido totalmente elucidado, o seu mecanismo de acção não está directamente ligado ao antagonismo do VEGF ou das integrinas.

O modelo de angiogénese retiniana em ratinho neonato foi utilizado para testar a eficácia de cada monoterapia e de várias combinações destes compostos individuais. Como indicado acima, os ratinhos nascem sem uma vasculatura retiniana. Durante as primeiras três semanas após o nascimento, desenvolve-se uma vasculatura similar à do adulto. A vasculatura retiniana forma três plexos planos distintos, em que o plexo vascular superficial se desenvolve durante a primeira semana pós-natal. No dia 8 pós-natal (P8), os vasos do plexo superficial ramificam-se e migram na direcção do plexo profundo na borda externa da camada nuclear interna. Para testar as propriedades angiostáticas de cada solução de monoterapia ou de combinação, aplicaram-se injecções intravítreas no dia P7, quando a formação da rede superficial está quase completa, mas antes de a formação dos plexos profundos ter começado. Os efeitos sobre a formação do plexo vascular profundo foram depois analisados cinco dias mais tarde (P12). O grau de inibição para cada retina injectada foi classificado como sendo de 0-10%, 10-25%, 25-50%, 50-75% ou 75-100% (Figura 48), com o grupo de inibição de 75-100% adicionalmente separado nos níveis de inibição >90% e 100% (Figura 49). O aspecto do plexo vascular primário previamente formado, assim como a morfologia retiniana global foram avaliados quanto a sinais de toxicidade.

Preparação das amostras. O antagonista das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ (Composto (1)) foi armazenado como um pó liofilizado num exsiccador à temperatura ambiente (I.A.) ou a -20°C (V.A.) e solubilizado em PBS 1x estéril e isento de ARNase imediatamente antes da utilização. O aptâmero de VEGF (Composto (2)) foi sintetizado como um composto conjugado com PEG de 40 kDa (Transgenomic Inc, Boulder, Colorado) com base

em informação publicada (Bridonneau, *et al.*, *J. Chromatogr: B. Diomed. Sci. App.* **726**: 237-47 (1999)). Determinou-se que o composto era puro por cromatografia líquida de fase reversa. As concentrações aqui referidas referem-se à concentração final do aptâmero de VEGF activo e não à concentração total do composto conjugado com PEG e foram determinadas por análise espectrofotométrica a 260/280 nm. O péptido T2-TrpRS foi preparado como um composto recombinante da forma descrita em Otani *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA* **99**: 178-183 (2002) e no pedido provisório de patente U.S. com o n.º de série 60/598,019, apresentado em 2 de Agosto de 2004. O produto purificado foi armazenado em glicerol a 50% a -20°C e dialisado para PBS 1x estéril imediatamente antes da utilização. As soluções de combinação foram preparadas mediante a preparação inicial de soluções-stock 3x de cada composto individual. Os compostos foram depois misturados uns com os outros, e com PBS nos casos apropriados, para preparar uma solução final contendo cada composto desejado a uma concentração equivalente a cada concentração de monoterapia correspondente.

Injecções intravítreas. Todo o trabalho com animais aderiu a directrizes protocolares estritas para uma utilização e tratamento humanos dos animais. Efectuaram-se as injecções intravítreas, as retinas foram dissecadas e visualizou-se a vasculatura. A RIO foi induzida de acordo com o protocolo descrito por Smith *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**: 101-111 (1994), mediante exposição das crias de 7 dias pós-natais (P7) e das suas mães a um ambiente de 75% de oxigénio (hiperóxia) durante 5 dias, seguida de retorno ao ar ambiente (normóxia). As injecções intravítreas foram realizadas no dia P12, imediatamente após o retorno a normóxia, e as retinas foram analisadas no dia P17. Os vasos sanguíneos foram corados utilizando isolectina GS-IB₄ de *Griffonia simplicifolia* (lectina GS), conjugada com o corante Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, diluição de 1:150 em PBS). As imagens focais foram obtidas utilizando uma objectiva 4x, focando cuidadosamente mesmo acima da membrana limítrofe interna da retina, tornando proeminentes os tufo neovasculares pré-laminares. Adquiriram-se quatro imagens sobreponíveis de cada retina, e cada imagem individual foi convertida para um tamanho de 5,08 x 5,08 cm com 300 píxeis

por polegada. As áreas de tufo neovasculares foram quantificadas por indivíduos com máscaras utilizando montagens totais da retina. Os tufo foram especificamente seleccionados com base no seu aspecto característico e na maior intensidade da coloração com isolectina, utilizando a ferramenta "varinha mágica" no software PHOTOSHOP® da Adobe. Determinou-se depois a área total em píxeis. As áreas de formação de tufo neovasculares foram normalizadas em relação a retinas de RIO de controlo injectadas com PBS.

Doseamento. As experiências de doseamento foram inicialmente efectuadas para determinar a dose eficaz máxima para cada composto individual. Verificou-se que cada composto tem uma curva de eficácia em forma de sino com doses eficazes óptimas de 5-10 µg (10-20 nmoles) por olho para o antagonista das integrinas (Figura 46); 1,0-2,0 µg (108-215 pmoles) por olho para o aptâmero de VEGF (Figura 44) e 0,25-0,5 µg (5,2-10,4 pmoles) por olho para T2-TrpRS (Figura 43). Efectuaram-se depois injeções únicas de cada monoterapia à dose óptima e de soluções que contêm combinações apropriadas de cada composto em doses equivalentes, para comparar as actividades angiostáticas. Às doses individuais máximas, cerca de 35% das retinas não foram afectadas pela injeção quer do antagonista das integrinas quer do aptâmero de VEGF. Os outros 67% de retinas basicamente distribuíram-se uniformemente pelos intervalos de 10-25%, 25-50%, 50-75% ou 75%-100% (Tabela 13A abaixo). A inibição da rede vascular profunda com o péptido T2-TrpRS foi ligeiramente melhor. 24% das retinas injectadas com o péptido T2-TrpRS desenvolveram um plexo vascular profundo completo normal, ao passo que 35% das retinas injectadas com o péptido T2-TrpRS apresentaram uma inibição superior a 75% em comparação com 17% e 21% para o antagonista das integrinas e o aptâmero de VEGF, respectivamente (Tabela 13A abaixo). Quando os compostos angiostáticos foram injectados em combinação, os efeitos angiostáticos sobre a neovascularização foram surpreendentes. Cada combinação dupla, antagonista das integrinas + T2-TrpRS, antagonista das integrinas + aptâmero de VEGF e T2-TrpRS + aptâmero de VEGF, demonstrou uma melhoria significativa da actividade angiostática em relação às monoterapias. Um número significativamente menor de retinas foi resistente ao tratamento angiostático utilizando as terapias de combinação.

A neovascularização foi inibida em mais de 75% na maioria das retinas tratadas com qualquer uma das combinações duplas (Tabela 13 A abaixo).

Quando a totalidade dos três compostos foi injectada em conjunto às mesmas doses óptimas das injeções de monoterapia correspondentes (combinação tripla 1x), mais de 90% das retinas tiveram uma inibição >75%. Ao contrário das retinas tratadas com monoterapia ou uma combinação dupla, todas as retinas tratadas com a combinação tripla apresentaram algum grau de inibição neovascular. Além disso, apenas 8% das retinas injectadas apresentaram ainda qualquer nível significativo de neovascularização. Observou-se uma inibição quase completa da angiogénese nos restantes 92% de retinas injectadas com os compostos em combinação tripla (Tabela 13A abaixo; Figura 48). As diferenças em termos de eficácia angiostática tornaram-se ainda mais pronunciadas quando a categoria de inibição >75% foi subdividida em inibição >90% e inibição de 100% (Figura 49). Mais de 80% das retinas injectadas com a combinação tripla apresentaram uma inibição da formação do plexo vascular profundo superior a 90% e 63% revelaram uma inibição de 100% da neovascularização, em que nem mesmo um único rebento neovascular pôde ser observado. Este resultado é uma melhoria substancial em relação tanto às monoterapias, que demonstraram uma inibição de 100% em <5% das retinas tratadas, como às terapias de combinação dupla. Além disso, o plexo vascular superficial de muitas das retinas tratadas com a combinação tripla assemelhou-se ao de uma retina normal do dia P7 em vez das retinas do dia P12, o que indica que o crescimento vascular adicional no interior do plexo superficial também foi impedido pela combinação tripla imediatamente após a injeção. Não se observou inibição do crescimento do plexo superficial em nenhuma retina tratada com monoterapia ou terapia dupla. Os vasos sanguíneos mais centrais do plexo vascular superficial que já se tinham formado antes da injeção permaneceram normais, o que indica níveis de toxicidade insignificantes para a vasculatura pré-existente. Adicionalmente, não se observaram quaisquer sinais de toxicidade neuronal e a morfologia retiniana permaneceu inalterada, indicando a não ocorrência de efeitos secundários negativos observáveis por injeção da solução de combinação tripla. As imagens dos plexos

vasculares superficial e profundo de uma experiência representativa completa estão apresentadas na Figura 50.

Para analisar a sinergia e para testar a possibilidade de manter uma actividade angiostática potente utilizando doses mais baixas da combinação tripla, testaram-se diluições em série. A combinação tripla ainda foi extremamente eficaz na inibição da angiogénese quando diluída até 100x (combinação tripla 0,01x) (Tabela 13B abaixo; Figuras 52 e 53). Quando a combinação tripla foi preparada através de combinação dos compostos individuais a um décimo da sua dose óptima, quase 80% das retinas tratadas ainda apresentaram uma inibição >75%, e 50% das retinas apresentaram uma inibição completa (100%) da neovascularização. Às concentrações 0,1x (1 µg/olho de antagonista das integrinas; 0,2 µg/olho de aptâmero de VEGF e 0,025 µg/olho de T2-TrpRS), a inibição da neovascularização pelos compostos angiostáticos individuais foi desprezável (Tabela 13C abaixo; Figura 54). Observou-se alguma eficácia após injeção da combinação dupla T2-TrpRS 0,1x e aptâmero de VEGF 0,1x. Contudo, apesar de esta combinação ter sido a mais eficaz de todas as combinações duplas testadas em termos angiostáticos, a actividade angiostática ainda foi mínima em comparação com os níveis de inibição observados por injeção da combinação tripla 0,1x.

TABELA 13**A. Experiência de combinação no modelo de angiogênese em ratinho neonato**

Percentagem de retinas com os níveis indicados de inibição neovascular

Injeção	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>90%	100%
PBS	38	84,2	10,5	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
5-10 µg antagonista de integrinas	30	33,3	20,0	13,3	16,7	16,7	0,0	0,0
1-2 µg aptâmero VEGF	42	39,1	20,0	7,6	11,9	21,4	4,7	2,4
0,25 µg T2-TrpRS	46	23,9	17,4	15,2	8,7	34,8	8,7	2,2
T2-TrpRS + ant. integrinas	22	18,2	13,6	9,1	9,1	50,0	27,3	13,6
Ant. integrinas + apt. VEGF	21	6,3	12,5	6,3	18,8	56,3	43,7	28,5
T2-TrpRS + apt. VEGF	36	5,6	11,1	13,9	8,3	61,1	38,3	19,4
Combinação tripla	24	0	8,3	0	0	91,7	83,2	62,6

B. Experiência de diluição em série da combinação tripla

Injeção	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>96%	100%
PBS	14	71,4	14,3	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Combinação tripla 1x	16	0,0	0,0	0,0	7,1	92,8	71,4	57,1
Combinação tripla 0,5x	16	0,0	0,0	0,0	0,5	100,0	87,5	50,0
Combinação tripla 0,25x	16	0,0	0,0	0,0	0,5	100,0	68,8	43,8
Combinação tripla 0,1x	18	0,0	5,5	11,1	5,5	77,8	61,1	44,4
Combinação tripla 0,05x	10	0,0	10,0	20,0	20,0	50,0	30,0	20,0
Combinação tripla 0,01x	10	10,0	10,0	30,0	30,0	20,0	20,0	10,0

C. Experiência de monoterapia versus combinação em doses baixas

Níveis de inibição:	N	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	>75%	>90%	100%
PBS	8	100	0	0	0	0	0	0
Ant. Integrina 0,1x (1,0 µg)	10	90	10	0	0	0	0	0
Apt. VEGF 0,1x (0,20 µg)	8	75	25	0	0	0	0	0
T2-TrpRS 0,1x (0,025 µg)	10	50	37,5	12,5	0	0	0	0
T2-TrpRS + Apt. VEGF 0,1x	10	10	30	20,0	20	20	0	0
Combinação tripla 0,1x	18	0	5,5	11,1	5,5	77,8	61,1	44,4

Exemplo 13. Efeitos sinérgicos de uma "terapia tripla"

O modelo de retinopatia induzida por oxigénio (RIO) em ratinho descrito acima é um modelo bem aceite de neovascularização induzida por hipóxia na retina. As alterações vasculares associadas são consistentes, reproduzíveis e quantificáveis. Em anos recentes, a utilização deste modelo foi alargada ao estudo geral de vasculopatias isquémicas relacionadas com a doença e intervenções antiangiogénicas relacionadas. Para estudar as propriedades sinérgicas destes compostos angiostáticos num modelo mais patológico de angiogénese, os efeitos de monoterapias e de terapias de combinação na formação da neovascularização patológica foram testados no modelo de RIO em ratinho. Para as experiências iniciais, utilizaram-se as doses óptimas obtidas a partir do modelo de angiogénese neonatal. Em cada caso, as terapias de combinação demonstraram actividades angiostáticas melhoradas em comparação com as monoterapias. Contudo, devido às actividades angiostáticas de cada monoterapia, foi difícil determinar se os resultados da combinação dos vários compostos foram sinérgicos ou simplesmente aditivos. Assim, com base nos resultados observados utilizando o modelo de angiogénese retiniana em ratinho neonato, que demonstraram eficácias equivalentes das terapias de combinação a doses relativamente baixas, cada monoterapia e as várias terapias de combinação foram testadas a um décimo das doses óptimas. Mais uma vez, a concentração de cada composto nas soluções de combinação foi equivalente à concentração de monoterapia correspondente. Às concentrações inferiores, não se observou uma inibição significativa da formação dos tufos neovasculares patológicos após os tratamentos de monoterapia. Contudo, observaram-se reduções significativas das formações de tufos neovasculares utilizando cada combinação dupla (Figura 57). Quando o antagonista das integrinas foi combinado com o péptido T2-TrpRS, a formação de tufos patológicos foi reduzida em >50%. A combinação do antagonista das integrinas com o aptâmero de VEGF reduziu a formação de tufos em >40%. Quando o péptido T2-TrpRS foi combinado com o aptâmero de VEGF, a neovascularização patológica foi reduzida em quase 80% em comparação com as retinas tratadas de controlo. Muitas das retinas tratadas com a combinação dupla T2-TrpRS/aptâmero de VEGF aparentaram uma quase normalidade,

sem praticamente nenhuma neovascularização patológica evidente (Figura 58).

Demonstrou-se a existência de um aumento dramático da actividade angiostática através da combinação de múltiplos compostos angiostáticos que visam vias de angiogénese distintas. Observaram-se actividades angiostáticas fortes tanto num modelo de desenvolvimento como num modelo patológico de angiogénese, mesmo após combinar os compostos em doses que não têm qualquer actividade monoterapêutica. Isto sugere um efeito sinérgico em vez de um efeito simplesmente aditivo. Estes resultados também sugerem que poderá ser necessário visar múltiplas vias para obter uma terapia antiangiogénica clínica eficaz e poderão fornecer um novo paradigma para o tratamento de doenças neovasculares. Preferencialmente, combinam-se pelo menos duas terapias antiangiogénicas (por exemplo, uma combinação de um inibidor da sinalização via VEGF, como um aptâmero de VEGF, combinado com um fragmento angiostático de TrpRS, como o fragmento T2 de TrpRS, e opcionalmente um antagonista das integrinas).

Ao visar e inibir três vias angiogénicas separadas, obteve-se uma inibição quase completa da angiogénese em dois modelos de angiogénese separados. A inibição completa da neovascularização poderá ser importante para o tratamento eficaz de doenças relacionadas com angiogénese utilizando terapias angiostáticas. Nos modelos do invento, mesmo os melhores resultados de injecções de monoterapia geralmente bloquearam apenas 50-75% do crescimento de novos vasos. Isto significa que, na maior parte dos casos, ainda se desenvolveu uma quantidade significativa de neovascularização. Em contraste, dois terços das retinas de ratinhos neonatos injectados com a terapia de combinação tripla tiveram uma inibição completa de 100% da formação neovascular (Tabela 13). De modo idêntico, no modelo de RIO de angiogénese patológica, uma grande parte dos ratinhos tratados demonstrou pouca ou nenhuma formação de tufos neovasculares patológicos (Figura 58). Durante o tratamento do cancro, poderão ser necessários níveis elevados de inibição da angiogénese para causar a inanição completa das células tumorais e prevenir o crescimento adicional do tumor. As monoterapias que inibem somente 50% do crescimento neovascular apenas são plausíveis

de reduzir, em vez de eliminar, o oxigénio e os nutrientes disponíveis para as células tumorais em crescimento rápido. Embora isto possa inicialmente abrandar o crescimento, poderá não ser suficiente para evitar o crescimento adicional do tumor. Nestes casos, as terapias de combinação que conseguem obter uma inibição completa da neovascularização poderiam melhorar grandemente os resultados das terapias antiangiogénicas durante os tratamentos do cancro. Adicionalmente, usando doses relativamente baixas ao mesmo tempo que se mantém um potencial angiostático forte, é possível minimizar a eventualidade de efeitos secundários adversos gerados pelos tratamentos angiostáticos. No seu conjunto, os resultados anteriores demonstram a utilidade benéfica de combinar diferentes moléculas angiostáticas para o tratamento da neovascularização associada à doença.

As composições do presente invento, que compreendem um fragmento angiostático de triptofanil-ARNt-sintetase (TrpRS), um inibidor da sinalização via o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e um inibidor da sinalização via integrinas, proporcionam um regime de tratamento novo e surpreendentemente eficaz para as doenças neovasculares, particularmente para as doenças neovasculares do olho.

Exemplo 14. Tratamento de um tumor

O glioblastoma multiforme é um tumor cerebral maligno incurável, geralmente fatal no espaço de um ano após o diagnóstico. A linha de células de gliossarcoma de rato 9L é utilizada como um modelo para os gliomas malignos. Em ambas as formas de glioma, o tumor é altamente vascularizado e infiltra-se no tecido cerebral normal. O animal não tratado que recebe um bolus de células 9L intracerebralmente tem um tempo de sobrevivência de aproximadamente 3 semanas, uma vez implantadas as células do tumor. No dia 0, estabeleceram-se os tumores 9L intracerebrais por inoculação estereotáctica de cerca de 50.000 células em cerca de 2 µl de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Gaithersburg, Maryland) no lobo frontal direito de ratos Fisher CD 344, que haviam sido previamente anestesiados com cetamina e xilazina.

No dia 6, injectou-se de modo estereotáctico um bolus de 10 µl de uma composição do invento (4,5 mg/l de T2-TrpRS, 30 mg/l de Composto (1) e 6 mg/l de Composto (2); pegaptanib sódico) ao longo de cerca de 2 minutos na mesma região do cérebro em que as células 9L foram implantadas. Após injeção do bolus, inseriu-se uma bomba numa bolsa subcutânea entre as omoplatas. Introduziu-se um cateter ligado à bomba via uma tubagem no mesmo orifício de broca efectuado para a introdução das células 9L e prendeu-se em posição. Cada bomba tinha um caudal de cerca de 8 µl por hora. Uma quantidade adicional da composição do invento foi bombeada de forma contínua para o interior do cérebro de cada animal durante cerca de 24 horas. O bombeamento contínuo distribuiu a composição por todo o hemisfério do cérebro onde as células tumorais haviam sido implantadas. Nove ratos receberam a composição do invento e nove ratos receberam PBS puro como grupo de controlo.

No dia 13, efectuou-se uma incisão entre as omoplatas, e a bomba foi removida e substituída por uma bomba nova. O tratamento com a composição do invento ou com PBS foi retomado durante 24 horas adicionais com a bomba nova, utilizando os mesmos caudais de bombeamento. Verificou-se um aumento de 21% da sobrevivência para os ratos tratados com a composição do invento em comparação com o grupo de controlo tratado com PBS (Ver Figura 60).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> The Scripps Research Institute

<120> COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEOVASCULARES

<130> 18-209

<140> EP 05 804 888.5

<141> 06-06-2005

<150> US 60/577,156

<151> 04-06-2004

<150> US 60/585,273

<151> 01-07-2004

<150> US 60/655,801

<151> 24-02-2005

<160> 6

<170> FastSEQ para Windows, versão 4.0

<210> 1

<211> 379

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

```

Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly
 1      5      10      15
Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr
 20      25      30
Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Ser His
 35      40      45
Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe
 50      55      60
Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly
 65      70      75
His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn
 80      85      90
Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys
 100     105     110
Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Val Glu Asn Ala Lys
 115     120     125
Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser
 130     135     140
Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val
 145     150     155
Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly
 160     165     170
Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln
 175     180     185
Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg
 190     195     200
Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr
 205     210     215
Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
 220     225     230
Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
 235     240     245
Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr
 250     255     260
Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly
 265     270     275
Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val
 280     285     290
                295                300
Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys
 305     310     315     320
Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly
 325     330
Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu
 335     340     345     350
His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe
 355     360     365
Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
 370     375

```

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly
 1      5      10      15
Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr
 20      25      30
Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Ser His
 35      40      45
Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe
 50      55      60
Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly
 65      70      75      80
His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn
 85      90      95
Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys
100      105      110
Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn Ala Lys
115      120      125
Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser
130      135      140
Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val
145      150      155      160
Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly
165      170      175
Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln
180      185      190
Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg
195      200      205
Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr
210      215      220
Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
225      230      235      240
Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
245      250      255
Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr
260      265      270
Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly
275      280      285
Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val
290      295      300
Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys
305      310      315      320
Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly
325      330      335
Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu
340      345      350
His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe
355      360      365
Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
370      375

```

<210> 3

<211> 424

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

```

Met Ser Tyr Lys Ala Ala Ala Gly Glu Asp Tyr Lys Ala Asp Cys Pro
1 5 10 15
Pro Gly Asn Pro Ala Pro Thr Ser Asn His Gly Pro Asp Ala Thr Glu
20 25 30
Ala Glu Glu Asp Phe Val Asp Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser Ser Ala
35 40 45
Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser Ser Lys
50 55 60
Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly Gln Arg
65 70 75 80
Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg Asp Met
85 90 95
Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr Leu Tyr
100 105 110
Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly His Leu Ile
115 120 125
Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn Val Pro Leu
130 135 140
Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp Leu Thr
145 150 155 160
Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp Ile Ile
165 170 175
Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp Leu Asp
180 185 190
Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys Ile Gln
195 200 205
Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe Thr Asp
210 215 220
Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro
225 230 235 240
Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile
245 250 255
Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met
260 265 270
Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu
275 280 285
His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser
290 295 300
Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln
305 310 315 320
Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr
325 330 335
Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser
340 345 350
Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln
355 360 365
Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys
370 375 380
Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala
385 390 395 400
Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro
405 410 415
Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
420

```

<210> 4

<211> 401

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

```

Ser Asn His Gly Pro Asp Ala Thr Glu Ala Glu Glu Asp Phe Val Asp
 1      5      10      15
Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys
 20      25
Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn
 35      40
Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg
 50      55      60
Gly Ile Phe Phe Ser His Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr
 65      70      75      80
Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser
 85
Glu Ala Met His Val Gly His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp
 100
Leu Gln Asp Val Phe Asn Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp
 115
Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr
 130
Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn
 145      150      155      160
Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly
 165      170      175
Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln
 180      185      190
Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile
 195
Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro
 210      215      220
Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala
 225      230      235      240
Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg
 245      250      255
Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala
 260      265      270
Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser
 275      280      285
Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys
 290      295      300
His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe
 305      310      315      320
Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe
 325      330      335
Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser
 340      345      350
Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu
 355      360      365
Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp
 370      375      380
Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe
 385      390      395      400
Gln

```

<210> 5

<211> 471

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

```

Met Pro Asn Ser Glu Pro Ala Ser Leu Leu Glu Leu Phe Asn Ser Ile
 1      5      10      15
Ala Thr Gln Gly Glu Leu Val Arg Ser Leu Lys Ala Gly Asn Ala Ser
 20      25
Lys Asp Glu Ile Asp Ser Ala Val Lys Met Leu Val Ser Leu Lys Met
 35      40      45
Ser Tyr Lys Ala Ala Ala Gly Glu Asp Tyr Lys Ala Asp Cys Pro Pro

```

	50					55				60					
Gly	Asn	Pro	Ala	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Gly	Pro	Asp	Ala	Thr	Glu	Ala
65					70				75						80
Glu	Glu	Asp	Phe	Val	Asp	Pro	Trp	Thr	Val	Gln	Thr	Ser	Ser	Ala	Lys
				85					90					95	
Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Ile	Val	Arg	Phe	Gly	Ser	Ser	Lys	Ile
			100					105						110	
Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Gln	Arg	Pro
		115					120					125			
His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His	Arg	Asp	Met	Asn
		130				135					140				
Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Thr
145					150					155					160
Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly	His	Leu	Ile	Pro
				165					170					175	
Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn	Val	Pro	Leu	Val
				180				185						190	
Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys	Asp	Leu	Thr	Leu
		195					200					205			
Asp	Gln	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys	Asp	Ile	Ile	Ala
	210					215					220				
Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr
225					230					235					240
Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val	Lys	Ile	Gln	Lys
				245					250					255	
His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Thr	Asp	Ser
			260					265					270		
Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser
		275					280					285			
Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg	Thr	Asp	Ile	Gln
	290					295					300				
Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr	Phe	Arg	Met	Thr
305					310					315					320
Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Arg	Ile	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro	Ala	Leu	Leu	His
				325					330					335	
Ser	Thr	Phe	Phe	Pro	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr	Lys	Met	Ser	Ala
			340					345					350		
Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr	Ala	Lys	Gln	Ile
		355					360					365			
Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly	Arg	Asp	Thr	Ile
	370					375						380			
Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Phe
385					390					395					400
Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys	Leu	Glu	Gln	Lys	Ile
				405					410				415		
Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys
			420					425					430		
Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	His	Gln	Ala	Arg
			435				440					445			
Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe	Met	Thr	Pro	Arg
	450					455					460				
Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln									
465					470										

<210> 6

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'fluoro C ligado na posição 5' via um elemento de ligação pentilamino a uma cadeia de polietilenoglicol de 40 quilodalton

<220>

<221> misc_feature

<222> (2), (3), (9), (11), (15)

<223> 2'OMe G

<220>

<221> misc_feature

<222> (4), (5)

<223> 2'OH (ribo) A

<220>

<221> misc_feature

<222> (6), (10), (14), (17), (18), (20), (24)

<223> 2'fluoro U

<220>

<221> misc_feature

<222> (7), (16), (22), (25), (26)

<223> 2'fluoro C

<220>

<221> misc_feature

<222> (8), (12), (13), (19), (21), (23)

<223> 2'OMe A

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> 2'OMe G ligado na posição 3' à extremidade 3' de desoxiT

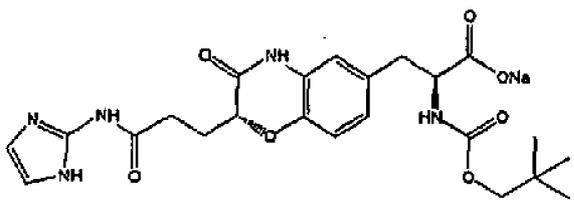
<400> 6

cggaaucagu gaaugcuuau acauccg 27

Lisboa, 2012-05-28

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo (i) um fragmento angiostático de triptofanil-ARNt-sintetase (TrpRS), em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) um composto possuindo a fórmula



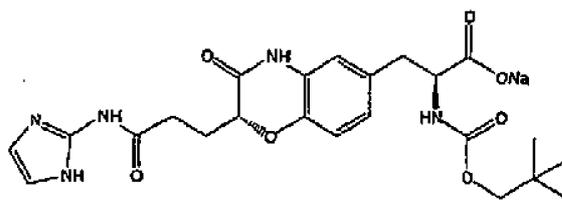
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o fragmento angiostático de TrpRS possui a sequência de resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, compreendendo adicionalmente pelo menos um agente terapêutico seleccionado entre o grupo que consiste em um esteróide angiostático, um agente antineoplásico, um agente antibacteriano, um agente antiviral e um agente anti-inflamatório.

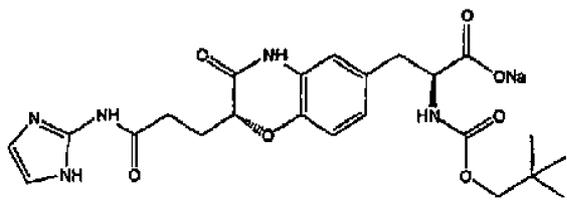
4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o fragmento angiostático de TrpRS é um dímero.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 para utilização num método para o tratamento de uma doença neovascular.

6. Utilização de (i) um fragmento angiostático de triptofanil-ARNt-sintetase (TrpRS), em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) um composto possuindo a fórmula:



para a preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento de uma doença neovascular num mamífero através da administração de uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de fármacos compreendendo (i) um fragmento angiostático de triptofanil-ARNT-sintetase (TrpRS), em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) um composto possuindo a fórmula:



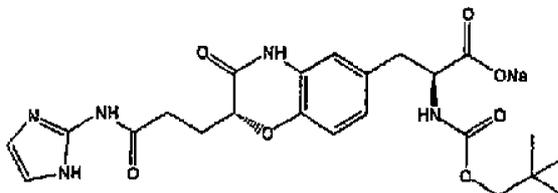
7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a doença é uma doença neovascular retiniana.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a combinação de fármacos destina-se a ser administrada por injeção intravítrea no olho de um mamífero que sofre de uma doença neovascular retiniana.

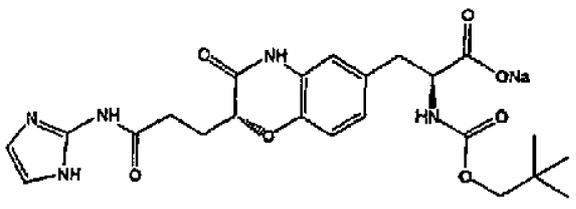
9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a doença é seleccionada entre o grupo que consiste em uma retinopatia isquémica, uma hemorragia vascular, uma fuga vascular, uma coroidopatia, uma degenerescência macular relacionada com a idade, uma retinopatia diabética, uma pseudo-histoplasmose ocular, uma retinopatia da prematuridade, uma anemia das células falciformes e uma retinite pigmentar.

10. Utilização de (i) um fragmento angiostático de triptofanil-ARNT-sintetase (TrpRS), em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de

aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) um composto possuindo a fórmula:



para a preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento de um tumor num mamífero através da administração de uma quantidade inibidora do desenvolvimento vascular de uma combinação de fármacos compreendendo (i) um fragmento angiostático de triptofanil-ARNt-sintetase (TrpRS), em que o fragmento angiostático de TrpRS possui uma sequência de resíduos de aminoácidos seleccionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; (ii) o pegaptanib sódico e (iii) um composto possuindo a fórmula:



11. Utilização de acordo com a reivindicação 6 ou 10, em que o mamífero é um ser humano.

12. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 11, em que o fragmento angiostático de TrpRS possui a sequência de resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

13. Composição farmacêutica compreendendo uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e um veículo farmacêuticamente aceitável para ela.

Lisboa, 2012-05-28

T2-TyrRS (SEQ ID NO: 1)

MSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPPSSEAM
HVGHLIIPFIETKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYSAYAVENAKDIIACGFDINKTFIFSDLDYMGMSGG
FYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTSDCIGKISFPALQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDY
APRIGYKPKALLHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTDTAKQIKTKVKNKHAFSGGRTDIEHRQFGGNCDDVVSF
MYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFO

T2-TyrRS-GD (SEQ ID NO: 2)

MSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPPSSEAM
HVGHLIIPFIETKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDQAYGDAVENAKDIIACGFDINKTFIFSDLDYMGMSGG
FYKNVVKIQKHVTFNQVKGIFGFTSDCIGKISFPALQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDY
APRIGYKPKALLHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTDTAKQIKTKVKNKHAFSGGRTDIEHRQFGGNCDDVVSF
MYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSFDFO

FIG. 1

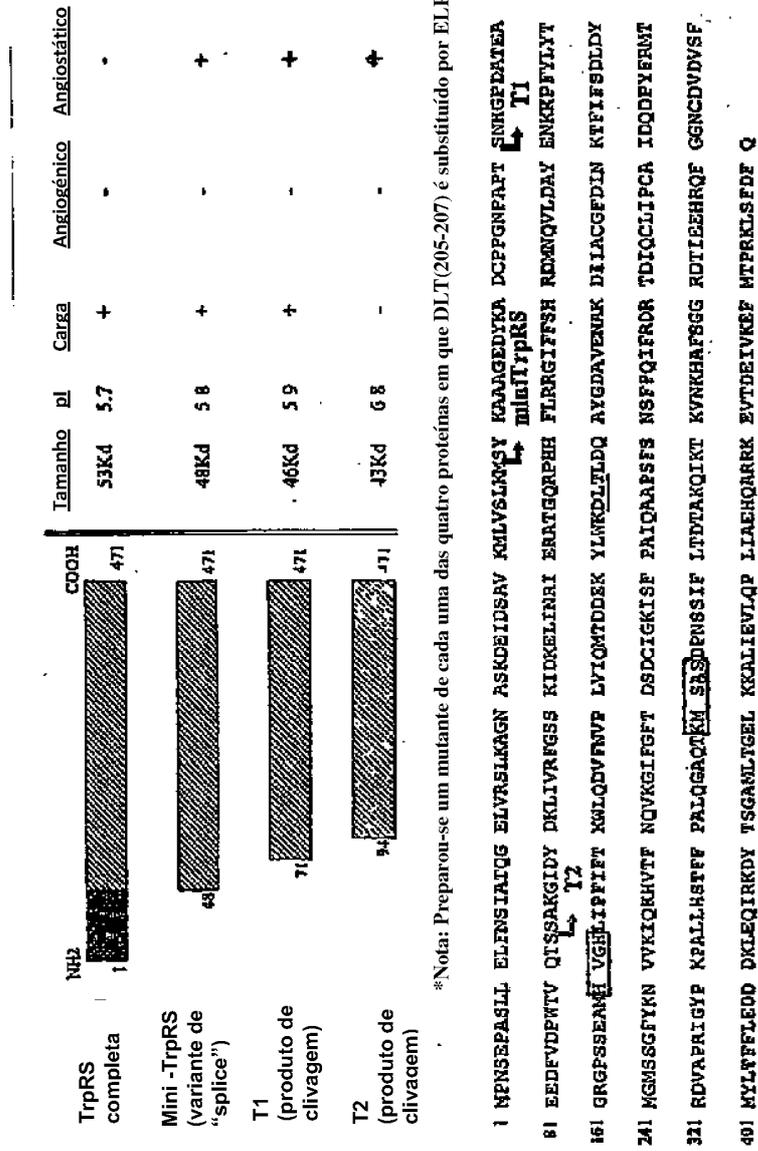
Mini TprRS (SEQ ID NO: 3)

MSYKAAAGEDYKADCPGENPAPTSNHGPDTEAEEDFVDPWTVQTSSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERAT
GQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVLDAYENKKPFYLYTGRGPPSSEAMHVGHILIPFIFTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKY
LWKDLTLDDQAYSAYAVENAKDIIACGFDINKTFIFSDLDYMGSSGFYKNVVKIQKHVTFNQKGI FGFTDSDCIGKI
SFPALQAAPSFNSFPQIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDVAPRIGYPKPALHSTFFPALQGAQTKMSASDP
NSSIFLTDTAKQIKTKVNKHAFSGGRDTIEEHRQFGGNCDDVVSFMYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKK
ALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDEIVKEFMTPRKLSDFDQ

T1-TprRS (SEQ ID NO: 4)

SNHGPDTEAEEDFVDPWTVQTSSAKGIDYDKLIVRFGSSKIDKELINRIERATGQRPHHFLRRGIFFSHRDMNQVL
DAYENKKPFYLYTGRGPPSSEAMHVGHILIPFIFTKWLQDVFNVPLVIQMTDDEKYLWKDLTLDDQAYSAYAVENAKDIIA
CGFDINKTFIFSDLDYMGSSGFYKNVVKIQKHVTFNQKGI FGFTDSDCIGKISFPALQAAPSFNSFPQIFRDRT
DIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDVAPRIGYPKPALHSTFFPALQGAQTKMSASDPNSSIFLTDTAKQIKTKVNKHAFS
GGRDTIEEHRQFGGNCDDVVSFMYLTFLEDDDKLEQIRKDYTSGAMLTGELKKALIEVLQPLIAEHQARRKEVTDE
IVKEFMTPRKLSDFDQ

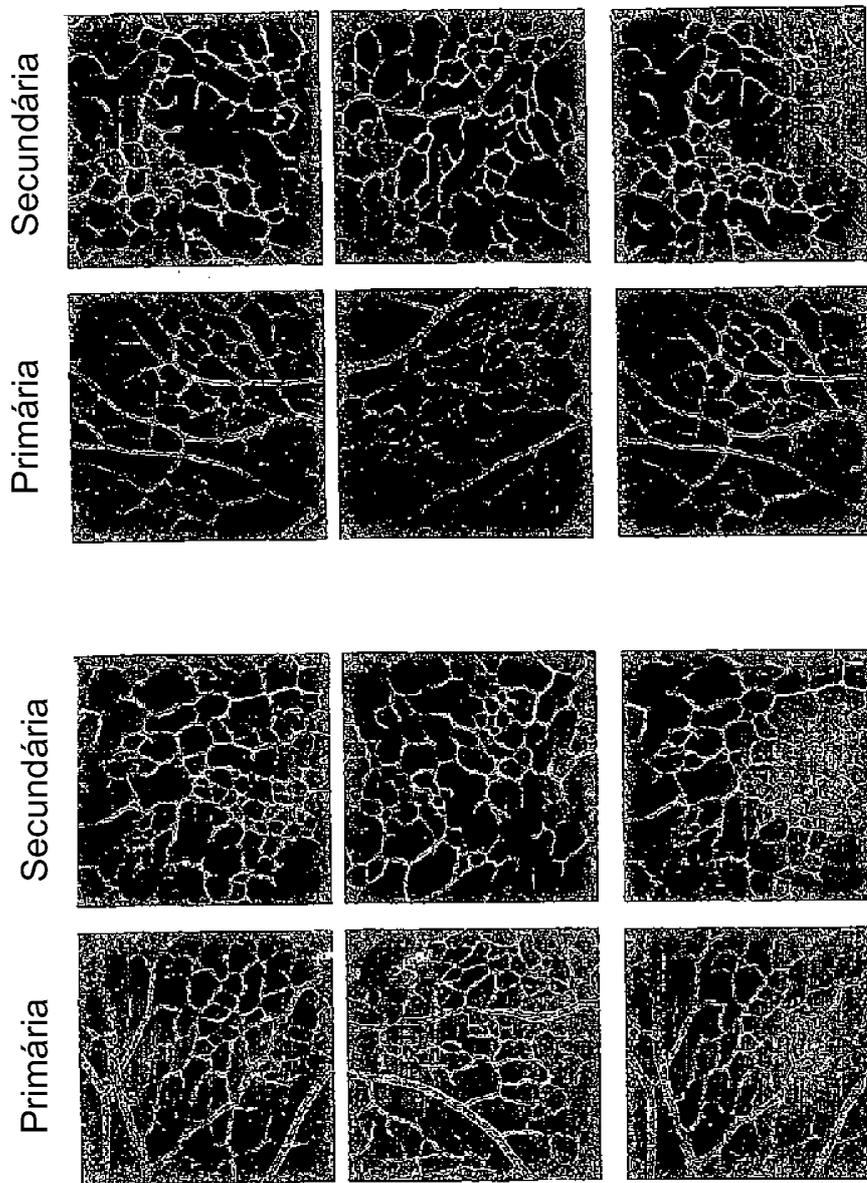
FIG. 2



*Nota: Preparou-se um mutante de cada uma das quatro proteínas em que DLT(205-207) é substituído por ELR.

FIG. 3

FIG. 4



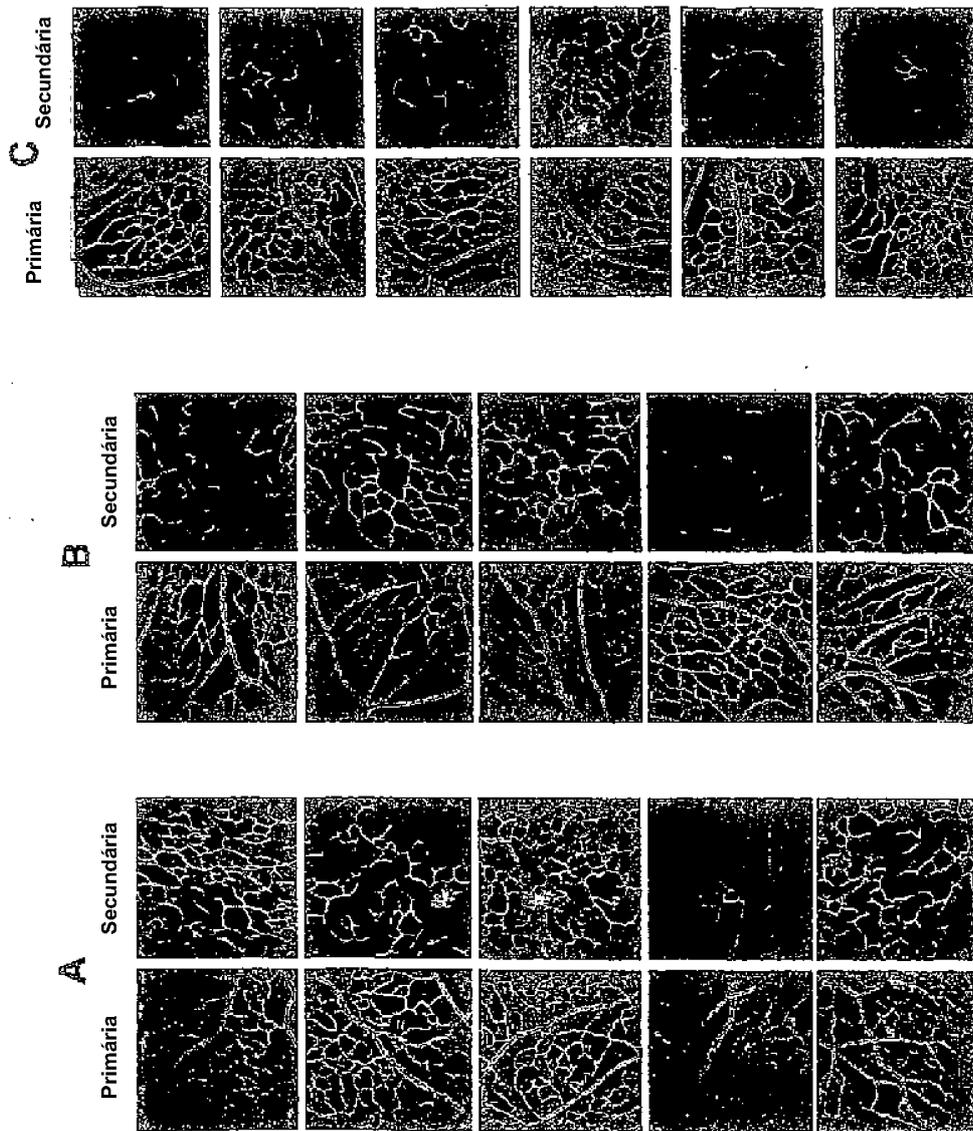


FIG. 5

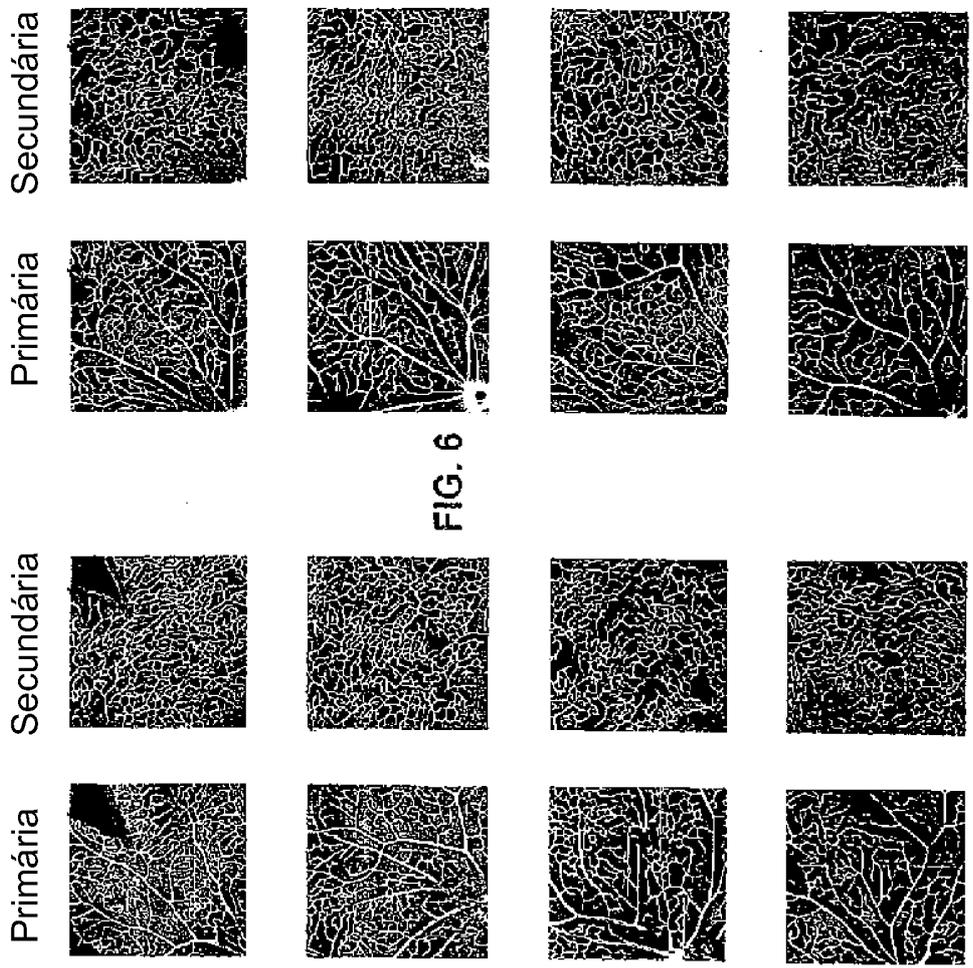
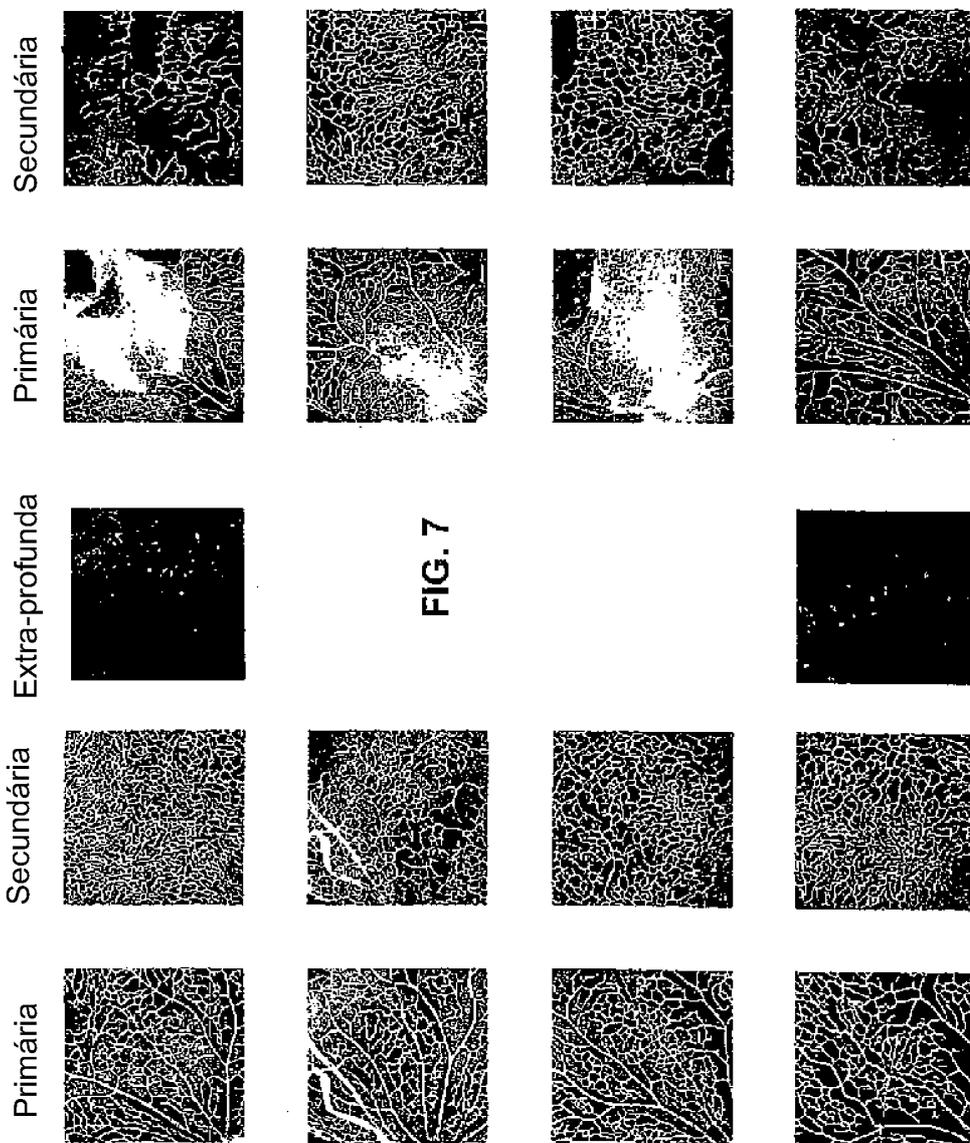


FIG. 6



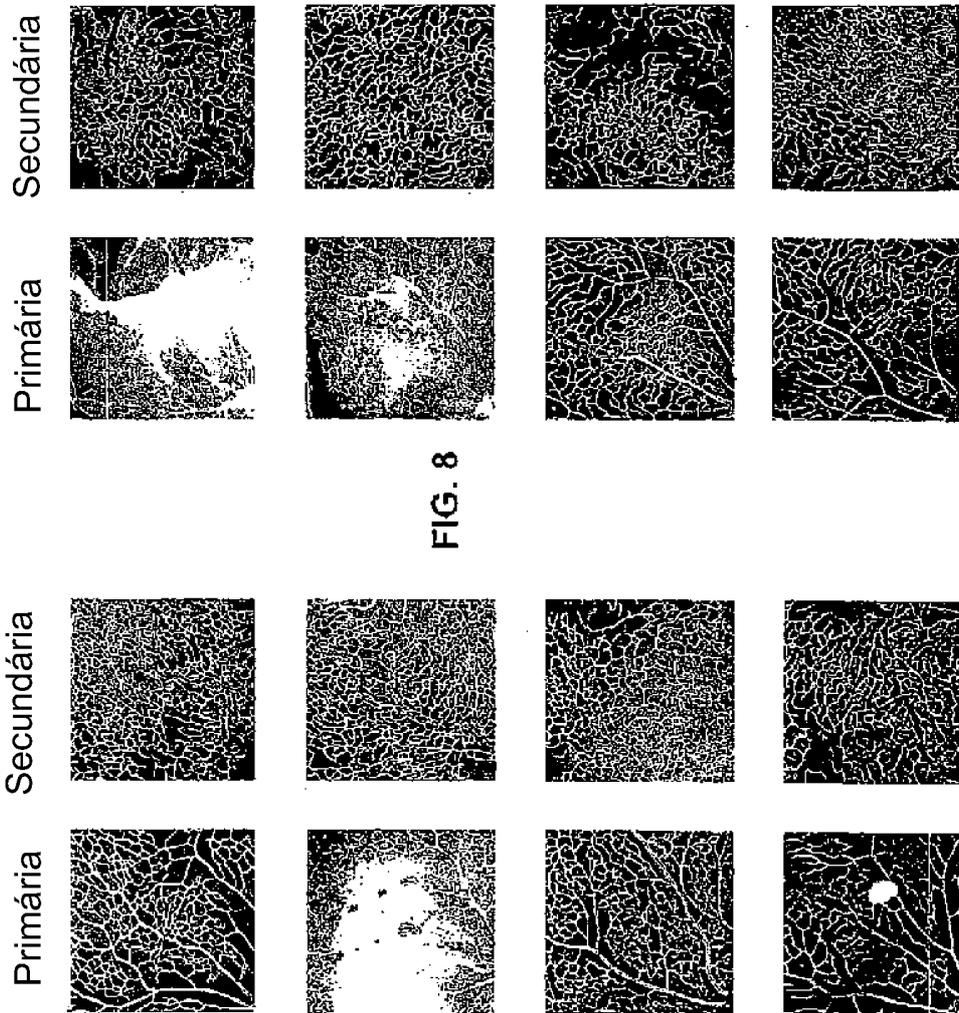


FIG. 8

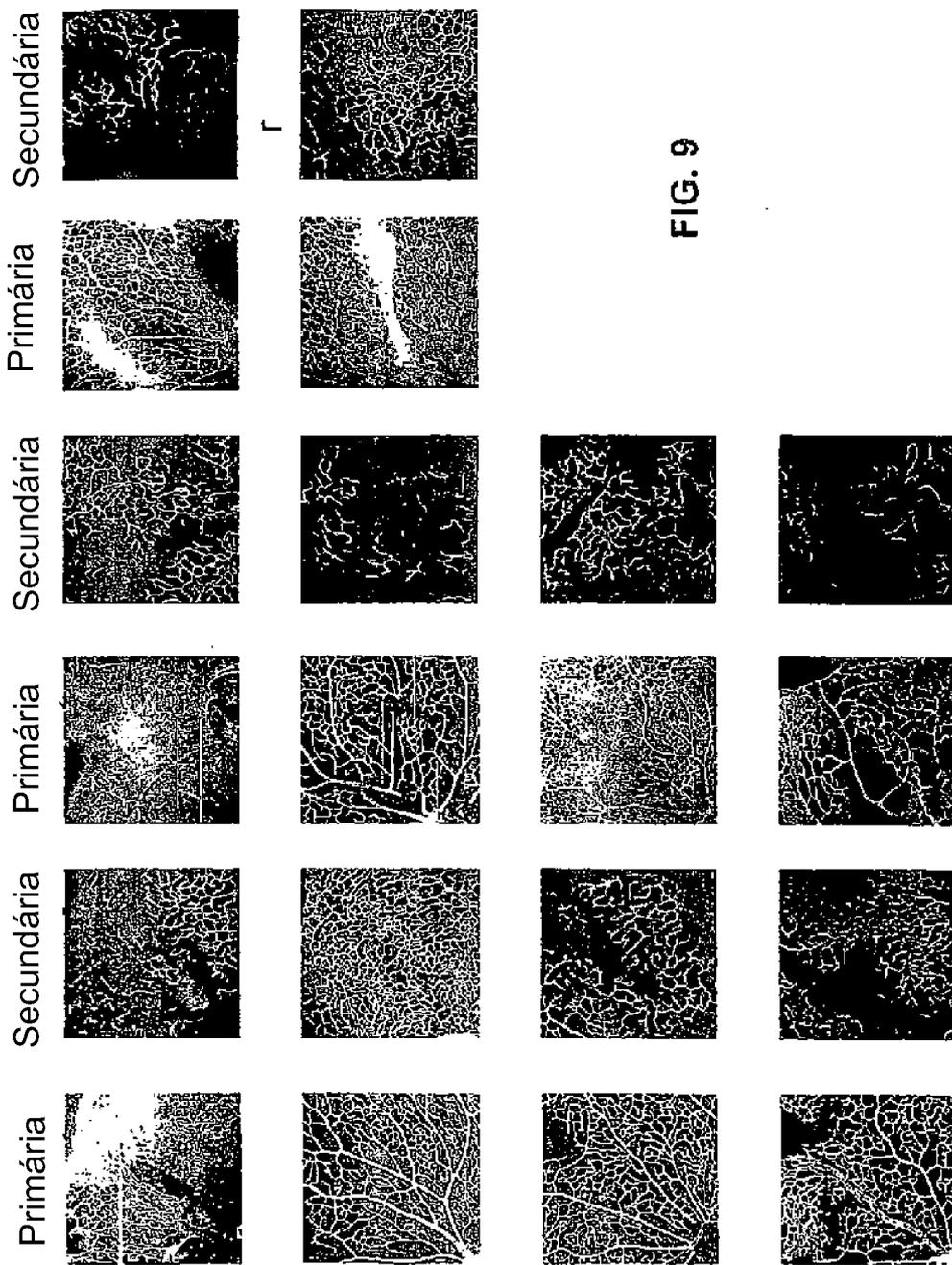


FIG. 9

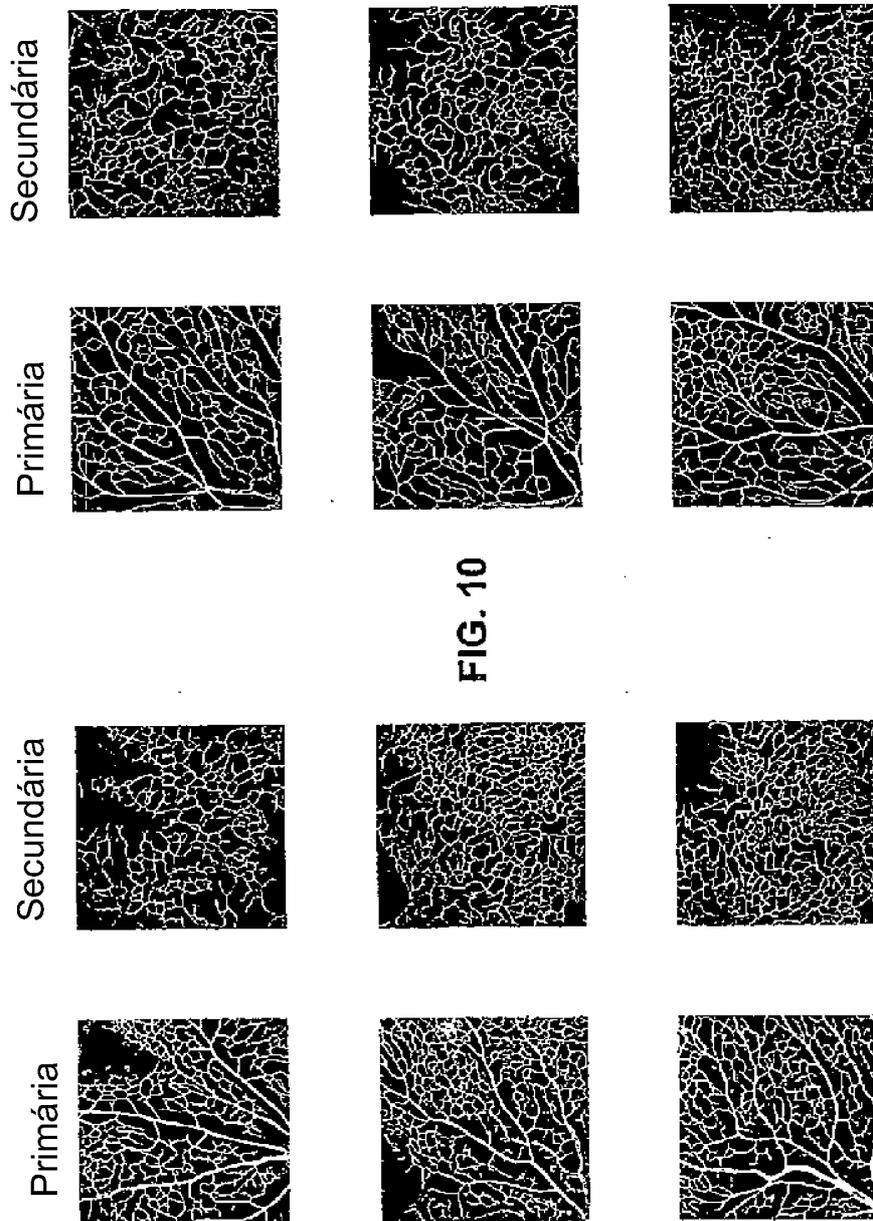
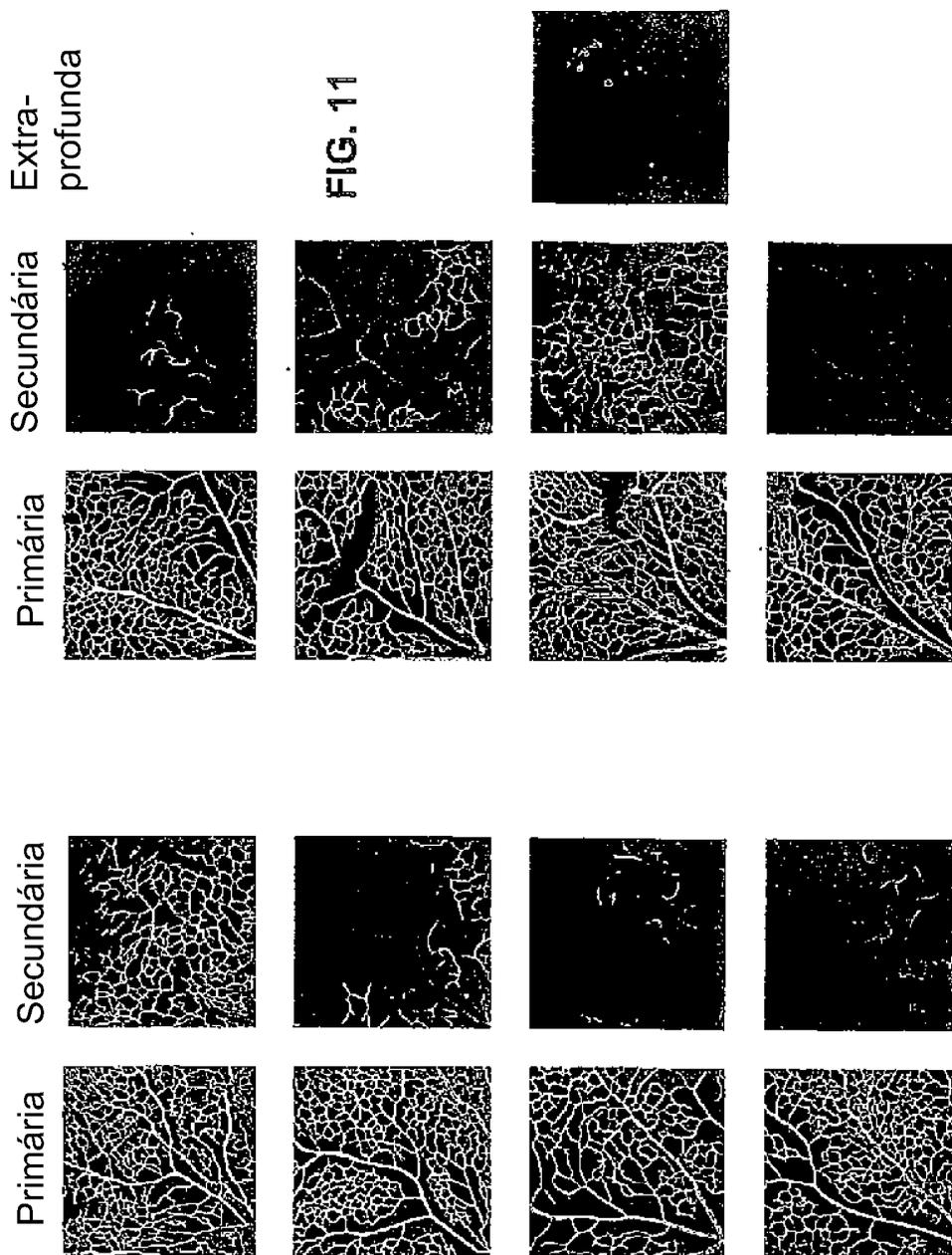


FIG. 10



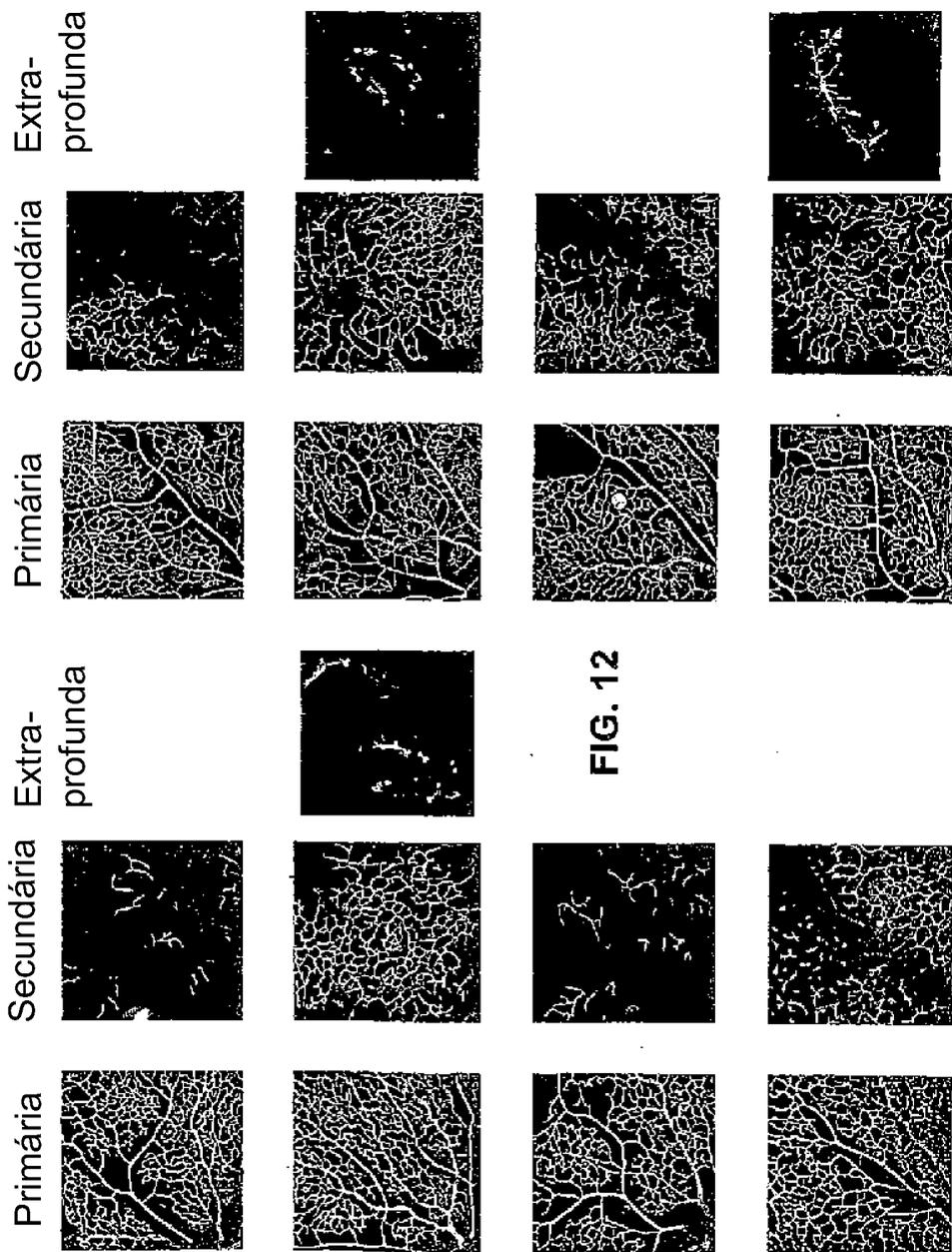
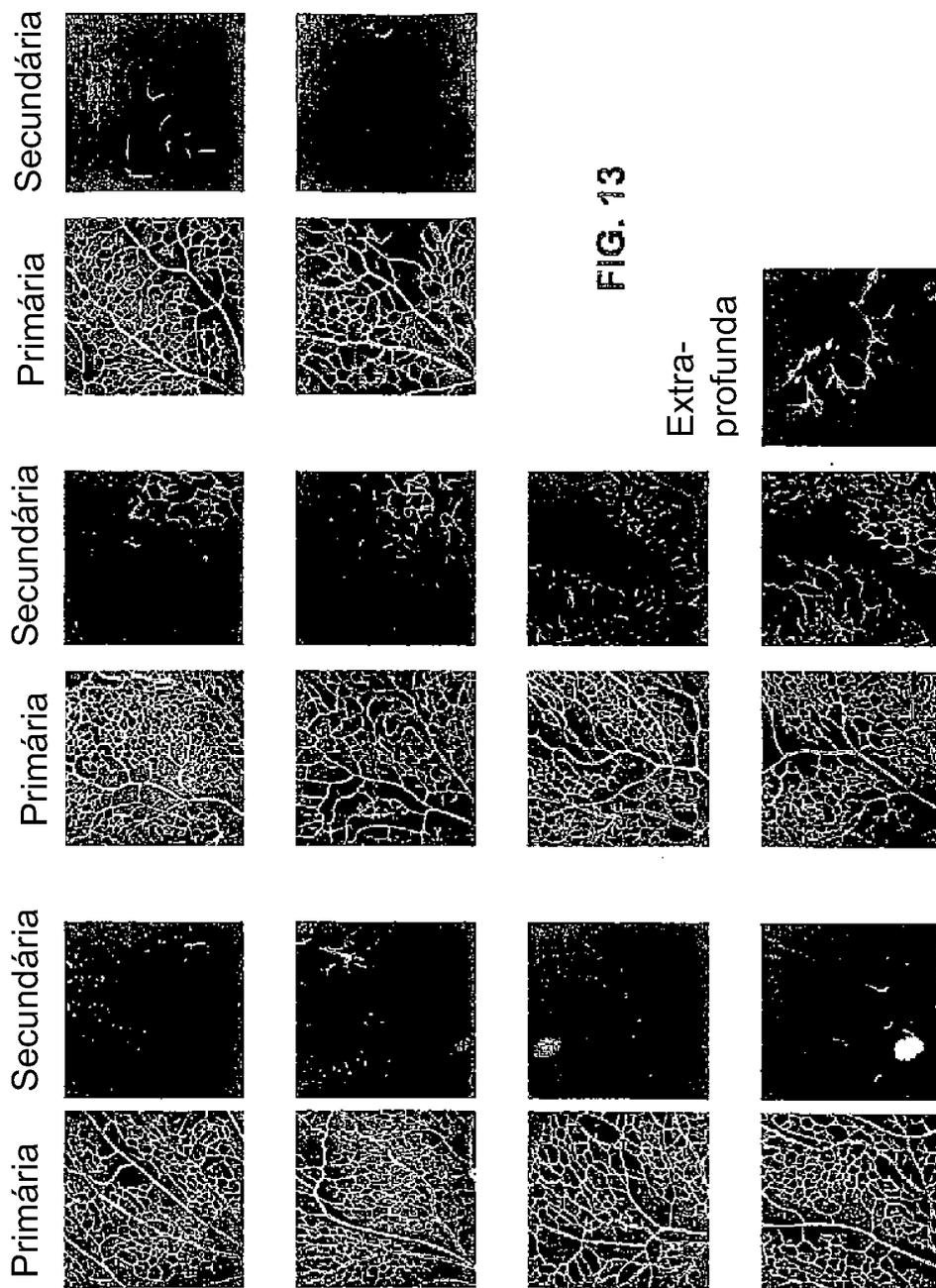


FIG. 12



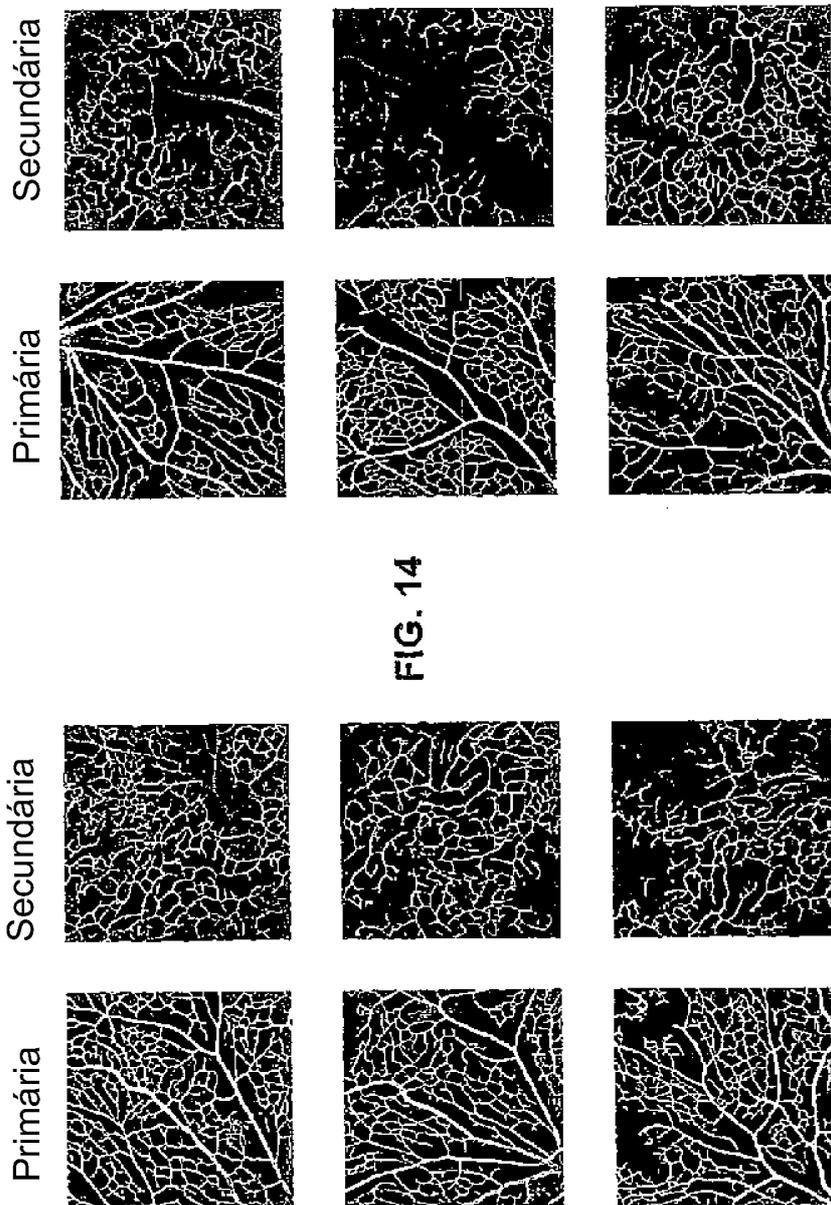
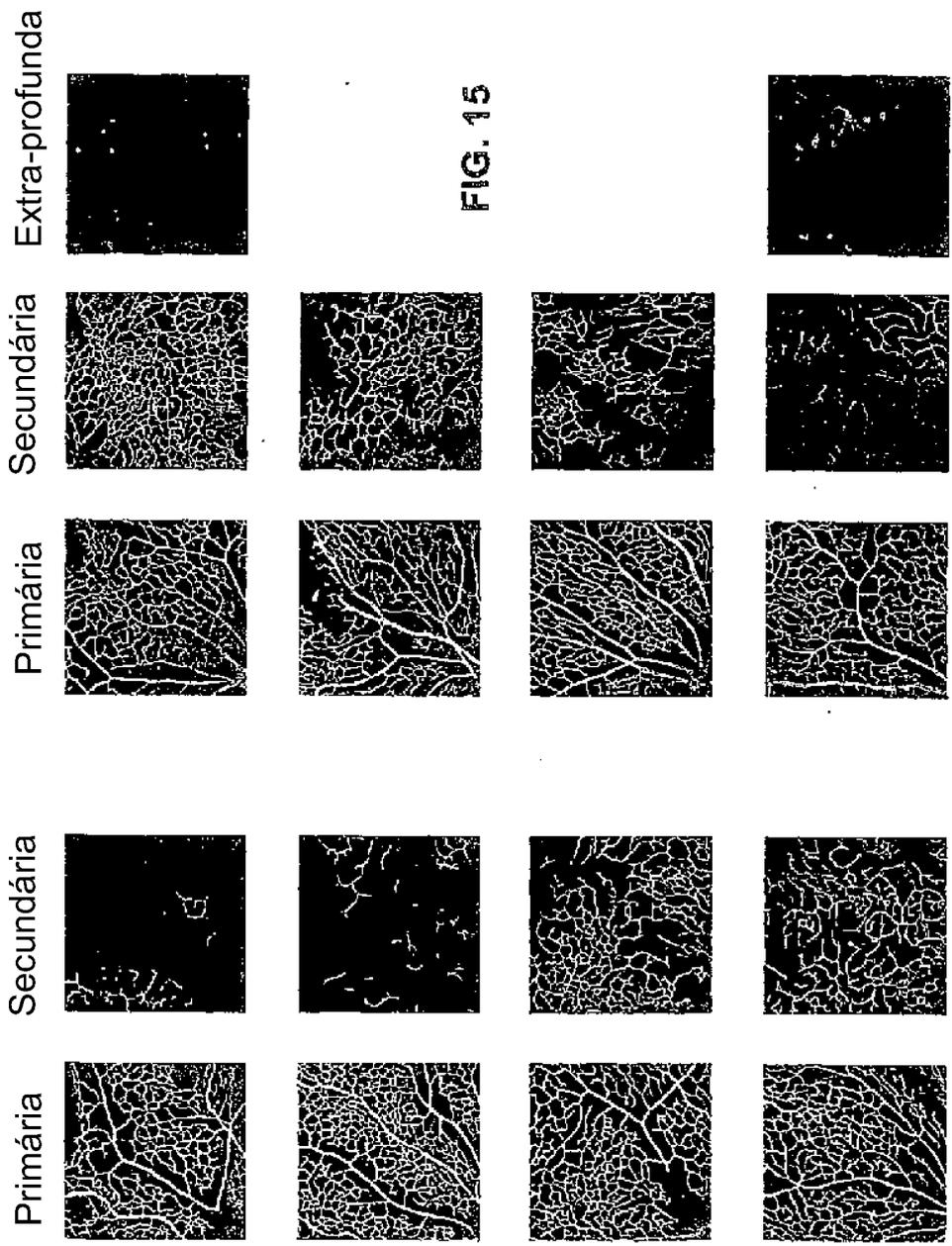


FIG. 14



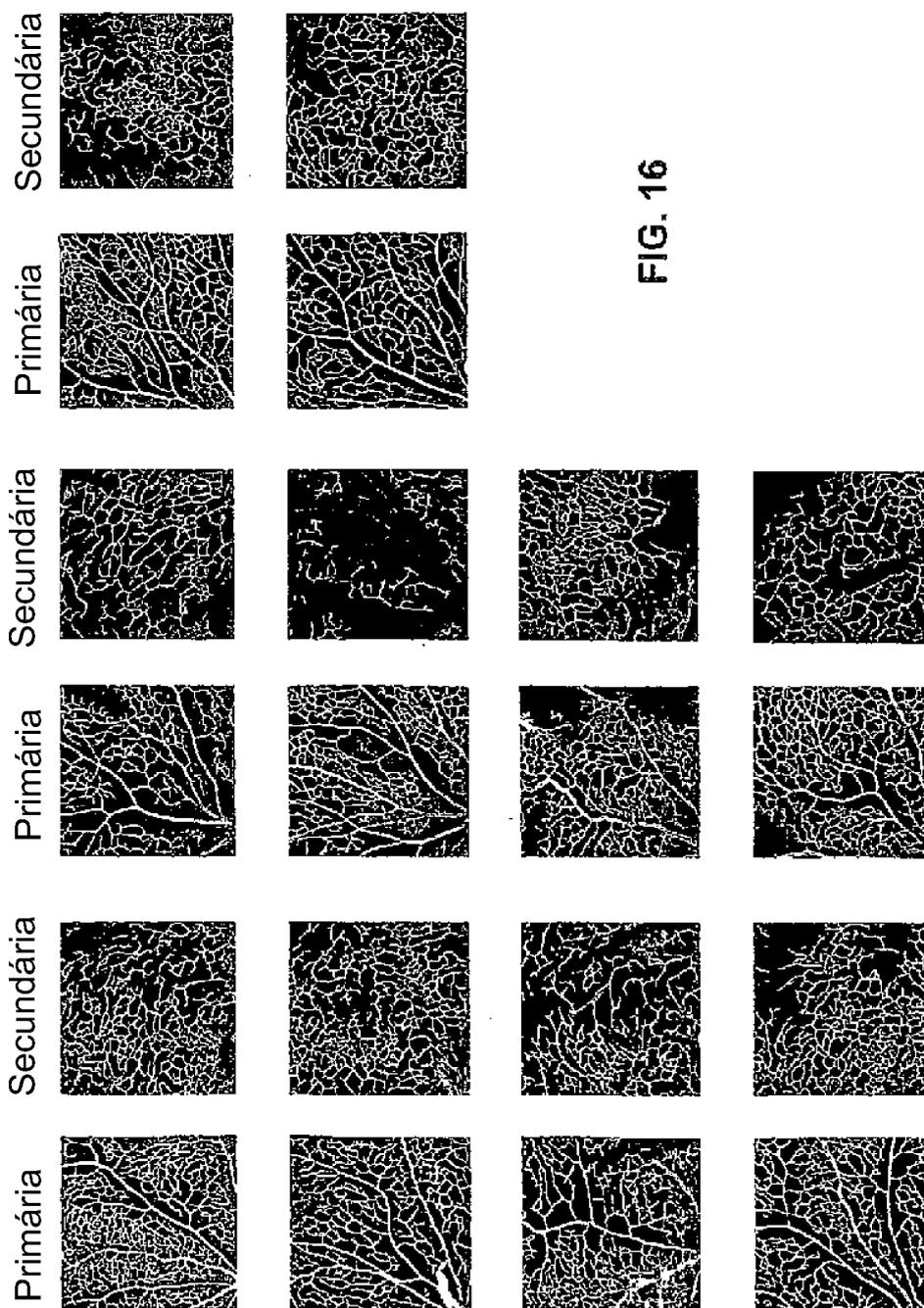


FIG. 16

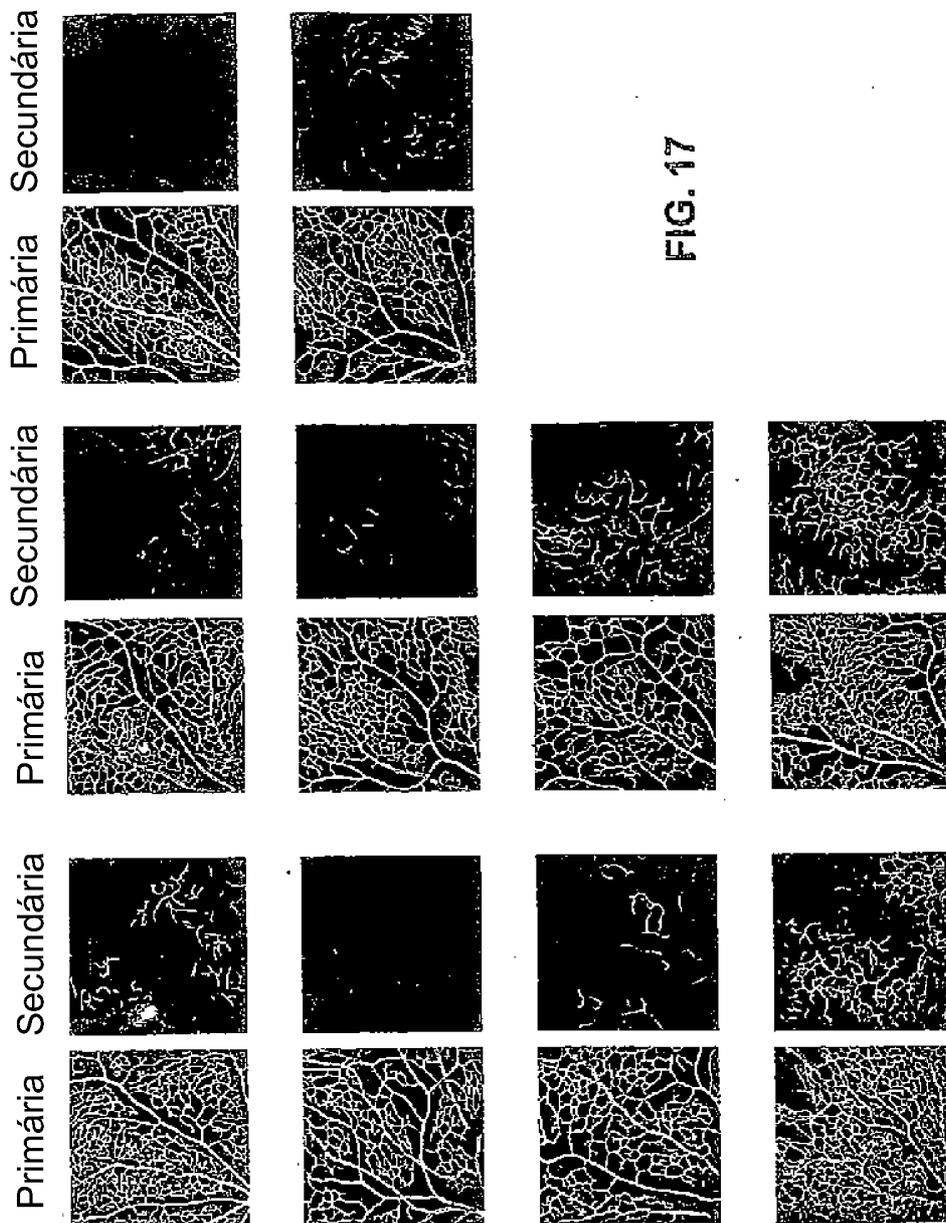


FIG. 17

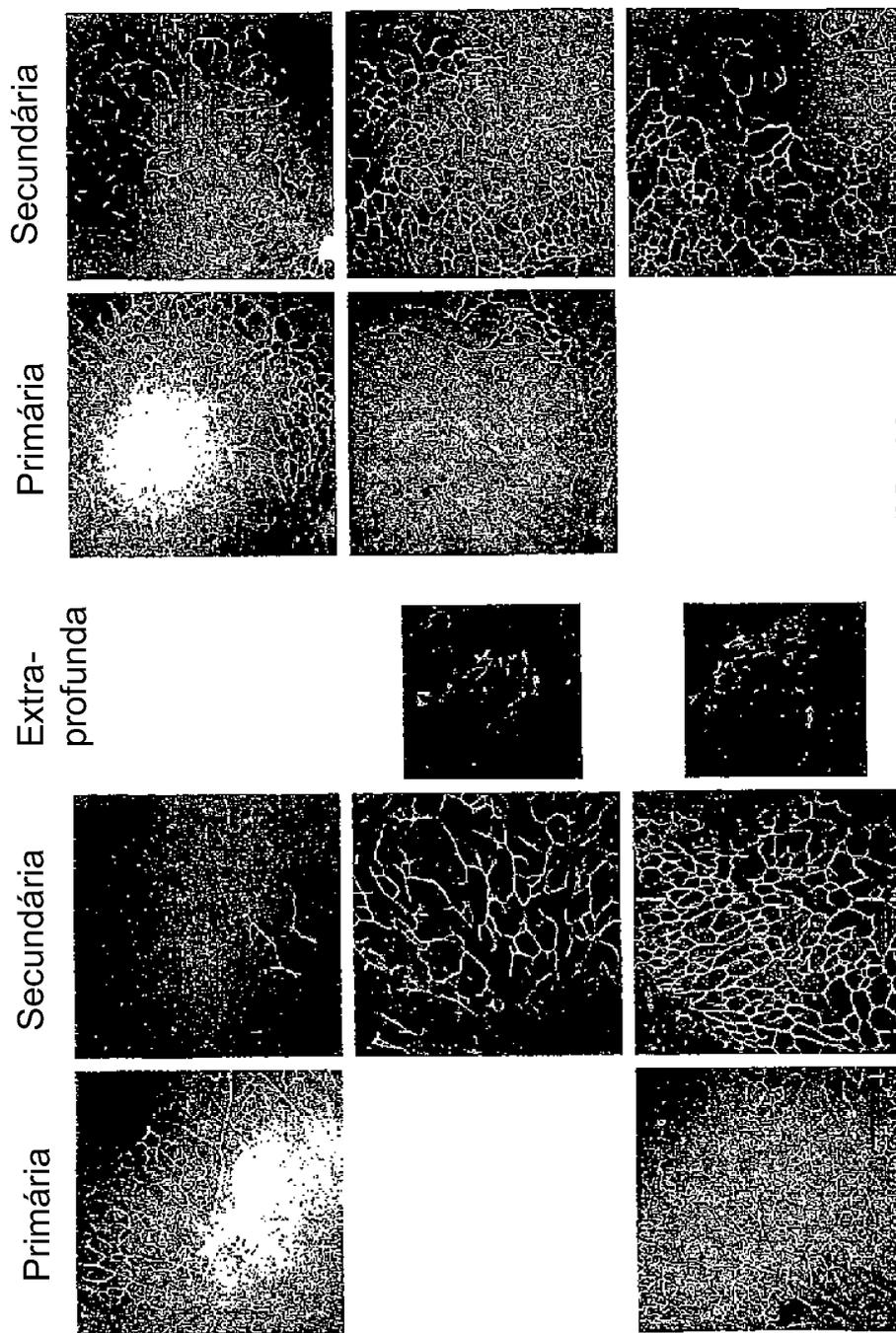


FIG. 19

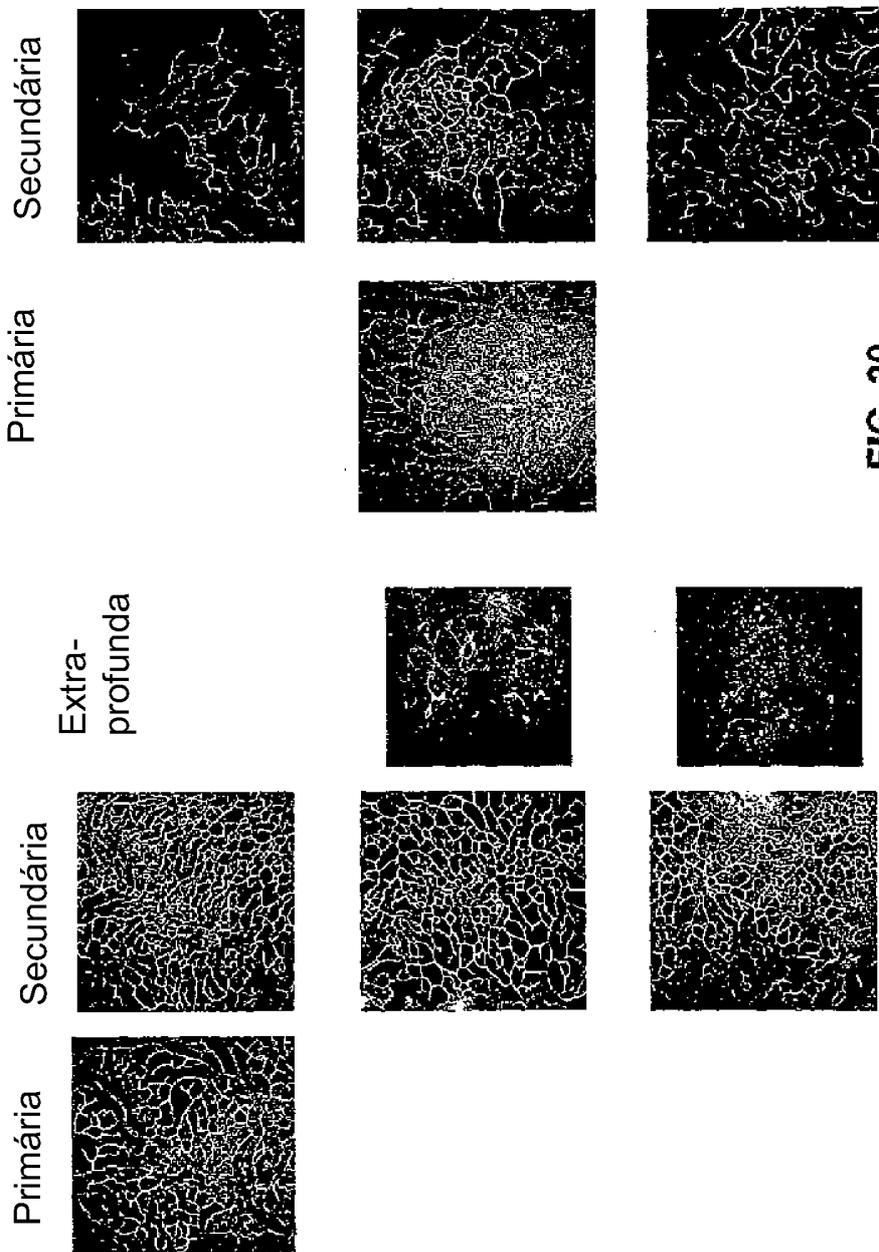


FIG. 20

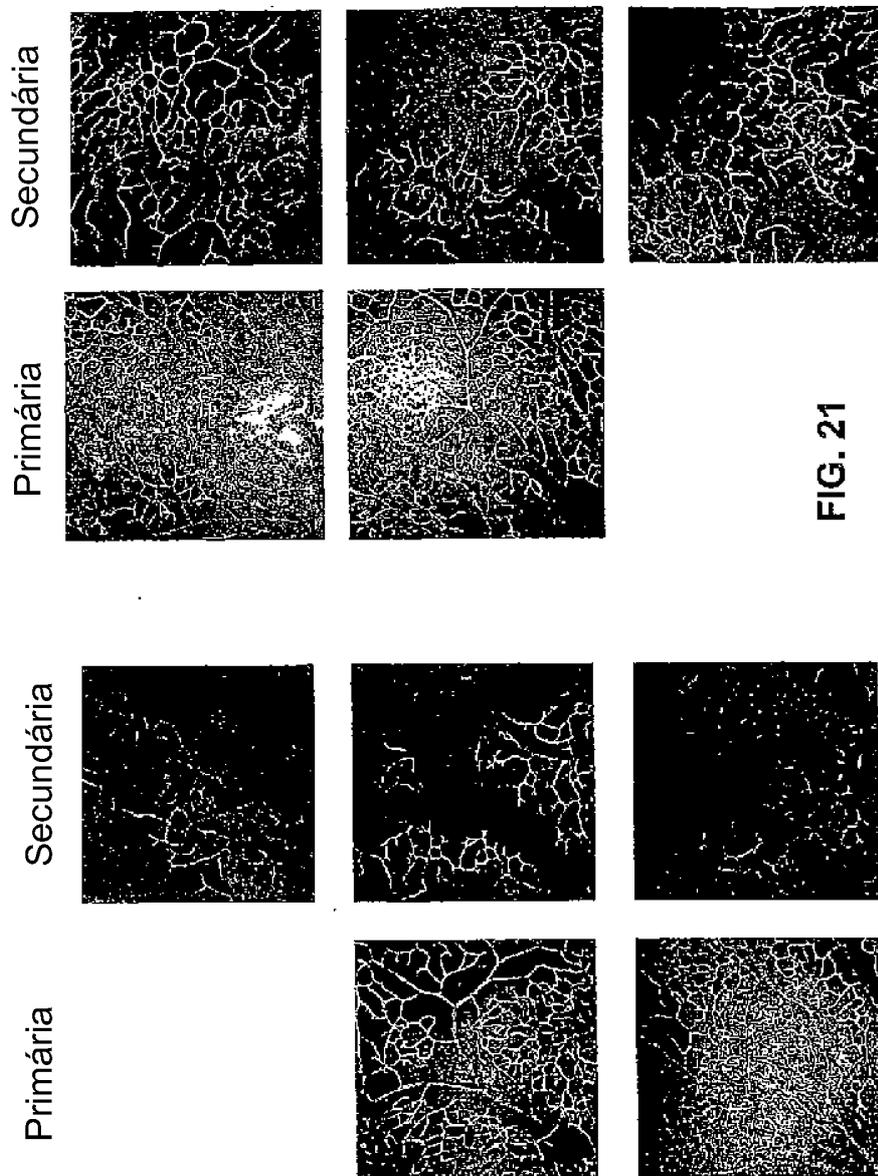


FIG. 21

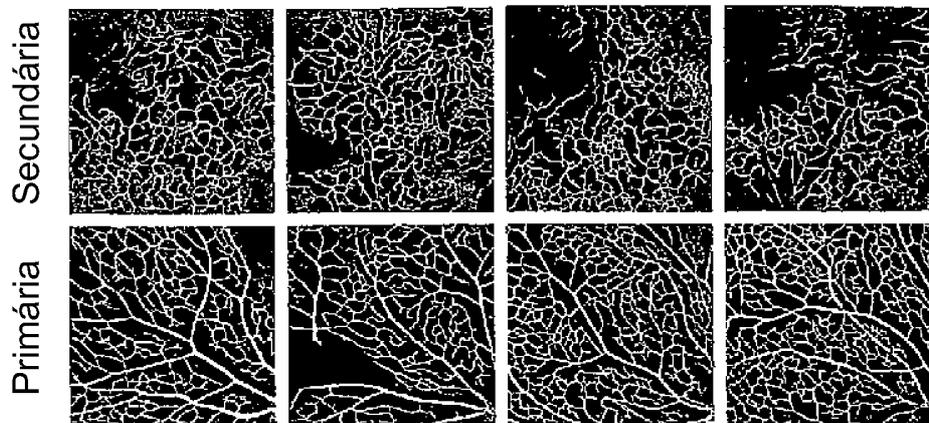
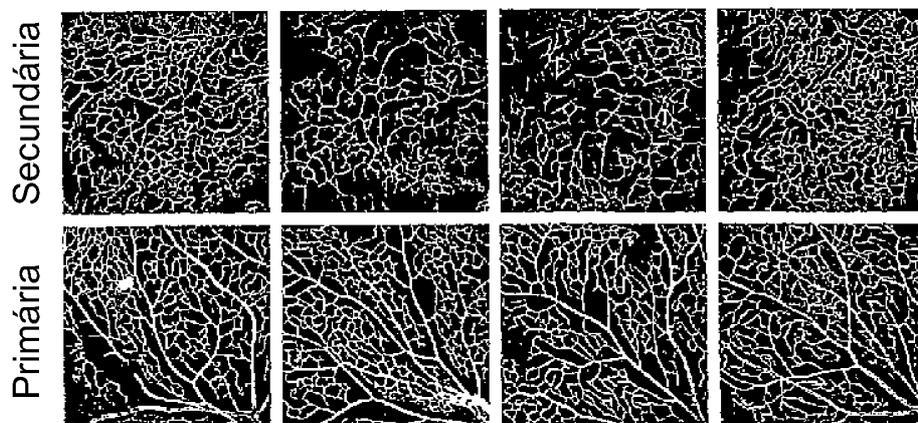


FIG. 22



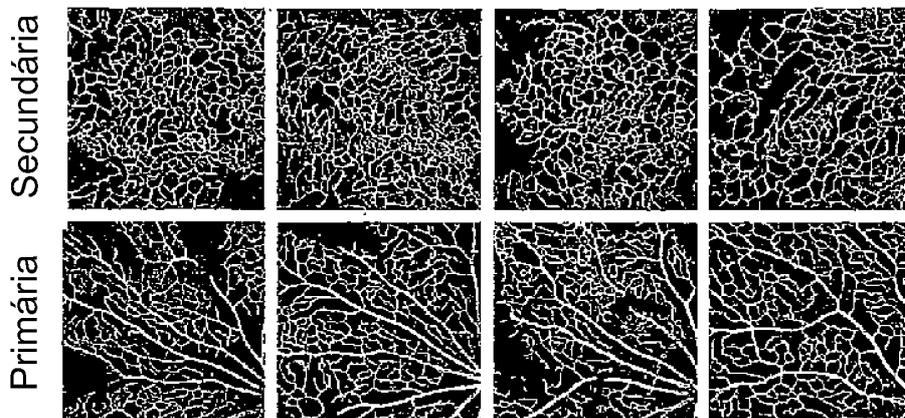
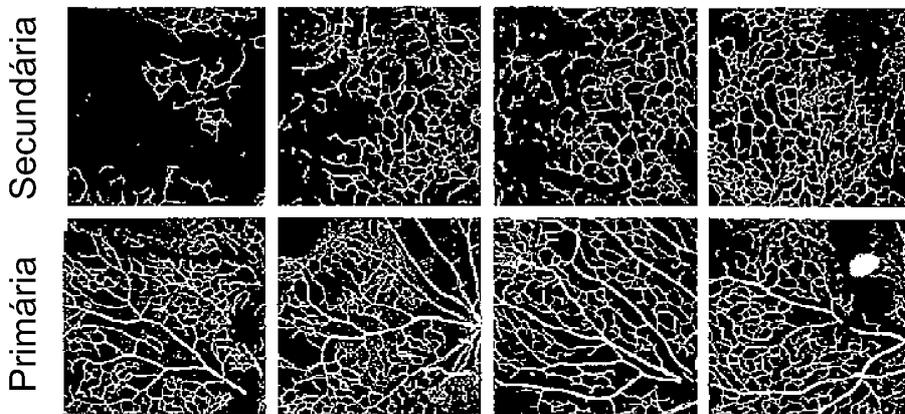


FIG. 23



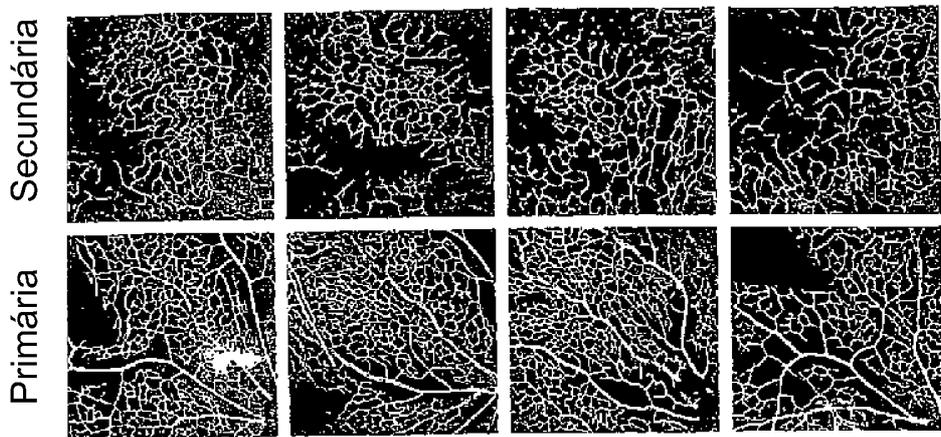
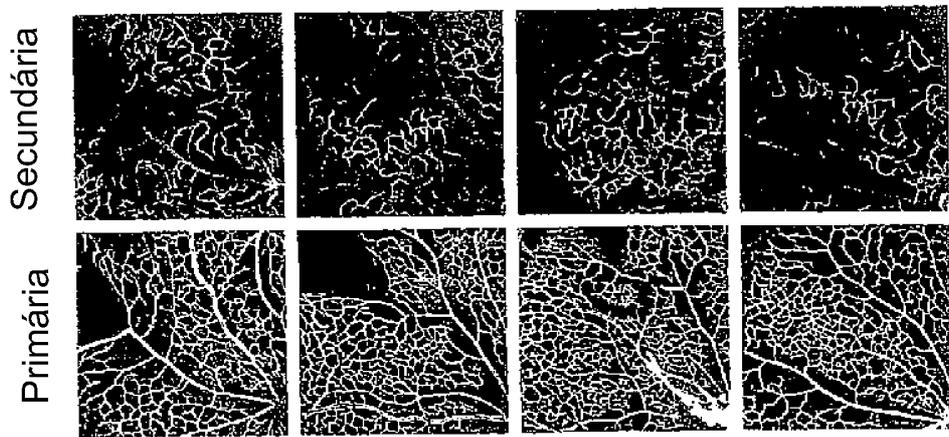


FIG. 24



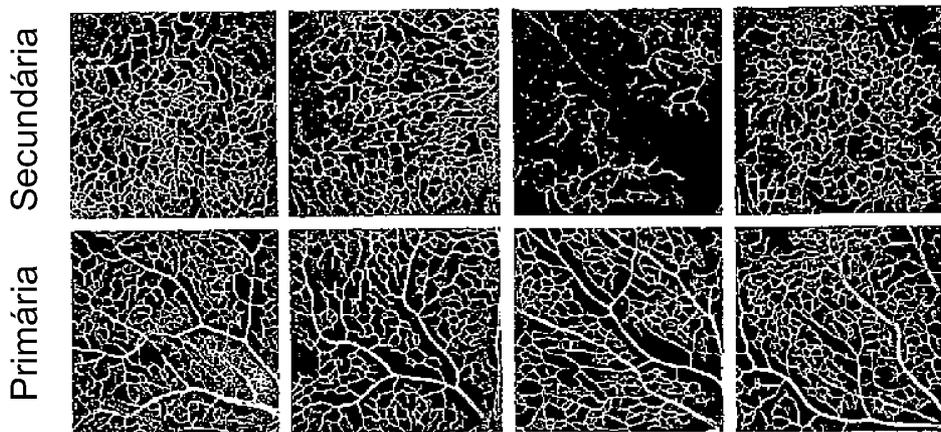
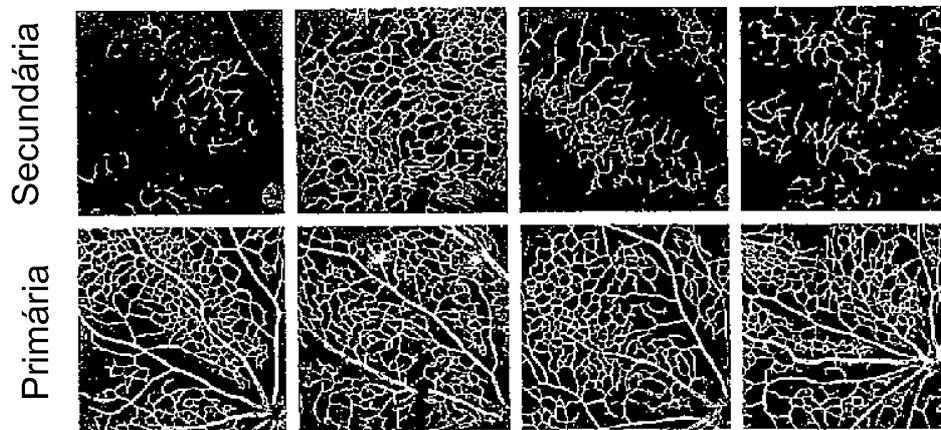


FIG. 25



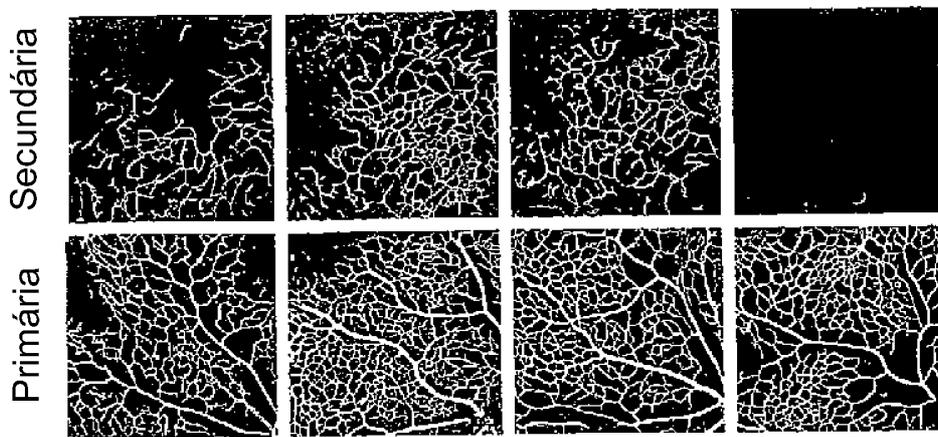
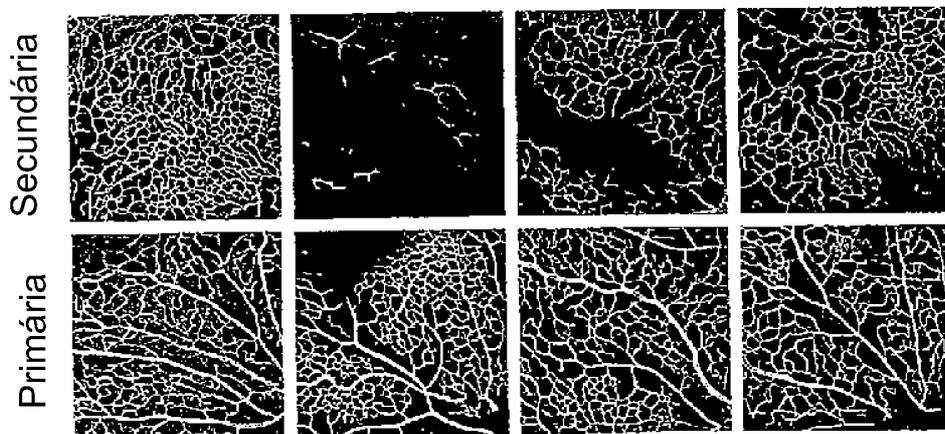


FIG. 26



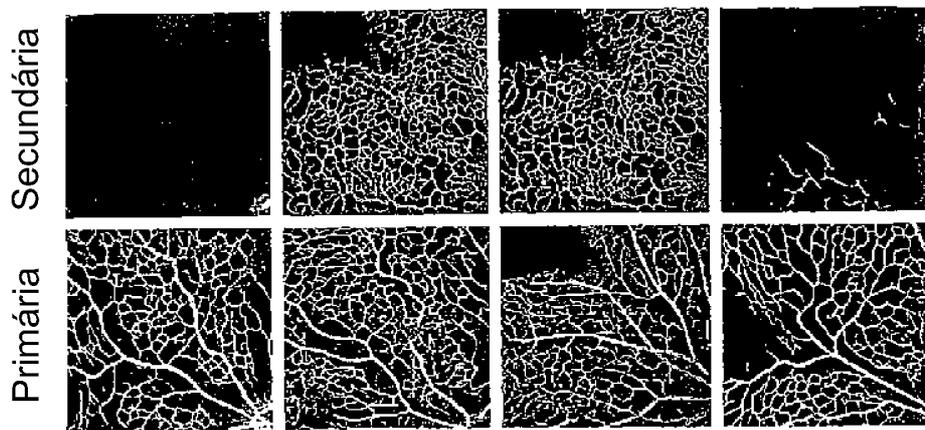
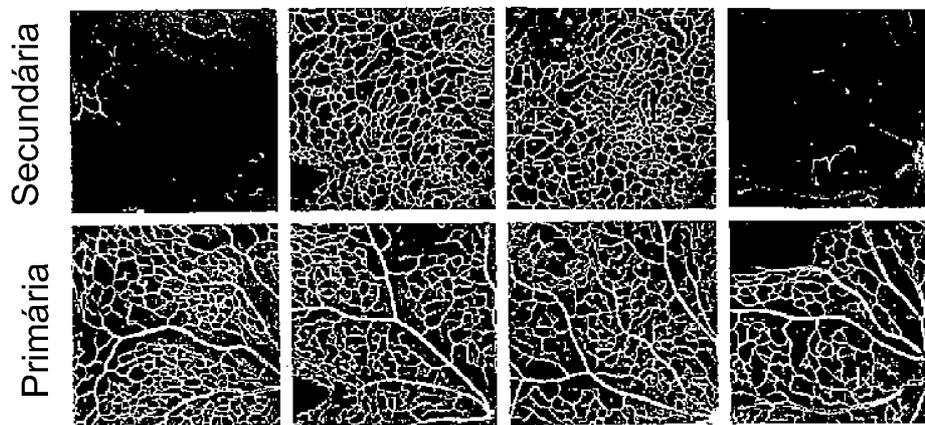


FIG. 27



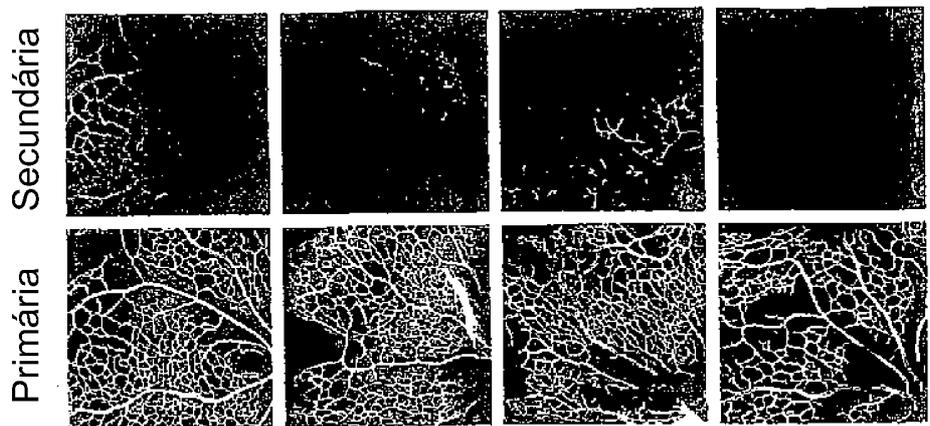
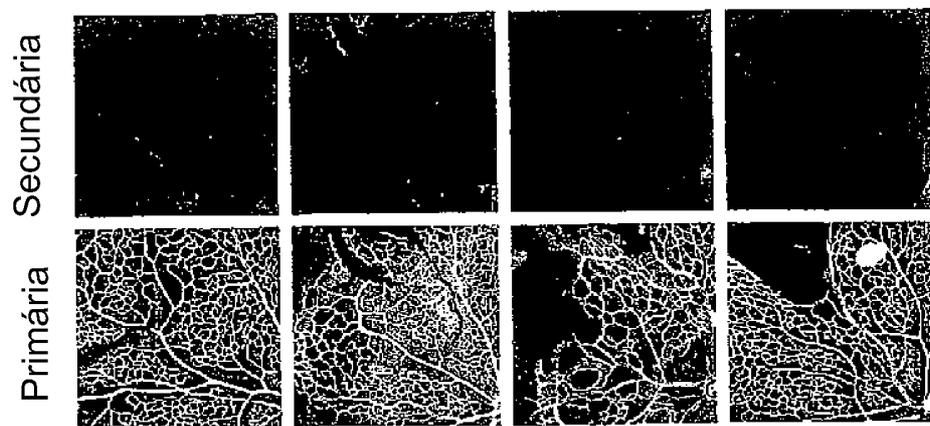


FIG. 28



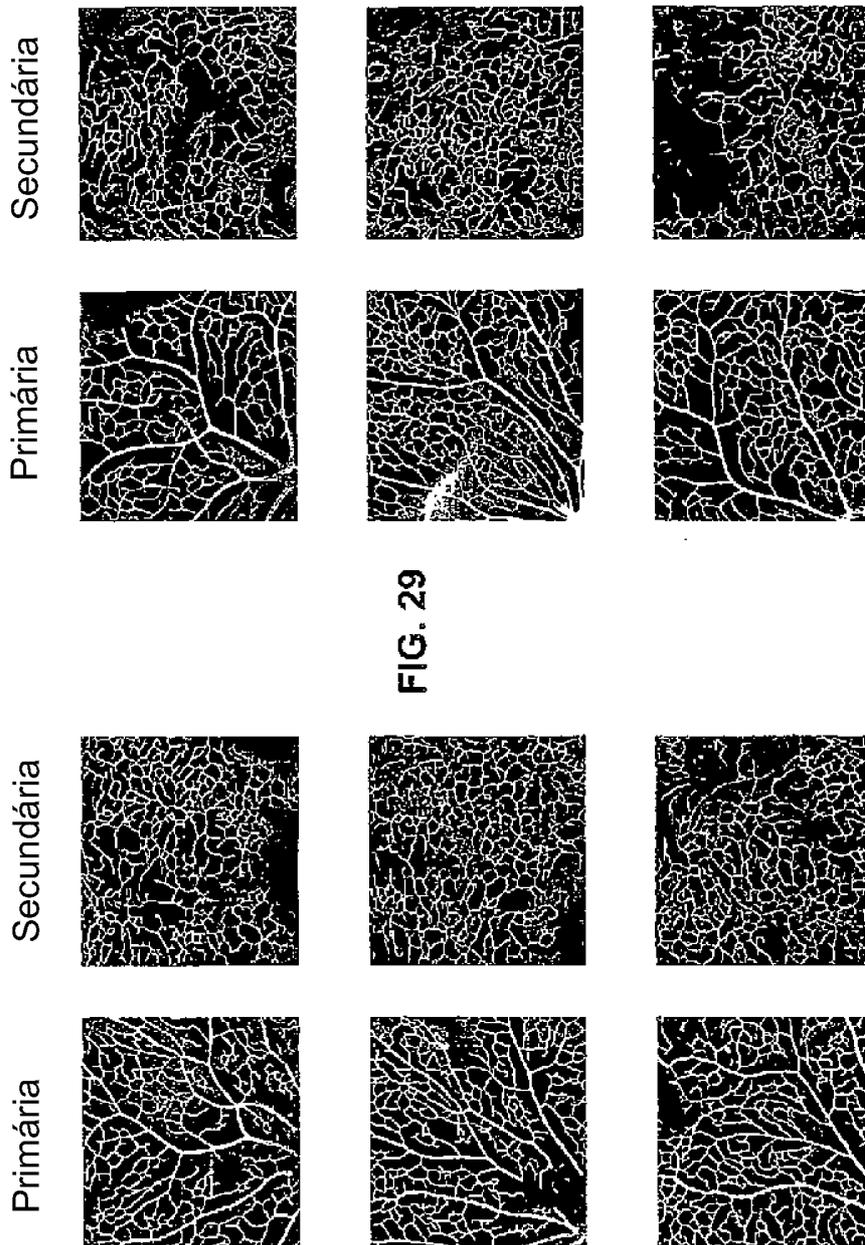


FIG. 29

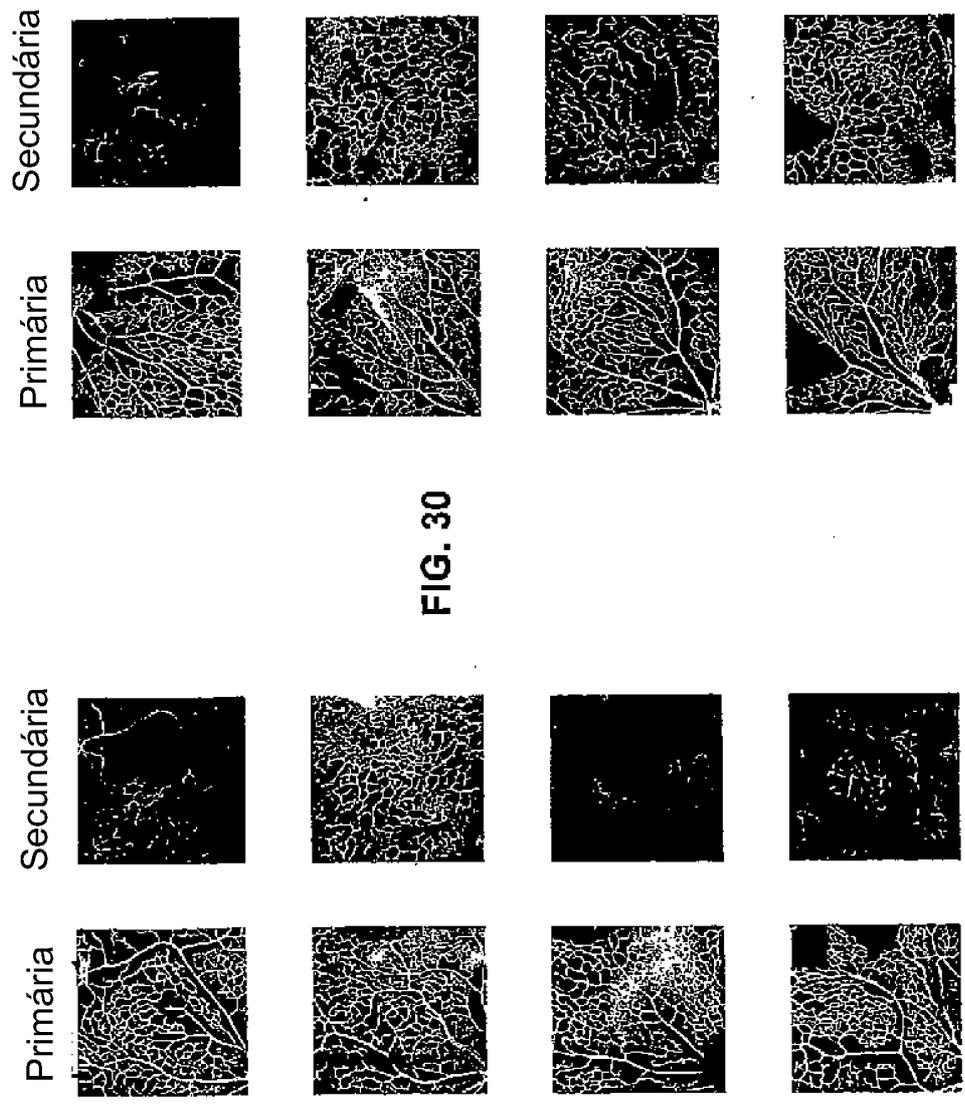
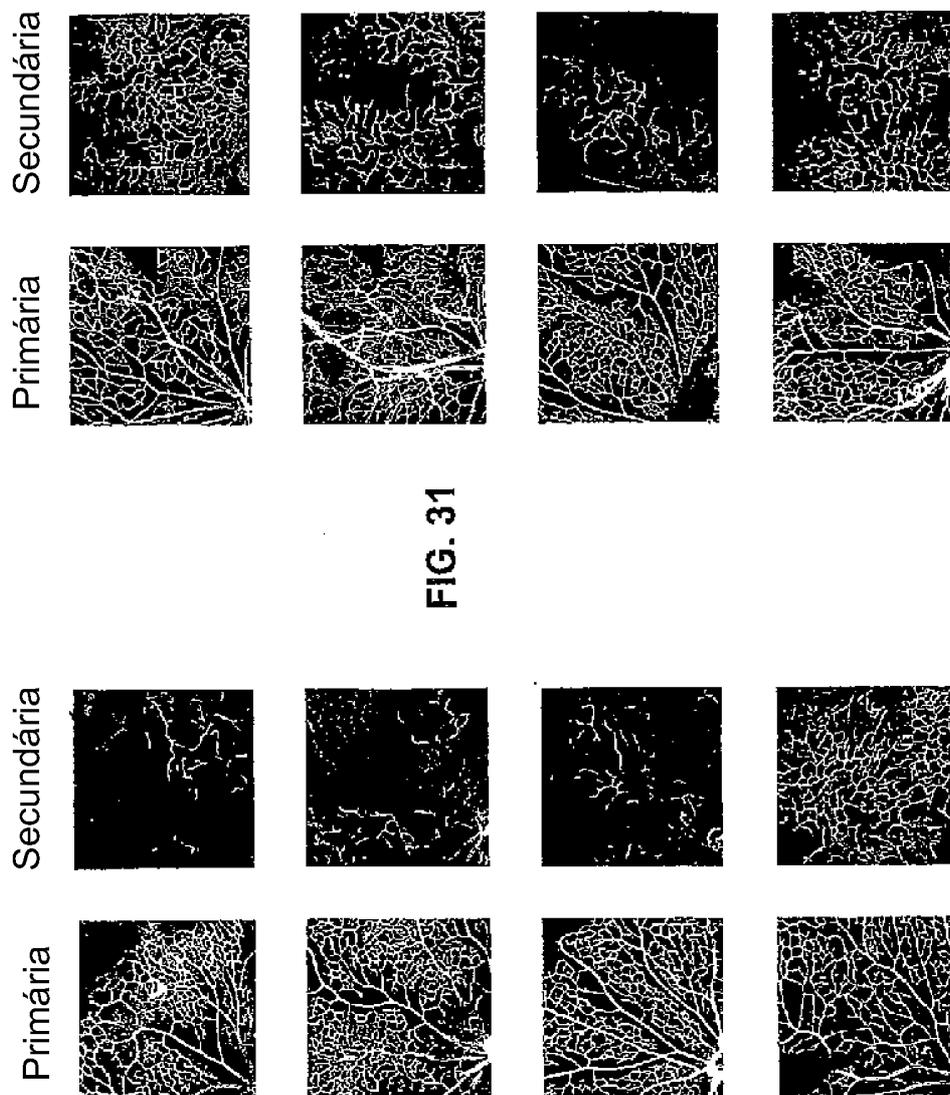


FIG. 30



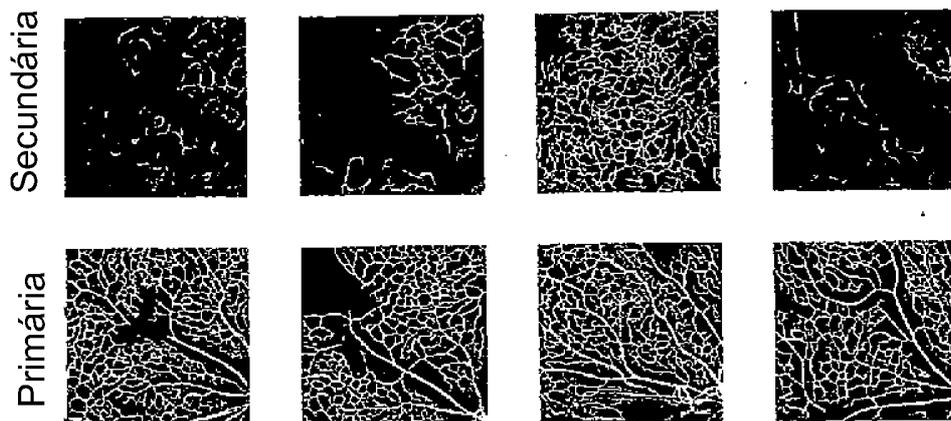
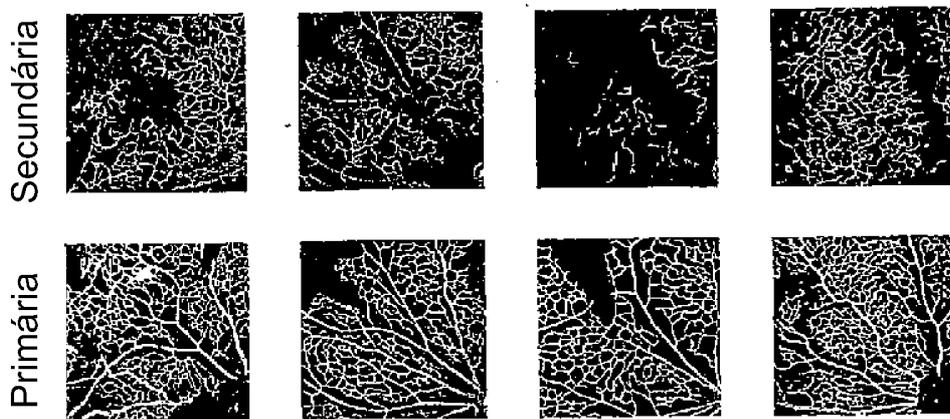


FIG. 32



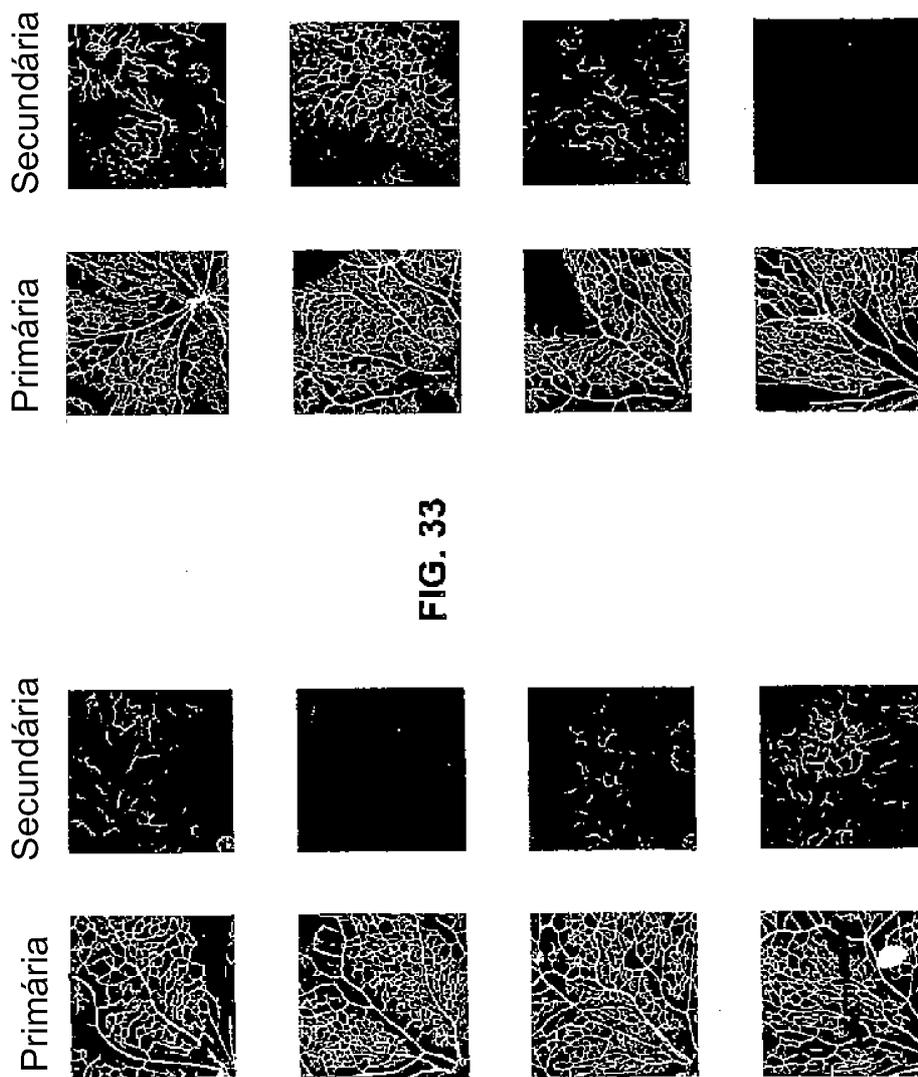


FIG. 33

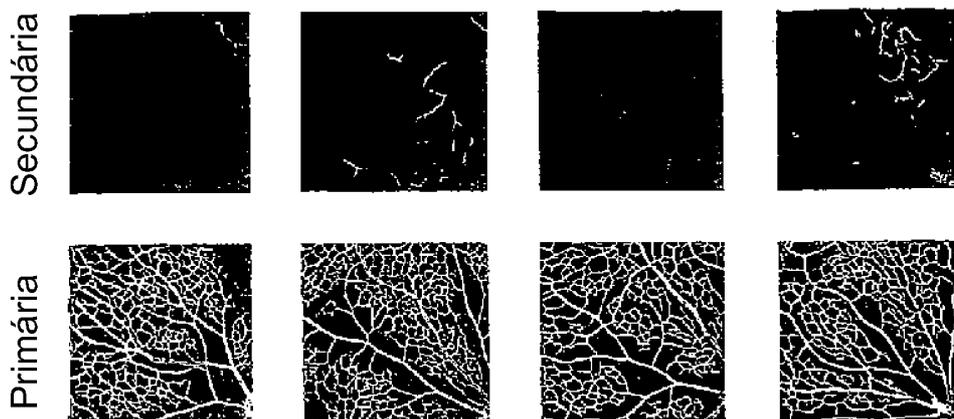
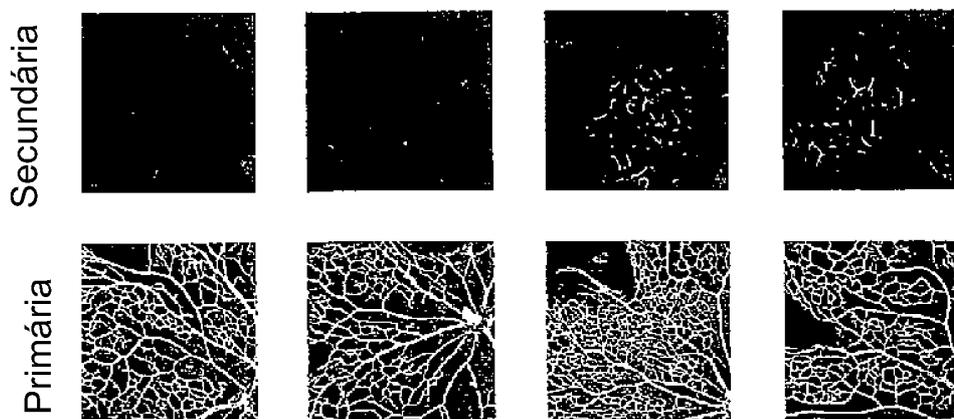


FIG. 34



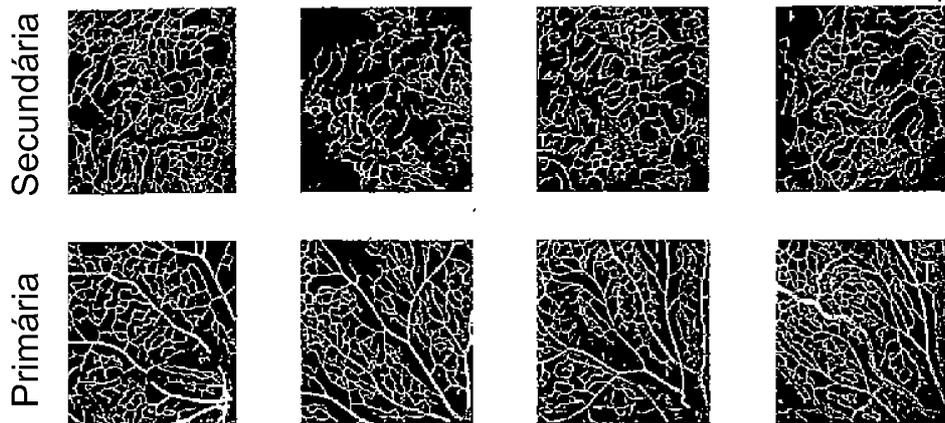
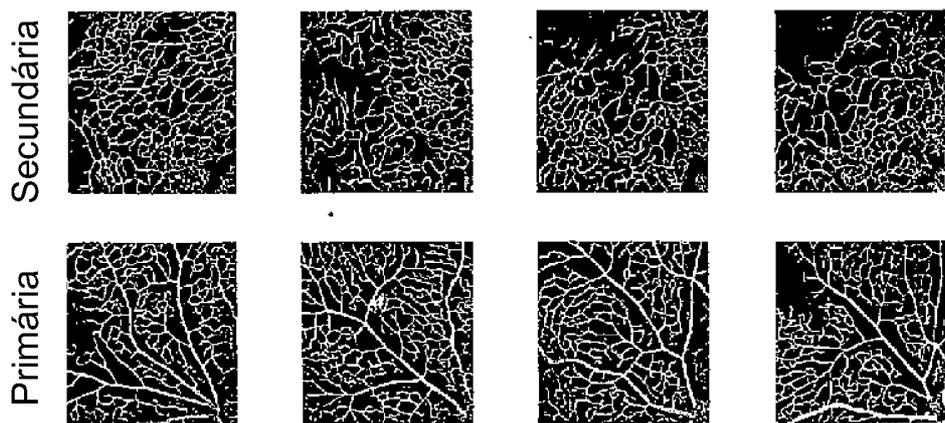
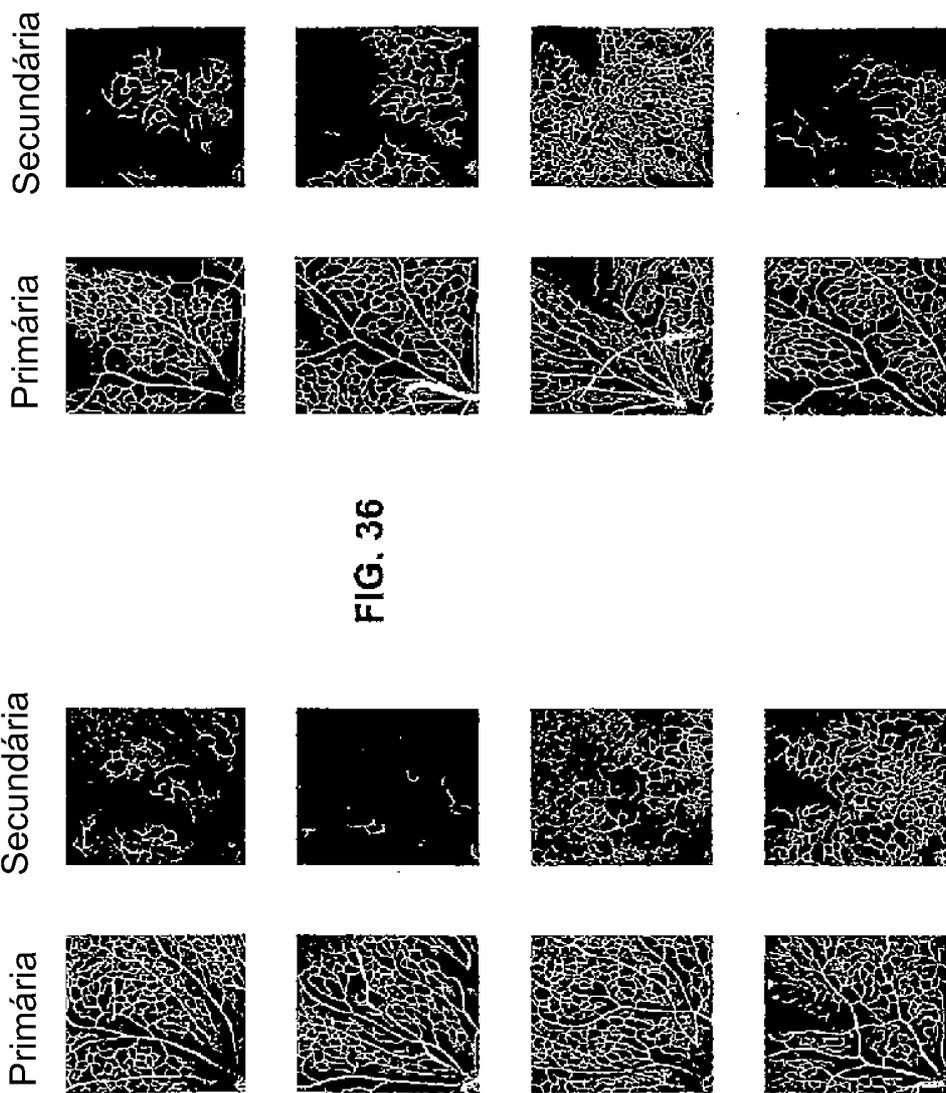


FIG. 35





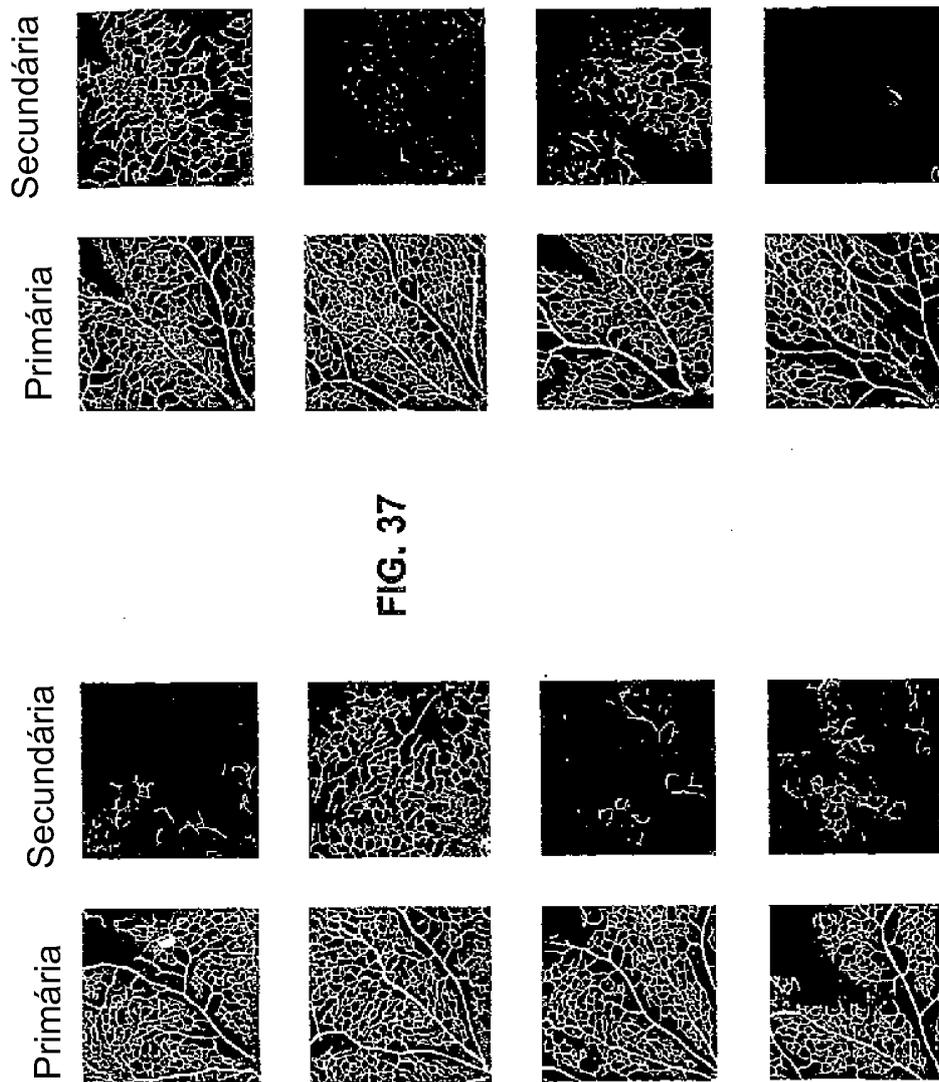
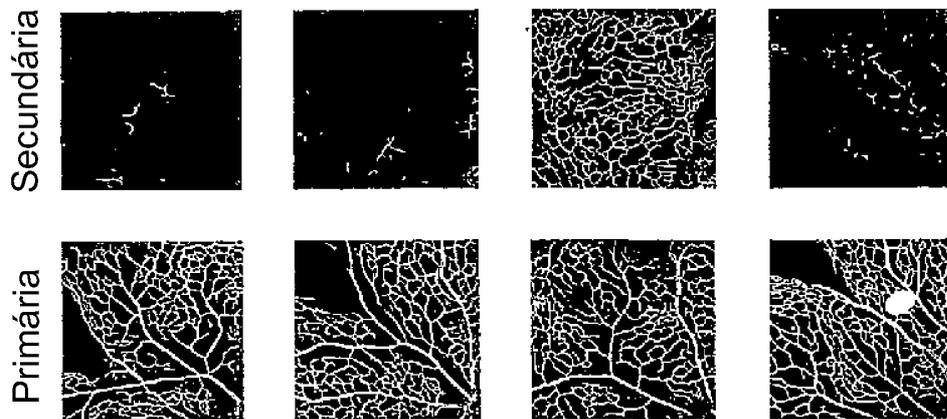




FIG. 38



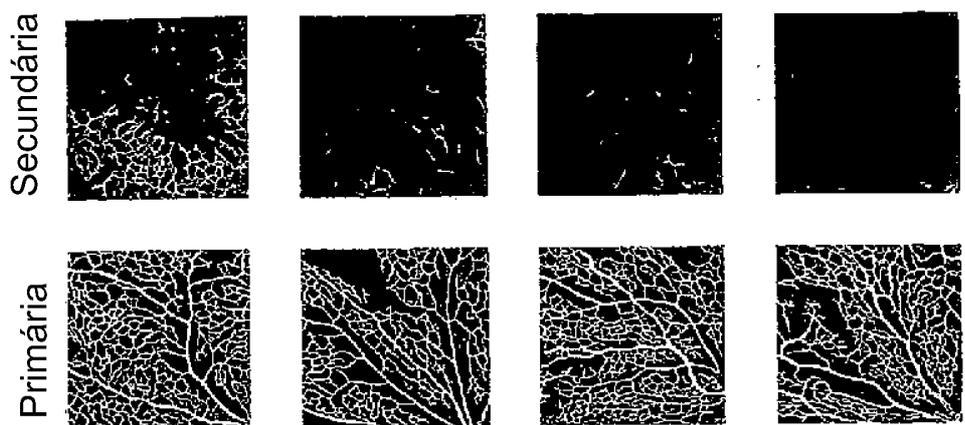
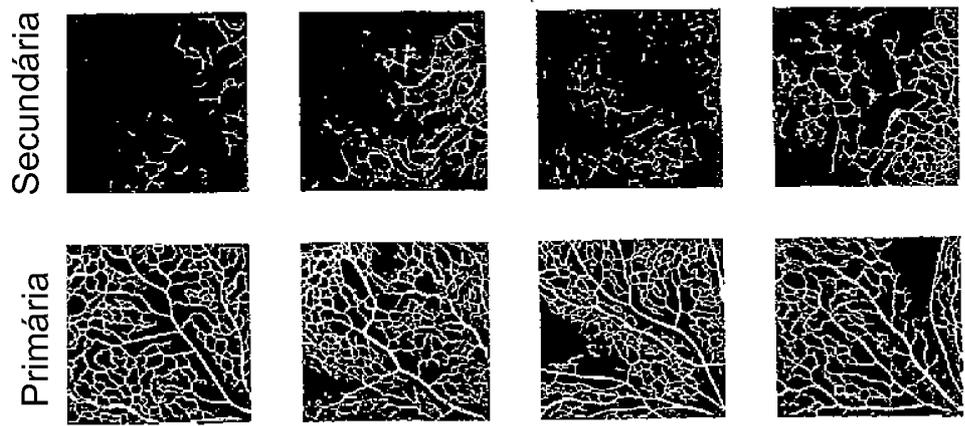
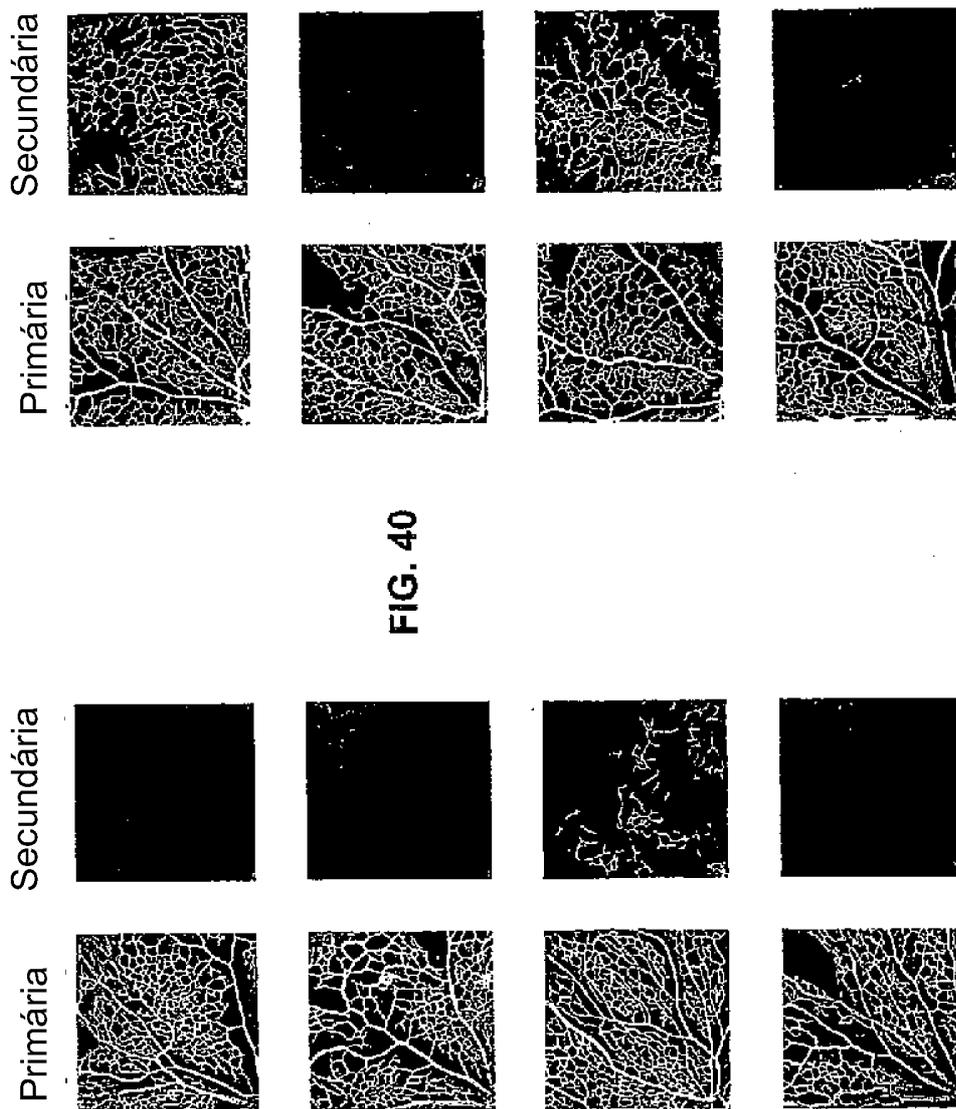
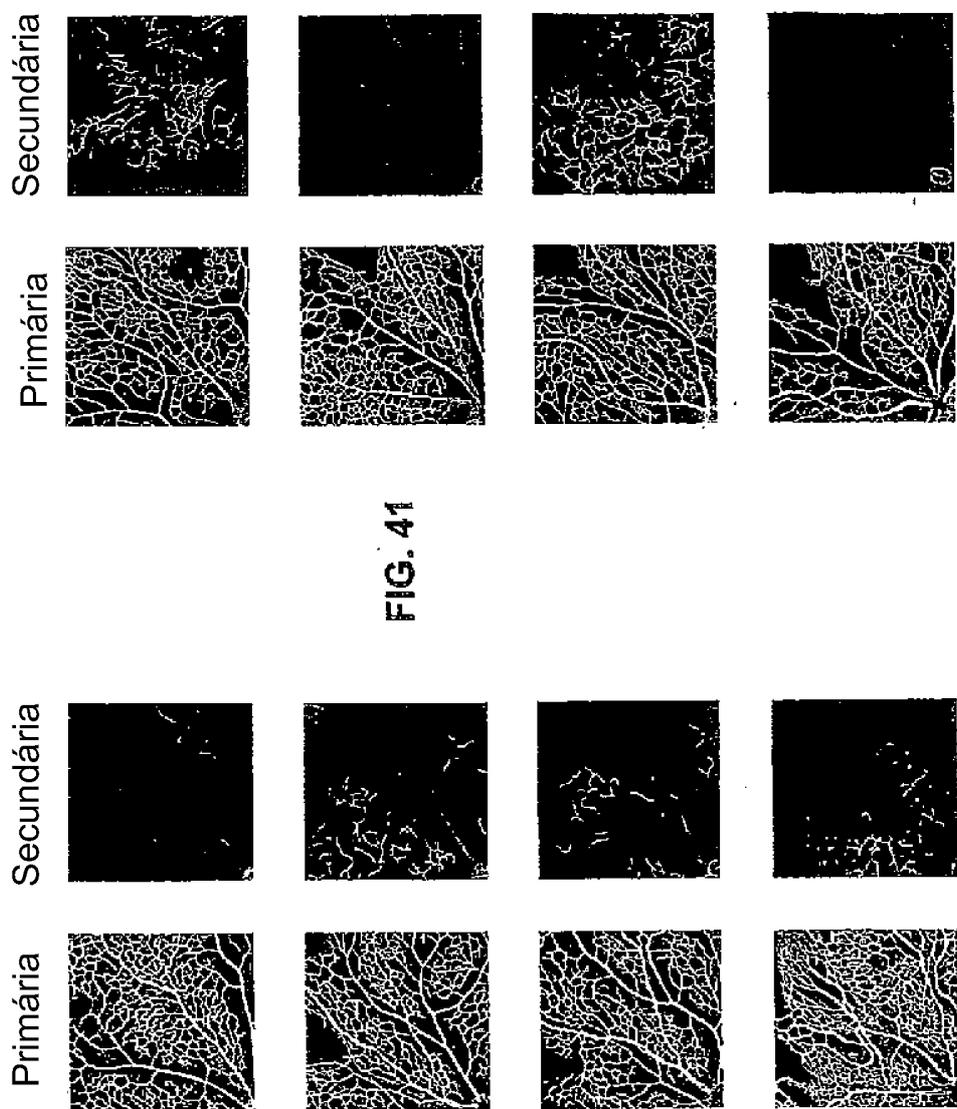
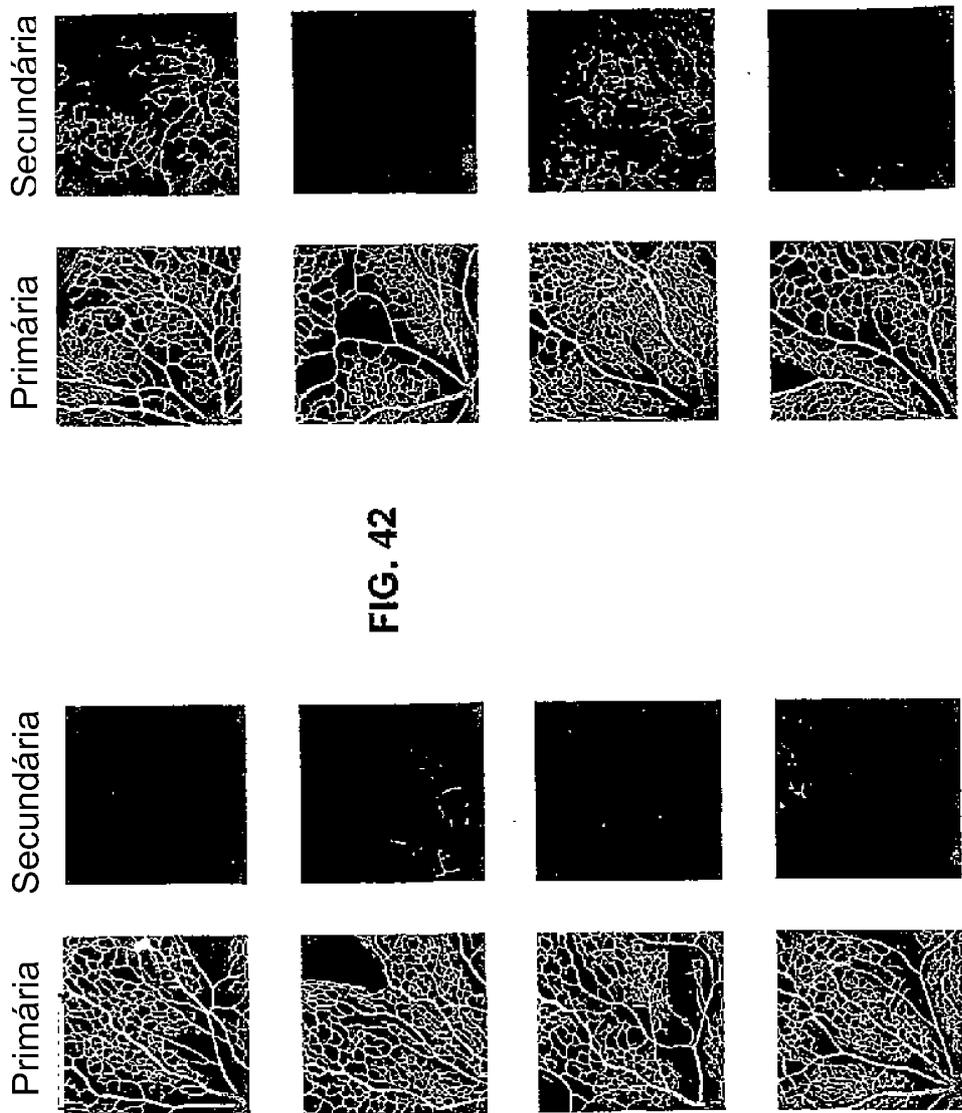


FIG. 39









Experiência de doseamento de T2

Percentagem de retinas com inibição superior a 75% a doses variáveis de T2-TrpRS preparado em laboratório ou comercial

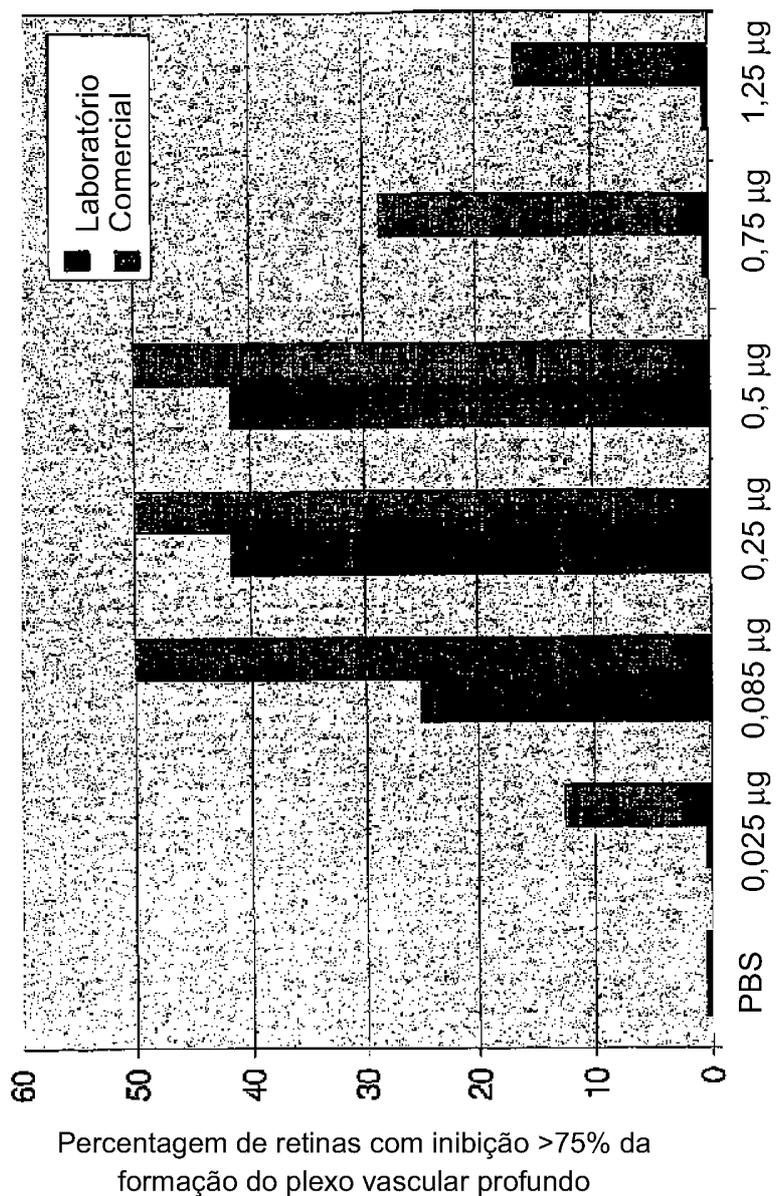


FIGURA 43

Curva de doseamento para o aptâmero de VEGF

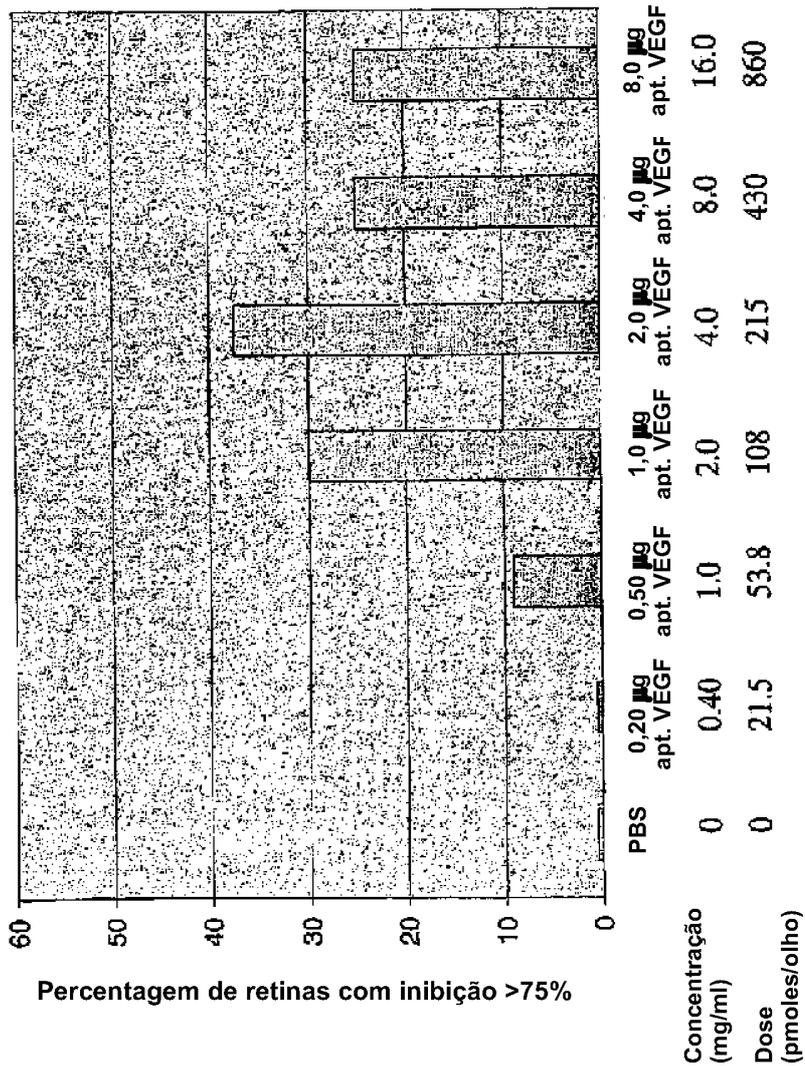


FIGURA 44

Combinação de doses óptimas (clínicas) de T2-TrpRS (0,25 µg) e do aptâmero de VEGF (2 µg) (% das retinas com inibição >90%)

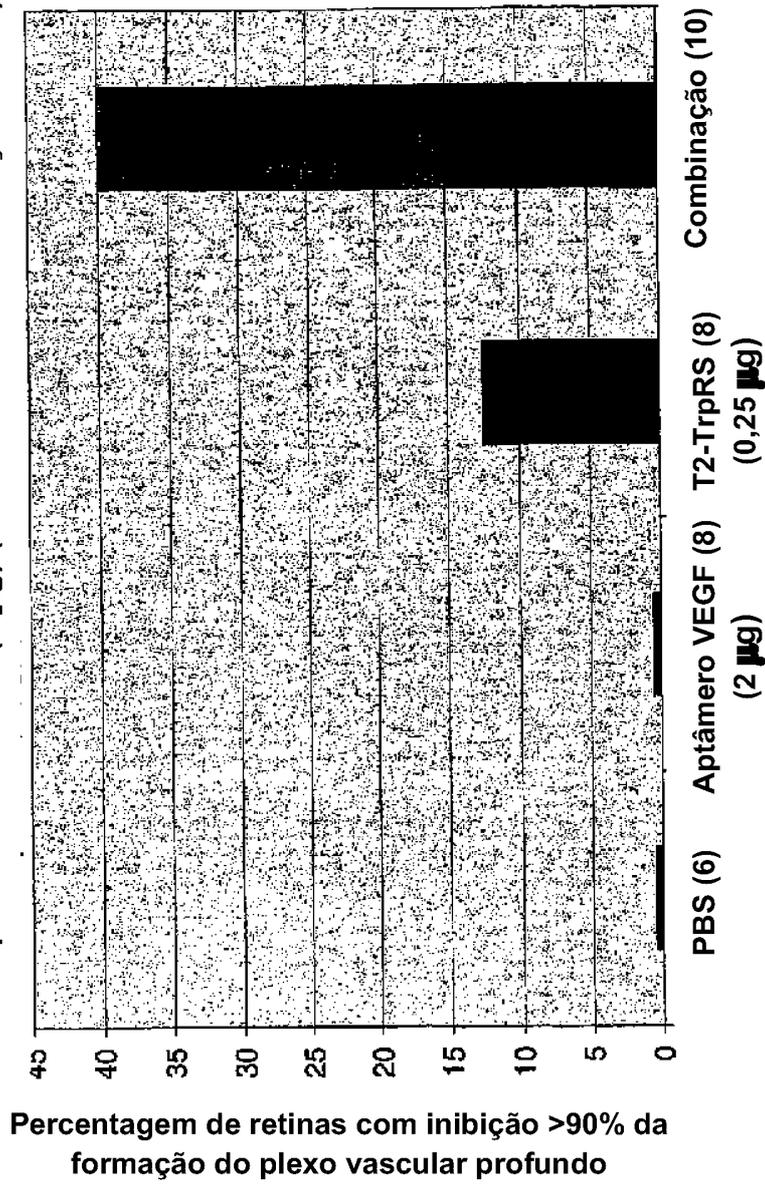


FIGURA 45

Curva de doseamento para o antagonista das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ do tipo pequena molécula

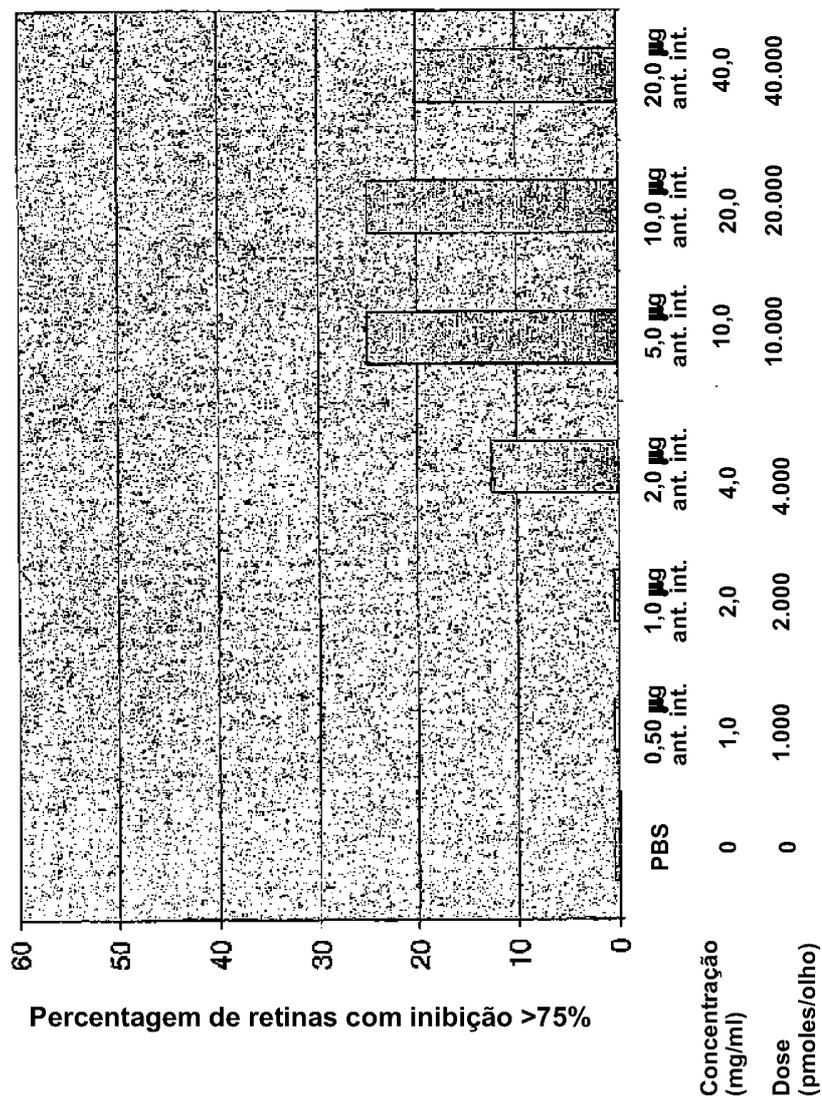


FIGURA 46

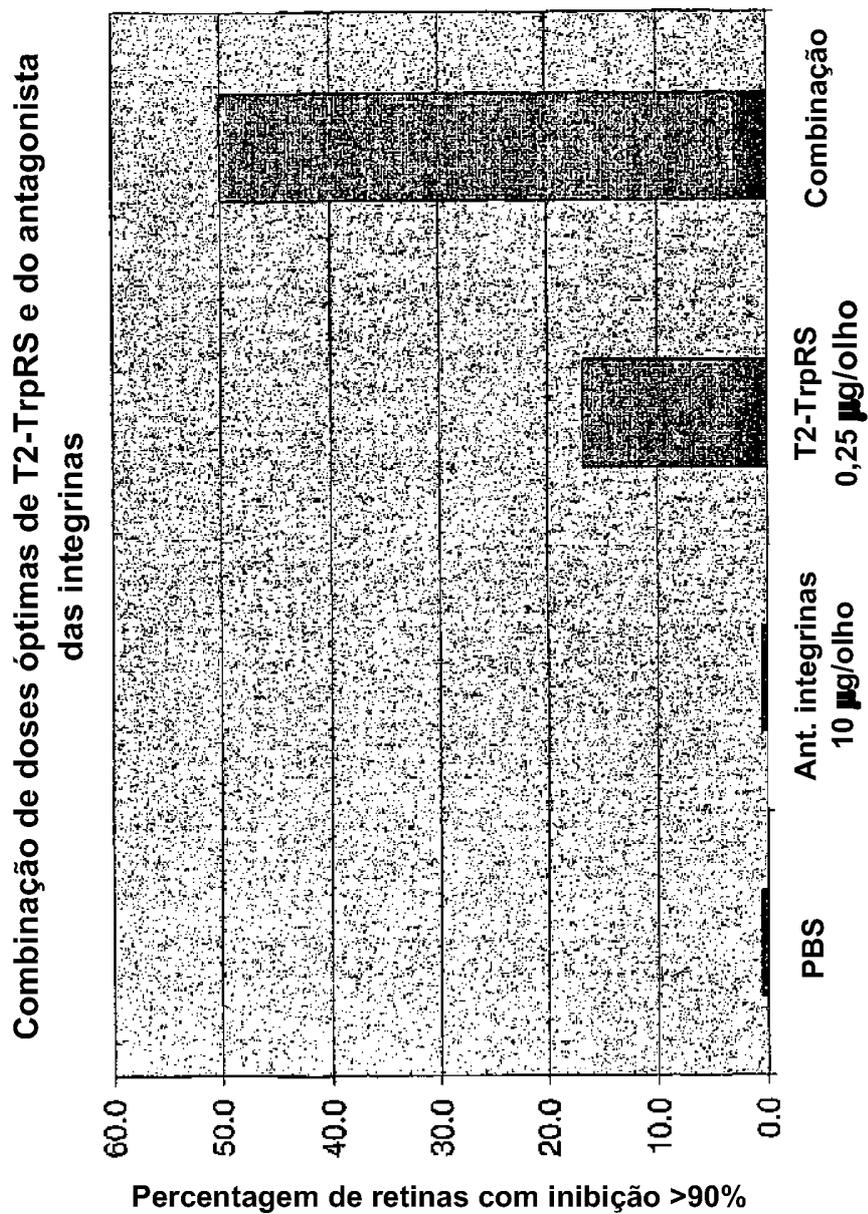
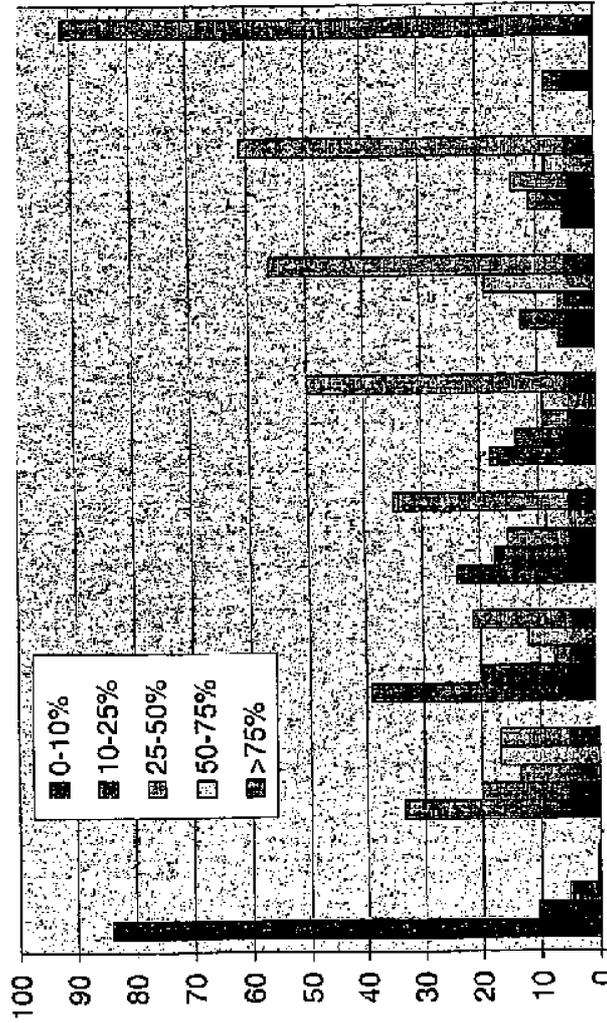


FIGURA 47

Resumo dos resultados das combinações (a doses óptimas)



Percentagem de retinas com os níveis indicados de inibição da formação do plexo vascular profundo

Quantidades injectadas (µg) de:		(Monoterapias)		(Combinações duplas)		Comb. tripla	
T2-TrpRS	Ant. integrinas	Apt. VEGF	T2-TrpRS	T2-TrpRS + ant. int. apt. VEGF	T2-TrpRS + ant. int. apt. VEGF	T2-TrpRS + ant. int. apt. VEGF + tripla	
0	0	0	0.25	0.25	U	0.25	0.25
0	5-10	0	0	5-10	5-10	0	5-10
0	0	1-2	0	0	1-2	1-2	1-2

FIGURA 48

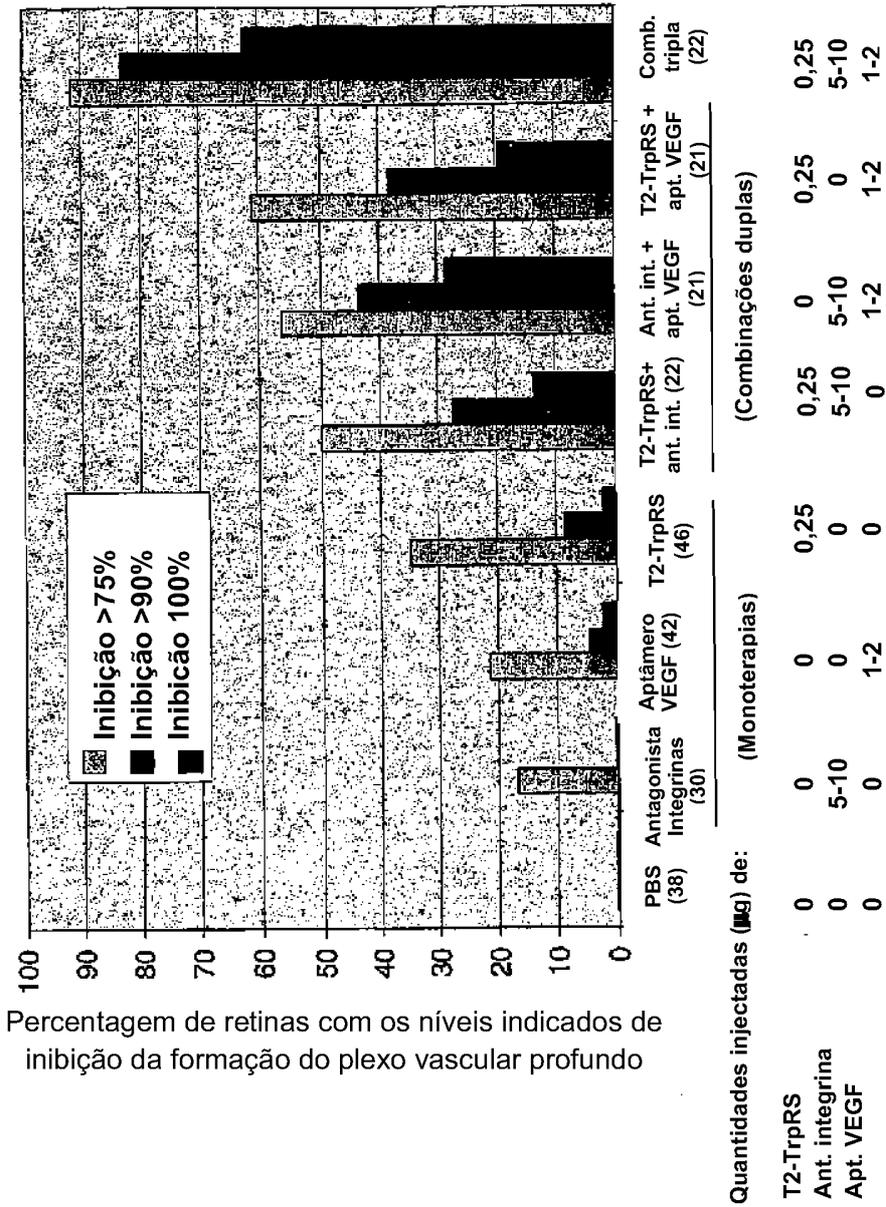


FIGURA 49

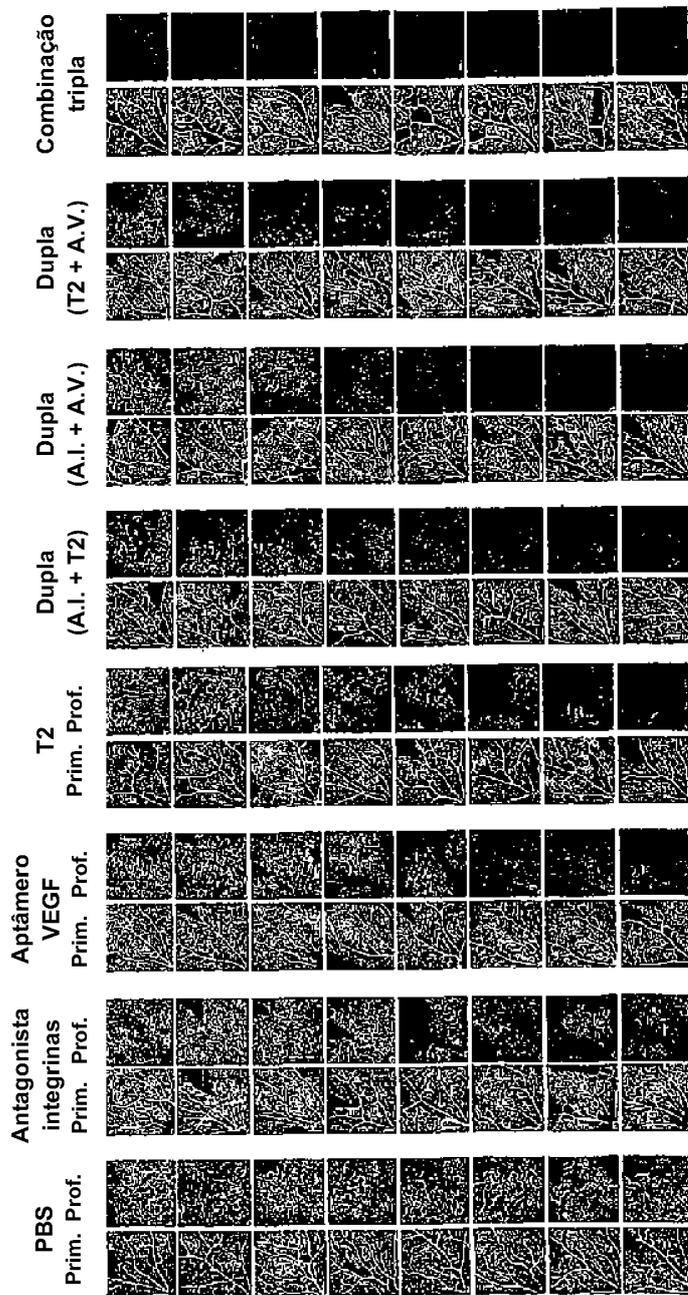


FIGURA 50

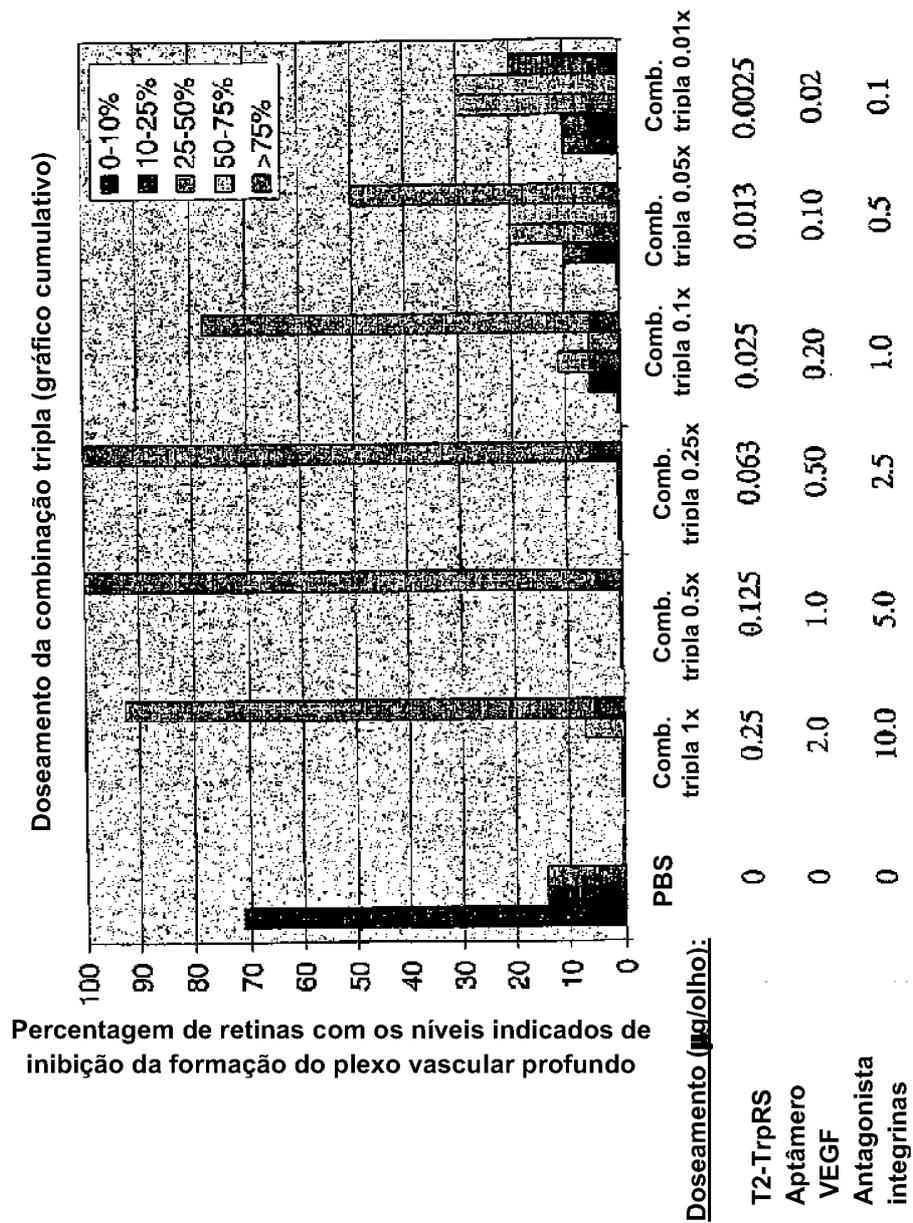


FIGURA 51

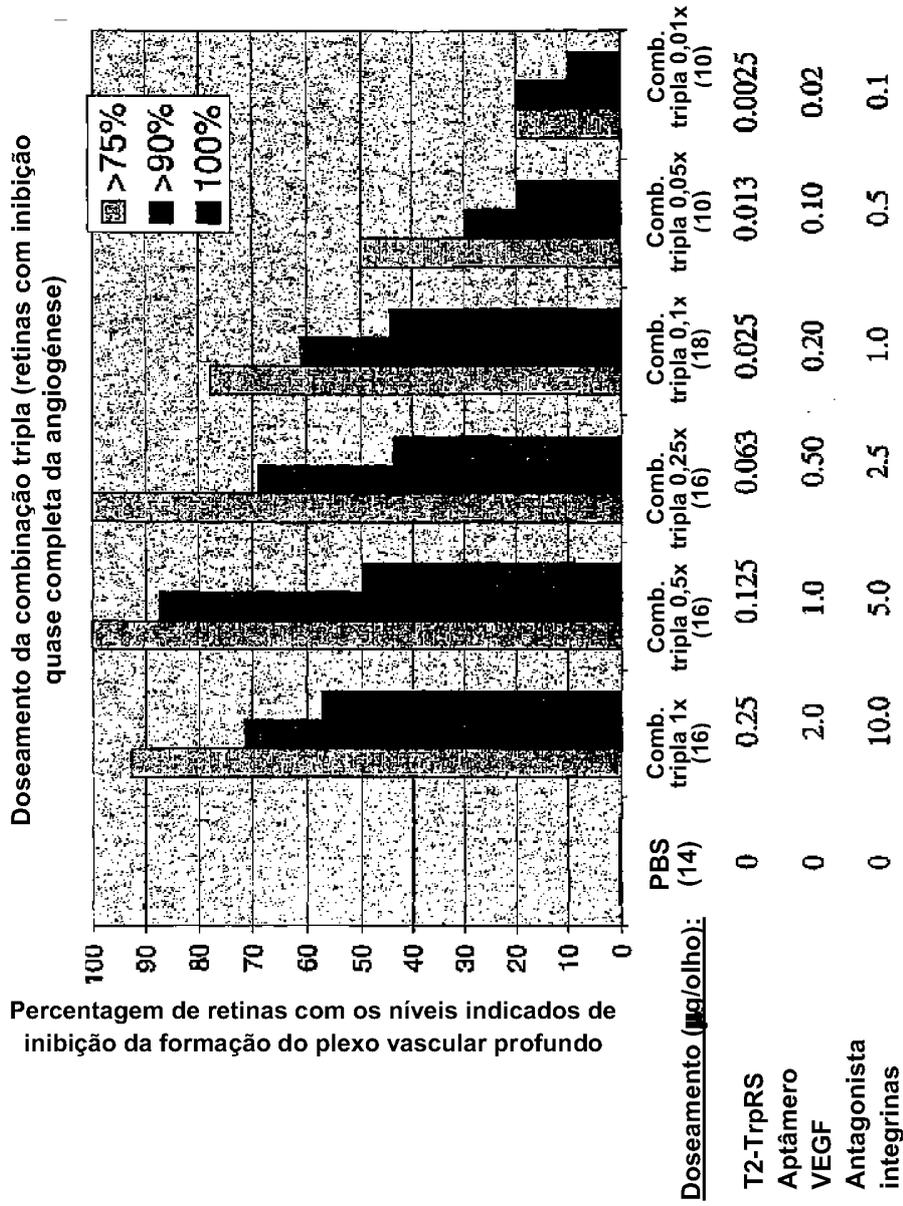
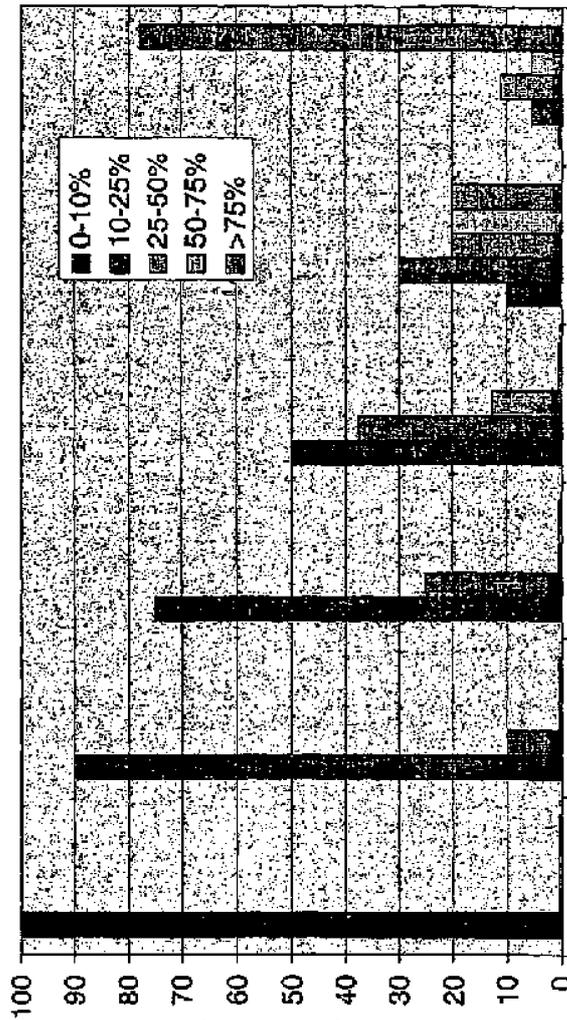


FIGURA 52

Comparação de monoterapias vs. terapias de combinação em doses baixas



Percentagem de retinas com os níveis indicados de inibição da formação do plexo vascular profundo

Doseamento (µg/olho):

	PBS	Antagonista int. 0,1x	Aptâmero VEGF 0,1x	T2-TrpRS 0,1x	Dupla 0,1x (T2 + AV)	Combinação tripla 0,1x
T2-TrpRS	0	0	0	0.025	0.025	0.025
Aptâmero VEGF	0	0	0.20	0	0.20	0.20
Antagonista integrinas	0	1.0	0	0	0	1.0

FIGURA 53

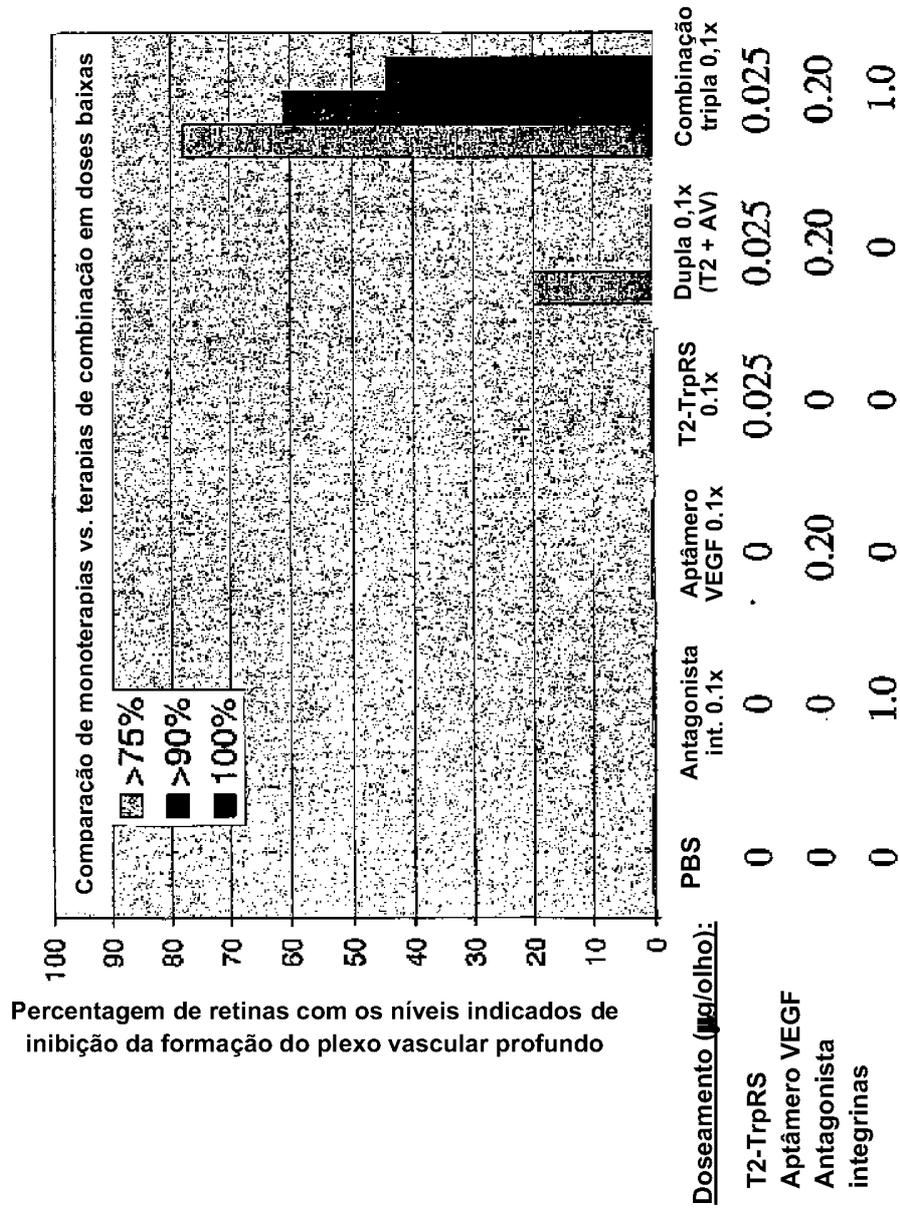


FIGURA 54

Injecção única no dia P13, analisadas no dia P17

Área de tufos neovasculares.

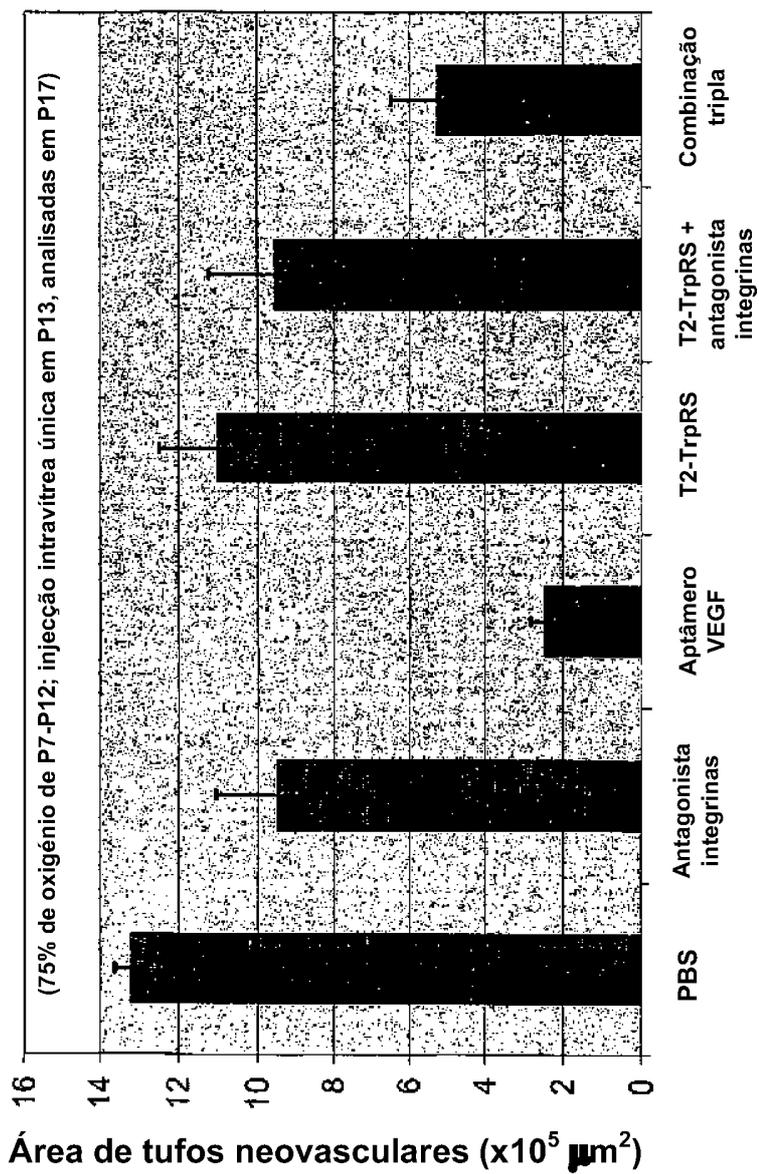


FIGURA 55

Injeções duplas, dias P13 e P16. Retinas foram analisadas no dia P19

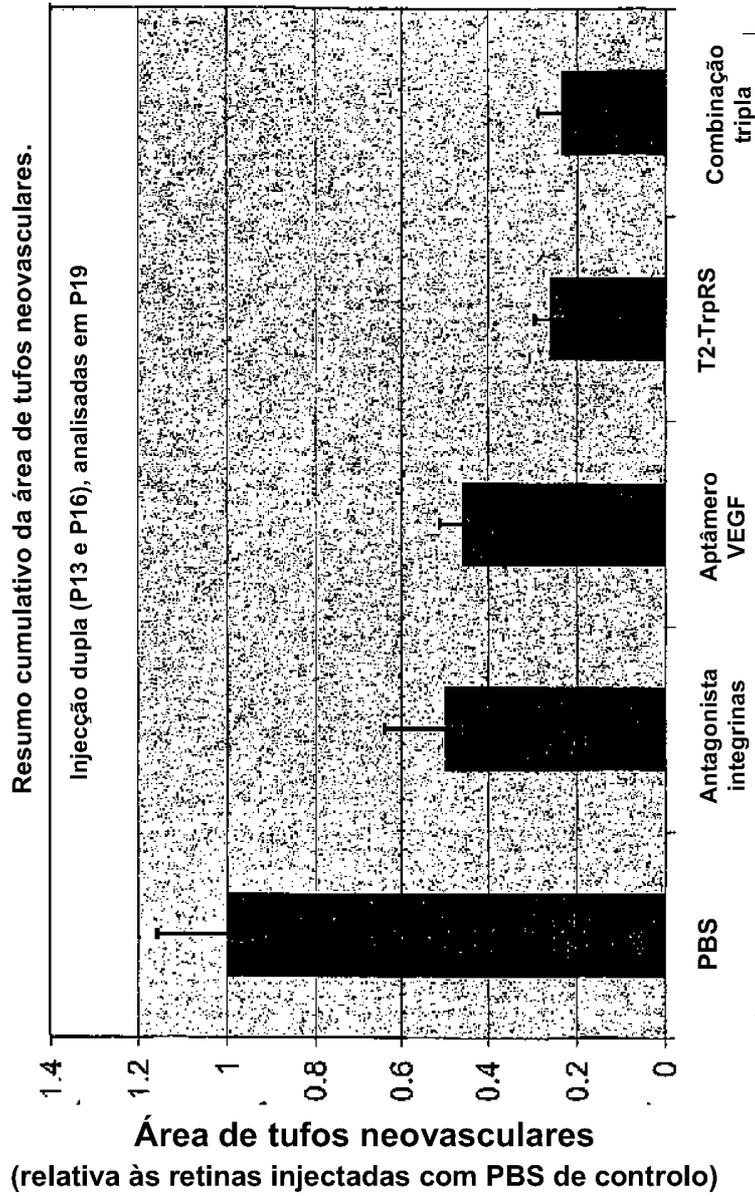


FIGURA 56

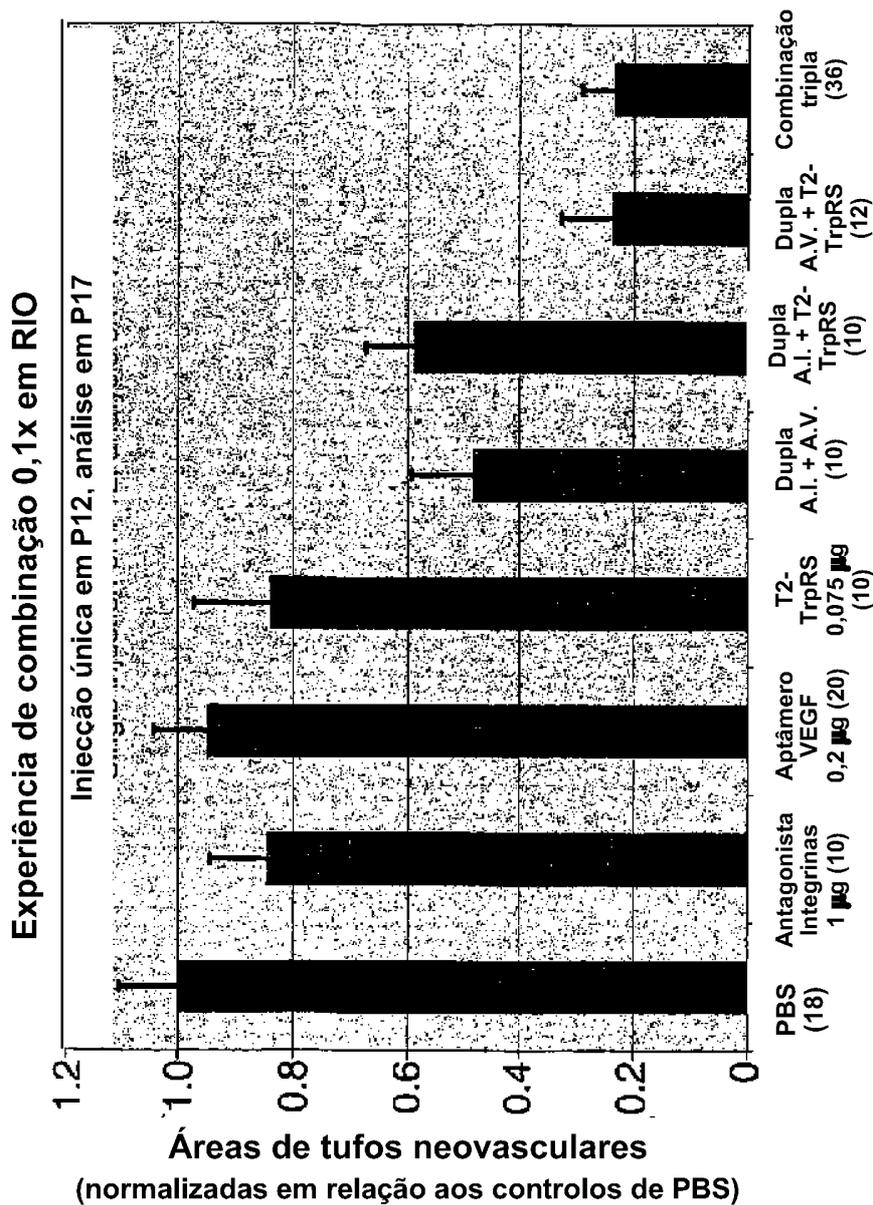


FIGURA 57

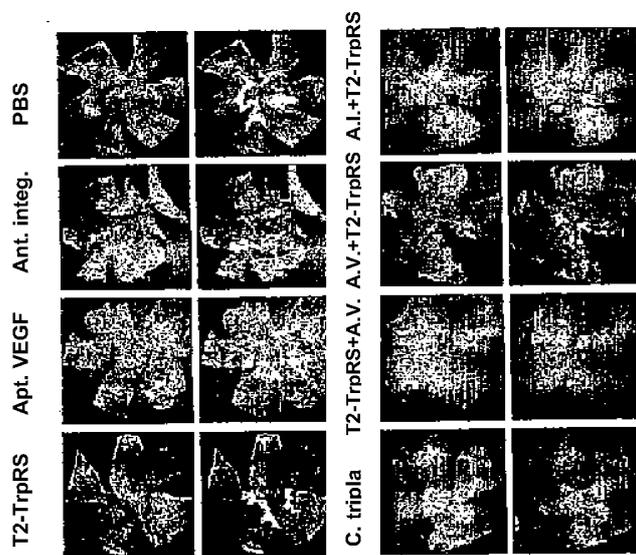


FIGURA 58

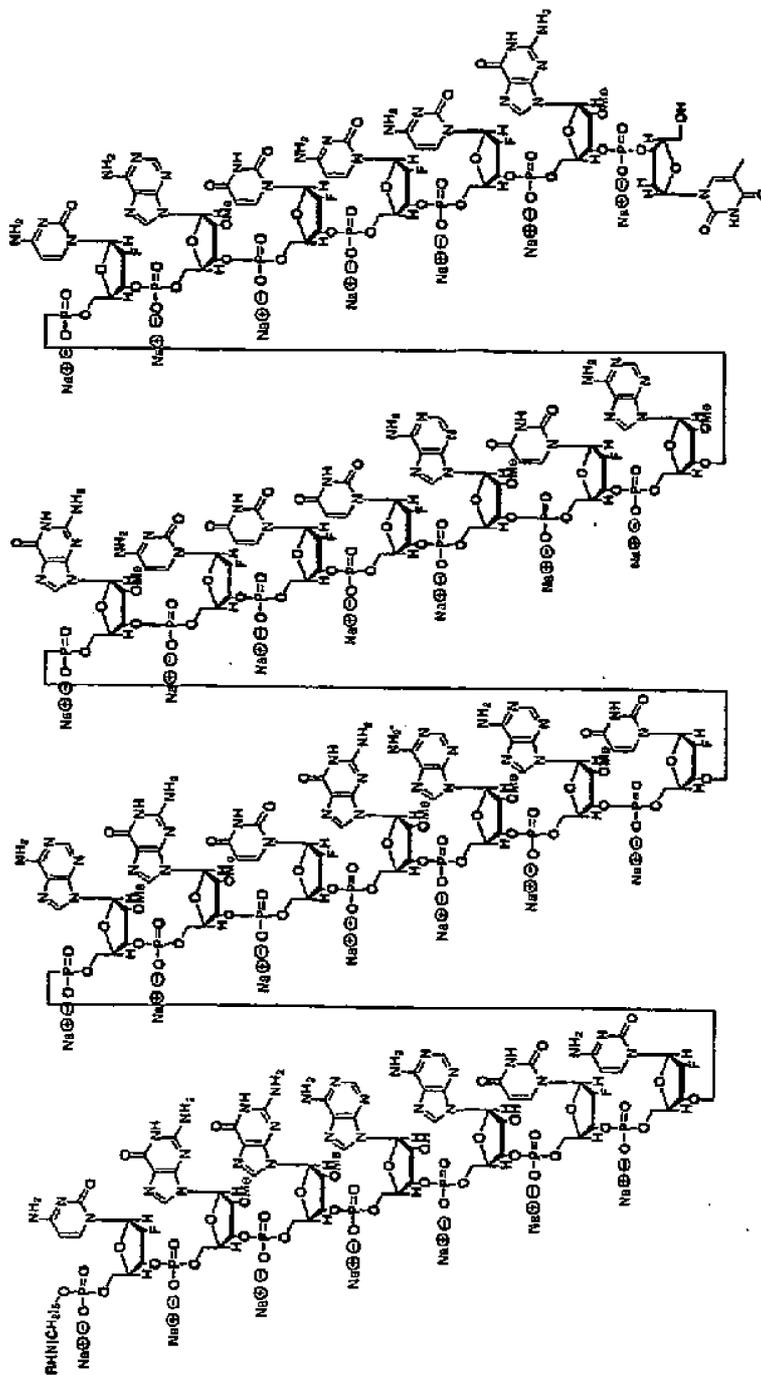


FIG. 59

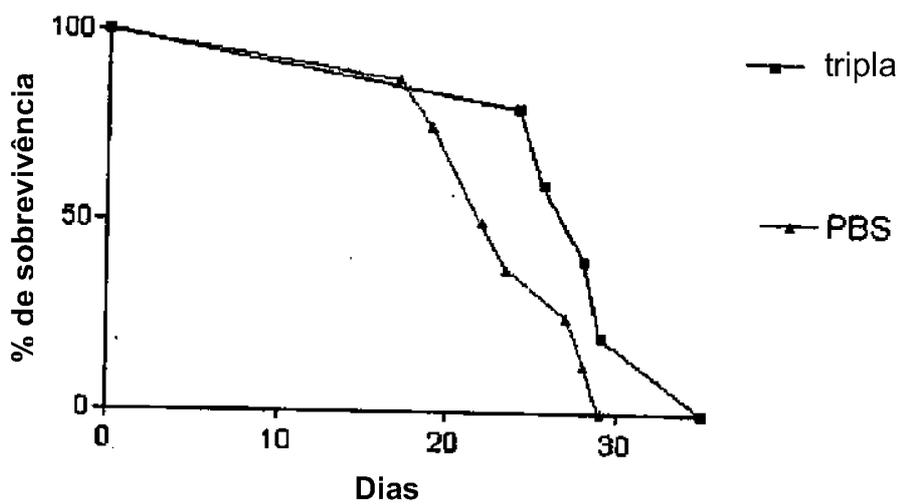


FIG. 60