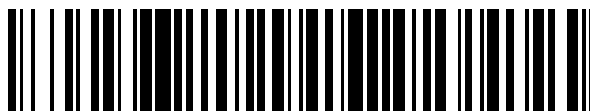


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 155**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2010** **PCT/EP2010/060722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011** **WO11009944**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010** **E 10745578 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017** **EP 2456784**

54 Título: **Compuestos moduladores de la actividad VEGF y usos de los mismos**

30 Prioridad:

24.07.2009 US 228384 P

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

05.07.2017

73 Titular/es:

ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS S.A.
(100.0%)

20 Rue Rudolph Diesel
01630 Saint Genis Pouilly, FR

72 Inventor/es:

D'ANDREA, LUCA DOMENICO;
PEDONE, CARLO y
TURCO, MARIA CATERINA

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 622 155 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos moduladores de la actividad VEGF y usos de los mismos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a compuestos que interactúan con receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), modulan la respuesta biológica dependiente de VEGF y su uso como agentes farmacológicos para tratar enfermedades dependientes de la angiogénesis. Estos compuestos imitan la región β -horquilla 79-92 de VEGF (o el fragmento correspondiente del factor de crecimiento de placenta) que está implicada en el reconocimiento de receptores. Aquí se describen el diseño y las propiedades biológicas de estos compuestos y su uso para los tratamientos de patologías dependientes de la modulación de la actividad biológica de VEGF, el diagnóstico de patologías que presentan una sobreexpresión de receptores de VEGF y como herramientas bioquímicas para el estudio de la ruta celular dependiente de la activación de los receptores de VEGF.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

[0002] La angiogénesis es un proceso fisiológico que se refiere a la remodelación del tejido vascular caracterizada por la ramificación de un nuevo vaso sanguíneo a partir de un vaso preexistente. Está íntimamente asociado con la migración y la proliferación de células endoteliales (EC). Las CE son particularmente activas durante el desarrollo embrionario, mientras que durante la vida adulta el volumen de negocios de la CE es muy bajo y se limita a fenómenos fisiológicos particulares (Carmeliet, P. Nat Med 2003, 9, 653). En un individuo sano, la angiogénesis se ajusta con precisión mediante factores pro y antiangiogénicos, el cambio de este equilibrio (cambio angiogénico), bajo estímulos específicos tal como la hipoxia, está relacionado con varias enfermedades humanas (angiogénesis patológica) (Hanahan, D., Folkman, J. Cell 1996, 86, 353). La prevalencia de factores pro-angiogénicos (angiogénesis excesiva), está asociada con cáncer, retinopatía proliferante, artritis reumatoide y psoriasis. Mientras, una angiogénesis insuficiente es la base de enfermedades coronarias, isquemia y una capacidad reducida para la regeneración tisular (Carmeliet, P., Jain, R.K. Nature 2000, 407, 249).

[0003] Uno de los factores angiogénicos más estudiados es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF y sus receptores están sobreexpresados en la angiogénesis patológica, haciendo de este sistema una diana para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas (Hanahan, D. et al. 1996 Cell 86, 353-364; Ferrara, N. et al. 1997 Endocr Rev 18, 4-25).

35 Factor del crecimiento endotelial vascular

[0004] El VEGF es una glucoproteína homodimérica, unida covalentemente por dos enlaces disulfuro, caracterizada por un motivo de nudo de cistina. El gen *vegf* codifica al menos para ocho isoformas de corte y empalme que difieren en el número de aminoácidos del polipéptido codificado. Las isoformas más comunes VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ están caracterizadas por una capacidad diferente para unirse a heparina, células y matrices [148]. VEGF₁₂₁ es soluble y carece de las exones que codifican el sitio de unión a heparina; VEGF₁₆₅ es la forma más abundante en la mayor parte de los tejidos y en la angiogénesis patológica, se une a heparina y se encuentra parcialmente unida a la matriz; VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ interactúan en gran medida con la matriz y se activan por escisión proteolítica (Park et al., Mol Biol Cell 1993; 4: 1317-26; Roth et al. Am J Pathol 2006; 68: 670-84). Se ha identificado una variante de corte y empalme adicional, VEGF_{165b}, y dio como resultado un inhibidor endógeno de VEGF (Woolard et al., Cancer Res 2004; 64: 7822-35).

[0005] VEGF posee varios homólogos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF y VEGF-E. Reconocen diferentes receptores y provocan diversas actividades biológicas. El VEGF-A (o VEGF) es la forma principal, es un mitógeno específico para EC vasculares y el principal regulador de la angiogénesis fisiológica y patológica. El VEGF-B puede formar heterodímeros con VEGF, induce la expresión de enzimas implicadas en la degradación de ECM y la migración de EC, y tiene un papel en el desarrollo de la arteria coronaria. VEGF-C y D están implicados principalmente en la linfangiogénesis; el VEGF-C se expresa principalmente durante la embriogénesis mientras que el VEGF-D también se expresa en el corazón, el pulmón y el músculo esquelético adulto (Carmeliet P. Nat Med 2003; 9: 653-60). El VEGF-E está codificado por el virus parapoxvirus Orf. PlGF (Maglione et al., Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 9267-71) ha adquirido mucha atención en los últimos años debido a su papel en la angiogénesis patológica (Luttun et al., Ann N Y Acad Sci 2002; 979: 80-93; Fischer et al., Cell 2007; 131: 463-75; Luttun et al., Nat Med 2002; 8: 831-40). PlGF ha visto implicado en varios procesos fisiológicos y patológicos tales como angiogénesis, arteriogénesis y aterosclerosis (Roy et al., FEBS Lett 2006; 580: 2879-87). Se expresa principalmente en la placenta y su expresión se regula por aumento durante condiciones patológicas tal como isquemia e infarto de miocardio (Iyer et al., Trends Cardiovasc Med 2002; 12: 128-34). La pérdida de PlGF no afecta al desarrollo embrionario pero altera la angiogénesis durante la isquemia, la cicatrización, la inflamación y el cáncer (Carmeliet et al., Nat Med 2001; 7: 575-83). Se han descrito dos isoformas principales, PlGF-1 y PlGF-2, que difieren en la

presencia de secuencias aminoacídicas de alto contenido en aminoácidos y en la capacidad de unirse a heparina (Hauser S, Weich HA. *Growth Factors* 1993; 9: 259-68; Maglione et al., *Oncogene* 1993; 8: 925-31).

[0006] La actividad biológica de la familia VEGF está mediada por la unión a tres receptores de membrana pertenecientes a la familia de la tirosina cinasa (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3) y dos receptores pertenecientes a la familia de las semaforinas (NRP1 y NRP2). La función de cada receptor en la angiogénesis fisiológica y patológica está aún lejos de ser completamente revelada. Puede encontrarse en otra parte una descripción detallada de la biología y patologías asociadas al VEGF y sus receptores (Nagy et al., *Annu Rev Pathol* 2007; 2: 251-75.; Roy et al., *FEBS Lett* 2006; 580: 2879-87; Ferrara et al., *Nat Med* 2003; 9: 669-76; Ferrara N. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 617-24; Ferrara N, Davis-Smyth T. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25; Cross et al., *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 488-94; Veikkola et al., *Cancer Res* 2000; 60: 203-12; Hicklin DJ, Ellis LM. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011-27). VEGFR2 y VEGFR1 se expresan principalmente en el endotelio vascular, pero también se han encontrado en la superficie de las células tumorales no endoteliales (Matsumoto T, Claesson-Welsh L. *Sci STKE* 2001; 2001: RE21). La expresión aumentada de estos receptores se produce en respuesta a varios estímulos y da como resultado el cebado de EC hacia la proliferación, la migración y la angiogénesis (Ferrara, N. et al. 2003 *Nat Med* 9, 669-676). Se componen por un dominio de cinasa intracelular, una región transmembrana y una porción extracelular constituida por siete dominios de tipo inmunoglobulinas. VEGF se une muy fuertemente a ambos receptores pero la afinidad de unión para VEGFR1 es diez veces mayor que para VEGFR2. También difieren en la capacidad de reconocer homólogos de VEGF, de hecho, VEGFR1 interactúa también con PIGF y VEGF-B, mientras que VEGFR2 reconoce VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. En una visión concisa de la biología de los receptores, la unión del VEGF induce la dimerización del receptor, la autofosforilación del dominio cinasa y la activación de varias rutas intracelulares que terminan con mitogénesis, angiogénesis, permeabilidad, supervivencia y migración. En etapa embrionaria, el VEGFR2 es esencial para la vasculogénesis y proliferación de células endoteliales, mientras que VEGFR1 es necesario para la organización del sistema vascular del embrión (Ferrara et al., *Nat Med* 2003; 9: 669-76). En la vida adulta, VEGFR2 ha sido reconocido como el principal mediador de la actividad biológica de VEGF en EC mientras que VEGFR1 ha sido considerado como un receptor de señuelo que regulaba negativamente los efectos del VEGF. Después, se ha demostrado que VEGFR1 está implicado en la migración de monocitos (Hiratsuka et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9349-54), la hematopoyesis (Hattori et al., *Nat Med* 2002; 8: 841-9) y en la liberación de factores de crecimiento específicos de tejido (Ferrara et al., *Nat Med* 2003; 9: 669-76). Además, se notificó una interacción entre los receptores de VEGF, regulados por PIGF (Autiero et al. *Nat Med* 2003; 9: 936-43). Un corte y empalme alternativo del gen VEGFR1 codifica una forma soluble del receptor que contiene únicamente seis dominios extracelulares (sVEGFR1). Esta molécula se une al VEGF, suprime la actividad mitógena del VEGF y actúa como un antagonista específico eficaz del VEGF *in vivo* (Kendall RL, Thomas KA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10705-9). Recientemente, se ha demostrado que sVEGFR1 tiene un papel en la preeclampsia (Maynard et al., *J Clin Invest* 2003; 111: 649-58).

[0007] El VEGFR3 se encuentra sobre la superficie de las células endoteliales linfáticas. Se une selectivamente a VEGF-C y VEGF-D y media la linfagiogénesis (Oliver G, Alitalo K. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 457-83; Alitalo et al., *Nature* 2005; 438: 946-53). Se cree que VEGFR3 desempeña diversas funciones que facilitan el desarrollo cardiovascular, remodelando la red vascular primaria durante la embriogénesis y facilitando la linfagiogénesis en la edad adulta [166]. Su activación también se ha observado en algunas afecciones neoplásicas (Achen et al., *J Pathol* 2001; 193: 147-54; Valtola et al., *Am J Pathol* 1999; 154: 1381-90).

[0008] NRP1 y NRP2, implicados principalmente en la orientación axonal y en el desarrollo neuronal, también están implicados en la angiogénesis fisiológica y patológica, de hecho, actúan como un co-receptor para VEGF. No transfieren directamente la señalización intracelular sino que aumentan la afinidad de unión de los miembros de la familia de VEGF a VEGFR1 o VEGFR2. NRP1 se une a VEGF₁₆₅ u PIGF-2 y es esencial para el desarrollo neuronal y cardiovascular, mientras que NRP2 interactúa con VEGF₁₆₅ y VEGF-C y tiene una función en la linfagiogénesis (Pellet-Many et al., *Biochem J* 2008; 411: 211-26; Geretti et al., *Angiogenesis* 2008; 11: 31-9).

Datos estructurales de la familia VEGF

[0009] Se han indicado muchos datos estructurales de los miembros de la familia VEGF. Se han descrito varias estructuras de VEGF o PIGF ya sea libres (Muller, Y. A et al., *Structure* 1997, 5, 1325; Muller, Y. A. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94, 7192), unidas a inhibidores peptídicos (Wiesmann, C. et al., *Biochemistry* 1998, 37, 17765; Pan, B. et al., *J Mol Biol* 2002, 316, 769) o a un anticuerpo neutralizante (Muller, Y. A. et al., *Structure* 1998, 6, 1153). Los únicos datos estructurales sobre VEGFR1 se refieren al dominio 2 de la región extracelular, VEGFR1_{D2}, en forma libre (Starovasnik et al., *J Mol Biol* 1999; 293: 531-44), unida a VEGF (Wiesmann, C. et al., *Cell* 1997, 91, 695) o PIGF (Christinger et al., *J Biol Chem* 2004; 279: 10382-8). Hasta el momento, no se han indicado datos estructurales para VEGFR3 y el dominio extracelular de VEGFR2. En su lugar, se ha descrito el dominio de cinasa intracelular de VEGFR2 (McTigue et al., *Structure* 1999; 7: 319-30). Se ha realizado una caracterización parcial de los receptores NRP1 y NRP2 (Pellet-Many et al., *Biochem J* 2008; 411: 211-26). Muy recientemente, el complejo entre VEGF y el dominio VEGFR1 extracelular se ha observado por microscopía electrónica (Ruch et al., *Nat Struct*

Mol Biol 2007; 14: 249-50). El VEGF es un homodímero antiparalelo, unido covalentemente a través de dos enlaces disulfuro. Se caracteriza por un motivo de nudo de cistina. El nudo consta de dos puentes disulfuro, con un tercer enlace disulfuro pasando a través de ellos. La estructura de los ligandos y del receptor no cambia pasando de las formas libres a las complejas. Los estudios de delección de dominio en VEGFR1 y VEGFR2 mostraron que el sitio de unión a ligando reside dentro de los tres primeros dominios extracelulares y VEGFR1_{D2} se une a VEGF aproximadamente 60 veces menos ajustado que la proteína de tipo silvestre, pero su eliminación suprime completamente la unión. La estructura global del complejo VEGF/VEGFR1_{D2} posee aproximadamente una simetría de dos pliegues. La interfaz de reconocimiento de VEGF se divide aproximadamente el 65 % y el 35 % entre ambos monómeros. El análisis de los datos estructurales y de mutagénesis permitió identificar los residuos implicados en la unión a los receptores. Se distribuyen sobre una superficie discontinua que incluye residuos de la hélice N-terminal (17-25), el bucle que conecta la hebra β3 a β4 (61-66) y la hebra β7 (103-106) de un monómero, así como residuos de la hebra β2 (46-48) y de la hebra β5 y β6 junto con el giro de conexión (79-91) del otro monómero. La interfaz de reconocimiento es principalmente hidrófoba, excepto por la interacción polar entre Arg224 (VEGFR1) y Asp63 (VEGF). VEGFR2 y VEGFR1 comparten la misma región de unión a VEGF, de hecho 5 de los 7 restos de unión a VEGF más importantes están presentes en ambas interfaces (Muller, Y. A. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94, 7192; Wiesmann,

[0010] C. et al., Cell 1997, 91, 695; Keyt et al., J Biol Chem 1996; 271: 5638-46). Los receptores de NRP son glucoproteínas transmembrana compuestas de una región extracelular constituida por dos dominios CUB (a1 y a2), dos dominios de homología de Factor V/VIII (b1 y b2) y un dominio MAM, intracelularmente presentan un dominio PDZ. Se han indicado las estructuras de los dominios a2, b1 y b2 de NRP1/2 en la forma libre (Lee et al., Structure 2003; 11: 99-108; Appleton et al., Embo J 2007; 26: 4902-12; Vander Kooi et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 6152-7), en complejo con tuftsin (Vander Kooi et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 6152-7) y con un anticuerpo (Appleton et al., Embo J 2007; 26: 4902-12).

VEGF y angiogénesis patológica

[0011] Se ha indicado el papel del VEGF en diferentes patologías y se ha demostrado que el bloqueo de la interacción del VEGF con sus receptores tiene varias aplicaciones terapéuticas. Muchas revisiones y patentes describen el papel y el uso de inhibidores de VEGF en la angiogénesis patológica y analizan sus aplicaciones terapéuticas. Las enfermedades que pueden beneficiarse de una terapia basada en la inhibición de la interacción entre el VEGF y sus receptores son el cáncer (D.J. Hicklin & L.M. Ellis J. Clin. Onc. 2005, 23, 1011; N. Ferrara et al., Nat. Med. 2003, 9, 669; N. Ferrara & T. Davis-Smyth Endocr. Rev. 1997, 18, 4). VEGF está sobreexpresado en varios tipos de tumores (pulmón, tiroides, mama, gastrointestinal, riñón, ovario, cuello uterino, carcinomas, angiosarcomas, tumores de células germinales, intracraneales). Los receptores de VEGF están sobreexpresados en algún tipo de tumores, tales como carcinoma de pulmón de células no pequeñas, melanoma, carcinoma de próstata, leucemia, mesotelioma, carcinoma de mama (D.J. Hicklin & L.M. Ellis J. Clin. Onc. 2005, 23, 1011), y sobre la superficie en células endoteliales angiogénicamente activas.

[0012] El VEGF está implicado en la neovascularización intraocular que puede conducir a hemorragia vítrea, desprendimiento de retina, glaucoma neovascular (N. Ferrara et al., Nat. Med. 2003, 9, 669; N. Ferrara Curr. Opin. Biotech. 2000, 11, 617) y en trastornos oculares tales como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética (documento US 2006/0030529).

[0013] El VEGF también está implicado en la patología del tracto reproductor femenino, tal como el síndrome de hiperestimulación ovárica y la endometriosis.

[0014] El VEGF se ha visto implicado en psoriasis, artritis reumatoide (P.C. Taylor Arthritis Res 2002, 4, S99) y en el desarrollo de edema cerebral.

[0015] Las enfermedades causadas por una angiogénesis defectuosa pueden ser tratadas (angiogénesis terapéutica) con agentes capaces de promover el crecimiento de nuevos vasos colaterales. La angiogénesis inducida por VEGF tiene varias aplicaciones terapéuticas. Por supuesto, las moléculas que se unen a receptores de VEGF e imitan la actividad biológica de VEGF son útiles para el tratamiento de estas enfermedades.

[0016] El VEGF se ha utilizado para los tratamientos de enfermedades cardiovasculares isquémicas para estimular la revascularización en regiones isquémicas, para aumentar el flujo sanguíneo coronario y para prevenir la reestenosis después de la angioplastia (M. Simons & J.A. Ware Nat. Rev. Drug Disc. 2003, 2, 1; N. Ferrara & T. Davis-Smyth Endocr. Rev. 1997, 18, 4).

[0017] El VEGF y sus receptores se han visto implicados en ictus, isquemia de la médula espinal, neuropatía isquémica y diabética. El VEGF es un agente terapéutico para el tratamiento de trastornos neuronales tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad isquémica crónica del

cerebro, esclerosis amiotrófica tardía, enfermedad de tipo esclerosis amiotrófica tardía, y otros trastornos neuronales degenerativos, en particular, de las neuronas motoras (documento US 2003/0105018; E. Storkebaum & P. Carmeliet J. Clin. Invest. 2004, 113, 14).

[0018] El VEGF tiene un papel fundamental en la angiogénesis ósea y en la formación ósea endocondral. Estos hallazgos sugieren que el VEGF puede ser útil para promover la formación de hueso potenciando la revascularización. Las afecciones que pueden beneficiarse de un tratamiento con VEGF son la reparación ósea en fracturas, lesión/destrucción de un cuerpo vertebral o disco, fusión espinal, menisco lesionado, necrosis avascular, reparación/reconstrucción craneofacial, destrucción/daño del cartílago, osteoartritis, osteosclerosis, osteoporosis, fijación de implantes, enfermedades o trastornos óseos hereditarios o adquiridos (documento US2004/0033949).

[0019] El VEGF se ha visto implicado en el proceso de úlcera gástrica (Ma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 6470), cicatrización, úlceras de pie diabético y neuropatía diabética.

[0020] El VEGF se ha visto implicado en la neurogénesis (K. Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, 11946) y para el tratamiento de estados patológicos y naturales que se benefician de la formación o regeneración de nuevos vasos (documento US 2005/0075288)

[0021] El VEGF o las moléculas capaces de unirse a receptores de VEGF pueden ser útiles para el diagnóstico de patologías que presentan una sobreexpresión de los receptores de VEGF (Li et al., Annals of Oncology 2003, 14, 1274) y para la formación de imágenes de la vasculatura angiogénica (Miller et al., J. Natl. Cancer Inst. 2005, 97, 172).

[0022] Los agentes moleculares para la formación de imágenes de la angiogénesis deben unirse a los receptores de VEGF con alta especificidad y ser detectables a bajas concentraciones. Se deben etiquetar según las modalidades de formación de imágenes, PET, SPECT y, en menor medida, ultrasonidos (con agentes de contraste de microburbujas) y formación de imágenes ópticas (con agentes de contraste fluorescentes). Además, a pesar de que la sensibilidad de la RM es baja, la imagen molecular de la angiogénesis es posible con sustancias paramagnéticas oligomerizadas ligadas a un agente, que se une a un marcador molecular de angiogénesis (Miller et al., J. Natl. Cancer Inst. 2005, 97, 172).

[0023] Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar compuestos capaces de modular enfermedades dependientes de VEGF como agentes terapéuticos, de diagnóstico o de formación de imágenes.

[0024] Esta invención se refiere a péptidos sintéticos diseñados para imitar la región de β -horquilla del VEGF 79-92 (o 87-100 de PlGF) capaces de unirse a los receptores de VEGF y modular la angiogénesis mediada por el VEGF.

[0025] Los compuestos descritos en la presente invención promueven o inhiben el proceso de angiogénesis y tienen aplicación en la terapia de pro o anti-angiogénesis. Además, son útiles como agentes de diagnóstico, por ejemplo, en la formación de imágenes de células tumorales o endoteliales que sobreexpresan los receptores de VEGF. Finalmente, tienen aplicación como herramientas bioquímicas para el estudio de la ruta celular dependiente de la activación de los receptores de VEGF.

[0026] Estos compuestos han sido diseñados partiendo de la estructura molecular del complejo VEGF-VEGFR1-D2 (Wiesmann, C. et al., Cell 1997, 91, 695; *Protein Data Bank code 1FLT*). La secuencia aminoacídica de VEGF (UniProtKB/Swiss-Prot P15692) 79-92 (QIMRIKPHQGQHIG; código de aminoácido una letra; SEQ ID No: 6), que comprende las hebras β 5 y β 6, adopta una conformación de β -horquilla tanto en la forma libre como compleja de VEGF. Los experimentos de mutagénesis mostraron que los residuos Gln79, Ile83, Lys84 y Pro85 son importantes para el reconocimiento de VEGFR2. A partir del análisis estructural del complejo VEGF-VEGFR1-D2, los autores identificaron los residuos de VEGF (Gln79, Met81, Ile83, Pro85, His86, Gln89, Ile91) situados a menos de 4,5 Å del receptor. Un análisis correspondiente en PlGF (UniProtKB/Swiss-Prot P49763; secuencia 87-100: QLLKIRSGDRPSYV; SEQ ID No: 7) destacó los residuos Gln87, Leu89, Ile91, Pro97 y Tyr99.

[0027] La estrategia de diseño consistió en mantener fija la disposición tridimensional de los residuos de interacción que limitan la secuencia de aminoácidos 79-92 para adoptar una conformación molecular como la natural. Para estabilizar la estructura de horquilla beta y considerando que los residuos de giro no pueden modificarse porque están implicados en la unión al receptor, los autores decidieron introducir en la secuencia aminoacídica, cuando fue posible, aminoácidos con alta propensión a una conformación beta y estabilizar el pliegue de las dos hebras utilizando dos herramientas moleculares: clúster hidrófobo y enlace disulfuro. La primera estrategia consistió en introducir, en una posición específica a través de las dos cadenas, aminoácidos hidrófobos, especialmente aromáticos, para formar un clúster hidrófobo que mantenga las dos cadenas plegadas (Cochran et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 5578-83). La última estrategia consistió en introducir dos residuos de

cisteína para formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. También se introdujeron residuos polares con alta preferencia por una conformación beta, tales como serina y treonina, con el fin de estabilizar la horquilla β y mejorar la solubilidad en agua. Finalmente, se adjuntó un residuo de lisina para completar el apareamiento de la cadena y permitir la derivatización del péptido.

[0028] En Goncalves M et al. : "On-resin cyclisation of a head-to-tail cyclopeptide using an allyldimethylsilyl polystyrene resin preloaded by metathesis" Tetrahedron, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, Vol, 61, n.º 32, 8 de agosto de 2005 (08-08-2005) páginas 7789-7795, XP025384157; ISSN: 0040-4020, DOI:DOI:10.1016/j.TET.2005.05.078 [recuperado el 08-08-2005], se describe la síntesis en fase sólida de una ciclación de cabeza-cola en resina 17-mer de un ciclopéptido 17-mer con propiedades antiangiogénicas.

[0029] El documento WO 02/28895 desvela diversos péptidos cíclicos para su uso como inhibidores de la angiogénesis o activadores que muestran diferentes secuencias.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0030] Por lo tanto, el objeto de la presente invención son dos péptidos: KQCMWIKPHQGQWTCTS (cíclico: los residuos Cys hacen un enlace disulfuro) (SEQ ID No 2) (#2) y KQLLWIRSGDRPWYYTS (SEQ ID No 3) (#3).

[0031] Preferiblemente, los péptidos de la invención son para uso médico, en particular, para uso de una patología dependiente de VEGF.

[0032] Preferiblemente, la patología se selecciona del grupo de: cáncer, trastornos oculares, patología del tracto reproductor femenino, psoriasis, artritis reumatoide, edema cerebral, enfermedades causadas por una angiogénesis defectuosa o excesiva, enfermedades cardiovasculares isquémicas, trastornos cerebrales, patología ósea, osteoartritis, osteosclerosis, osteoporosis.

[0033] Es un objeto adicional de la invención el uso de la molécula de la invención para el diagnóstico de una patología dependiente de VEGF.

[0034] Es un objeto adicional de la invención el uso de la molécula de la invención como un agente de formación de imágenes. Preferiblemente, la molécula está marcada.

[0035] Aún preferiblemente, la etiqueta es un contraste o un agente paramagnético.

[0036] Preferiblemente, se forman imágenes de la vasculatura angiogénica.

[0037] Es un objeto adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende la molécula de la invención como se ha descrito anteriormente, y los diluyentes y/o excipientes apropiados.

[0038] Los ensayos biológicos e *in vivo* demostraron que los péptidos según la invención son capaces de unirse a receptores de VEGF y modular la respuesta angiogénica. Los autores encontraron que el péptido # 3 KQLLWIRSGDRPWYYTS tiene una actividad biológica proangiogénica mientras que el péptido #2 mostró una actividad antiangiogénica. Los compuestos tienen aplicación en el diagnóstico y el tratamiento de patologías dependientes de la angiogénesis, especialmente se pueden utilizar en terapia de angiogénesis.

[0039] Los compuestos tienen aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de estados patológicos dependientes de la angiogénesis excesiva, de estados patológicos y naturales que se benefician de la formación o regeneración de nuevos vasos, de patologías que presentan una sobreexpresión de receptores de VEGF.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0040] La invención se describirá ahora por ejemplos no limitantes haciendo referencia a las siguientes figuras:

Figura 1 - Las células HUVE ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) se incubaron en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1 %, BSA al 0,1 %) con A) el péptido #3 (25-100 ng/ml) o el péptido desordenado pep-RND (100 ng/ml); o C) el péptido #2 a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se usó VEGF165 como control positivo (véanse los métodos). Después de 8 horas, se determinó la actividad de caspasa-3. Los datos se indican como un porcentaje de rescate celular de la activación de caspasa-3 con respecto al control.

Figura 2 - Las células HUVE se incubaron en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1 %, BSA al 0,1 %) con VEGF (25 ng/ml) o A) el péptido #3 (25-100 ng/ml), péptidos desordenados Pep-RND (100 ng/ml) durante 15 min y 30 min.

Figura 3 - A) Las células HUVEC se incubaron en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1 %, BSA al

0,1 %) en solitario o en presencia de VEGF165 (25 ng/ml) o con concentraciones indicadas de Pep #3 o Pep RND (100 ng/ml), durante 24, 48 y 72 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después, las células se incubaron con el reactivo CyQUANT® NF durante 1 hora a 37 °C y se midieron las intensidades de fluorescencia de muestras cuádruples con un lector de microplacas de fluorescencia usando excitación a 485 nm y detección de fluorescencia a 530 nm. En el gráfico, los valores se calculan como % de células de proliferación en comparación con los controles (células no tratadas) a las 24, 48 y 72 horas. B) Se evaluó la fosforilación de ERK1/2 y phospho-RB 24 h después de la estimulación con Pep #3 (10-25-50 y 100 ng/ml), VEGF165 (25 ng/ml) y Pep RND (100 ng/ml). Se utilizaron los anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-GAPDH como control de carga.

Figura 4 - Los angioreactores se prepararon e implantaron como se describe en la sección del método. Después de 21 días, los angioreactores se recuperaron y fotografiaron usando una cámara digital (A). En los angioreactores que contenían VEGF y el péptido #3, se observó la formación de nuevos vasos. Panel B) Se cuantificó el desarrollo de vasos sanguíneos mediante un microscopio de fluorescencia determinando el número de células positivas a lectina FITC. Se analizaron 20 campos para la muestra; los resultados se expresan en varias células positivas a lectina FITC/campo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

MATERIAL Y MÉTODOS

Síntesis de péptidos

[0041] Los péptidos se sintetizaron en fase sólida usando resina Wang (Novabiochem) con química Fmoc (N-(9-fluorenil)metoxycarbonilo) estándar. La lisina N-terminal se protegió con el grupo metiltrilito para permitir la desprotección selectiva y el marcaje de péptidos. La escisión de la resina se consiguió por tratamiento con ácido trifluoroacético, triisopropilsilano, agua, etanoditio (93; 2,5; 2,5) a temperatura ambiente durante 3 horas. La pureza y la identidad de los péptidos se evaluaron mediante HPLC y espectrometría de masas MALDI-ToF. El VEGF utilizado como control positivo era el VEGF₁₆₅ disponible en el mercado (UniProtKB/Swiss-Prot P15692-4)

Cultivo celular

[0042] Se adquirieron células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) en Promocell (Heidelberg, Alemania). Todos los experimentos se realizaron en cultivos de células de bajo paso. Las células se cultivaron en EGM-2 (medio de crecimiento endotelial) (EBM-2, FBS al 2 %, VEGF, R3-IGF-1, hEGF, hFGF, hidrocortisona, ácido ascórbico, heparina y GA-1000) (Clonetics, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville MD USA) a 37 °C y en CO₂ al 5 %.

Ensayo fluorométrico de caspasa 3

[0043] La determinación de la actividad de la caspasa-3 se realizó mediante un ensayo fluorométrico basado en la escisión proteolítica del sustrato derivado de AMC N-acetil-DEVD-AMC, que produce un producto fluorescente.

[0044] Las células HUVEC se pusieron en placas de 6 pocillos a 1×10^5 células/cm². Al día siguiente, las células se trataron, en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1 %, BSA al 0,1 %), con Pep #3 (25-100 ng/ml) o los péptidos desordenados Pep RND (100 ng/ml) durante 8 h a 37 °C. Se usó VEGF165 (R & D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), 25 ng/ml, como control positivo.

[0045] Después de 8 h, las células se procesaron con 150 µl de tampón de reacción Caspasa-3 (HEPES pH 7,5, 50 mM, EDTA 0,1 mM, NP-40 0,1%, CHAPS 0,1%, DTT 1 mM) y proteínas celulares recogidas después de la centrifugación a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) y se incubaron 20 µg de lisados en placas de 96 pocillos con 20 µM de N-acetil-DEVD-AMC a 37 °C durante 3 h.

[0046] Las muestras se analizaron usando un lector de microplacas (L55 Luminescence Spectrometer Perkin Elmer Instruments) (excitación: 360 nm, emisión: 440 nm).

Transferencia Western

[0047] Las células se pusieron en placas de 12 pocillos a 1×10^5 células/cm². Al día siguiente, las células se trataron, en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1 %, BSA al 0,1 %), con Pep #3 (25-100 ng/ml) o los péptidos Pep RND (100 ng/ml) durante 15 min y 30 min a 37 °C. Se usó VEGF165 (R & D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), 25 ng/ml, como control positivo. Después del tratamiento, se obtuvieron lisados de células completas usando tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, EGTA 1 mM, SDS al 0,05

%) complementado con Inhibidores de proteasa completos e inhibidores de fosfato (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Después, se recogieron las proteínas celulares después de la centrifugación y se determinó el contenido de proteína mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore Corp., Bedford, MA) mediante electrotransferencia semi-seca (Transblot, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

[0048] Se visualizaron ERK1/2 fosforilado con serina-tirosina (anticuerpo policlonal, Cell Signalling Technology, Inc. Danvers, MA, Estados Unidos) y α GAPDH (anticuerpo monoclonal 6C5, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) por anticuerpos específicos, anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante anti-conejo y anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Baltimor Pike, PA, Estados Unidos) por quimioluminiscencia estándar (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Ensayo de proliferación celular.

[0049] Las células HUVEC se pusieron en placas a una densidad de 1200 células/pocillo en microplacas revestidas con poli-D-lisina de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Después de 24 horas de incubación en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1%, BSA al 0,1%), las células se trataron con 25 ng/ml de VEGF165 (R & D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), con Pep #3 (10-25-50-100 ng/ml) o Pep RND (100 ng/ml). La proliferación celular se determinó usando el kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT® NF (Molecular Probes, Invitrogen S.R.L., Milano, Italia) a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. El ensayo CyQUANT® NF se basa en la medición del contenido de ADN celular mediante unión colorante fluorescente. Debido a que el contenido de ADN celular está altamente regulado, es estrechamente proporcional al número de células. En resumen, se retiró el medio y las células se incubaron con reactivo CyQUANT NF durante 1 hora a 37 °C de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se analizaron a continuación utilizando un lector de microplacas (L55 Luminescence Spectrometer Perkin Elmer Instruments) (excitación: 485 nm, emisión: 520 nm).

Animales

[0050] Los ratones CD1 hembra (20-25 g) se suministraron por Charles-River (Italia) y se mantuvieron en sales de temperatura y humedad controladas (22 °C, 50 %) con luces encendidas de 07:00 a 19:00 h, agua y alimentos disponibles *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la ley Italiana (Decreto Legislativo n.º 116, 27 de enero de 1992), que reconoce la Directiva Europea 86/609/CEE, y cumplían plenamente con la política de GlaxoSmithKline sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio y códigos de práctica. Además, se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

Angioreactor de angiogénesis dirigida *in vivo* (DIVAA)

[0051] Los cilindros de silicona estériles cerrados en un extremo, denominados angioreactores (Cultrex, Trevigen, Inc. Helgerman Ct., Gaithersburg), se cargaron con 20 μ l de extracto de membrana basal (BME) premezclado con o sin factores de angiogénesis (VEGF, FGF) para obtener controles positivos y negativos respectivamente. Además se añadieron los péptidos desordenados HPLW (100 ng/ml) o HW-RND (100 ng/ml) a los angioreactores. Estos se incubaron a 37 °C durante 1 hora para permitir la formación de gel, antes de la implantación subcutánea en el costado dorsal de CD1. Los animales se anestesiaron antes de la implantación con 100 mg/ml de Ketamina HCl y se inyectaron por vía subcutánea 20 mg/ml de xilazina. Se realizaron incisiones en el flanco dorsal (izquierdo y derecho) del ratón, aproximadamente 1 cm por encima de la cavidad de la cadera, y se cerraron con grapas de piel.

[0052] La evaluación de la formación de vasos se realizó después de 21 días. El matrigel se eliminó de los angioreactores y se digirió en 300 μ l de solución CellSpense durante 1 hora a 37 °C. Después de la digestión, la mezcla de incubación se depuró por centrifugación a 800 rpm. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 500 μ l de DMEM-SBF al 10% y se pusieron en placas en cubreobjetos en placas de 24 pocillos durante 16 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 3,7 % durante 30 min a temperatura ambiente y se inactivaron mediante incubación con glicina 0,1 mM durante 5 min. Posteriormente, las células se incubaron con reactivo de FITC-Lectina (disponible en el kit) y luego se observaron mediante microscopio de fluorescencia (ZEISS, Alemania).

RESULTADOS

Efectos biológicos de los péptidos sobre la actividad de caspasa 3

[0053] Para investigar la actividad biológica de los péptidos diseñados, los autores analizaron la activación de la caspasa 3 en células endoteliales primarias humanas (HUVEC) privadas de suero por medio de un ensayo fluorimétrico de caspasa-3. Se sabe bien que el VEGF actúa como un factor de supervivencia para las EC. Cuando la actividad de la caspasa 3 privada de suero aumenta, por lo tanto, la adición de VEGF rescató parcialmente, como

se esperaba (Yilmaz A, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2003, 306: 730-6), las células HUVEC de la apoptosis. Los experimentos se realizaron en células HUVEC privadas de suero tratadas con péptidos diseñados en presencia o ausencia de VEGF con el fin de destacar una actividad antagonista o agonista (tipo VEGF), respectivamente. La actividad biológica de los compuestos analizados se indica como porcentaje de rescate de VEGF (Figura 1). La disminución de la actividad de caspasa-3 después de la incubación de VEGF se ajusta en un 100 % de rescate. La actividad de la caspasa 3, medida después de 8 horas, disminuyó significativamente (y en consecuencia, el rescate se aumentó significativamente) por el Péptido #3 a concentraciones finales de 25 ng/ml y 100 ng/ml, con respecto las células no tratadas y células tratadas con (Pep-RND) desordenado.

[0054] El efecto del VEGF se suprimió parcialmente cuando se añadieron el péptido #2 y #4 a los cultivos (Figura 1B y 1C).

Efectos biológicos de los péptidos #3 y #4 en la activación de ERK 1/2 y AKT

[0055] La angiogénesis modulada con VEGF es en gran medida dependiente de ERK1/2, dando lugar a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Se demostró que la unión de VEGF a células HUVEC inducía la activación de la cinasa ERK. Por lo tanto, los autores investigaron si el péptido #3 también podría inducir la activación de ERK y AKT como VEGF. Las células HUVEC, tratadas con el péptido #3 (25-100 ng/ml) en condiciones de privación de suero durante 15 y 30 minutos, mostraron la activación de ERK1/2 y AKT, como se muestra en los análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-phospho serina-tirosina ERK1/2 y AKT (Figura 2A). El Pep-RND desordenado no tuvo efecto sobre la activación de ERK1/2 y AKT, siempre que sea incapaz de activar la señalización intracelular (Figura 2A). El péptido #4, en cambio, a 100 ng/ml, no muestra ningún efecto biológico en células HUVE no tratadas, pero reduce drásticamente la activación de ERK 1/2 de células HUVE estimuladas con VEGF, confirmando su actividad inhibitoria biológica (Figura 2B).

Efecto del péptido #3 en la proliferación celular

[0056] Para evaluar si el péptido #3 induce la proliferación celular, se realizó un ensayo de proliferación celular en células HUVEC tratadas, en condiciones de privación de suero, con el pep #3 (10-25-50-100 ng/ml) o el Pep RND (100 ng/ml). Después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento, la proliferación celular se midió mediante el kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT® NF. Los resultados obtenidos de este experimento demostraron que el péptido #3 es capaz de inducir, de una manera dependiente de la dosis, la proliferación celular de una manera similar a VEGF165 (25 ng/ml) usada como control positivo. Este efecto es evidente a las 24, 48 y 72 horas. También se observaron efectos considerables con el tratamiento con pep #3 a concentraciones de 25 y 50 ng/ml a las 48 y 72 horas. El péptido desordenado, pep RND, fue ineficaz a la concentración de 100 ng/ml. (Figura 3A).

[0057] Además, el análisis de transferencia Western, a partir de proteínas de células completas que se obtuvo después de 24 horas de tratamiento, confirmó la activación de ERK1/2 en células tratadas con el péptido #3 y VEGF165. Como marcador de proliferación celular, se verificó también el estado de fosforilación de RB en las mismas condiciones experimentales. La proteína RB, de hecho, es capaz de regular la proliferación controlando la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción dentro de las fases G1 y S. El Pep #3 y VEGF165, pero no Pep RND, mejoraron la fosforilación de RB, indicando de este modo la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S (Figura 3B).

Actividad pro-angiogénica del péptido #3 *in vivo*

[0058] La actividad del péptido pro-angiogénico #3 también se ensayó en un ensayo *in vivo* usando DIVAA (angioreactor de angiogénesis dirigida *in vivo*). El ensayo DIVAA se realiza implantando angioreactores en el flanco dorsal de los ratones; esto permite una evaluación cuantitativa del desarrollo de los vasos sanguíneos. En la Figura 3A se muestran imágenes de angioreactores que contienen PBS (control negativo), VEGF (control positivo), el péptido #3 (100 ng/ml) o el péptido desordenado Pep-RND (100 ng/ml), eliminados después de 21 días desde la implantación subcutánea en ratones. El desarrollo de los vasos sanguíneos se observó en los angioreactores que contenían VEGF y el péptido #3. De hecho, como se muestra en la Figura 3B, la inducción de la formación de nuevos vasos por el péptido #3 fue 3,8 veces mayor con respecto a los controles negativos (péptido #3 frente al Pep-RND: $3,83 \pm 0,67$, $p = 0,000835$; péptido #3 frente a PBS: $2,4 \pm 0,42$, $p = 0,001477$).

[0059] Se visualizaron Technology, Inc. Danvers, MA, Estados Unidos) y α GAPDH (anticuerpo monoclonal 6C5, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) por anticuerpos específicos, anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante anti-conejo y anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Baltimor Pike, PA, Estados Unidos) por quimioluminiscencia estándar (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Ensayo de proliferación celular.

[0060] Las células HUVEC se pusieron en placas a una densidad de 1200 células/pocillo en microplacas revestidas con poli-D-lisina de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Después de 24 horas de incubación en medio de inanición (EBM-2, heparina al 0,1%, BSA al 0,1%), las células se trataron con 25 ng/ml de VEGF165 (R & D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), con Pep #3 (10-25-50-100 ng/ml) o Pep RND (100 ng/ml). La proliferación celular se determinó usando el kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT® NF (Molecular Probes, Invitrogen S.R.L., Milano, Italia) a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. El ensayo CyQUANT® NF se basa en la medición del contenido de ADN celular mediante unión colorante fluorescente. Debido a que el contenido de ADN celular está altamente regulado, es estrechamente proporcional al número de células. En resumen, se retiró el medio y las células se incubaron con reactivo CyQUANT NF durante 1 hora a 37 °C de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se analizaron a continuación utilizando un lector de microplacas (L55 Luminescence Spectrometer Perkin Elmer Instruments) (excitación: 485 nm, emisión: 520 nm).

Animales

[0061] Los ratones CD1 hembra (20-25 g) se suministraron por Charles-River (Italia) y se mantuvieron en sales de temperatura y humedad controladas (22 °C, 50 %) con luces encendidas de 07:00 a 19:00 h, agua y alimentos disponibles *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la ley Italiana (Decreto Legislativo n.º 116, 27 de enero de 1992), que reconoce la Directiva Europea 86/609/CEE, y cumplían plenamente con la política de GlaxoSmithKline sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio y códigos de práctica. Además, se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

Angioreactor de angiogénesis dirigida *in vivo* (DIVAA)

[0062] Los cilindros de silicona estériles cerrados en un extremo, denominados angioreactores (Cultrex, Trevigen, Inc. Helgerman Ct., Gaithersburg), se cargaron con 20 µl de extracto de membrana basal (BME) premezclado con o sin factores de angiogénesis (VEGF, FGF) para obtener controles positivos y negativos respectivamente. Además se añadieron los péptidos desordenados HPLW (100 ng/ml) o HW-RND (100 ng/ml) a los angioreactores. Estos se incubaron a 37 °C durante 1 hora para permitir la formación de gel, antes de la implantación subcutánea en el costado dorsal de CD1. Los animales se anestesiaron antes de la implantación con 100 mg/ml de Ketamina HCl y se inyectaron por vía subcutánea 20 mg/ml de xilazina. Se realizaron incisiones en el flanco dorsal (izquierdo y derecho) del ratón, aproximadamente 1 cm por encima de la cavidad de la cadera, y se cerraron con grapas de piel.

[0063] La evaluación de la formación de vasos se realizó después de 21 días. El matrigel se eliminó de los angioreactores y se digirió en 300 µl de solución CellSpense durante 1 hora a 37 °C. Después de la digestión, la mezcla de incubación se depuró por centrifugación a 800 rpm. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 500 µl de DMEM-SBF al 10% y se pusieron en placas en cubreobjetos en placas de 24 pocillos durante 16 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 3,7 % durante 30 min a temperatura ambiente y se inactivaron mediante incubación con glicina 0,1 mM durante 5 min. Posteriormente, las células se incubaron con reactivo de FITC-Lectina (disponible en el kit) y luego se observaron mediante microscopio de fluorescencia (ZEISS, Alemania).

RESULTADOS

Efectos biológicos de los péptidos sobre la actividad de caspasa 3

[0064] Para investigar la actividad biológica de los péptidos diseñados, los autores analizaron la activación de la caspasa 3 en células endoteliales primarias humanas (HUVEC) privadas de suero por medio de un ensayo fluorimétrico de caspasa-3. Se sabe bien que el VEGF actúa como un factor de supervivencia para las EC. Cuando la actividad de la caspasa 3 privada de suero aumenta, por lo tanto, la adición de VEGF rescató parcialmente, como se esperaba (Yilmaz A, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2003, 306: 730-6), las células HUVEC de la apoptosis. Los experimentos se realizaron en células HUVEC privadas de suero tratadas con péptidos diseñados en presencia o ausencia de VEGF con el fin de destacar una actividad antagonista o agonista (tipo VEGF), respectivamente. La actividad biológica de los compuestos analizados se indica como porcentaje de rescate de VEGF (Figura 1). La disminución de la actividad de caspasa-3 después de la incubación de VEGF se ajusta en un 100 % de rescate. La actividad de la caspasa 3, medida después de 8 horas, disminuyó significativamente (y en consecuencia, el rescate se aumentó significativamente) por el Péptido #3 a concentraciones finales de 25 ng/ml y 100 ng/ml, con respecto las células no tratadas y células tratadas con (Pep-RND) desordenado.

[0065] El efecto del VEGF se suprimió parcialmente cuando se añadieron el péptido #2 y #4 a los cultivos (Figura 1B y 1C).

Efectos biológicos de los péptidos #3 y #4 en la activación de ERK 1/2 y AKT

[0066] La angiogénesis modulada con VEGF es en gran medida dependiente de ERK1/2, dando lugar a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Se demostró que la unión de VEGF a células HUVEC inducía la activación de la cinasa ERK. Por lo tanto, los autores investigaron si el péptido **#3** también podría inducir la activación de ERK y AKT como VEGF. Las células HUVEC, tratadas con el péptido **#3** (25-100 ng/ml) en condiciones de privación de suero durante 15 y 30 minutos, mostraron la activación de ERK1/2 y AKT, como se muestra en los análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-phospho serina-tirosina ERK1/2 y AKT (Figura 2A). El Pep-RND desordenado no tuvo efecto sobre la activación de ERK1/2 y AKT, siempre que sea incapaz de activar la señalización intracelular (Figura 2A). El péptido **#4**, en cambio, a 100 ng/ml, no muestra ningún efecto biológico en células HUVE no tratadas, pero reduce drásticamente la activación de ERK 1/2 de células HUVE estimuladas con VEGF, confirmando su actividad inhibitoria biológica (Figura 2B).

Efecto del péptido **#3** en la proliferación celular

[0067] Para evaluar si el péptido **#3** induce la proliferación celular, se realizó un ensayo de proliferación celular en células HUVEC tratadas, en condiciones de privación de suero, con el pep **#3** (10-25-50-100 ng/ml) o el Pep RND (100 ng/ml). Después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento, la proliferación celular se midió mediante el kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT® NF. Los resultados obtenidos de este experimento demostraron que el péptido **#3** es capaz de inducir, de una manera dependiente de la dosis, la proliferación celular de una manera similar a VEGF165 (25 ng/ml) usada como control positivo. Este efecto es evidente a las 24, 48 y 72 horas. También se observaron efectos considerables con el tratamiento con pep **#3** a concentraciones de 25 y 50 ng/ml a las 48 y 72 horas. El péptido desordenado, pep RND, fue ineficaz a la concentración de 100 ng/ml. (Figura 3A).

[0068] Además, el análisis de transferencia Western, a partir de proteínas de células completas que se obtuvo después de 24 horas de tratamiento, confirmó la activación de ERK1/2 en células tratadas con el péptido **#3** y VEGF165. Como marcador de proliferación celular, se verificó también el estado de fosforilación de RB en las mismas condiciones experimentales. La proteína RB, de hecho, es capaz de regular la proliferación controlando la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción dentro de las fases G1 y S. El Pep **#3** y VEGF165, pero no Pep RND, mejoraron la fosforilación de RB, indicando de este modo la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S (Figura 3B).

Actividad pro-angiogénica del péptido **#3** *in vivo*

[0069] La actividad del péptido pro-angiogénico **#3** también se ensayó en un ensayo *in vivo* usando DIVAA (angioreactor de angiogénesis dirigida *in vivo*). El ensayo DIVAA se realiza implantando angioreactores en el flanco dorsal de los ratones; esto permite una evaluación cuantitativa del desarrollo de los vasos sanguíneos. En la Figura 3A se muestran imágenes de angioreactores que contienen PBS (control negativo), VEGF (control positivo), el péptido **#3** (100 ng/ml) o el péptido desordenado Pep-RND (100 ng/ml), eliminados después de 21 días desde la implantación subcutánea en ratones. El desarrollo de los vasos sanguíneos se observó en los angioreactores que contenían VEGF y el péptido **#3**. De hecho, como se muestra en la Figura 3B, la inducción de la formación de nuevos vasos por el péptido **#3** fue 3,8 veces mayor con respecto a los controles negativos (péptido **#3** frente al Pep-RND: $3,83 \pm 0,67$, $p = 0,000835$; péptido **#3** frente a PBS: $2,4 \pm 0,42$, $p = 0,001477$).

LISTA DE SECUENCIAS

[0070]

<110> ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS S.A.

<120> Compuestos moduladores de la actividad VEGF y usos de los mismos

<130> 10541PTWO

<150> US provisional 61/228/384

<151> 24-07-2009

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> preparada mediante síntesis química

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(17)
 <223> lineal

10

<400> 1
 Lys Gln Ile Met Trp Ile Lys Pro His Gln Gly Gln Trp Ile Tyr Thr
 1 5 10 15
 Ser

15

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> preparada mediante síntesis química

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(17)
 <223> cíclico: Los residuos Cys hacen un enlace disulfuro

25

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> (3)..(15)

30

<400> 2
 Lys Gln Cys Met Trp Ile Lys Pro His Gln Gly Gln Trp Thr Cys Thr
 1 5 10 15
 Ser

35

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> preparada mediante síntesis química

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(17)
 <223> lineal

45

<400> 3
 Lys Gln Leu Leu Trp Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Trp Tyr Tyr Thr
 1 5 10 15
 Ser

50

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> preparada mediante síntesis química

60

	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(17)
5	<223> cíclico: Los residuos Cys hacen un enlace disulfuro
	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (3)..(15)
10	<400> 4
	Lys Gln Cys Leu Trp Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Trp Tyr Cys Thr
	1 5 10 15
	Ser
	<210> 5
15	<211> 17
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
20	<223> PREPARADA MEDIANTE SÍNTESIS QUÍMICA
	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(17)
25	<223> lineal o cíclico
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (1)..(1)
30	<223> cualquier aminoácido natural o sintético
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (3)..(3)
35	<223> cualquier aminoácido natural o sintético
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (4)..(4)
40	<223> Met o Leu o su homólogo u ortólogo
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (5)..(5)
45	<223> cualquier aminoácido natural o sintético
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (7)..(7)
50	<223> cualquier aminoácido natural o sintético
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (8)..(8)
55	<223> Pro o Ser o su homólogo u ortólogo
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (9)..(9)

<223> His o Gly o su homólogo u ortólogo
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (10)..(10)
 <223> cualquier aminoácido natural o sintético
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (11)..(11)
 <223> cualquier aminoácido natural o sintético
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (12)..(12)
 <223> Gln o Pro o su homólogo u ortólogo
 <220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (13)..(13)
 <223> cualquier aminoácido natural o sintético
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (14)..(14)
 <223> Ile o Tyr o su homólogo u ortólogo
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (15)..(17)
 <223> cualquier aminoácido natural o sintético
 <400> 5
 Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 35 Xaa
 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)
 45 <223> Secuencia aminoacídica VEGF (UniProtKB/Swiss-Prot P15692) 79-92
 <300>
 <308> UniProtKB Swiss-Prot/P15692
 <309> 01-04-1990
 50 <313> (79)..(92)
 <400> 6
 Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly
 1 5 10
 55 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <220>
 <221> PÉPTIDO

ES 2 622 155 T3

<222> (1)..(14)

<223> PIGF (UniProtKB/Swiss-Prot P49763) secuencia 87-100

<300>

5 <308> UniProtKB/Swiss-Prot P49763

<309> 01-10-1996

<313> (87)..(100)

<400> 7

10 Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Péptido KQCMWIKPHQGQWTCTS de la SEQ ID NO: 2 cíclico debido a que los residuos Cys hacen un enlace disulfuro, y KQLLWIRSGDRPWYYTS de la SEQ ID NO: 3.
- 5 **2.** Péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 para uso médico.
- 10 **3.** Péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una patología dependiente de VEGF, en el que dicha patología se selecciona del grupo de: cáncer, trastornos oculares, patología del tracto reproductor femenino, psoriasis, artritis reumatoide, edema cerebral, enfermedades causadas por una angiogénesis defectuosa o excesiva, enfermedades cardiovasculares isquémicas, trastornos cerebrales, patología ósea, osteoartritis, osteosclerosis, osteoporosis.
- 15 **4.** Péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de formación de imágenes.
- 15 **5.** El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el péptido está marcado.
- 20 **6.** El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la etiqueta es un contraste o un agente paramagnético.
- 20 **7.** El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en la formación de imágenes de la vasculatura angiogénica.
- 25 **8.** Una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y diluyentes y/o excipientes apropiados.

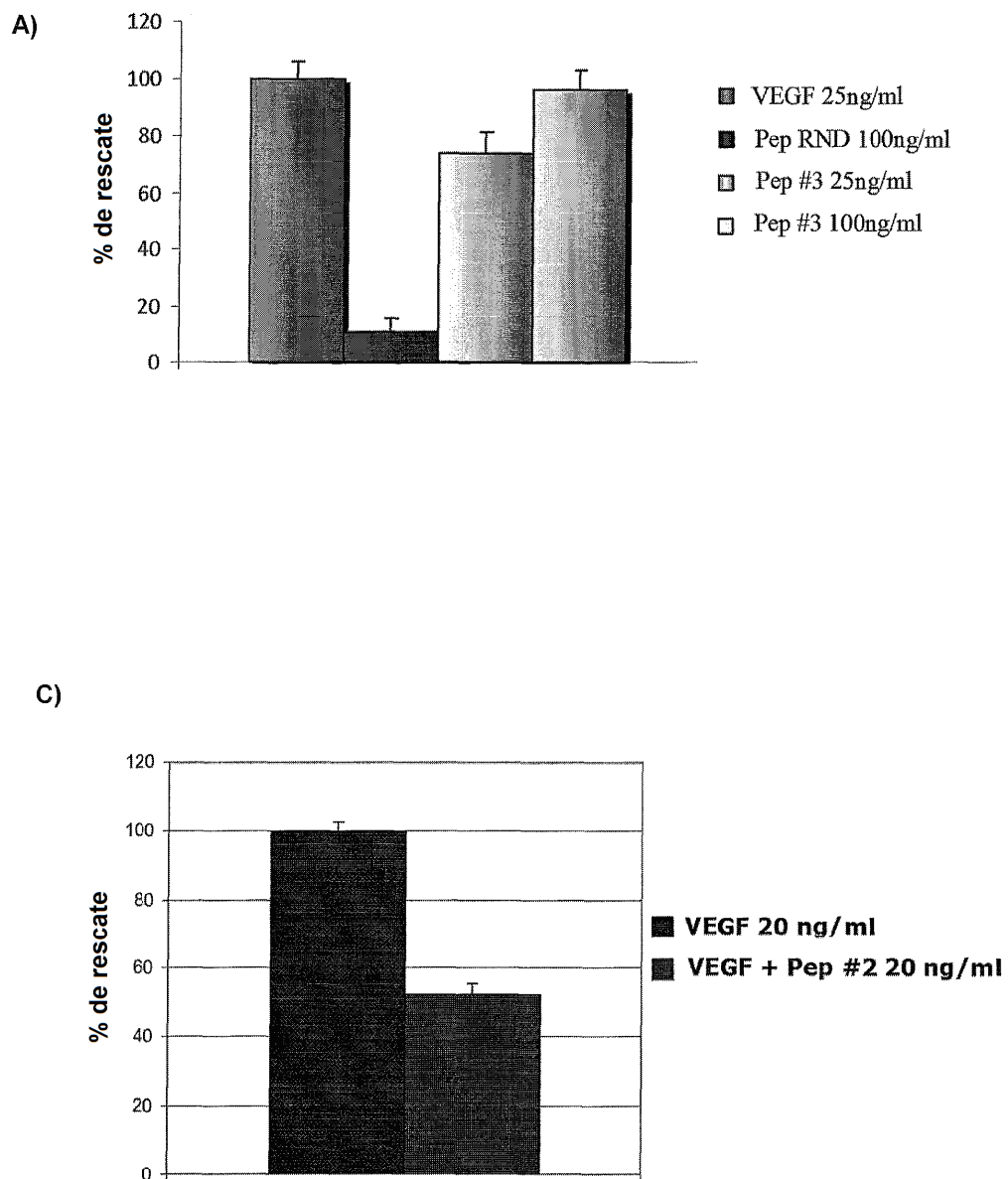


Fig. 1

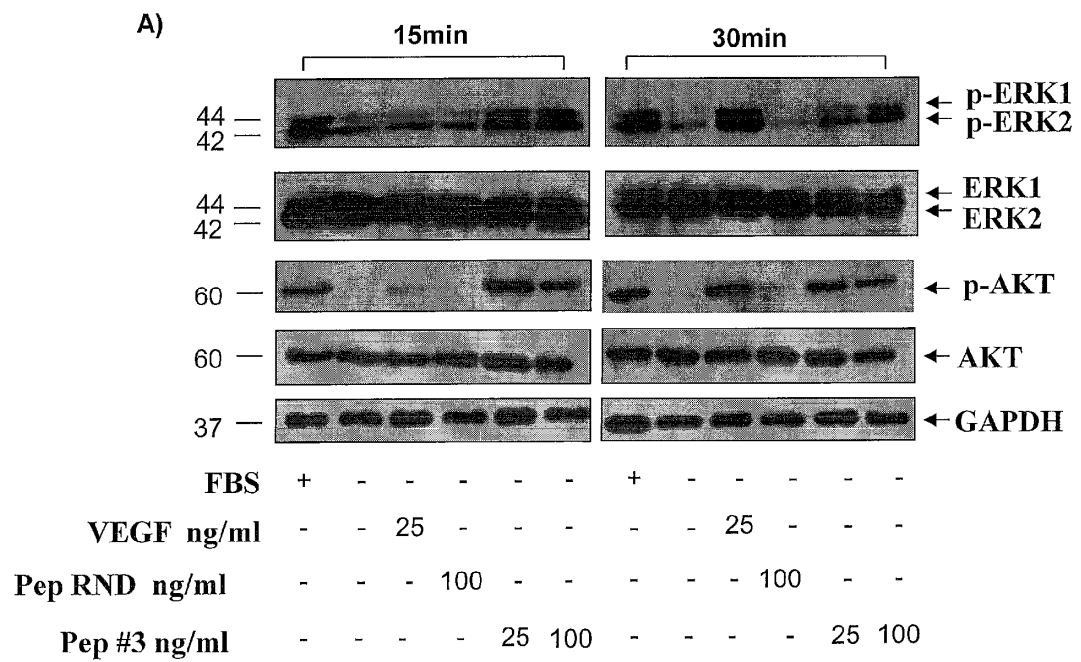


Fig. 2

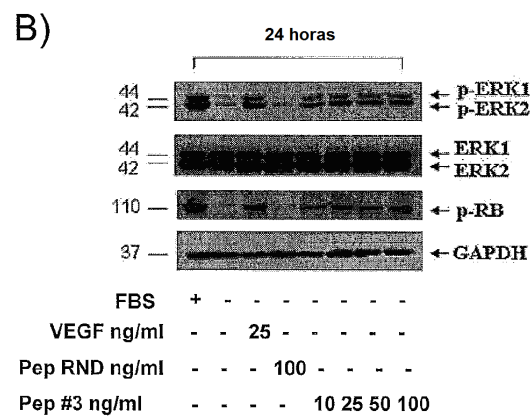
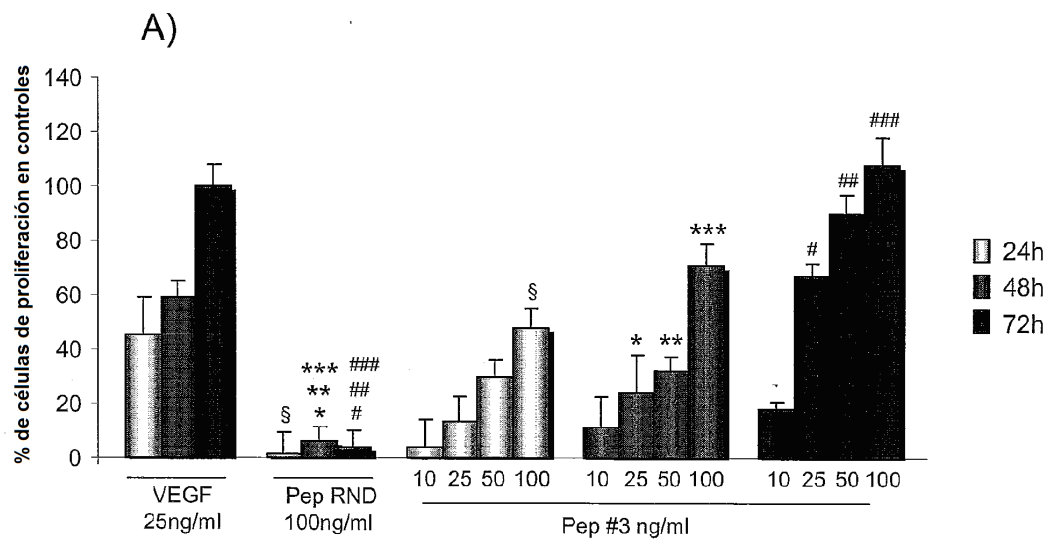
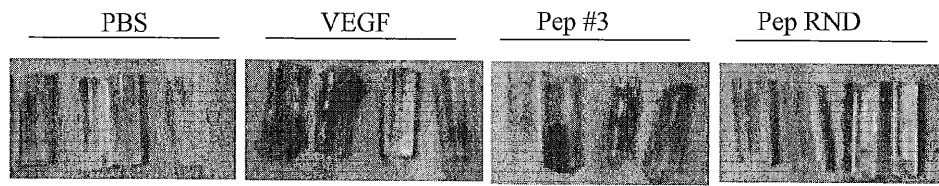


Fig. 3

A)



B)

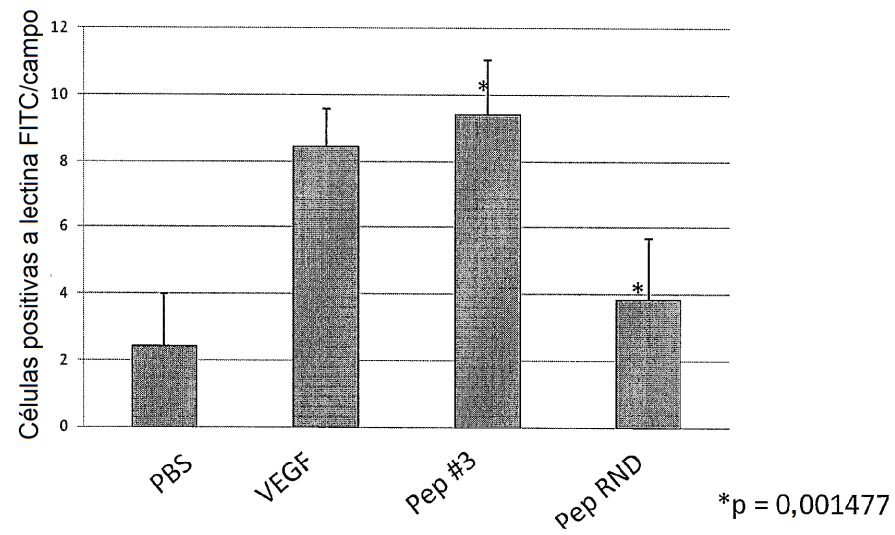


Fig. 4