

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 710**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2016 PCT/US2016/020443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16141053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2016 E 16710568 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3265110**

54 Título: **Péptidos para inhibir la angiogénesis**

30 Prioridad:

02.03.2015 US 201562126968 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLIONIS (100.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South
Wright Street
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

**KOMAROVA, YULIA, A.;
ROSENBLATT, MARK y
MALIK, ASRAR, B.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 820 710 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

Péptidos para inhibir la angiogénesis

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos para inhibir la angiogénesis. La presente invención también se refiere a métodos para inhibir la angiogénesis y a métodos para tratar trastornos asociados con la permeabilidad vascular inducida por VEGF usando los péptidos de la invención.

10 Antecedentes

El citoesqueleto de microtúbulos (MT) proporciona un importante punto de control de la regulación de la barrera endotelial; sin embargo, el papel de este elemento clave del citoesqueleto no ha sido bien estudiado. Se ha demostrado que el fármaco estabilizante de MT, taxol, atenúa la fuga vascular endotelial en modelos de ratones de inflamación pulmonar, lo que sugiere que los MT pueden ser importantes para mediar el aumento de la permeabilidad vascular pulmonar. Sin embargo, el taxol muestra una toxicidad general que lo convierte en un fármaco inconveniente para los médicos y sus pacientes.

Las proteínas de unión al extremo de los microtúbulos son factores accesorios de seguimiento de extremos positivos de microtúbulos altamente conservados que se unen a microtúbulos (MT) en crecimiento y suprimen eventos catastróficos de MT. Dos de tales proteínas de unión al extremo, EB1 y EB3, desempeñan papeles en la regulación de la dinámica endotelial del citoesqueleto y el cambio de forma de la célula, los determinantes primarios de la permeabilidad de la barrera endotelial.

Ca^{2+} es un segundo mensajero altamente versátil que regula la permeabilidad endotelial y la homeostasis vascular. La activación de la fosfolipasa C β (PLC β), corriente abajo de mediadores proinflamatorios, promueve la hidrólisis del fosfatidil inositolbifosfato (PIP2) en inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y en diacilglicerol (DAG). IP_3 estimula la liberación de Ca^{2+} a partir de almacenes intracelulares sensibles a IP_3 , es decir, el retículo endoplásmico (RE). La depleción de Ca^{2+} de almacenes de RE es mediada por la activación de IP_3R en la membrana del RE y conduce a un aumento transitorio en Ca^{2+} intracelular. La entrada o "flujo" de Ca^{2+} está mediada por canales canónicos potenciales transitorios del receptor (CPTTR) que son permeables a diversos cationes incluyendo Ca^{2+} y Mg^{2+} . TRPC1 y 4 son canales de Ca^{2+} operados por almacén (COA) en células microvasculares pulmonares endoteliales que se activan por depleción de RE.

El aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} regula positivamente la actividad de la proteína quinasa C α (PKC α). PKC α es un regulador clave de la respuesta de permeabilidad endotelial a múltiples mediadores incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). PKC α fosforila la p120-catenina y media su disociación de la VE-cadherina, dando como resultado por tanto la internalización de la VE-cadherina, PKC α actúa también corriente arriba de la activación de RhoA por fosforilación de p115RhoGEF y GDI-1. RhoA, a su vez, facilita la inhibición inducida por fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) mediante la activación de Rho quinasa (ROCK). La inhibición de MLCP se acompaña de la activación dependiente de Ca^{2+} /calmodulina de MLCK que conduce a la fosforilación de MLC e induce la contracción de actomiosina en respuesta a mediadores proinflamatorios tales como trombina e histamina y factores de crecimiento.

La integridad del citoesqueleto de MT se requiere para la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 de almacenes de RE. La alteración de la dinámica de MT por los agentes desestabilizadores de MT o estabilizadores de MT, nocodazol, colchicina y taxol inhibe la liberación de Ca^{2+} activador de IP_3 , lo que sugiere que la dinámica de MT es necesaria para la activación completa de IP_3R . El citoesqueleto de MT está implicado en la remodelación del RE, asegurando por tanto la organización y propagación de las ondas de Ca^{2+} en respuesta a estímulos externos. El RE se une y se alarga junto con MT que crece en los extremos a través de la interacción directa de EB1 y EB3 con la molécula de interacción estromal 1 (STIM1). La depleción de EB1 en HeLa (las células HeLa no expresan EB3) disminuye los eventos de protrusión de RE, sin embargo no inhibe la activación de SOC por taspargina, lo que sugiere que algunos otros mecanismos están implicados en la activación de SOC y la propagación de la señalización de calcio en células epiteliales. En las células endoteliales, la localización de IP_3R en cavéola es crítica tanto para la depleción del almacén de Ca^{2+} en RE como para la activación de SOC. Esto indica que la activación de IP_3R y/o su capacidad de respuesta a IP_3 es un elemento importante de la señalización del calcio. De acuerdo con los hallazgos anteriores, se descubrió que el citoesqueleto de MT regula positivamente la activación de IP_3R en respuesta a IP_3 y, por tanto, transmite las señales extracelulares a través de la célula, provocando una respuesta fisiológica. EB3 pero no EB1 interactúa directamente con IP_3Rs y esta interacción proporciona un punto crítico de control para la organización de las señales de calcio en las células endoteliales.

Se sabe que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) contribuye a la angiogénesis mediante métodos directos e indirectos. Se sabe que el VEGF hace que las células endoteliales microvasculares sean hiperpermeables de manera que las proteínas plasmáticas se derramen hacia el espacio extravascular, dando lugar a la coagulación del fibrógeno extravasado con la deposición de un gel de fibrina. La fibrina extravascular sirve como una matriz que

soporta el crecimiento interno de nuevos vasos sanguíneos y otras células mesenquimales que generan estroma vascularizado maduro. Por tanto, la inhibición de la permeabilidad vascular inducida por VEGF dará como resultado la inhibición de la angiogénesis. Se necesitan nuevas terapias para evitar la permeabilidad vascular inducida por VEGF e inhibir la angiogénesis.

La formación de la red de vasos sanguíneos del tumor, es decir, neovascularización, desempeña un papel esencial a lo largo del desarrollo del tumor ayudando al tumor a crecer y metastatizarse. Una vez que una lesión tumoral supera unos pocos milímetros de diámetro, la hipoxia y la privación de nutrientes desencadena un "cambio angiogénico". Las células tumorales liberan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que estimula el brote y la proliferación de las células endoteliales. Varias terapias antiangiogénicas están aprobadas por la FDA para el cáncer, incluyendo el fragmento de anticuerpo bloqueador funcional humanizado contra VEGF-A, Avastin (bevacizumab) y los inhibidores de tirosina quinasa, sorafenib y sunitinib, que se dirigen a varios receptores de crecimiento. Por tanto, las terapias que controlan la angiogénesis asociada al tumor son una táctica prometedora para limitar la progresión del cáncer y la metástasis.

La pérdida de la barrera hemato-retiniana interna endotelial y el edema macular resultante y el daño son las principales causas de trastorno ocular y ceguera en la población de edad avanzada. En la actualidad, estas condiciones, también conocidas como degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), son incurables. Además, la forma neovascular de DMRE se caracteriza por el crecimiento de los vasos sanguíneos de la coroides, que penetran a través de la membrana de Bruch en el área subretiniana. Algunas terapias eficaces para detener la causa subyacente común de la DMRE neovascular son limitadas con el objetivo de obstaculizar la pérdida de la visión mediante la destrucción de nuevos vasos que surgen en la coroides. Aunque los tratamientos actuales con inyección intravítrea de corticosteroides y agentes anti-VEGF son eficaces para retrasar la progresión de la enfermedad ocular, no eliminan completamente el riesgo de ceguera. Por lo tanto, se necesitan nuevas y más potentes terapias o enfoques de terapia combinacional para tratar trastornos oculares y prevenir la pérdida de la visión.

Sumario de la invención

Se proporciona en el presente documento un péptido aislado. El péptido puede comprender KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), un fragmento del mismo, o una variante del mismo. El péptido también puede consistir en KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), un fragmento del mismo, o una variante del mismo. La variante puede comprender una sustitución conservativa. La variante puede comprender cualquier secuencia peptídica que contenga la secuencia Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5), la secuencia mínima de motivo de consenso de unión a EB. El péptido puede conjugarse con un ácido graso, es decir, miristoilado o enlazado a un péptido portador. El péptido portador puede ser un péptido antenapedia (AP), péptido antenapedia, péptido penetratina, TAT, tranportano o poliarginina. El péptido puede ser parte de una formulación farmacéutica, que puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona métodos de inhibición de la angiogénesis que comprenden administrar a un paciente en necesidad de los mismos un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención, tal como una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis. Además, los métodos incluyen administrar composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención. La invención proporciona un método de tratamiento en el que el paciente en necesidad padece cáncer o un trastorno asociado con la permeabilidad inducida por VEGF, tal como deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

La invención también proporciona métodos tratar un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF que comprende administrar a un paciente en necesidad de los mismos un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención, tal como una cantidad eficaz para inhibir la permeabilidad vascular inducida por VEGF. Además, los métodos incluyen administrar composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención. La invención proporciona un método de tratamiento en el que el paciente en necesidad padece cáncer o un trastorno asociado con la permeabilidad inducida por VEGF, tal como deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

En cualquiera de los métodos anteriores, el péptido administrado puede estar enlazado a un péptido portador tal como péptido antenapedia (AP), péptido antenapedia, péptido penetratina, TAT, transportano o poliarginina. Además, en cualquiera de los métodos anteriores, El péptido administrado puede conjugarse con un ácido graso, p. ej., miristoilado.

5 En cualquiera de los métodos anteriores, el péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo se administra en combinación con uno o más inhibidores de VEGF, en donde "inhibidores de VEGF" se refieren a anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de los mismos, anticuerpos de receptores anti-VEGF (anti-VEGFR) y fragmentos de los mismos, péptidos antagonistas y moléculas pequeñas que inhiben la actividad o la vía de señalización de VEGF y/o VEGFR. Los
10 inhibidores de VEGF a modo de ejemplo incluyen Bevacizumab (Avastin), Ranibizumab (Lucentis), Pegaptanib (Macugen), Aflibercept (Eylea), Sorafenib (Nexvar), Sunitinib (Sutent), Pazopanib (Votrient), Axitinib (Inlyta), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547.632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, o SU11248.

15 En cualquiera de los métodos anteriores de la invención, el péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo puede administrarse en combinación con un tratamiento con láser para la enfermedad ocular, en donde "enfermedad ocular" se refiere a un deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

25 En cualquiera de los métodos anteriores de la invención, el péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo puede administrarse en combinación con un tratamiento con un esteroide o cualquier método actual de tratamiento de la enfermedad ocular.

30 Además, en cualquiera de los métodos de la invención, el péptido aislado de la invención, el inhibidor de VEGF, el esteroide o cualquier otro tratamiento se pueden administrar por inyección intravítrea o por vía tópica, tal como en forma de una gota para los ojos.

La invención también proporciona un uso de un péptido aislado para la preparación de un medicamento para la inhibición de la angiogénesis en un paciente en necesidad, en donde el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo. Los usos de la invención incluyen el uso del péptido aislado de la invención para la preparación de un medicamento que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención, tal como una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis. Además, la invención nos proporciona el péptido aislado de la invención para la preparación de un
40 medicamento que comprende una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención. La invención proporciona el uso del péptido aislado de la invención para la preparación de un medicamento para administrar a un enfermo de cáncer o un trastorno asociado con la permeabilidad inducida por VEGF, tal como deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

50 La invención también proporciona el uso de un péptido aislado para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno vascular inducido por VEGF, en donde el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo. Los usos de la invención incluyen el uso del péptido aislado de la invención para la preparación de un medicamento que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención, tal como una cantidad eficaz para inhibir la permeabilidad vascular inducida por VEGF. Además, la invención nos proporciona el péptido aislado de la invención para la preparación de un medicamento que comprende una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención. La invención proporciona el uso del péptido de la invención para la preparación de un medicamento para administrar a un sujeto que padece cáncer o un trastorno asociado con permeabilidad inducida por VEGF, tal como deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.
65

En cualquiera de los usos anteriores de la invención, el péptido aislado administrado puede estar enlazado a un péptido portador tal como péptido antenapedia (AP), péptido antenapedia, péptido penetratina, TAT, transportano o poliarginina. Además, en cualquiera de los métodos anteriores, el péptido aislado administrado puede conjugarse con un ácido graso, p. ej., miristoilado.

5 En cualquiera de los usos anteriores, el péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo se administra en combinación con uno o más inhibidores de VEGF, en donde "inhibidores de VEGF" se refieren a anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de los mismos, anticuerpos anti-VEGFR y fragmentos de los mismos, péptidos antagonistas y moléculas
10 pequeñas que inhiben la actividad o la vía de señalización de VEGF o VEGFR. Los inhibidores de VEGF a modo de ejemplo incluyen Bevacizumab (Avastin), Ranibizumab (Lucentis), Pegaptanib (Macugen), Aflibercept (Eylea), Sorafenib (Nexvar), Sunitinib (Sutent), Pazopanib (Votrient), Axitinib (Inlyta), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547.632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, o SU11248.

15 En cualquiera de los usos anteriores de la invención, el medicamento que comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo puede administrarse en combinación con un tratamiento con láser para la enfermedad ocular, en donde "enfermedad ocular" se refiere a un deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad
20 neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

25 En cualquiera de los usos anteriores de la invención, el medicamento puede administrarse en combinación con un esteroide o cualquier método actual de tratamiento para la enfermedad ocular.

Además, en cualquiera de los usos de la invención, el medicamento puede administrarse por inyección intravítrea o por vía tópica, tal como en forma de una gota para los ojos.

30 La invención proporciona un péptido aislado para la inhibición de la angiogénesis, en donde el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo.

35 La invención también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención para la inhibición de la angiogénesis. La invención proporciona un péptido aislado o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido para la inhibición de la angiogénesis en un sujeto que padece cáncer o un trastorno asociado con la permeabilidad inducida por VEGF, tal como deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama
40 venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

45 La invención también proporciona un péptido aislado para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un paciente que padece un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF, en donde el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) o un fragmento del mismo.

50 La invención también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido aislado de la invención para la inhibición de la permeabilidad vascular inducida por VEGF. La invención proporciona un péptido aislado o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido para la inhibición de la permeabilidad inducida por VEGF en un sujeto que padece cáncer o un trastorno asociado con
55 permeabilidad inducida por VEGF, tal como deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y
60 retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

La invención también proporciona un péptido aislado para el tratamiento de un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF. Por ejemplo, el trastorno vascular asociado al VEGF es el deterioro visual o la pérdida
65 de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía

de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

Cualquiera de los péptidos de la invención se usa para inhibir la angiogénesis o para tratar un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF puede estar enlazado a un péptido portador tal como péptido antenapedia (AP), péptido antenapedia, péptido penetratina, TAT, transportano o poliarginina. Además, cualquiera de los péptidos aislados de la invención para su uso en la inhibición de la angiogénesis o el tratamiento de un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF puede conjugarse con un ácido graso, p. ej., miristoilado.

Cualquiera de los péptidos aislados o composiciones de la invención puede administrarse en combinación con uno o más inhibidores de VEGF, en donde "inhibidores de VEGF" se refieren a anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de los mismos, anticuerpos anti-VEGFR y fragmentos de los mismos, péptidos antagonistas y moléculas pequeñas que inhiben la actividad o la vía de señalización de VEGF o VEGFR. Los inhibidores de VEGF a modo de ejemplo incluyen Bevacizumab (Avastin), Ranibizumab (Lucentis), Pegaptanib (Macugen), Aflibercept (Eylea), Sorafenib (Nexvar), Sunitinib (Sutent), Pazopanib (Votrient), Axitinib (Inlyta), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547.632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, o SU11248. Además, el péptido o el VEGFR se administra mediante inyección intravítrea o por vía tópica, tal como en forma de una gota para los ojos.

Cualquiera de los péptidos aislados o composiciones de la invención puede administrarse en combinación con un tratamiento con láser para enfermedad ocular en donde "enfermedad ocular" se refiere a deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

Los péptidos aislados o composiciones de la invención pueden administrarse en combinación con un esteroide o cualquier método de tratamiento actual para enfermedad ocular.

Además, los péptidos aislados o composiciones de la invención pueden administrarse mediante inyección intravítrea o por vía tópica, tal como en forma de una gota para los ojos.

Descripción breve del dibujo

La **Figura 1** muestra el papel de EB3 en la hiperpermeabilidad inducida por inflamación de la barrera endotelial. EB3 establece interacciones transitorias de los extremos de MT en crecimiento con el IP_3R_3 , sensibiliza el IP_3R_3 y regula positivamente la liberación de Ca^{2+} de almacenes y entrada de Ca^{2+} dependiente de SOC durante la inflamación. Esto da como resultado la amplificación de la señalización de Ca^{2+} y el aumento de la permeabilidad a través de la fosforilación mediada por $PKC\alpha$ de la contractilidad de p120-catenina y de la actomiosina.

La **Figura 2** muestra una alineación de receptores IP_3 humanos (794-814 aa de IP_3R_3 tipo 3) con motivo de unión a EB (resaltado). El péptido IP_3R_3 (SEQ ID NO: 1) se muestra debajo de la alineación.

La **Figura 3** muestra una representación en cinta de la estructura de EB3 (magenta) y del péptido derivado de IP_3R_3 (SEQ ID NO: 1) acoplado a la ranura de unión hidrofóbica EB3 de EB3; se muestra una rotación de 180° . El péptido derivado de IP_3R_3 se acopló utilizando un programa Z-Dock junto con el software Discovery Studio 3.0. La energía de unión entre el péptido y EB3 se calculó que era de -68,882 kcal/mol.

La **Figura 4** muestra el péptido IP_3R_3 (SEQ ID NO: 1) que inhibe la liberación de Ca^{2+} de RE en respuesta a la activación de PAR-1. A. Las CEMPH pretratadas con el péptido IP_3R_3 o el péptido de control (AP) unidos a AP se cargaron con Fura 2-AM y la relación 340/380 se calculó después de la estimulación de células con trombina (50 nM) en ausencia y en presencia de Ca^{2+} extracelular. Flecha, tiempo de adición de trombina. B. La gráfica muestra la media $\pm$ DT para la liberación de Ca^{2+} inducida por trombina y la entrada se calcula como un incremento máximo sobre el valor basal. El aumento se normaliza para controlar las células no tratadas del mismo experimento ($n = 4$).

La **Figura 5** muestra una representación en cinta de EB3 en el complejo con EBIN (SEQ ID NO: 3) y péptido IP_3R_3 (SEQ ID NO: 1). La energía de unión calculada es -68,882 y -60,251 para IPR y EBIN, respectivamente.

El panel A de la **Figura 6A-6B** muestra una fuga vascular subcutánea de colorante azul de Evans unido a albúmina, que se indujo por inyección intradérmica de VEGF, y el panel B cuantifica la fuga vascular según se mide espectrofotométricamente a 620 nm.

El panel A de la **Figura 7A-7D** muestra que EBIN inhibió la tubulogénesis en pocillos recubiertos de matrigel (escala de barra de 200 μ m). El panel B muestra el número de ramas por área; ST = sin tratar; Contr = péptido de control; ** $p < 0,001$ ($n = 3$ pocillos por grupo). El panel C muestra tinción de hematoxilina y eosina (HE) de tapones de matrigel *in vivo*. El grupo 1 se trató con el péptido de control y el grupo 3 se trató con Myr-EBIN a 0,36 y 60 h; el grupo 2 recibió solo 36 y 60 h de tratamiento. El panel D muestra el número de vasos por mm^2 ; *** $p < 0,001$ ($n = 15$ por grupo). Barra de escala, 200 μ m.

La **Figura 8A-8B** muestra el efecto del tratamiento con EBIN sobre la curva de crecimiento tumoral y la neovascularización. El panel A representa la curva de crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto; se muestra la media; $n = 8$ ratones por grupo. El panel B representa el número de vasos por área contada fuera del tumor; $N = 25$ campos/ratón; $N = 5$ ratones; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

La **Figura 9** muestra una visión general del modelo animal para la inducción de la neovascularización coroidea (NVC) en: (a) vista en sección transversal del ojo que demuestra el haz láser enfocado en el epitelio pigmentario de la retina para inducir una quemadura por láser y ruptura de la membrana de Bruch, (b) la ruptura de la membrana de Bruch induce la proliferación de los vasos sanguíneos en la coroides y la lesión de NVC en la retina.

La **Figura 10** muestra un esquema de la programación para la NVC inducida por láser, la tomografía de coherencia ocular (TCO), la angiografía con fluoresceína de fondo, el tratamiento y la recolección de tejidos para los grupos 1-3 (como se expone en la Tabla 4).

La **Figura 11** muestra el efecto del tratamiento con EBIN en NVC. Análisis correlativo de la pérdida vascular (a) y la lesión (b-c) en ratones tratados con inyección intravítrea de péptido control (Myr-FAEIPIT), EBIN (Myr-FTEIPTI) y anticuerpo anti-VEGF de ratón (LEAFTM). Imágenes representativas de la angiografía con fluoresceína de fondo (a) y tomografía de coherencia óptica correspondiente (b) en el día 15 después de la fotocoagulación por láser; los números en amarillo indican lesiones NVC correspondientes. El área de fuga se correlaciona con el tamaño de la lesión. (c) La lesión de la NVC se detecta por tinción de isolectina B4 utilizando un epitelio pigmentario de retina plana/coroides/esclerótica. Cuantificación del área de fuga de fluoresceína (d) y lesión (e) utilizando las imágenes mostradas en (a) y (c); $n = 6-9$ ratones por grupo; **, $p < 0,01$. Barra de escala, 200 μ m y 100 μ m en (a) y (c), respectivamente. La comparación entre los grupos se realizó utilizando ANOVA. El tratamiento anti-VEGF alteró significativamente la curación/cicatrización de heridas del área dañada, mientras que el tratamiento con EBIN no afectó el proceso de curación.

La **Figura 12** muestra los efectos del estudio de toxicidad aguda de 7 días para EBIN. Imágenes representativas de la angiografía con fluoresceína de fondo (a) y tomografía de coherencia óptica correspondiente (b) en el día 8 después del tratamiento intravítreo con EBIN (1 μ g/ojo). Nota, EBIN forma pequeños cristales/se precipita dentro del humor vítreo; no se detectaron cambios visibles en la vasculatura retiniana y epitelio pigmentario de la retina, coroides, esclerótica.

Descripción detallada

Los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que los péptidos derivados del dominio que interactúa con EB3 del receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) tipo 3 (IP_3R_3) reducen la interacción entre la proteína de unión al extremo 3 (EB3) e IP_3R_3 e inhiben la permeabilidad vascular inducida por VEGF o la fuga microvascular inducida por VEGF. Los péptidos de la invención demuestran propiedades protectoras de la barrera en diversas enfermedades inflamatorias y demuestran propiedades antiangiogénicas *in vitro* e *in vivo*.

El trabajo previo sugerido por el papel del citoesqueleto de MT en la regulación de la liberación activada por IP_3 de Ca^{2+} del almacén de RE y EB3 es necesario para la depleción de Ca^{2+} en RE. IP_3R_3 contiene un motivo de consenso de unión a EB, Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP) (SEQ ID NO: 5). Un péptido corto basado en la secuencia IP_3R_3 (KFARLWTEIPTAIT--SEQ ID NO: 1) muestra una actividad de unión elevada para EB3 (véase el Ejemplo 1). Estos estudios demuestran que la interacción entre IP_3R_3 y EB3 es crítica en el mecanismo de activación de IP_3R .

El papel de EB3 en la hiperpermeabilidad inducida por inflamación de la barrera endotelial se centra en su capacidad para establecer interacciones transitorias de los extremos de MT en crecimiento con IP_3R_3 . Como resultado, EB3 sensibiliza IP_3R_3 a IP_3 y regula positivamente la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). Esto conduce a la entrada de Ca^{2+} dependiente de SOC y la amplificación de la señalización de Ca^{2+} . El aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico induce la fosforilación mediada por PKC α de p120-catenina, lo que resulta en el desmontaje de las adhesiones de VE-cadherina. También facilita la contractilidad de actomiosina dependiente de RhoA que resulta en los cambios de forma de la célula. Véase la FIG. 1. Este trabajo se describe con detalle en la solicitud internacional n.º PCT/US2012/042118 y en la patente de Estados Unidos n.º 8.912.139.

Los métodos y materiales descritos a continuación evitan o inhiben la fuga microvascular inducida por VEGF y, por lo tanto, son útiles para inhibir la angiogénesis y tratar trastornos tales como degeneración macular, retinopatía diabética, cáncer, oclusión de la vena retiniana central u oclusión de rama venosa retiniana, por citar algunos.

Definiciones

La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante. Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Para la recitación de intervalos numéricos en el presente documento, se contempla de manera explícita cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan de manera explícita los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

"Angiogénesis", como se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso a través del cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Por ejemplo, las citocinas y proteasas de matriz extracelular inducen remodelación tisular en la preparación para la migración de células endoteliales de vasos existentes para formar nuevos vasos.

"Fragmento", como se utiliza en el presente documento, puede significar una porción de un péptido o polipéptido de referencia o secuencia de ácido nucleico.

"Idéntico" o "identidad", como se utiliza en el presente documento en el contexto de dos o más polipéptidos o secuencias nucleotídicas, puede significar que las secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos o nucleótidos que son iguales en una región especificada. El porcentaje se puede calcular alineando de manera óptima las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región especificada, determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. En los casos en que las dos secuencias son de diferentes longitudes o la alineación produce uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluye solo una secuencia, los residuos de secuencia sencilla se incluyen en el denominador pero no en el numerador del cálculo.

"Péptido" o "polipéptido", como se utiliza en el presente documento, puede referirse a una secuencia enlazada de aminoácidos y puede ser natural, sintético, o una modificación o combinación de natural y sintético.

"Sustancialmente idéntico", tal como se utiliza en el presente documento, puede significar que una primera y segunda secuencia de proteína o nucleótido son al menos 50 %-99 % idénticas sobre una región de 6-100 o más aminoácidos nucleótidos.

"Que trata", "tratamiento", o "tratar" cada uno puede significar aliviar, suprimir, reprimir, eliminar, evitar o retrasar la aparición de síntomas, signos clínicos o patología subyacente de una afección o trastorno de manera temporal o permanente. La prevención de una afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto antes de la aparición de la enfermedad. Suprimir una afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto después de la inducción de la afección o trastorno pero antes de su aparición clínica. La represión de la afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto después de la aparición clínica de la enfermedad.

La expresión "terapéuticamente eficaz" depende de la afección de un sujeto y del compuesto específico administrado. La expresión se refiere a una cantidad eficaz para conseguir un efecto clínico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz varía con la naturaleza de la afección que se está tratando, la duración del tiempo cuya actividad se desea, y la edad y la afección del sujeto y, en última instancia, se determina por el proveedor de servicios de salud. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido o composición es una cantidad eficaz para inhibir, reducir o evitar la permeabilidad vascular inducida por VEGF y/o angiogénesis.

Una "variante" significa un péptido o polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos por la inserción, delección o sustitución conservativa de aminoácidos, pero conserva al menos una actividad biológica. Ejemplos representativos de "actividad biológica" incluyen la capacidad de unirse a la proteína de unión al extremo, un receptor tipo toll (TLR) y de unirse por un anticuerpo específico. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, reemplazar un aminoácido con un aminoácido diferente de propiedades similares (p. ej., hidrofiliidad, grado y distribución de las regiones cargadas) se reconoce en la técnica como que implica generalmente un cambio menor. Estos cambios menores se pueden identificar, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y aún conservar la función proteica. En un aspecto, están sustituidos los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofiliidad de los aminoácidos también se puede utilizar para revelar

sustituciones que darían como resultado proteínas que conservan la función biológica. Una consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofiliidad media local de ese péptido, una medida útil que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Patente de Estados Unidos n.º 4.554.101. La sustitución de aminoácidos que tiene valores de hidrofiliidad similares puede dar como resultado péptidos que conservan actividad biológica, por ejemplo, inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones se pueden realizar con aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad dentro de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. De acuerdo con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y particularmente de las cadenas laterales de esos aminoácidos, como lo revela la hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y otras propiedades.

En el presente documento se proporciona un péptido, que puede comprender la secuencia de aminoácidos KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2) (también se denomina en el presente documento péptido IP₃R₃), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) (también se denomina en el presente documento péptido o "EBIN"), un péptido divulgado en el presente documento en la Tabla 1, un fragmento del mismo o una variante del mismo. La variante puede comprender una sustitución conservativa. El péptido puede comprender una secuencia de motivo de consenso de unión a EB, tal como la secuencia de consenso de unión a EB de IP₃R₃, o un fragmento de la misma. La secuencia de consenso de unión a EB de IP₃R₃ puede ser Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5). El péptido puede consistir en KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), una secuencia de consenso que comprende Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5), un péptido divulgado en el presente documento en la Tabla 1, un fragmento de lo anterior, o una variante conservativa de lo anterior. La variante puede comprender cualquier secuencia peptídica que contenga la secuencia Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5), la secuencia mínima de motivo de consenso de unión a EB.

El péptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2) (también se denomina en el presente documento péptido IP₃R₃), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) (también se denomina en el presente documento péptido o "EBIN"), un péptido divulgado en el presente documento en la Tabla 1, un fragmento del mismo o una variante del mismo, en donde el péptido o un polipéptido que comprende el péptido es 7 residuos de aminoácidos, 8 residuos de aminoácidos, 9, residuos de aminoácidos, 10, residuos de aminoácidos, 11, residuos de aminoácidos, 12 residuos de aminoácidos, 13 residuos de aminoácidos, 14 residuos de aminoácidos, 15 residuos de aminoácidos, 16 residuos de aminoácidos, 17 residuos de aminoácidos, 18 residuos de aminoácidos, 19, residuos de aminoácidos, 20 residuos de aminoácidos, 21 residuos de aminoácidos, 22 residuos de aminoácidos, 23 residuos de aminoácidos, 24 residuos de aminoácidos, 25 residuos de aminoácidos, 26 residuos de aminoácidos, 27 residuos de aminoácidos, 28 residuos de aminoácidos, 29 residuos de aminoácidos, 30 residuos de aminoácidos, 35 residuos de aminoácidos, 40 residuos de aminoácidos, 45 residuos de aminoácidos, 50 residuos de aminoácidos, 55 residuos de aminoácidos, 60 residuos de aminoácidos, 65 residuos de aminoácidos, 70 residuos de aminoácidos, 75 residuos de aminoácidos, 80 residuos de aminoácidos, 85 residuos de aminoácidos, 90 residuos de aminoácidos, 95 residuos de aminoácidos o 100 residuos de aminoácidos.

El péptido puede ser modificado ya que la secuencia de aminoácidos tiene una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento de terminal carboxi o un truncamiento de terminal amino.

El péptido también puede estar glucosilado, fosforilado, sulfatado, glucosilado, animado, carboxilado, acetilado. Por ejemplo, el extremo C-terminal puede modificarse con amidación, adición de alcoholes peptídicos y aldehídos, adición de ésteres, adición de p-nitorailina y péptidos de tioésteres y de múltiples antígenos. Las cadenas N-terminales y laterales pueden ser modificadas por PEGilación, acetilación, formilación, adición de un ácido graso, adición de benzoilo, adición de bromoacetilo, adición de piroglutamilo, succinilación, adición de tetrabutioxicarbonilo y adición de 3-mercaptopropilo, acilaciones (p. ej., lipopéptidos), biotinilación, fosforilación, sulfatación, glucosilación, introducción de grupo maleimido, restos quelantes, cromóforos y fluoróforos.

El péptido puede conjugarse con un ácido graso, p. ej., el péptido está miristoilado. Por ejemplo, un ácido graso puede conjugarse con el extremo N-terminal del péptido, tales ácidos grasos incluyen ácido caprílico (C8), ácido cáprico (C10), ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16) o ácido esteárico (C18), etc. Además, las cisteínas en péptidos pueden ser palmitoiladas.

El péptido puede conjugarse o enlazarse a otro péptido, tal como un péptido portador. El péptido portador puede facilitar la penetración celular, tal como péptido antenapedia, péptido penetratina, TAT, tranportano o poliarginina.

Los péptidos pueden ser cíclicos. El péptido desvelado en el presente documento puede ciclarse añadiendo puentes disulfuro únicos o múltiples, añadiendo una unión única o múltiple entre el extremo N y C-terminal, ciclación de cabeza a cola, ciclación de cadena lateral (p. ej., puente de lactama, tioéster), péptidos estables con hidrocarburo.

El péptido puede marcarse con marcado isotópico pesado, p. ej., ¹⁵N, ¹³C, FITC, conjugación con una proteína portadora, conjugación con un agente de formación de imágenes, sustratos de FRET con un par fluoróforo/colorante

inhibidor, conjugación péptido-ADN, conjugación péptido-ARN y marcado péptido-enzima.

El péptido puede estar dentro de una proteína de fusión tal como fusionada a un polipéptido o péptido que promueve la oligomerización, tal como un dominio de cremallera de leucina; un polipéptido o péptido que aumenta la estabilidad o aumenta la semivida, tal como una región constante de inmunoglobulina; y un polipéptido que tiene una actividad terapéutica diferente del péptido o de la invención, un agente quimioterápico, un anticuerpo o una proteína para la orientación específica del tejido.

Las fusiones pueden hacerse bien en el extremo amino-terminal o bien en el extremo carboxi-terminal del polipéptido. Las proteínas de fusión pueden ser directas sin un enlazador o una molécula adaptadora o indirectas utilizando una molécula enlazadora o adaptadora. Una molécula enlazadora o adaptadora puede ser uno o más residuos de aminoácidos, normalmente hasta aproximadamente 20 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. También se puede diseñar una molécula enlazadora o adaptadora con un sitio de escisión para una proteasa para permitir la separación de los restos fusionados. Por ejemplo, el péptido puede fusionarse a uno o más dominios de una región Fc de IgG humana para aumentar la semivida del péptido o la adición de un dominio variable de Fab para acortar la semivida del péptido.

Métodos de tratamiento

En el presente documento se proporciona un método para inhibir, evitar o reducir la angiogénesis. La angiogénesis se asocia con el crecimiento tumoral, progresión del cáncer y metástasis, ceguera y degeneración macular, retinopatía diabética, por citar algunos.

La invención proporciona un método para inhibir la angiogénesis implicada en el crecimiento tumoral, progresión del cáncer y metástasis. La invención también proporciona métodos para tratar, inhibir y evitar el crecimiento de tumores y cánceres tales como, p. ej., tumores cerebrales (incluyendo meningiomas, glioblastoma multiforme, astrocitomas anaplásicos, astrocitomas cerebelosos, otros astrocitomas de alto grado o de bajo grado, gliomas del tronco cerebral, oligodendrogliomas, gliomas mixtos, otros gliomas, neuroblastomas cerebrales, craneofaringiomas, gliomas diencefálicos, germinomas, meduloblastomas, ependimomas, tumores del plexo coroideo, tumores pineales parenquimatosos, gangliogliomas, tumores neuroepiteliales, tumores gliales neuronales o neuronales mixtos), tumores de pulmón (incluyendo carcinomas de células pequeñas, carcinomas epidermoides, adenocarcinomas, carcinomas de células grandes, tumores carcinoides, tumores de las glándulas bronquiales, mesoteliomas, sarcomas o tumores mixtos), cánceres de próstata (incluyendo adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, carcinoma del utrículo prostático, o carcinosarcomas), cánceres de mama (incluyendo adenocarcinomas o tumores carcinoides), o cánceres gástricos, intestinales, o de colon (incluyendo adenocarcinomas, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma medular, carcinoma ductal in situ, carcinoma lobular in situ, carcinoma coloide o enfermedad de Paget del pezón), cáncer de piel (incluyendo melanoma, carcinoma de células escamosas, progresión tumoral de queratinocitos cutáneos humanos, carcinoma de células basales, hemangiopericitoma y sarcoma de Kaposi), linfoma (incluyendo enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), sarcomas (incluyendo osteosarcoma, condrosarcoma y fibrosarcoma), así como para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso.

La administración de los péptidos de la invención puede combinarse con otras terapias contra el cáncer, agentes antitumorales y agentes quimioterapéuticos tales como un inhibidor de la aromatasas, un antiestrógeno, un antiandrógeno, un agonista de la gonadorelina, un inhibidor de la topoisomerasa I, un inhibidor de la topoisomerasa II, un agente activo de microtúbulos, un agente alquilante, un retinoide, un carotenoide, un tocoferol, un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de MMP, un inhibidor de mTOR, un antimetabolito, un compuesto de platino, un inhibidor de la metionina aminopeptidasa, un bisfosfonato, un anticuerpo antiproliferativo, un inhibidor de la heparanasa, un inhibidor de las isoformas oncogénicas de Ras, un inhibidor de la telomerasa, un inhibidor del proteasoma, un compuesto utilizado en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, un inhibidor de la Flt-3, un inhibidor de la Hsp90, un inhibidor de la proteína del huso de quinesina, un inhibidor de MEK, un antibiótico antitumoral, una nitrosourea, un compuesto que está dirigido/disminuye una actividad de proteína o lípido quinasa, un compuesto que está dirigido/disminuye una actividad de proteína o lípido fosfatasa, cualquier compuesto antiangiogénico adicional, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de agentes antitumorales incluyen, pero no se limitan a, azacitidina, axatioprina, bevacizumab, bleomicina, capecitabina, carboplatino, clorabucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, fluorouracilo, gemcitabina, herceptin, idarrubicina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, taflupósido, tenipósido, tioguanina, ácido retinoico, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, inhibidores de la tirosina quinasa del receptor, y combinaciones de los mismos. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de agentes antitumorales o quimioterapéuticos.

La invención proporciona métodos para tratar la degeneración macular incluyendo degeneración macular húmeda y seca que comprende administrar el péptido de la invención. La degeneración macular húmeda ocurre cuando los vasos sanguíneos anormales crecen detrás de la mácula. Estos vasos son frágiles y pueden producir fugas de líquido y sangre, lo que resulta en la cicatrización de la mácula y aumenta el potencial de daño rápido y severo. La membrana de Bruch se descompone, por lo general cerca de depósitos de drusas. Aquí es donde el nuevo crecimiento de los

vasos sanguíneos, o neovascularización, se produce. La visión central puede distorsionarse o desaparecer por completo en un corto período de tiempo, a veces en unos días.

Para los métodos de tratamiento de la degeneración macular, se contempla la administración ocular de los péptidos de la invención. Además, la administración de los péptidos puede combinarse con otros agentes terapéuticos tales como otros fármacos antiangiogénicos tales como Bevacizumab (Avastin), Ranibizumab (Lucentis), Pegaptanib (Macugen), Aflibercept (Eylea), Lodamina (una formulación polimérica de TNP-470), Verteporfina (Visudyne),

(terapia fotodinámica o TFD), terapias de oligonucleótido, anticuerpos contra Dr5, moduladores de quinasa de molécula pequeña dirigidos a c-Met, derivados de quinolona, piridina bicíclica fusionada y derivados de pirazina, o compuestos de pirrolopirimidina como inhibidores de CDK4/6. Agentes terapéuticos adicionales son conocidos en la técnica. Además, la administración de los péptidos de la invención para tratar la degeneración macular puede combinarse con otros procedimientos tales como un telescopio implantable, una fotocoagulación por láser y una cirugía de translocación macular.

En el presente documento se proporciona un método para tratar un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF. Por ejemplo, la invención proporciona métodos para tratar el deterioro visual o la pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

Sujeto

El sujeto puede ser un mamífero, que puede ser un ser humano. Antes del diagnóstico, el sujeto puede estar en riesgo de padecer cáncer debido a la exposición a uno o más factores de riesgo o tener un riesgo genético de desarrollar cáncer. Uno o más factores de riesgo pueden incluir, por ejemplo, el sujeto que tiene antecedentes familiares de cáncer, la edad, fumar tabaco, exposición al sol, beber bebidas alcohólicas, la falta de actividad física, obesidad y/o deficiencia dietética.

Antes del diagnóstico, el sujeto puede estar en riesgo de desarrollar degeneración macular debido a la exposición a uno o más factores de riesgo o tener un riesgo genético de desarrollar degeneración macular. Uno o más factores de riesgo pueden incluir, por ejemplo, el sujeto que tiene antecedentes familiares de degeneración macular, la edad, fumar tabaco, exposición prolongada al sol, dieta alta en grasas, deficiencia dietética, tensión arterial alta, obesidad y/u ojos de color claro.

Administración

Los métodos adecuados para administrar una composición fisiológicamente aceptable, tal como una composición farmacéutica que comprende un compuesto y/o una micela descritos en el presente documento, son bien conocidos en la técnica. Aunque se puede usar más de una vía para administrar un péptido, una vía particular a menudo puede proporcionar una vía más inmediata y más eficaz que otra vía. Dependiendo de las circunstancias, se aplica o instila una composición farmacéutica que comprende el péptido en las cavidades corporales, se absorbe a través de la piel o las membranas mucosas, se ingiere, se inhala y/o se introduce en la circulación. Por ejemplo, en determinadas circunstancias, será deseable administrar la composición farmacéutica oralmente; mediante inyección o infusión por un medio intravenoso, intratumoral, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, uretral, vaginal o rectal; por sistemas de liberación controlada, retardada, sostenida o modificada de otro modo; o mediante dispositivos de implantación. En un aspecto, la exposición al fármaco puede optimizarse manteniendo las concentraciones plasmáticas de fármaco constantes con el tiempo. Dicho estado estacionario se logra generalmente en entornos clínicos mediante infusión continua del fármaco a dosis que dependen del aclaramiento del fármaco y de la concentración plasmática a ser sostenida. Si se desea, la composición se administra regionalmente mediante administración intratumoral, administración intratecal, administración intracerebral (intraparenquimal), administración intracerebroventricular o administración intraarterial o intravenosa dirigida a la región de interés. Como alternativa, el péptido se administra por implantación de una matriz, membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual se ha encapsulado o absorbido el compuesto deseado. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo es, en un aspecto, implantado en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración del compuesto deseado es, por ejemplo, mediante difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

La administración ocular de los péptidos puede llevarse usando implantes intraoculares, inyecciones intravítreas, administración sistémica, aplicación tópica, nanopartículas, micropartículas, gotas para los ojos, geles bioadhesivos o sellante de fibrina, polisacáridos para modular la permeabilidad del complejo de barrera de células epiteliales, el péptido mejora la administración del fármaco en la córnea, la administración de la mucosa, tal como la administración

usando un polímero biovector, pulverizaciones oftálmicas acuosas y tratamiento electrodinámico de pulverización ocular. En una realización particular, el péptido puede administrarse por inyección intravítrea o por vía tópica, tal como en forma de una gota para los ojos.

- 5 El péptido puede administrarse como una monoterapia o simultáneamente o metrónicamente con otros tratamientos, que pueden ser una cirugía o extirpación de un tumor. El término "simultáneo" o "simultáneamente", como se utiliza en el presente documento, significa que el péptido y otro tratamiento se administran en un plazo de 48 horas, preferentemente de 24 horas, más preferentemente de 12 horas, aún más preferentemente de 6 horas, y los más preferentemente de 3 horas o menos, entre sí. El término "metrónicamente", como se utiliza en el presente documento, significa la administración del péptido a veces diferente del otro tratamiento y a una cierta frecuencia con respecto a la administración repetida. Por ejemplo, el péptido de la invención puede administrarse con uno o más inhibidores de VEGF. Por ejemplo, el péptido de la invención se puede administrar con uno o más inhibidores de VEGF o en combinación con un tratamiento con láser para la pérdida de la visión.
- 10
- 15 El péptido puede administrarse en cualquier punto antes de otro tratamiento que incluya aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50 h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 15 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min, y 1 min. El péptido puede administrarse en cualquier punto antes de un segundo tratamiento del péptido que incluye aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50 h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 15 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min, y 1 min.
- 20
- 25

El péptido puede administrarse en cualquier punto después de otro tratamiento que incluye aproximadamente 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 26 h, 28 h, 30 h, 32 h, 34 h, 36 h, 38 h, 40 h, 42 h, 44 h, 46 h, 48 h, 50 h, 52 h, 54 h, 56 h, 58 h, 60 h, 62 h, 64 h, 66 h, 68 h, 70 h, 72 h, 74 h, 76 h, 78 h, 80 h, 82 h, 84 h, 86 h, 88 h, 90 h, 92 h, 94 h, 96 h, 98 h, 100 h, 102 h, 104 h, 106 h, 108 h, 110 h, 112 h, 114 h, 116 h, 118 h, y 120 h. El péptido puede administrarse en cualquier punto después de un segundo tratamiento del péptido que incluye aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50 h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 15 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min, y 1 min.

Formulación

- 40 El método puede comprender administrar el péptido. Los péptidos proporcionados en el presente documento pueden tomar la forma de comprimidos o grageas formulados de forma convencional. Por ejemplo, los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, pueden ser agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, desintegrantes y agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucilago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas pueden ser lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol, y sílice. Los desintegrantes pueden ser almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes humectantes pueden ser laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.
- 45
- 50

- Los péptidos proporcionados en el presente documento pueden ser también formulaciones líquidas tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Los péptidos también pueden formularse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. El agente de suspensión puede ser jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes pueden ser lecitina, monooleato de sorbitán y acacia. Los vehículos no acuosos pueden ser aceites comestibles, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico. Los conservantes pueden ser p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico. En particular, los péptidos de la invención pueden estar en formulaciones acuosas para administración tópica, tal como en forma de una gota para los ojos.
- 55
- 60

- Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse como supositorios, que pueden contener bases de supositorios tales como manteca de cacao o glicéridos. Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse para inhalación, que puede estar en una forma tal como una solución, suspensión o emulsión que se puede administrar como un polvo seco o en forma de un aerosol usando un propelente,
- 65

tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano. Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse como formulaciones transdérmicas que comprenden vehículos acuosos o no acuosos tales como cremas, pomadas, lociones, pastas, emplastro medicado, parche o membrana. Los péptidos proporcionados en la presente invención también pueden formularse para administración parenteral, tal como por inyección, inyección intratumoral o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación que incluyen, pero no limitados a, agentes de suspensión, estabilizantes y dispersantes. El péptido también puede proporcionarse en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado que incluye, pero no limitados a, agua estéril libre de pirógenos.

Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse como una preparación de depósito, que puede administrarse mediante implante o mediante inyección intramuscular. Los péptidos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (como una emulsión en un aceite adecuado, por ejemplo), resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles (como una sal escasamente soluble, por ejemplo).

Dosificación

El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido a un paciente en necesidad del mismo. La cantidad terapéuticamente eficaz requerida para su uso varía con la naturaleza de la afección que se está tratando, la duración de tiempo deseada para activar la actividad de TLR y la edad/condición del paciente. En general, sin embargo, las dosis empleadas para el tratamiento de seres humanos adultos están normalmente en el intervalo de 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg al día. La dosis puede ser de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg al día. La dosis deseada puede administrarse convenientemente en una dosis única o como dosis múltiples administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. Pueden ser deseadas dosis múltiples o requeridas.

La dosificación puede ser a cualquier dosificación tal como aproximadamente 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,07 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,09 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,3 µg/kg, 0,4 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,6 µg/kg, 0,7 µg/kg, 0,8 µg/kg, 0,9 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 50 µg/kg, 75 µg/kg, 100 µg/kg, 125 µg/kg, 150 µg/kg, 175 µg/kg, 200 µg/kg, 225 µg/kg, 250 µg/kg, 275 µg/kg, 300 µg/kg, 325 µg/kg, 350 µg/kg, 375 µg/kg, 400 µg/kg, 425 µg/kg, 450 µg/kg, 475 µg/kg, 500 µg/kg, 525 µg/kg, 550 µg/kg, 575 µg/kg, 600 µg/kg, 625 µg/kg, 650 µg/kg, 675 µg/kg, 700 µg/kg, 725 µg/kg, 750 µg/kg, 775 µg/kg, 800 µg/kg, 825 µg/kg, 850 µg/kg, 875 µg/kg, 900 µg/kg, 925 µg/kg, 950 µg/kg, 975 µg/kg.

La dosificación puede ser a cualquier dosificación tal como aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, 425 mg/kg, 450 mg/kg, 475 mg/kg, 500 mg/kg, 525 mg/kg, 550 mg/kg, 575 mg/kg, 600 mg/kg, 625 mg/kg, 650 mg/kg, 675 mg/kg, 700 mg/kg, 725 mg/kg, 750 mg/kg, 775 mg/kg, 800 mg/kg, 825 mg/kg, 850 mg/kg, 875 mg/kg, 900 mg/kg, 925 mg/kg, 950 mg/kg, 975 mg/kg, 1 g/kg, 2 g/kg, 3 g/kg, 4 g/kg, 5 g/kg, 6 g/kg, 7 g/kg, 8 g/kg, 9 g/kg, o 10 g/kg.

Kit

En el presente documento se proporciona un kit, que puede utilizarse para tratar un trastorno asociado con la permeabilidad vascular inducida por VEGF o angiogénesis. El kit puede comprender uno o más de los péptidos. Los péptidos pueden ser parte de una composición farmacéutica. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit y llevar a cabo la administración del péptido o formulación.

El kit también puede comprender uno o más recipientes, tales como viales o botellas, conteniendo cada recipiente un reactivo separado. El kit puede comprender además instrucciones escritas, que pueden describir cómo realizar o interpretar el método descrito en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1

Papel de la interacción de EB3 con IP3R en el mecanismo de liberación activada por IP3 de Ca²⁺

Se determinó si la modulación alostérica de la función EB3 con los péptidos de la invención (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3) inhibe tanto la pérdida vascular inducida por VEGF como la angiogénesis. Los ratones fueron estimulados con VEGF o angiogénesis por inyección subcutánea del matrigel, células tumorales o quemadura por láser de la membrana de Bruch.

IP₃R₅ contiene un motivo de consenso de unión a EB, Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP) (SEQ ID NO: 5). Un péptido corto basado en la secuencia de IP.sub.3R.sub.3 (KFARLWTEIPTAIT--SEQ ID NO: 1) (FIG. 2) muestra una alta actividad

de unión para EB3 con unión de energía libre de -68,882 kcal/mol (FIG. 3). El papel de la interacción entre EB3 e IP₃R₃ fue descrito recientemente por Geyer *et al.*, Cell Rep 12(1):79-89; 2015. El pretratamiento de la célula con la secuencia IP₃R₃ unida al extremo C-terminal del péptido antenapedia (AP) permeante a las células a 10 nM disminuyó notablemente la liberación de Ca²⁺ de los almacenes en respuesta a la trombina (FIG. 4A), lo que sugiere que la interacción entre IP₃R₃ y EB3 es crítico en el mecanismo de activación de IP₃R₃. Los efectos del péptido IP₃R₃ y del taxol se compararon en la regulación de la liberación de Ca²⁺. Se descubrió que el pretratamiento de células con 5 µg/ml de taxol durante 20 min antes de la estimulación de trombina inhibe la liberación de Ca²⁺ de RE en la misma medida que el péptido IP₃R₃ (FIG. 4B).

Ejemplo 2

Diseño basado en la estructura del péptido inhibidor de unión al extremo (EBIN)

El péptido inhibidor de unión al extremo, a saber EBIN, se diseñó basándose en el barrido computacional de alaninas in silico y acoplamiento totalmente flexible del péptido IPR al bolsillo de unión a EB (Tablas 2 y 3). La energía libre de unión (ΔG) se utilizó para determinar una contribución de cada residuo en la estabilización de la interacción del péptido con la proteína EB.

Se utilizaron los siguientes criterios: ΔG valor.gtoeq.1= residuo de estabilización ΔG valor.gtoeq.-1= residuo desestabilizador ΔG valor<-1 a 0 a <1= el barrido del residuo neutro alanina revela residuos de estabilización (con una energía de unión positiva de 0,50 Kj/mol o más; mostrado en negro) y desestabilización (con una energía de unión negativa de -1, mostrado en azul).

Tabla 1: Cambios calculados en la energía libre de unión después del truncamiento de residuos de aminoácidos que rodean el motivo Thr-x-Pro de IP₃R₃

Secuencia peptídica	Unión de energía libre (-kcal/mol)	SEQ ID NO
KFARLWTEIPTAIT (péptido IP₃R₃)	-68,882	1
FARLWTEIPTAIT	-68,809	6
RLWTEIPTAIT	-46,571	7
LWTEIPTAIT	-54,443	8
WTEIPTAIT	-42,886	9
TEIPTAIT	-37,16	10
TEIPTAI	-39,337	11
TEIPTA	-41,234	12
TEIPT	-34,5	13
FARLWTEIPTAI	-51,42	14
TEIP	-45,071	15
RTEIPTI	-49,74	16
FRTEIPTI	-40,728	17
FTKIPTI	-55,469	18
KFARTKIPTAIT	-57,32	19
FARTEIPTAI	-33,415	20
KFARTEIPTAIT	-55,736	21

Tabla 2: Cambios calculados en la energía libre de unión después de la mutación de cada residuo de aminoácido de IP₃R₃ para alanina: K1F2A3R4L5W6T7E8I9P10T11A12I13T14

Aminoácido	ΔG
K1	0,25
F2	0,52
R4	0,01
L5	-1,03
W6	-1,08
T11	0,91
I13	1,33
T14	0,40

Tabla 3: Cambios calculados en la energía libre de unión después de la mutación de cada residuo de aminoácido de EBIN para alanina.

Aminoácido	ΔG
F1	1,64
T2	1,07
E3	0,02
I4	0,68
T11	0,98
I7	0,94

- 5 Como resultado, el péptido IPR de 14 aminoácidos se redujo a un péptido inhibidor de unión al extremo de 7 aminoácidos (EBIN; FTEIPTI (SEQ ID NO: 3). La FIG. 5 demuestra la interacción entre EB3 y EBIN. De forma similar a IP₃R₃ (se muestra en un palo amarillo en la FIG. 5), EBIN se une a una arboleda hidrófoba entre la cola ácida EB y el dominio de hélice enrollada. La unión de energía calculada EBIN a EB3 es de -60,251 kcal/mol, que es similar a la unión de energía entre IPR y EB3. La treonina en la posición 2 de EBIN desempeña un papel crítico en la unión a la interfaz EB3 ya que la mutación de este residuo a alanina suprime completamente la unión. Por lo tanto, una sola mutación T→A de péptido de aminoácidos, FAEIPTI (SEQ ID NO: 4), se utilizó como un control de pérdida de unión.

Ejemplo 6

15 EBIN previno la fuga microvascular inducida por VEGF

La VE-cadherina es la principal proteína de adhesión de las uniones interendoteliales que une las células endoteliales a una monocapa continua con el fin de mantener una barrera restrictiva de la pared del vaso a fluidos ricos en proteínas. Tanto VEGF como Ang2 desestabilizan la adhesión de VE-cadherina ya sea directamente, induciendo la fosforilación de tirosina de la VE-cadherina y dirigiéndose a VE-cadherina para la internalización y degradación, o indirectamente, por medio de la interrupción de la adhesión de la VE-cadherina debido a la respuesta a las fuerzas intracelulares.

25 Se ha descrito recientemente una interacción cruzada crítica entre la adhesión de VE-cadherina y el citoesqueleto de microtúbulos (Komarova *et al.* Molecular Cell 48(6): 914-25; 2012.). Se descubrió que la calcineurina, una fosfatasa dependiente del calcio, era el principal actor de señalización en esta interacción cruzada, ya que desfosforila EB3, promueve la reorganización dependiente de EB3 del citoesqueleto de MT y proporciona por tanto un mecanismo de alimentación directa para la interrupción de la adhesión de VE-cadherina.

30 Se llevó a cabo un estudio que investigaba si la inyección de la EBIN previno la fuga microvascular inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los ratones Balb/cJ fueron pretratados con el péptido EBIN (1 μ M/kg) o un péptido de control (mutación 2T→A) y luego se inyectó por vía intradérmica VEGF humano (50 ng/kg de pesos corporales) para inducir la fuga vascular con azul de Evans unido a albúmina (véase la FIG. 6A). Además, se cuantificó espectrofotométricamente el azul de Evans extraído con formamida a 620 nm y se corrigió la hemoglobina (740 nm) y el peso de la piel (véase la FIG. 6B). Los datos proporcionados en la Figura 6 demostraron que el tratamiento de animales con el péptido EBIN inhibía significativamente la fuga vascular subcutánea como inducida por la inyección intradérmica de VEGF humano y, por tanto, apoya plenamente que la EBIN puede representar una nueva terapia potente para inhibir la angiogénesis y para el tratamiento de trastornos asociados con permeabilidad vascular inducida por VEGF.

Ejemplo 7

EBIN abolió el crecimiento de los vasos sanguíneos en modelos de angiogénesis

45 El efecto de EBIN sobre la tubulogénesis *in vitro* y la angiogénesis *in vivo* se investigó utilizando modelos de matrigel. Una sola suspensión de células de células endoteliales de la vena umbilical humana se sembró en placas sobre pocillos recubiertos con matrigel en presencia de 1 μ M de EBIN o péptido de control; la formación de tubo se evaluó 16 horas más tarde. Como se muestra en la Fig. 7A y en 7B, EBIN suprimió significativamente la formación de tubos en este modelo de matrigel 2D *in vitro*.

50 También se investigó el efecto EBIN sobre los injertos de los vasos sanguíneos en un modelo *in vivo* de angiogénesis ectópica en matrigel. El vaso sanguíneo en matrigel de crecimiento se premezcló con heparina y VEGF pero no con células endoteliales, y se inyectó i.p. en el abdomen bajo de los ratones. Había dos tapones de 400 μ l por ratón. En los ratones tratados con el péptido de control (Grupo 1), los vasos sanguíneos recién formados crecieron en el matrigel (Fig. 7C, 1). Estos vasos fueron funcionales y perfundidos con sangre que es evidente por la presencia de glóbulos rojos dentro de los vasos. Además, los ratones fueron tratados con EBIN en el momento de la inyección de matrigel (Fig. 7C, 2; Grupo 2) o 36 h después de matrigel (Fig. 7C, 3; Grupo 3). Los tapones de matrigel se retiraron a las 96

horas, se fijaron y se tiñeron con HE para evaluar la formación del vaso. El número de vasos se redujo notablemente indicando la reducción significativa de los vasos sanguíneos en crecimiento con una confianza del 99 %. Debe observarse que el tratamiento posterior fue tan eficaz como un tratamiento que sugiere que es similar a la terapia anti-VEGF y al taxol, EBIN puede causar la regresión del vaso. Aunque, EBIN no indujo la muerte de las células endoteliales o la detención del ciclo celular (los datos no se muestran).

Ejemplo 8

EBIN inhibió el crecimiento de células tumorales

Se investigó el efecto de la EBIN sobre la tasa de crecimiento de células cancerosas de mama de humano triple negativo (receptor de estrógeno [ER], receptor de progesterona [PR] y factor de crecimiento epidérmico humano receptor-2 [HER-2] no se expresan en esta línea celular) utilizando un modelo de xenoinjerto. A los ratones desnudos (n = 8 ratones por grupo) se les inyectó 3×10^6 células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 en la almohadilla adiposa mamaria superior izquierda. Todos los ratones desarrollaron el tumor en el día 13. En ese momento, los ratones fueron asignados al azar y divididos por 5 grupos y cada grupo recibió el tratamiento. El estudio se terminó en el día 24 cuando el tumor alcanzó un tamaño de 2000 mm³. El tratamiento con péptido de control y EBIN se realizó diariamente durante 7 días. EBIN y el péptido de control se administraron mediante inyección en la vena de la cola. El péptido de control se inyectó a 5 µM/kg de peso corporal. EBIN se inyectó a 1 µM/kg y 5 µM/kg de peso corporal.

El tratamiento con taxol se realizó por inyección intraperitoneal a 10 µM/kg de peso corporal durante 4 días. El tamaño del tumor se midió 3 veces por semana. Como se muestra en la Fig. 8A, se observó un retraso significativo en el crecimiento tumoral en el grupo taxol y se observó reducción en el tamaño del tumor en el grupo tratado con EBIN después de 4 tratamientos. Este efecto fue bastante transitorio, aunque, el tamaño de los tumores en el grupo tratado con EBIN fue significativamente menor en comparación con el grupo control sin tratar. Los ratones tratados con 1 µM/kg de EBIN desarrollaron el tumor a la misma velocidad que los ratones no tratados, lo que sugiere que la dosis baja no era efectiva.

Para correlacionar el efecto del tratamiento con EBIN con neovascularización tumoral, se recogió tejido tumoral, se fijó y se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E). Se anotó el número de células fuera de la masa tumoral y se normalizó por área. De acuerdo con la curva de crecimiento tumoral, el número de vasos fuera del tumor se redujo significativamente solo en taxol y los grupos tratados con EBIN (5 µM/kg). EBIN mostró un efecto superior en comparación con taxol (véase la Fig. 8B). Todos los demás grupos no mostraron diferencias en comparación con el grupo sin tratar. Estos datos sugieren que EBIN demuestra propiedades antiangiogénicas y puede utilizarse para el tratamiento de la angiogénesis patológica. Solo el tratamiento con taxol y EBIN a una dosis de 5 µM/kg de peso corporal redujo significativamente el número de vasos fuera del tumor.

Ejemplo 9

Determinar la eficacia de EBIN para tratar modelos *in vivo* de neovascularización coroidea (NVC) inducida por láser

La DMRE neovascular se caracteriza por el crecimiento de los vasos sanguíneos de la coroides, que penetran a través de la membrana de Bruch en el área subretiniana. El modelo de ratón de la neovascularización coroidea inducida (NVC) por láser es un modelo bien establecido de la forma exudativa de DMRE. La interrupción de la membrana de Bruch por un rayo láser promueve el crecimiento de nuevos vasos coroides en la retina, imitando por tanto las condiciones patológicas de la DMRE (Figura 9). Este modelo se ha utilizado con éxito en la predicción de la eficacia clínica de la terapia con VEGF para la DMRE neovascular.

Para evaluar las actividades protectoras de barrera y antiangiogénicas de EBIN, EBIN se ensaya en modelos murinos de NVC. Además del tratamiento con EBIN, se utilizaron el anticuerpo LEAF™ (un anticuerpo monoclonal de rata contra VEGF-A de ratón) y el péptido de control (Myr-FAEIPIT), como controles experimentales positivos y negativos, respetuosamente.

Se adquirieron ratones C57/BL6 (de 6-8 semanas de edad) de Charles River Laboratory y se utilizaron de acuerdo con un protocolo aprobado. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilazina (100 mg/5 mg/kg IP) y sus pupilas se dilataron con una aplicación tópica de ciclodríl (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX). El fondo fue visto con una cámara de imagen, y la fotocoagulación por láser fue inducida utilizando el sistema de láser guiado por imagen (Micron IV, Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA). Cuatro quemaduras por láser a igual distancia del nervio óptico fueron inducidas una por una en el ojo derecho por un pulso de láser de argón verde con una longitud de onda de 532 nm, un diámetro fijo de 50 µm, duración de 70 ms y niveles de potencia de 210-250 mW. La aparición de una burbuja o una pequeña hemorragia subretiniana (diámetro <1 mm) en la mancha del láser sirve para indicar la ruptura de la membrana de Bruch y como confirmación de la NCV inducida por láser. Este procedimiento se realizó solo en el ojo derecho de cada ratón. El esquema del protocolo de fotocoagulación y tratamiento inducido por láser se muestra en la Figura 10. El tratamiento con péptidos de control y EBIN (1 µg/ojo) y un anticuerpo contra VEGF-A de ratón (2 µg/ojo; LEAF™; endotoxina baja, libre de azida) se administraron una vez al ojo derecho mediante inyección intravítrea

(2 µl) después de la fotocoagulación por láser. Los ojos se enjuagaron suavemente con solución salina estéril para eliminar las gotas oculares lubricantes y se trataron con una pomada de antibiótico, eritromicina (Fougera, Melville, NY). Los ratones se colocaron entonces en una placa de calentamiento precalentada a 35 °C después del tratamiento con láser hasta que se despertaron. La eficacia antiangiogénica de EBIN se evaluó mediante tomografía de coherencia ocular (TCO) a los días 8 y 15, se realizó un angiograma solo en el día 15 (Figura 10). La angiografía con fluoresceína y la TCO se realizan para la obtención de imágenes de la vasculatura retiniana, similar al procedimiento clínicamente utilizado habitualmente para los pacientes. Esto se realiza mediante inyección intravenosa de 10 µl de colorante fluorescente al 0,2 % a través de una vena de la cola de los ratones. Un tamaño de muestra de 10 ratones por grupo de tratamiento proporciona potencia suficiente para detectar una diferencia hipotética del 10 % en la fuga vascular (área de lesión) basándose en los parámetros determinados en Gong *et al.*, PLoS One 2015, 10(7): e 0132643.

La Tabla 4 enumera los diez grupos de tratamiento (n = 10 ratones con NVC por grupo de tratamiento, 30 ratones en total), régimen farmacológico y objetivos finales previstos para medir la respuesta al tratamiento. Los ratones del grupo 1 recibieron el péptido Myr-control, los ratones del grupo 2 se trataron con Myr-EBIN y los ratones del grupo 3 se trataron con el anticuerpo LEAF™ como control positivo. Todos los tratamientos se administran como una sola inyección en el momento de la NVC por vía intravítrea como se indica en la Figura 10.

Tabla 4: Grupos de tratamiento, régimen farmacológico y objetivos finales previstos para medir la respuesta al tratamiento de NVC en ratones.

Grupo	N	Fármaco	Régimen	Ensayos de objetivo final
1	10	péptido Myr-control (1 µg/ojo)	inyección intravítrea de 1 µg/ojo en 1ul; en el día 1 (en el momento de la NVC)	1. Angiografía con fluoresceína en el día 15 y TCO en los días 8 y 15 2. Recogida de ojo para examen histopatológico en el día 15
2	10	Myr-EBIN intravítrea (1 µg/ojo)	inyección intravítrea de 1 µg/ojo en 1ul; en el día 1 (en el momento de la NVC)	
3	10	anticuerpo LEAF™	inyección intravítrea de 2 µg/ojo en 1ul (equivalente a 2,5 mg dosis en humano); en el día 1 (en el momento de la NVC)	
Total	30			

Las Figuras 11a y 11b muestran imágenes de angiografía con fluoresceína de fondo (a) y tomografía de coherencia óptica correspondiente (b) al día 15 después de la fotocoagulación por láser (los números indican lesiones de NVC correspondientes) para ratones con NVC tratados con EBIN, con anticuerpo anti-VEGF o tratados con péptido de control. EBIN redujo las lesiones de NVC similares al tratamiento anti-VEGF y por ende, proporciona una potente alternativa al tratamiento actual de la enfermedad ocular como la degeneración macular. Los experimentos se terminaron en el día 15, momento en el cual, los animales se sacrificaron con ketamina/xilazina (100 mg/5 mg/kg IP) seguido de dislocación cervical y se recogió tejido ocular para tinción inmunofluorescente y análisis patológico. Para la tinción con lectina marcada con Alexa594 de *Bandeiraea simplicifolia* (B4) para el análisis post-mortem del área de la NVC se utilizaron las preparaciones de retina/coroides/esclerótica de montaje plano (Figura 11c).

Los análisis de datos se realizaron utilizando criterios de exclusión establecidos en estudios previos (Gong *et al.*, PLoS One 2015, 10(7): e 0132643). Se excluyeron casos de hemorragias graves, tales como quemaduras por láser excesivas que dañan no solo la membrana de Bruch, sino también el epitelio pigmentario corioideo y retiniano, lesiones fundidas, lesión que es más de 5 veces mayor que la media de las lesiones en las mismas condiciones experimentales. El área de fuga vascular y NVC se cuantificaron utilizando imágenes de angiografía con fluoresceína e imágenes confocales de tinción de NVC para lectina B4 utilizando el software MetaMorph. Los datos se representaron utilizando el software Sigma Plot (Figura 11d y 11e) y se analizaron mediante ANOVA unidireccional utilizando Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA).

Estudios adicionales

El tratamiento de ratones con EBIN redujo significativamente la fuga vascular y las lesiones de NVC en comparación con los ratones tratados con péptido de control (Figura 11). El efecto de EBIN fue similar al tratamiento con LEAF™, lo que sugiere que EBIN podría proporcionar una alternativa rentable y eficiente al tratamiento anti-VEGF actualmente disponible de DMRE tal como bevacizumab y aflibercept.

Como alternativa, EBIN se administra a través de una vía de gota para los ojos. En este caso, el tratamiento comienza un día antes de la fotocoagulación por láser y los ratones se tratan dos veces al día hasta 15 días después de la fotocoagulación por láser. La duración del tratamiento y la observación es de 15 días. Además, EBIN se administra en combinación con el anticuerpo LEAF™ mediante inyección intravítrea y/o mediante una vía de gota para los ojos. En todos los casos, el anticuerpo LEAF™ se administra mediante inyección intravítrea. Como se ha descrito previamente, la eficacia antiangiogénica EBIN se evalúa mediante angiografía con fluoresceína y tomografía de coherencia ocular (TCO) a los 8 y 15 días después de la NVC inducida por láser. Además, el tejido del ojo se cosecha en el día 15.

La Tabla 5 enumera los diez grupos de tratamiento (n = 10 ratones con NVC por grupo de tratamiento, 100 ratones en total), régimen farmacológico y ensayos de objetivos finales previstos para medir la respuesta al tratamiento para futuros estudios. Los ratones del grupo 1 se tratan con el anticuerpo LEAF™ como un control positivo y los ratones del grupo 2 reciben IgG2a de rata purificada LEAF™, isotipo κ Ctrl, como un control para el grupo 1. Los grupos 3 y 4 se tratan con un receptor señuelo para VEGF de ratón (control positivo 2) o péptido Myr-control negativo, respectivamente. Todos los anticuerpos LEAF™, el receptor señuelo y el péptido de control se administran como una sola inyección en el momento de la NVC por vía intravítrea. Los grupos 5 y 6 reciben Myr-EBIN por vía intravítrea, 0,1 µg/ojo o 1 µg/ojo, respectivamente. Los grupos 7 y 8 reciben Myr-EBIN a través de gotas para los ojos, 0,5 µg/ojo o 5 µg/ojo, dos veces al día, respectivamente. Los ratones del grupo 9 se tratan con Myr-EBIN (0,1 µg/ojo) en combinación con el anticuerpo LEAF™, ambos administrados por vía intravítrea. El grupo 10 se trata con Myr-EBIN a través de gotas para los ojos (0,5 µg/ojo) en combinación con el anticuerpo LEAF™ por vía intravítrea.

Tabla 5: Grupos de tratamiento futuros, régimen farmacológico y objetivos finales previstos para medir la respuesta al tratamiento de NVC en ratones.

Tratamiento de NVC en ratones.				
Grupo	N	Fármaco	Régimen	Ensayos de objetivo final
1	10	anticuerpo LEAF™	inyección intravítrea de 2 µg/ojo en 1 ul (equivalente a 2,5 mg dosis en humano); en el día 1 (en el momento de la NVC)	1. Angiografía con fluoresceína en el día 15 y TCO en los días 8 y 15
2	10	IgG2a de rata purificada LEAF™, isotipo κ Ctrl	inyección intravítrea de 2 µg/ojo en 1 ul (equivalente a 2,5 mg dosis en humano); en el día 1 (en el momento de la NVC)	2. Recogida de ojo para examen histopatológico en el día 15
3	10	Receptor señuelo para VEGF de ratón	inyección intravítrea de 2 µg/ojo en 1 ul en el día 1(en el momento de la NVC)	
4	10	péptido Myr-control (1 µg/ojo)	inyección intravítrea de 1 µg/ojo en 1 ul; en el día 1 (en el momento de la NVC)	
5	10	Myr-EBIN intravítreo (0,1 µg/ojo)	inyección intravítrea de 0,1 µg/ojo en 1 ul; en el día 1 (en el momento de la NVC)	
6	10	Myr-EBIN intravítreo (1 µg/ojo)	inyección intravítrea de 1 µg/ojo en 1 ul; en el día 1 (en el momento de la NVC)	
7	10	Myr-EBIN a través de gotas para los ojos (0,5 µg /ojo)	Gotas para los ojos, 0,5 µg/ojo; dos veces al día	
8	10	Myr-EBIN a través de gotas para los ojos (5 µg /ojo)	Gotas para los ojos, 5 µg/ojo; dos veces al día	
9	10	Myr-EBIN intravítreo (0,1 µg/ojo) + anticuerpo LEAF™ intravítreo	Grupo n.º 1 en combinación con el grupo n.º 5	
10	10	Myr-EBIN a través de gotas para los ojos (0,5 µg/ojo) + anticuerpo LEAF™ intravítreo	Grupo n.º 1 en combinación con el grupo n.º 7	
Total	100			

Ejemplo 10

Pruebas de toxicidad aguda de EBIN *in vivo*

Se diseña un estudio a corto plazo para evaluar la seguridad de la administración *in vivo*. Los ratones C57BL/6 (n = 10, 5 ratones por grupo/vía de tratamiento) se asignan al azar y se dividen en dos grupos. El primer grupo es tratado con EBIN en el ojo derecho a través de gotas para los ojos administradas dos veces al día, 5 µg por ojo (10 µl) y, el segundo grupo es tratado con inyección intravítrea de EBIN en el ojo derecho a la dosis máxima, 1 µg por ojo (2 µl) en el primer día. La inyección intravítrea se realiza bajo anestesia de ketamina/xilazina (100 mg/5 mg/kg). Ambos grupos se monitorean diariamente para su salud general, incluyendo el peso corporal, así como cualquier anomalía ocular incluyendo opacidad, exoftalmia, enoftalmia, conjuntivitis, secreciones anormales o costras y úlceras corneales durante un período de 8 días. Los animales se someten posteriormente a angiografía con fluoresceína y formación de imágenes por TCO. No se observó toxicidad después del tratamiento con EBIN, con o sin inducción de NVC (Figura 12).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LOS FIDUCIARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENNSILVANIA

<120> PÉPTIDOS PARA INHIBIR LA ANGIOGÉNESIS

<130> 30303/49324A PC

5

<150> US 62/126.968

<151> 02-03-2015

<160> 21

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 14

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20

<400> 1

Lys Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
1 5 10

25

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Lys Phe Ala Arg Leu Trp Ala Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
1 5 10

35

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45

<400> 3

Phe Thr Glu Ile Pro Thr Ile
1 5

50

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> Péptido sintético

<400> 4

Phe Ala Glu Ile Pro Thr Ile
1 5

60

<210> 5

ES 2 820 710 T3

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

5

<220>
 <223> Secuencia de motivo de consenso

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Ser o Thr

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 5

20

Xaa Xaa Ile Pro
 1

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Péptido sintético

30

<400> 6

Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
 1 5 10

35

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 7

Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
 1 5 10

45

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 8

55

Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
 1 5 10

60

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

ES 2 820 710 T3

	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 9	
5		Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
		1 5
	<210> 10	
	<211> 8	
10	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
15	<400> 10	
		Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
		1 5
20	<210> 11	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 11	
		Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile
30		1 5
	<210> 12	
	<211> 6	
	<212> PRT	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
40	<400> 12	
		Thr Glu Ile Pro Thr Ala
		1 5
45	<210> 13	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Péptido sintético	
	<400> 13	
		Thr Glu Ile Pro Thr
		1 5
55	<210> 14	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	

ES 2 820 710 T3

<223> Péptido sintético

<400> 14

5 Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

15 <400> 15

Thr Glu Ile Pro
1

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Péptido sintético

<400> 16

Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ile
1 5

30 <210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 17

40 Phe Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ile
1 5

<210> 18
<211> 7
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

50 <400> 18

Phe Thr Lys Ile Pro Thr Ile
1 5

55 <210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Péptido sintético

ES 2 820 710 T3

<400> 19

Lys Phe Ala Arg Thr Lys Ile Pro Thr Ala Ile Thr
1 5 10

5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 20

15

Phe Ala Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido sintético

25

<400> 21

Lys Phe Ala Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un paciente que lo necesita, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), en donde el péptido o un fragmento del mismo, reduce la interacción entre la proteína de unión al extremo 3 (EB3) y el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3 (IP₃R₃), en donde el paciente padece deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.
2. Un péptido aislado para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la permeabilidad vascular inducida por VEGF, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) en donde el péptido, o un fragmento del mismo, reduce la interacción entre la proteína de unión al extremo 3 (EB3) y el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3 (IP₃R₃), en donde el trastorno es un deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.
3. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido se enlaza a un péptido portador.
4. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el péptido portador es el péptido antenapedia (AP), péptido penetratina, TAT, transportano o poliarginina.
5. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido se conjuga con un ácido graso.
6. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el péptido está miristoilado.
7. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el péptido aislado o un fragmento del mismo se administran en combinación con uno o más inhibidores de VEGF.
8. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el péptido aislado o un fragmento del mismo se administran en combinación con tratamiento con láser de una enfermedad ocular.
9. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el péptido aislado o un fragmento del mismo se administran en combinación con un esteroide.
10. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el péptido aislado, el inhibidor de VEGF o el esteroide se administran por inyección intravítrea o por vía tópica.
11. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de la angiogénesis, en donde el paciente padece un deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.
12. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un trastorno asociado a la permeabilidad vascular inducida por VEGF, en donde el trastorno es un deterioro visual o pérdida de la visión (ceguera), degeneración macular, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de rama venosa retiniana de retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad neovascular (DMRE), retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidea, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa, rubeosis iridis, glaucoma neovascular, retinoblastoma, uveítis y neovascularización del injerto corneal.

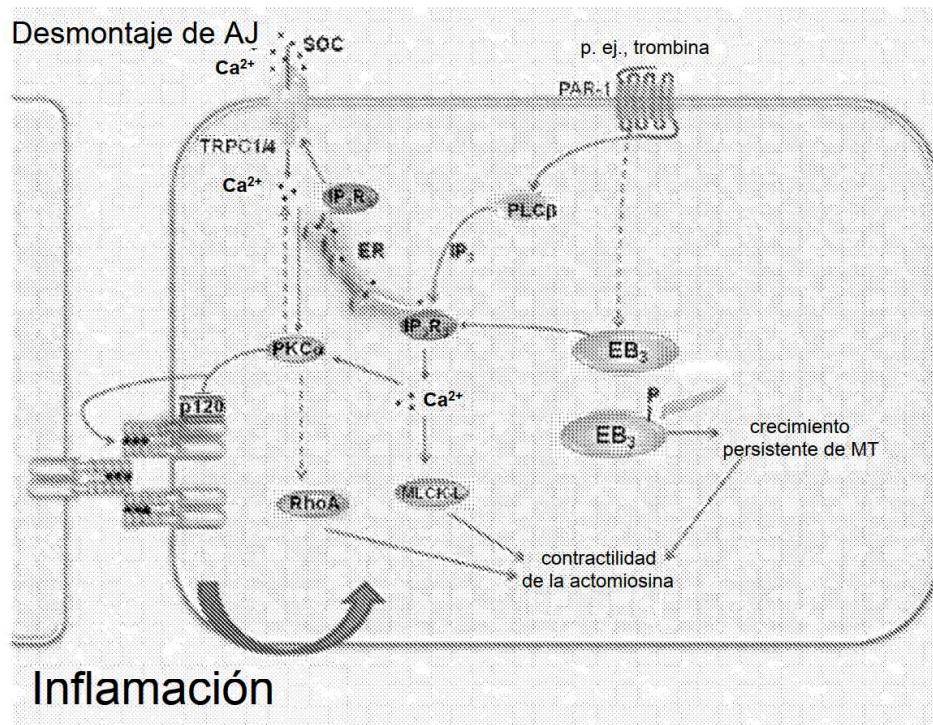


FIGURA 1

isoforma 1 de IP ₃ R ₁	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
isoforma 2 de IP ₃ R ₁	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP ₃ R ₂	VVPVRYARLWTEIPTKITIHE
IP ₃ R ₃	VTPVKFARLWTEIPTAITIKD
unión a EB	-----S/TxIP-----
SEQ ID NO: 1 péptido de IP ₃ R ₁	KFARLWTEIPTAIT

FIGURA 2

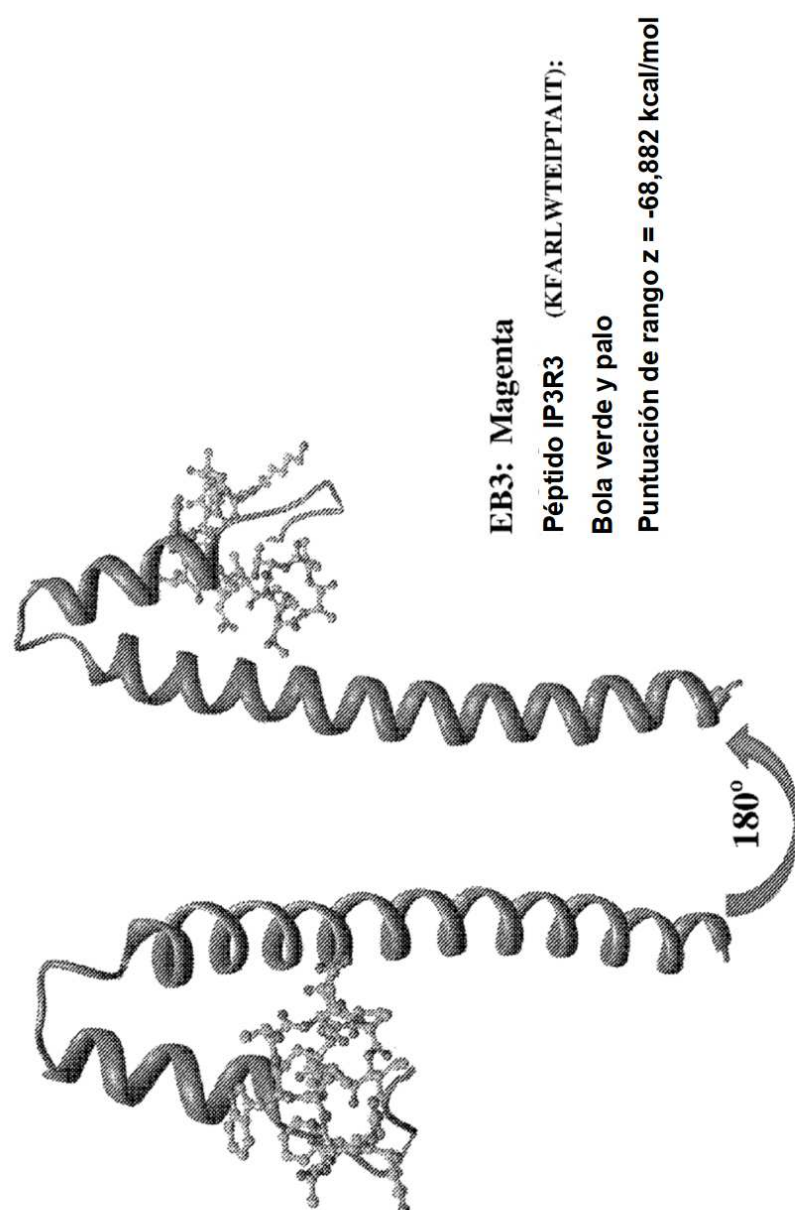


FIGURA 3

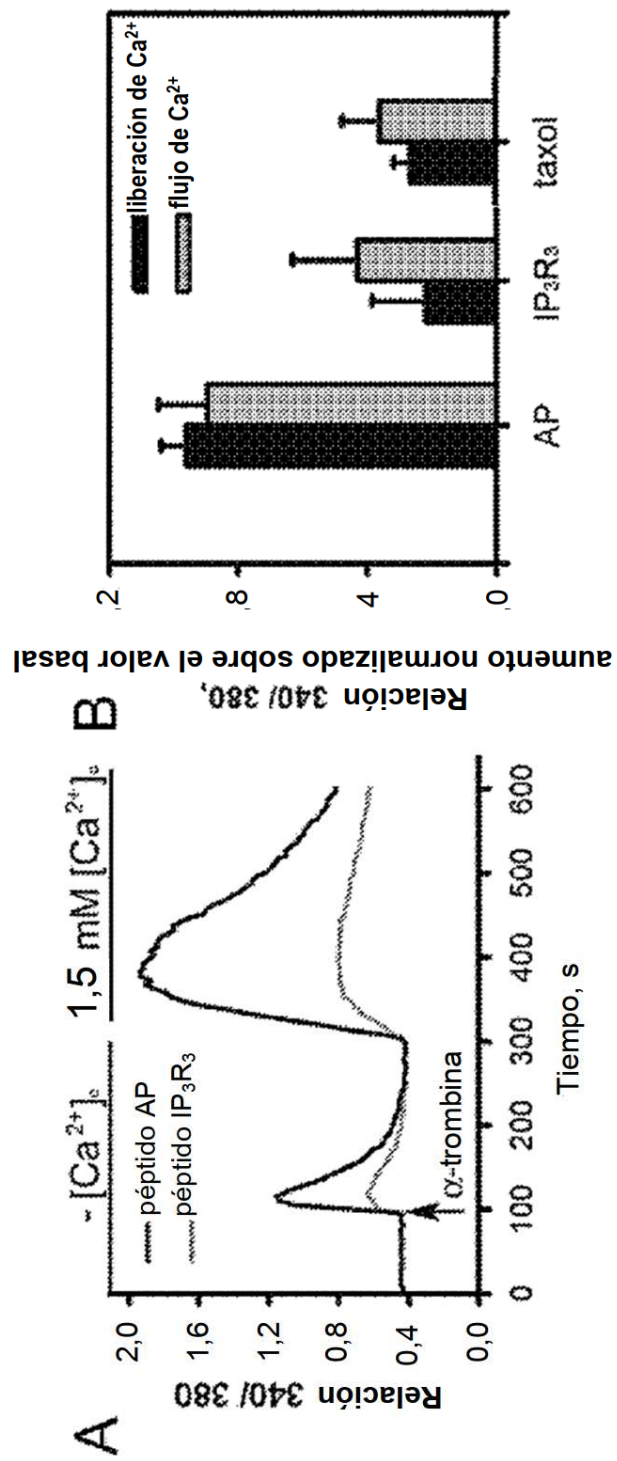


FIGURA 4

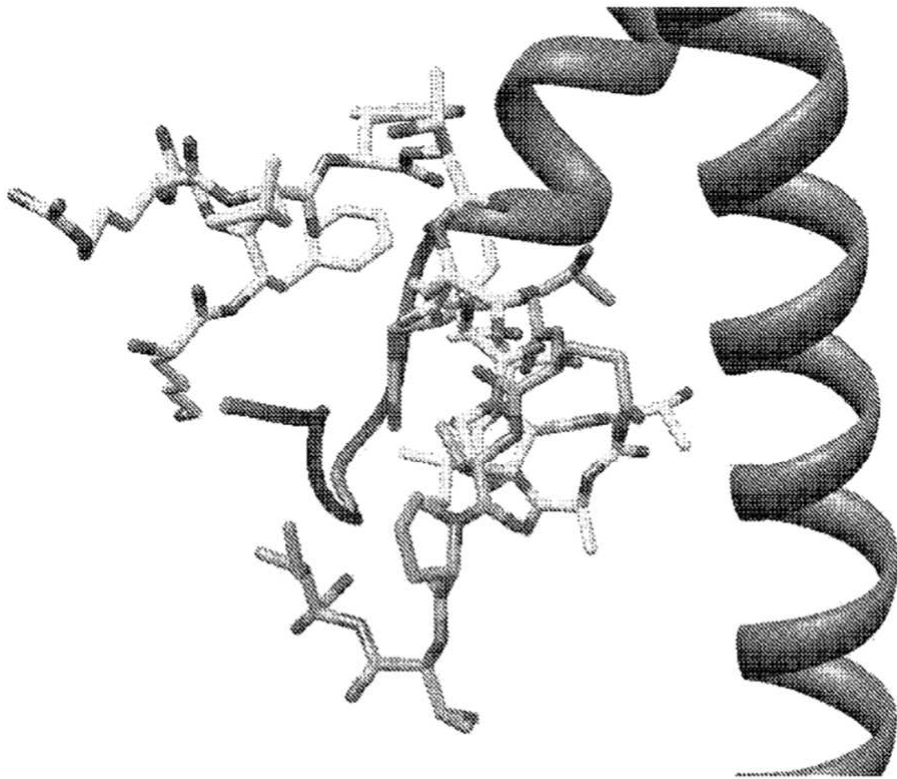


FIGURA 5



FIGURA 6

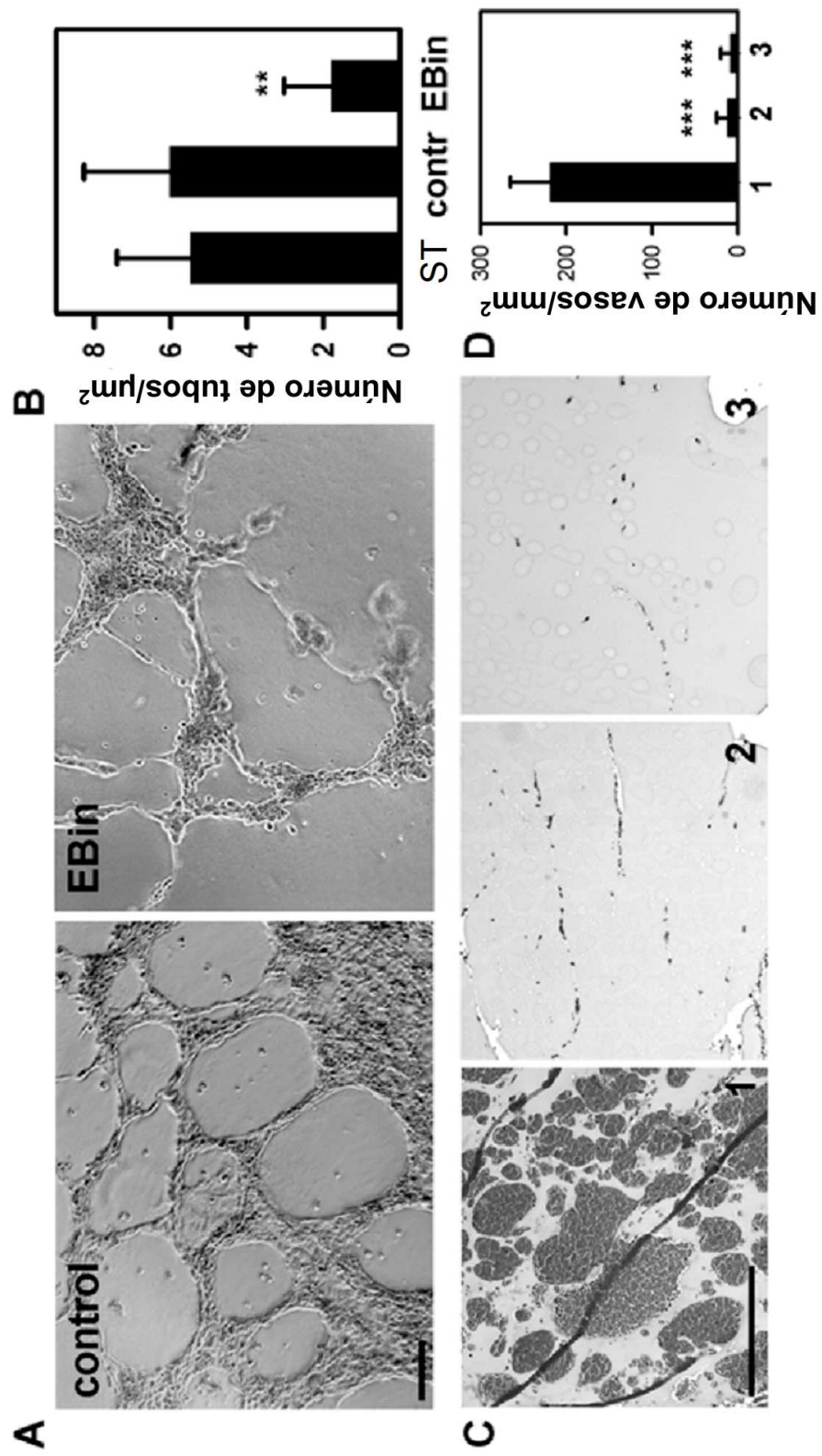


FIGURA 7

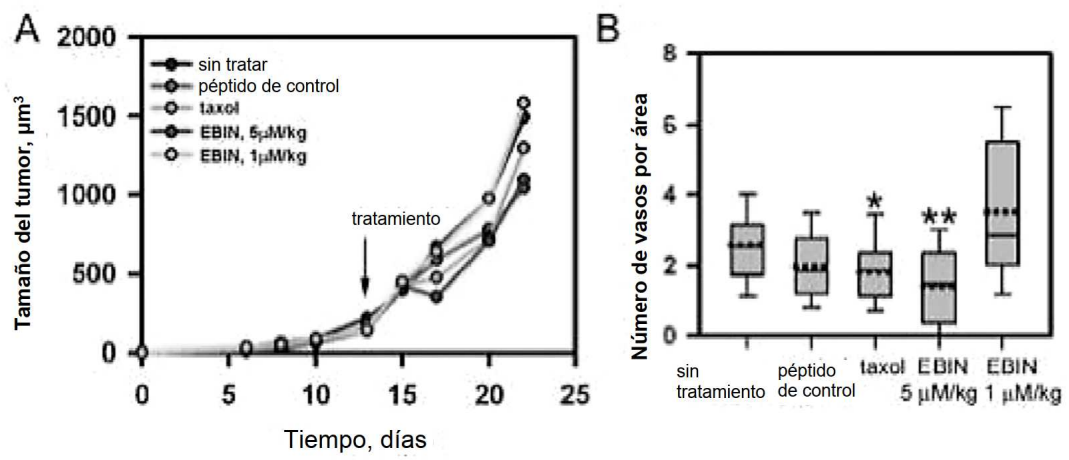


FIGURA 8

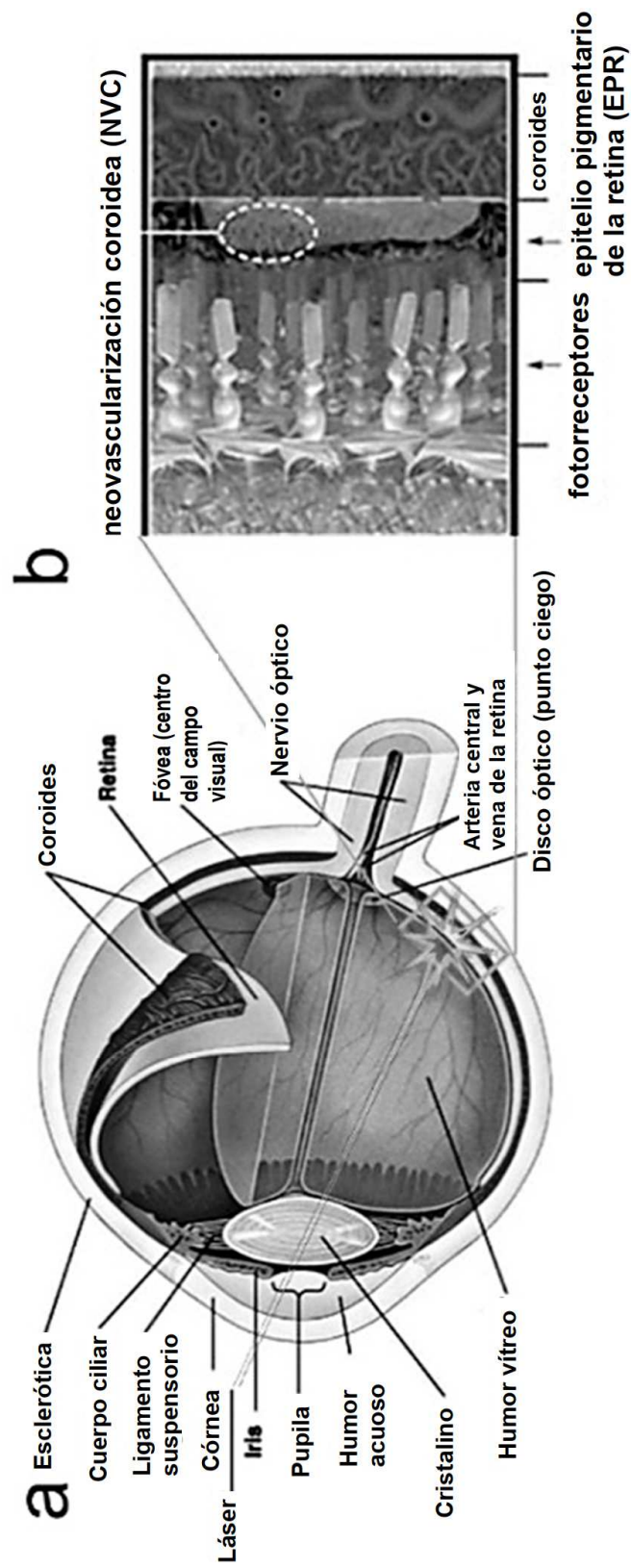


FIGURA 9

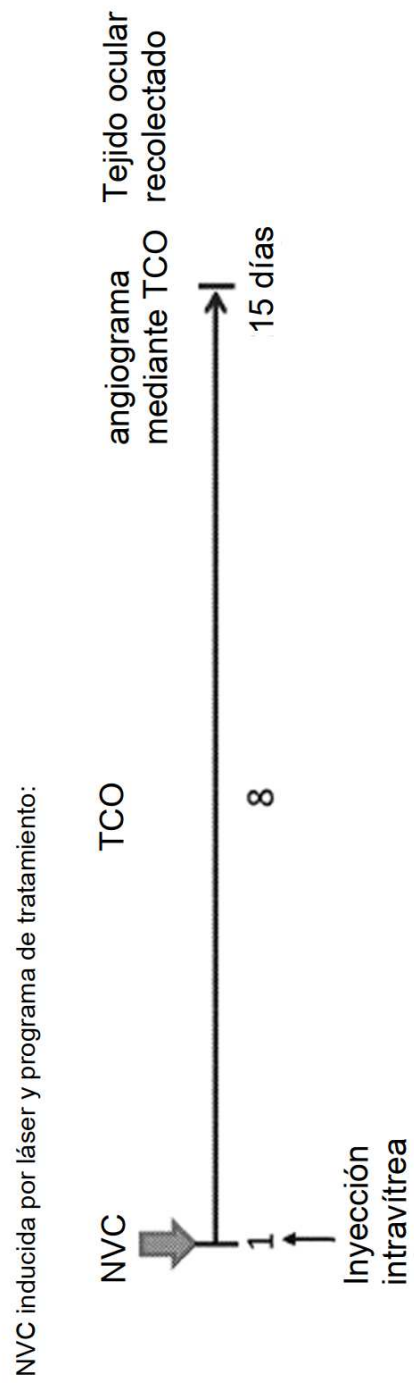


FIGURA 10

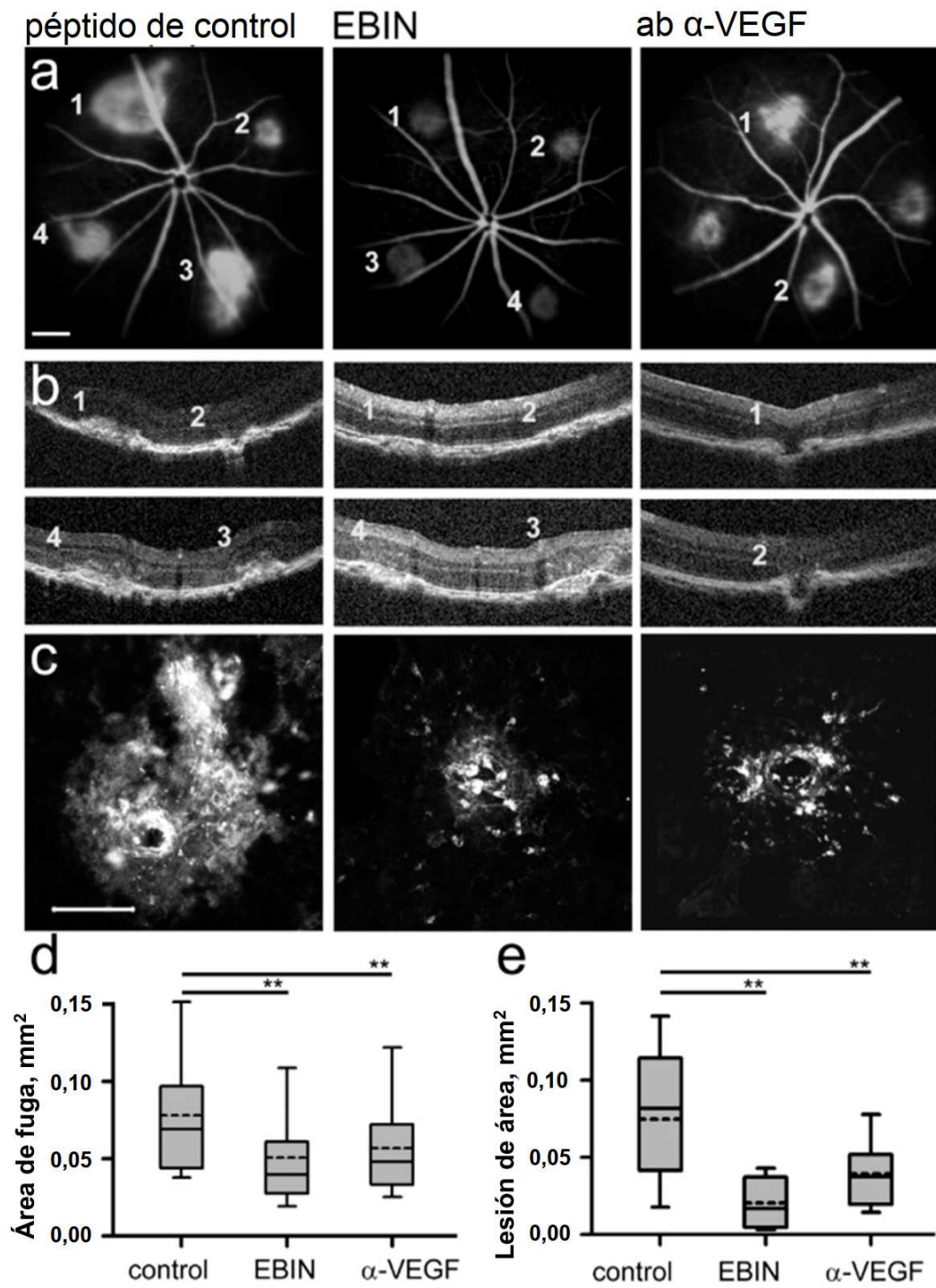


FIGURA 11

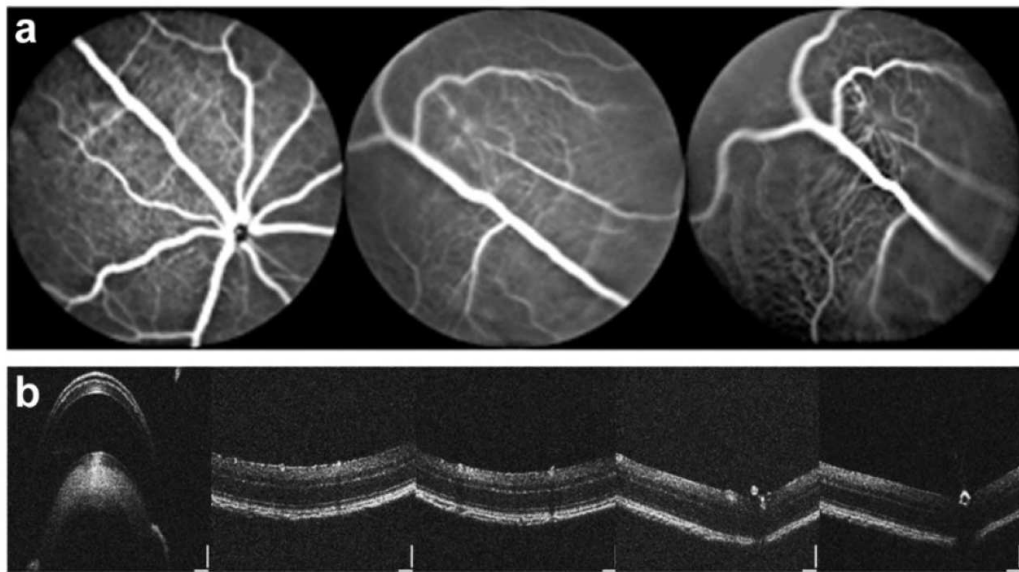


FIGURA 12