



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 288 640**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03813706 .3**
(86) Fecha de presentación : **27.02.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1578438**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

(54) Título: **Análogos peptídicos sintéticos para el tratamiento del cáncer.**

(30) Prioridad: **23.12.2002 US 329321**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2008

(73) Titular/es: **Dabur Research Foundation**
22, Site IV Sahibabad
Ghaziabad, Uttar Pradesh 201 010, IN

(72) Inventor/es: **Mukherjee, Rama;**
Burman, Anand, C.;
Singh, Anu, T.;
Jaggi, Manu;
Prasad, Sudhanand y
Dutt, Sarjana

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Análogos peptídicos sintéticos para el tratamiento del cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una combinación de péptidos que puede usarse en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. La combinación de péptidos compite por la unión de neuropéptidos específicos en la membrana plasmática y así altera los niveles de moléculas intracelulares clave implicadas en la proliferación celular, dando como resultado un amplio espectro de actividad anticancerígena. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen una combinación de tales análogos peptídicos.

Antecedentes de la invención

Los neuropéptidos funcionan periféricamente como factores paracrinós y endocrinos para regular diversos procesos fisiológicos y actúan como neurotransmisores y neuromoduladores. En una gran mayoría de casos, los receptores que median la señalización por neuropéptidos son miembros de la superfamilia de los siete receptores transmembrana acoplados a proteínas G (Burbach y Meijer, Eur J Pharmacol, 227, 1-18, 1992). Se ha documentado que los neuropéptidos desempeñan papeles importantes como factores de crecimiento autocrinos / paracrinós para cánceres humanos (Rozengurt E, 1996, En Neuropeptides growth factors: Signaling pathways and role in cancer. En: Pusttai, L.L. *et al* (editores), Cell proliferation in cancer: Regulatory mechanisms of Neoplastic cell growth, Oxford, Oxford University press, páginas 247- 259, 1996). La interrupción de la señalización por neuropéptidos autocrina y paracrina con antagonistas específicos o antagonistas derivados de amplio espectro ofrece nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Lynn E.H, Oncogene research, Vol. 20, 1563- 1569, 2001).

Se ha mostrado previamente en la patente estadounidense 6.156.725, la patente europea 0835662 y la patente australiana 707.158; (Mukherjee *et al.*) que se secretan el péptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina, sustancia P y bombesina por algunas células tumorales humanas y que hay sitios de unión de alta afinidad específicos para estos péptidos en estas células. También se mostró que los cuatro péptidos se unen a células tumorales. Se mostró que los antagonistas / análogos de estos péptidos tienen actividad antiproliferativa sobre ciertas células cancerígenas, más específicamente adenocarcinomas. También se mostró que una combinación de los antagonistas / análogos peptídicos provocaba regresión del tumor en un modelo de xenoinjerto de ratón desnudo. Se planteó la hipótesis de que existe un mecanismo autocrino para la proliferación celular en el que los péptidos se secretan por células tumorales y transducen señales celulares a través de receptores de superficie celular específicos, lo que conduce a la proliferación celular. Entonces, los análogos / antagonistas de estos péptidos pueden anular / bloquear estas señales celulares relacionadas con la proliferación. Además, también se ha descrito previamente el potencial antiangiogénico de los antagonistas/análogos (Mukherjee *et al*; solicitud estadounidense 09/248.381 y solicitud PCT WO 00/047221).

Se describieron anteriormente en la patente estadounidense (6.316.414; Burman *et al*) péptidos novedosos que son agonistas de la somatostatina y su uso para el tratamiento del cáncer. Esta invención se refiere particularmente al diseño y síntesis de análogos novedosos de somatostatina que incorporan aminoácidos alfa,alfa-dialquilados de una manera específica del sitio. También se han descrito los métodos para la generación de estos péptidos, composiciones que contienen los péptidos y las aplicaciones farmacológicas de estos péptidos, especialmente en el tratamiento y la prevención del cáncer.

También se describieron en las solicitudes de patentes estadounidenses (09/630.333, 09/630.345 y 09/629.642, Burman *et al*) análogos antiproliferativos novedosos de VIP, bombesina y sustancia P que son útiles en el tratamiento del cáncer. Estos análogos incorporan aminoácidos α,α -dialquilados y muestran actividad antiproliferativa en varias líneas de células tumorales humanas. Además, provocaron una regresión parcial del tumor en xenoinjertos de ratones desnudos cuando se administraron en una dosis de aproximadamente 1-25 microlitros/ratón. Por tanto, cuando se usan individualmente, estos péptidos muestran niveles moderados de citotoxicidad.

Los neuropéptidos y sus análogos se unen a receptores transmembrana de alta afinidad específicos en células diana para iniciar una cascada de acontecimientos de señalización citoplasmáticos. Esto incluye el reclutamiento de varias proteínas efectoras / adaptadoras que inician una cascada de interacciones proteína-proteína. La unión de neuropéptidos a sus receptores provoca la modulación de varios sistemas efectores celulares tales como adenilil ciclasa que provoca la alteración en los niveles de moléculas de segundos mensajeros (Pimentel, En Growth factors and neoplasia, En Handbook of Growth factors, CRC Press, EE.UU., Vol. 1, 329-337, 1994). La unión de un ligando peptídico a su receptor también provoca la activación de proteína cinasas / fosfatasas intracelulares que son reguladores negativos / positivos críticos en las rutas de señalización intracelulares que dan como resultado respuestas celulares específicas del factor de crecimiento tales como mitosis, diferenciación, transformación o muerte. Varios elementos de esta cascada se han visto implicados directa / indirectamente en la transformación maligna y la tumorigénesis de adenocarcinoma. El papel de los neuropéptidos en el cáncer y la angiogénesis asociada con el cáncer se ha revisado ampliamente con anterioridad. (Anticancer Res sep.-oct. de 2000; 20 (5A): 3123-9); (Danesi R, Del Tacca M, Metabolism agosto de 1996; 45 (8 Supl. 1): 49-50); (Woltering EA *et al*, J Surg Res marzo de 1991; 50 (3): 245-251).

Los adenocarcinomas expresan y segregan múltiples factores de crecimiento, a saber, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante (TGF) alfa. La unión de los factores de crecimiento a sus respectivos receptores activa una cascada de rutas intracelulares, especí-

ficamente acontecimientos de fosforilación mediados por proteínas cinasas y fosfatasa, que modulan la actividad de una variedad de factores de transcripción celulares. Las aberraciones en estos acontecimientos inducidos por señales se asocian con el desarrollo del cáncer y/o la progresión del cáncer.

La señalización celular mediada por receptores acoplados a proteínas G, tal como los de péptidos reguladores, se transduce mediante el sistema de AMPc-adenilil ciclase. La respuesta mitogénica de las células a los factores de crecimiento y los péptidos reguladores se ve influida por las concentraciones intracelulares de AMPc, que a su vez activa las proteínas cinasas (PKA) dependientes de AMPc, AMPc colabora con una variedad de hormonas y factores de crecimiento para estimular de manera sinérgica la proliferación de diferentes tipos de células eucariotas.

Las tirosina cinasas receptoras (RTK) se transactivan mediante receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) se fosforilan en las tirosinas tras la activación por GPCR. Los factores de crecimiento fosforilados reclutan a su vez múltiples proteínas auxiliares para activar las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Los adenocarcinomas humanos tienen una actividad de MAPK constitutiva aumentada (Ostrowski *et al*, Br. J Cancer Vol. 78, 1301-1306, 1997), y el bloqueo de esta proteína cinasa suprime el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Sebolt - Leopold *et al*, Nature Medicine, Vol. 5, 810-816, 1999). La ruta de la MAP cinasa es un punto de convergencia crucial para muchas redes de señalización citoplasmáticas. Las MAP cinasas forman una familia de Ser/Thr cinasas, que puede activarse mediante factores de crecimiento celulares. La MAP cinasa se encuentra aguas abajo de la ruta oncogénica Ras-Raf y su activación conduce a la fosforilación de factores de transcripción nucleares, lo que da como resultado la proliferación celular (Ostrowski *et al*, Br. J Cancer Vol. 78, 1301- 1306, 1997).

Las tirosina fosfatasa asociadas a la membrana desfosforilan dianas específicas, oponiéndose así de manera funcional a la acción de las tirosina cinasas. La inhibición de la tirosina fosfatasa induce reversiblemente la transformación de células en cultivo de una manera dependiente de la dosis *in vitro*. La inducción de tirosina fosfatasa en células cancerígenas conduce a la diferenciación celular e inversión del fenotipo transformado.

La proteína supresora de tumores p53 desempeña un papel clave en el control de la señalización apoptótica y del ciclo celular normal. Se producen mutaciones en el gen p53 en aproximadamente la mitad de todos los cánceres de una amplia variedad de tumores humanos y se asocian con un mal pronóstico y tratamiento (Kirch & Kastan, J. Clin Oncology, Vol. 16, 3158 - 3168, 1998). La sobreexpresión de p53 de tipo natural en las células induce la detención del crecimiento en el ciclo celular, lo que da como resultado la apoptosis en casos específicos.

Bcl-2 es el primer miembro de una familia de proteínas que se ha mostrado que evitan la muerte que o bien es dependiente de p53 o bien es independiente de p53 (Peled *et al*, Cancer research, 56, 2148 - 2156, 1 de mayo de 1996). La sobreproducción de la proteína bcl-2 también evita la muerte celular inducida por casi todos los agentes anticancerígenos citotóxicos contribuyendo con frecuencia a fracasos del tratamiento en pacientes con varios tipos de cánceres (Reed *et al*, J. Cell Biochem, Vol. 60, 23-32, 1996). La fragmentación apoptótica del ADN está provocada por la activación secuencial de la familia de caspasas.

Sumario de la invención

En la presente solicitud, se ha usado una combinación de análogos peptídicos, que comparada con péptidos individuales, provoca una citotoxicidad significativamente superior frente a las células tumorales. Esto condujo a la investigación de las moléculas de señalización intracelular claves que se alteraban por la combinación de péptidos.

Los análogos peptídicos en la combinación compiten con los receptores por los péptidos nativos en la membrana plasmática, de este modo regulando por disminución de manera sinérgica las señales intracelulares que convergen en moléculas específicas estimuladas por estos péptidos pro-proliferativos, dando como resultado la inhibición de la proliferación de células tumorales o cancerígenas. Se investigaron los efectos de las combinaciones de péptidos para determinar su modulación de moléculas intracelulares específicas en células de adenocarcinoma. La proliferación dependiente del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de las células cancerígenas, los niveles de AMPc intracelular, la actividad de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y las tirosina fosfatasa, estuvieron modulados por la combinación de péptidos de esta invención. Además, en otro efecto relacionado con la invención, pero no reivindicado en el presente documento, la combinación de péptidos indujo la expresión de p53, reguló por disminución los niveles de la proteína antiapoptótica bcl2 y activó la caspasa 3, desencadenando así la muerte celular apoptótica en adenocarcinomas. La inducción de la proteína supresora de tumores p53 mediante esta combinación es una propiedad novedosa de esta combinación, no notificada anteriormente. Adicionalmente, la combinación también es antiangiogénica ya que inhibe la formación de "estructura de tipo tubo" y la migración de células endoteliales de manera concomitante con una reducción de los niveles de VEGF.

Por tanto, la combinación de péptidos bloquea varias de las rutas implicadas en la proliferación celular alterando los niveles de moléculas clave implicadas y, por tanto, puede provocar no sólo una muerte celular significativamente superior, sino que también presenta un espectro más amplio de actividad anticancerígena. La combinación de péptidos, cuando se usa en la fabricación de un medicamento, provoca una reducción significativa de los niveles de AMPc en adenocarcinomas de estómago y mama. Inhibe la proliferación dependiente del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en las células de cáncer pancreático. La combinación de péptidos, cuando se usa en la fabricación de un medicamento, provoca la inducción de caspasa-3 activa en células de cáncer de ovarios, y esto provoca la reducción

de los niveles de VEGF en células de cáncer de mama. Por tanto, habiendo realizado varios experimentos, se ha optimizado una combinación de péptidos con alta actividad citotóxica y de amplio espectro. El efecto anticancerígeno de la presente invención está mediado por la alteración de múltiples rutas celulares en las células neoplásicas, lo que conduce así a apoptosis y actividad antiangiogénica.

La presente invención se refiere a una composición útil en la fabricación de un medicamento para destruir o inhibir el crecimiento y/o la multiplicación de células tumorales y/o cancerígenas. La composición comprende péptidos de SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 o sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) de los mismos, o, en una variante de la invención, no reivindicada en el presente documento, puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, una combinación terapéuticamente eficaz de un análogo peptídico de somatostatina, un análogo peptídico de un péptido intestinal vasoactivo, un análogo peptídico de bombesina y un análogo peptídico de la sustancia P. En una realización preferida, se usa un vehículo, diluyente o disolvente farmacéuticamente eficaz con los análogos peptídicos. La invención también permite un método de tratamiento para seres humanos, mamíferos u otros animales que padecen cáncer y metástasis y angiogénesis asociada con cáncer. Adecuadamente, el método puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de manera que se inhibe la metástasis o angiogénesis asociada con tumor o cáncer y se destruyen, se inhibe el crecimiento, o se inhibe la multiplicación, de células cancerígenas o tumorales mediante inducción de apoptosis. Otro aspecto de la invención permite un método para tratar un mamífero (incluyendo un ser humano) aquejado de cáncer. Los métodos permitidos por esta invención comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, administrar sistemáticamente al mamífero una combinación de péptidos terapéuticamente eficaz.

Breve descripción del dibujo

La figura 1 muestra la actividad antitumoral *in vivo* con la administración subcutánea de la combinación de péptidos en xenoinjertos de PTC.

Descripción detallada de la invención

Esta invención comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una composición de una combinación terapéuticamente eficaz de 4 péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. La combinación consiste en:

SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO: 3

SEQ ID NO: 4

Las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 se describen a continuación. Pueden usarse una o más de las sales farmacéuticamente aceptables de SEQ ID: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en vez de los respectivos SEQ ID: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. La concentración de cada péptido en la combinación es preferiblemente de 10^{-6} a 10^{-10} M, preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-9} M.

La secuencia del inhibidor de unión al receptor de VIP es:

Leu-Met-Tyr-Pro-Thr-Tyr-Leu-Lys-OH (SEQ ID NO: 1)

que se describe en la solicitud de patente estadounidense número: 09/630.345.

La secuencia del antagonista de bombesina es:

D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Aib-His-Leu-NH₂ (SEQ ID NO: 2)

que se describe en la solicitud de patente estadounidense número: 09/630.333.

La secuencia del antagonista de la sustancia P es:

D-Arg-Pro-Lys-Pro-D-Phe-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Ac5c-NH₂ (SEQ ID NO: 3)

que se describe en la solicitud de patente estadounidense número: 09/629.642.

La secuencia del análogo de somatostatina es:

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 4)

(hay un enlace disulfuro entre los aminoácidos Cys y Pen) que se describe en la patente estadounidense número 6.156.725 (Mukherjee *et al*).

Los métodos permitidos por esta invención comprenden, consisten esencialmente o consisten en administrar a un ser humano o animal, preferiblemente un mamífero, una combinación terapéuticamente eficaz de esta invención. Las combinaciones de esta invención pueden usarse en la fabricación de medicamentos para destruir o inhibir la multiplicación de células tumorales o células cancerígenas. Las combinaciones son especialmente eficaces para tratar cáncer de mama, de ovarios, de colon, de pulmón, pancreático, de próstata, de estómago y bucal y para tratar fibroblastos de piel. Las combinaciones de esta invención también pueden usarse en la fabricación de un medicamento para modular moléculas intracelulares individuales, en las que la molécula intracelular es factor de crecimiento epidérmico, adicionalmente en las que la molécula intracelular es proteína cinasa activada por mitógeno, adicionalmente en las que la molécula intracelular es proteína bcl2, adicionalmente en las que la molécula intracelular es caspasa 3. Las combinaciones de esta invención pueden usarse en un método no reivindicado en el presente documento para regular por disminución la proliferación dependiente de factor de crecimiento epidérmico, los niveles intracelulares de AMPc, la actividad intracelular de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK); y regular por incremento la actividad intracelular de tirosina fosfatasa en diversos tipos de células cancerígenas. También pueden usarse en un método no reivindicado en el presente documento para inducir la proteína p53 de tipo natural, la actividad enzimática de caspasa e inhibir la proteína bcl2, e inhibir la secreción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en estos tipos de células cancerígenas.

La razón de péptidos en la composición puede variar de tal manera que el peso de un péptido puede ser de entre 1 y 3 veces el peso de otro péptido. El peso total de una única dosis es de entre 0,01 y 50,0 mg. Esto está de acuerdo con una dosis de 0,05 - 500 microgramos/kg de peso corporal del ser humano o animal. Estos péptidos tienen su mejor actividad biológica sistémica o *in vitro* (anticancerígena) cuando sus concentraciones individuales oscilan entre 10^{-6} M y 10^{-10} M (preferiblemente de 10^{-8} M a 10^{-9} M). No es necesario que el peso de todos los péptidos en la dosis sea el mismo. El peso del péptido en una dosis dependerá de muchos factores tales como (i) biodisponibilidad del péptido, (ii) semivida del péptido, (iii) número y afinidad de receptores por un péptido particular en el tumor y (iv) tipo de tumor o cáncer que va a tratarse.

Una dosis eficaz de la combinación oscila preferiblemente desde 0,05 - 500 microgramos/kg de peso corporal del mamífero, dependiendo la dosis, entre otros, de los efectos buscados, el modo de administración, el péptido seleccionado y el cáncer que está tratándose. La administración sistémica se refiere a la bucal, rectal, nasal, transdérmica y parenteral (es decir, intramuscular, intravenosa y subcutánea). De acuerdo con la buena práctica clínica, se prefiere administrar la composición a una dosis que produzca efectos anticancerígenos sin provocar efectos secundarios perjudiciales excesivos. La composición puede administrarse o bien sola o bien como una mezcla con otros agentes terapéuticos tales como 5-fluorouracilo, metotrexato, etopósido, paclitaxel, taxotere, doxorubicina, daunorubicina, vincristina, vinblastina y otros fármacos anticancerígenos de este tipo.

La composición puede contener opcional y preferiblemente diluyentes, excipientes, disolventes, aglutinantes, estabilizantes y similares farmacéuticamente aceptables, tales diluyentes pueden incluir rpmi 1649, solución salina tamponada, NaCl isotónico, disolución de Ringer, agua, agua destilada, polietilenglicol (puro o en agua), Tween al 2% en agua, dimetilsulfóxido hasta el 50% en agua, propilenglicol (puro o en agua), solución salina tamponada con fosfato, solución de sal equilibrada, glicerol, y otros fluidos convencionales que son adecuados para la administración intravenosa. Se prefieren composiciones farmacéuticas que proporcionan desde aproximadamente 0,5 hasta 20 mg (preferiblemente de 0,5 a 10,0 mg de la composición por dosis unitaria) y se preparan convencionalmente como comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas, polvos, suspensiones acuosas u oleosas, jarabes, elixires y disoluciones acuosas. Por supuesto, la naturaleza de la composición farmacéutica empleada dependerá de la vía de administración deseada.

Se prefieren composiciones farmacéuticas que proporcionan de 0,01 a 50,0 mg de la combinación por dosis unitaria y se preparan convencionalmente como comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas, polvos, suspensiones acuosas u oleosas, jarabes, elixires y disoluciones acuosas. Por supuesto, la naturaleza de la composición farmacéutica empleada dependerá de la vía de administración deseada.

Una cantidad eficaz se refiere a aquella cantidad de un péptido, combinación de péptidos o composición que comprende, consiste esencialmente en o consiste en péptidos que provocará la respuesta médica biológica de un tejido, célula de un sistema, animal o ser humano que se pretende.

Se llevó a cabo una búsqueda en PubMed de la National Library of Medicine ("Biblioteca Nacional de Medicina") para determinar la relevancia de las líneas celulares usadas para determinar la actividad anticancerígena de los péptidos. Aunque HT29 (colon humano) mostró 2021 "coincidencias" cuando se buscó con referencia al cáncer, otras líneas de células cancerígenas humanas también mostraron un gran número de coincidencias (6848 para K562, 2532 para MOLT-4, 542 para DU145, 1063 para MCF-7 y 182 para PA-1). Esto muestra claramente el amplio uso de estas líneas celulares en la investigación del cáncer. Además, es una norma y práctica común y convencional para someter a prueba moléculas para determinar la actividad anticancerígena *in vitro* en líneas de células tumorales humanas. (Br J Cancer. 18 de mayo de 2001; 84 (10): 1289-90 (Flasks, Fibres and Flanks - Preclinical tumor models for predicting clinical antitumor activity). Los autores notifican que la actividad *in vitro* frente a 6 o más líneas celulares de cáncer de pulmón o de mama predice actividad del xenoinjerto frente a estos tipos de tumores. En los artículos "Semin Oncol dic. de 1992; 19 (6): 622-38 (The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program)" y "Jpn J Antibiot dic. de 1977; 30 Supl.: 35-40 (Antitumor screening procedures of the National Cancer Institute)" se describe el extenso uso de líneas de células tumorales humanas para la identificación de posibles fármacos citotóxicos.

La presente invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a los siguientes ejemplos, que se facilitan para el fin de ilustrar meramente la invención sin limitarla.

Ejemplo 1

Síntesis de péptidos

Los péptidos en la presente invención se han generado mediante la técnica en fase sólida según la estrategia de Fmoc, en un sintetizador semiautomático de péptidos (CS Bio, Modelo 536), usando una protección óptima de las cadenas laterales. Los péptidos se ensamblaron desde el extremo C-terminal hacia el extremo N-terminal. Los péptidos amidados en el extremo carboxi-terminal se sintetizaron usando resina Rink Amide y los péptidos con extremo carboxi-terminal libre usando resina Wang.

Tras completar el ensamblaje del péptido, se retiró el grupo Fmoc amino-terminal y entonces se lavó el péptido-resina con metanol y se secó. Entonces se desprotegieron los péptidos y se escindieron del soporte de resina mediante tratamiento con ácido trifluoroacético, fenol cristalino, etanoditiol, tioanisol y agua desionizada durante de 1,5 a 5 horas a temperatura ambiente. Se obtuvo el péptido bruto mediante precipitación con éter seco frío. Se disolvió adicionalmente en agua y se liofilizó.

Se purificó el péptido bruto resultante mediante cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa usando una columna de fase inversa C-18 en un sistema de HPLC preparativa usando un gradiente de TFA al 0,1% en acetonitrilo y agua. Volvieron a analizarse las fracciones eluidas en un sistema de HPLC analítico. Se evaporó el acetonitrilo y se liofilizaron las fracciones para obtener el péptido puro. Se confirmó la identidad de cada péptido mediante espectroscopía de masas. Los péptidos se obtuvieron como sal de trifluoroacetato. Los péptidos pueden contener otras sales farmacéuticamente aceptables. Las sales englobadas dentro del término "sal farmacéuticamente aceptable" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de esta invención. Ésteres y sales representativas incluyen las siguientes: acetato, ascorbato, benzoato, citrato, oxalato, estearato, trifluoroacetato, succinatos, tartrato, lactato, fumarato, gluconato, glutamato, fosfato / difosfato, valerato y similares.

Se usan las siguientes abreviaturas para los aminoácidos poco frecuentes:

Orn = Ornitina

Pen = Penicilamina

Aib = ácido α -aminoisobutírico

Ac5c = ácido 1-aminociclopentanocarboxílico

Ejemplo 2

La combinación se preparó de la siguiente manera

Se prepara una disolución madre para cada uno de los cuatro péptidos (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) con un pH de aproximadamente 3,5 a 7,0 pero preferiblemente de 4,0 a 5,5. Aunque se usó solución salina tamponada con fosfato para preparar cada disolución madre para las pruebas descritas en el siguiente ejemplo, pueden usarse otros diluyentes tales como solución salina tamponada, NaCl isotónico, disolución de Ringer, agua, agua destilada, polietilenglicol (puro o en agua), Tween en agua, dimetilsulfóxido hasta el 50% en agua, propilenglicol (puro o en agua), solución salina tamponada con fosfato, solución de sal equilibrada, glicerol y otros fluidos convencionales que son adecuados para la administración parenteral. Para obtener un pH en el intervalo de aproximadamente 3,5 a 7,0, para cada disolución madre, el pH puede ajustarse usando HCl 1 N para reducir el pH o NaOH 1 N para elevar el pH, aunque pueden usarse otros tampones tales como tampón citrato, tampón fosfato y similares u otros agentes convencionales para ajustar el pH. Entonces se mezcla la disolución madre de cada péptido en diluciones apropiadas de manera que se obtiene una concentración final de 10^{-6} a 10^{-10} M, pero más preferiblemente en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-10} M y todavía más preferiblemente de 10^{-8} M. Se prepara una disolución madre para las sales farmacéuticamente aceptables de la misma manera.

Formulación de una dosis de la combinación para su administración parenteral

Se preparó una dosis de la formulación de combinación de la siguiente manera. En primer lugar, se preparó una disolución madre de cada uno de los cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 usando solución salina tamponada con fosfato estéril con un pH aproximado de 4,0 a 5,5. Se mezclaron juntas alícuotas de las disoluciones madre de los péptidos para preparar formulaciones que contenían combinaciones de dos péptidos, formulaciones que contenían tres péptidos o formulaciones que contenían cuatro péptidos. La razón de péptidos en las formulaciones puede variar de tal manera que el peso de un péptido puede ser de entre 1 y 3 veces el peso de otro péptido. Más preferiblemente, la razón de los cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 debe ser de 3:1:1:2 (p/p). El peso total de una única dosis es de entre 0,01 y 50,0 mg. Esto está de acuerdo con una dosis de 0,05 - 500 microgramos/kg de peso corporal del mamífero. Preferiblemente, el peso

de los cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en la dosis debe estar en la razón de 3:1:1:2. Estos péptidos tienen su mejor actividad biológica sistémica o *in vitro* (anticancerígena) cuando sus concentraciones individuales oscilan entre 10^{-6} M y 10^{-10} M (preferiblemente de 10^{-8} M a 10^{-9} M, más preferiblemente de 10^{-8} M.). Para lograr las concentraciones sistémicas terapéuticamente eficaces, se necesita administrar una dosis de 0,05 - 500 microgramos/kg de peso corporal del mamífero. Además, no es necesario que el peso de todos los péptidos en la dosis sea el mismo. El peso del péptido en una dosis dependerá de muchos factores tales como (i) biodisponibilidad del péptido, (ii) semivida del péptido, (iii) número y afinidad de receptores por un péptido particular en el tumor y (iv) tipo de cáncer o tumor que va a tratarse.

10 Ejemplo 3

Se cultivaron adenocarcinoma de colon humano primario, carcinoma de células escamosas y PTC, KB en medio RPMI 1640 complementado con glutamina 2 mM, HEPES 25 mM, penicilina 100 u/ml, estreptomycin 50 micromolar/ml, gentamicina 40 micromolar/ml y un 10% de FCS. Se mantuvieron las células a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO₂. Todos los ensayos de unión se realizaron a 4°C. Se obtuvieron TGF α , sustancia P, somatostatina, bombesina y VIP marcado con ¹²⁵I cada uno de 2000 Ci/mmol de actividad específica de DuPont NEN, EE.UU. Se llevó a cabo el ensayo en células intactas tal como se describe por (Qin *et al.*, 1995). En resumen, se sembraron 5 x 10⁴ células por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se dejó que se adhirieran durante la noche. Se lavaron las células dos veces con tampón de unión enfriado en hielo (MgCl₂ 10 mM, 1% de BSA, EGTA 1 mM, PMSF 0,25 mM y aprotinina 10 micromolar/ml en RPMI 1640). Se incubaron las células con 3 nM de VIP, bombesina o sustancia P o TGF α o con 2 nM de somatostatina en presencia o ausencia de diversas concentraciones de combinación de péptidos fríos y se dejaron incubas durante 2 h a 4°C. Se lavaron posteriormente las células tres veces con tampón de unión enfriado en hielo para eliminar el radioligando no unido y se lisaron con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, que contenía un 1% de SDS. Se midieron las cuentas radiactivas en el lisado celular usando un contador gamma (LKB Wallace, Finlandia). Se determinó la unión no específica en presencia de 1:1M del péptido nativo. Se trataron las cuentas usando el programa EBDA Biosoft para obtener valores de Kd y Bmax (pmol/mg de proteína celular). Los estudios de competición en frío con la combinación de péptidos (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) muestran que los péptidos constituyentes del fármaco pueden unirse a los receptores de neuropéptidos para VIP, somatostatina, bombesina y sustancia P en células PTC. La combinación de péptidos no desplazó la unión de TGF α de sus receptores, incluso cuando se añadió en una concentración de 30.000 veces comparado con la de TGF α . El fármaco pudo desplazar los péptidos nativos de sus respectivos receptores de una manera dependiente de la dosis (tabla 1).

TABLA 1

Inhibición en porcentaje de la unión de los neuropéptidos nativos en PTC por la combinación de péptidos

Exceso en veces de la combinación de péptidos fríos			
Neuropéptido	400 veces (1,2 micromolar)	1000 veces (3 micromolar)	30.000 veces (90 micromolar)
VIP	2,6%	35,87%	94,01%
Somatostatina	20,31%	42,91%	96,6%
Bombesina	7,89%	39,08%	93,13%
Sustancia P	5,06%	27,71%	97,52%
TGF α	Nada	Nada	4,5%

La combinación de péptidos pudo inhibir significativamente la unión de péptidos nativos radiomarcados a una concentración 1000 veces superior a la del péptido nativo y menos del 10% de unión residual permaneció en todos los casos con un exceso de 30.000 veces. Los estudios de competición en frío con combinación de péptidos en células KB muestran que los péptidos constituyentes del fármaco pueden unirse a los receptores de neuropéptidos para VIP, somatostatina, bombesina y sustancia P. El fármaco pudo desplazar los péptidos nativos de sus respectivos receptores de una manera dependiente de la dosis tal como se observa para PTC (tabla 2). La combinación de péptidos no desplazó la unión de TGF α de sus receptores, incluso cuando se añadió en una concentración de 30.000 veces comparado con la de TGF α .

Se observó que la combinación de péptidos inhibe la unión de los péptidos nativos radiomarcados a células KB a una concentración de un exceso de 1000 veces y menos del 10% de unión específica permaneció en todos los casos con un exceso de 30.000 veces.

TABLA 2

Inhibición en porcentaje de la unión de los neuropéptidos nativos en KB por la combinación de péptidos

Exceso en veces de la combinación de péptidos fríos			
Neuropéptido	400 veces (1,2 micromolar)	1000 veces (3 micromolar)	30.000 veces (90 micromolar)
VIP	8,64%	50,4%	93,17%
Somatostatina	12,9%	45%	97,8%
Bombesina	19,16%	62,54%	86,3%
Sustancia P	13,29%	38,5%	98,8%
TGF α	Nada	Nada	4,25%

Estos resultados sugieren que los derivados peptídicos incorporados en la combinación de péptidos también siguen siendo funcionales en la formulación combinada y pueden inhibir competitivamente la unión de concentraciones fisiológicamente relevantes de los neuropéptidos nativos. Además, la combinación de péptidos no compite por la unión de los factores de crecimiento en la membrana plasmática, a saber, tal como para TGF α . Los datos sugieren que el desplazamiento de neuropéptidos pro-proliferativos específicos de sus receptores en la membrana plasmática puede regular por disminución de manera sinérgica las señales intracelulares estimuladas por estos péptidos pro-proliferativos, sin alterar la unión de los factores de crecimiento e indirectamente conduce a una inhibición de la proliferación de células tumorales o cancerígenas.

Ejemplo 4

Efecto citotóxico de la combinación sobre líneas de células tumorales humanas

Se realizaron experimentos para estudiar el efecto citotóxico de la combinación sobre 23 líneas de células tumorales humanas usando el ensayo citotóxico de MTT de tres días. Estas líneas celulares fueron K562 (leucemia humana), MOLT-4 (linfoma humano), L132 (pulmón), A549 (carcinoma de pulmón humano), MCF-7 (mama), HBL100 (mama), MDA.MB.453 (mama humana), SW620 (colon), PTC (colon), CoLo205 (colon), HT29 (colon), CaCO.2 (colon humano), HuTu80 (duodeno humano) y Hu746T (estómago humano). En resumen, se incubaron células de las 21 líneas de células tumorales humanas en una placa de cultivo de 96 pocillos (aproximadamente 50.000 células cancerígenas en cada pocillo) durante 72 horas a 37°C en una incubadora de CO₂. Se añadió la combinación de SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4, todos a una concentración de 10⁻⁸ M (20 μ l por pocillo) a los pocillos de todas las muestras tratadas a tiempo 0, 24 y 48 horas. Los controles fueron células de 21 líneas de células tumorales que no se trataron con la combinación. Al final de las 72 horas, se añadió disolución madre de MTT a cada pocillo y se continuó la incubación durante una hora adicional. Tras añadir SDS-HCl 0,01 N, se leyó la placa a 540 nm. La citotoxicidad en porcentaje provocada por la combinación en cada una de las 21 líneas celulares se enumera en la tabla 3.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 288 640 T3

TABLA 3

Citotoxicidad en porcentaje provocada por la combinación de péptidos en 21 líneas de células tumorales humanas

Línea celular	Tipo de tumor	Citotoxicidad en porcentaje
Colon	PTC	94,2 ± 3,1
	CoLo205	80,1 ± 6,3
	HT29	41,4 ± 2,7
	SW620	33,2 ± 4,7
	CaCO.2	79,2 ± 3,4
Pulmón	L132	36,2 ± 4,3
	A549	15,2 ± 4,8
Mama	HBL100	52,5 ± 3,8
	MDA.MB.453	47,2 ± 2,2
	MCF-7	34,6 ± 5,8
Leucemia	MOLT-4	81,3 ± 4,2
	K562	41,9 ± 4,8
Glioblastoma	U87MG	84,2 ± 2,4
	U373MG	88,3 ± 3,1
Páncreas	MiaPaCa.2	85,4 ± 2,9
Próstata	DU145	46,2 ± 3,1
Cervicouterino	HeLa	33,1 ± 1,8
Ovarios	PA-1	28,4 ± 4,1
Estómago	HuTu80	92,1 ± 2,2
Duodeno	Hs746T	9,4 ± 3,7
Bucal	KB	70,0 ± 2,7
SK.MEL.28	Melanoma	No activa
SKO.007	Mieloma	No activa

Ejemplo 5

Efecto de la combinación de péptidos sobre los niveles de AMPc en células de cáncer de mama

Se llevó a cabo un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas intercalado (“sándwich”) en células de cáncer de mama (MCF7) para estudiar la modulación de los niveles de AMPc con el tratamiento con los péptidos y sus combinaciones. Se cultivaron las células en placas de 6 pocillos estériles a una densidad de $0,5 \times 10^6$ /pocillo en DMEM complementado con un 10% de FCS, y se dejó que se adhirieran durante la noche. Se cambió el medio a DMEM y se trataron las células con concentraciones apropiadas del péptido y sus combinaciones, tal como se muestra en la tabla III, durante 30 minutos, de tal manera que, en cada caso, la concentración de péptido final fue de 10^{-9} M.

Se coincubaron las células con forskolina a una concentración de 1 micromolar. Se rascaron las células usando un rascador celular y se sedimentaron. Se suspendió el sedimento celular en un tampón de resuspensión apropiado (Tris 50 mM, que contenía EDTA, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM, pepstatina 1 μ g/ml y leupeptina

0,5 microgramos/ml ajustado a pH 7,4). Se transfirieron los extractos celulares a tubos de microcentrifuga y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 x g. Se prepararon patrones de AMPc con concentraciones que oscilaban desde 200 unidades/ml hasta 0 unidades/ml inmediatamente antes del inicio del ensayo. Se añadió anticuerpo monoclonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigido frente a AMPc a los pocillos de microtitulación recubiertos previamente con anticuerpo monoclonal primario frente a AMPc. Se añadieron 50 µl de lisados de muestras y patrones de AMPc por duplicado en los pocillos de microtitulación que contenían ambos anticuerpos monoclonales frente a AMPc. Se incubaron los pocillos a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron los pocillos de microtitulación tres veces con un tampón de lavado apropiado (PBS 50 mM, con Tween al 0,5%) y se añadió la dilución apropiada de conjugado de peroxidasa del rábano anti-FITC y se incubó durante 30 minutos. Se lavaron los pocillos de microtitulación tres veces con el tampón de lavado y posteriormente con agua destilada. Se añadió tetrametilbencidina a cada pocillo y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia en cada pocillo a una longitud de onda dual de 450/595 nm en el plazo de 30 minutos desde la adición de disolución de detención y se calculó la cantidad de AMPc presente en las muestras de células.

Se regularon por disminución los niveles intracelulares de AMPc con el tratamiento con subcombinaciones de péptidos mediante 30 minutos de tratamiento. La tabla 4 muestra la inhibición en porcentaje de los niveles de AMPc tras el tratamiento con subcombinaciones en células MCF 7 (células de cáncer de mama). La inhibición máxima en los niveles intracelulares de AMPc se observó con la combinación de cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4.

TABLA 4

Niveles de AMPc expresados como porcentaje de los valores control en células de cáncer de mama tratadas con la combinación de péptidos

N° S.	PÉPTIDO (combinaciones)	AMPc (% del control)
1	SEQ ID NO: 1	25,2 ± 4,5
2	SEQ ID NO: 2	15,4 ± 3,0
3	SEQ ID NO: 3	13,3 ± 4,0
4	SEQ ID NO: 4	12,9 ± 5,0
5	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4	13,7 ± 5,5
6	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4	5,7 ± 6,0

Ejemplo 6

Efecto de la combinación de péptidos sobre la proliferación dependiente del factor de crecimiento epidérmico en células de cáncer pancreático (MiaPaCa2)

Se cultivaron células de cáncer pancreático (MiaPaCa2) en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo en DMEM complementado con un 10% de FCS, y se dejó que se adhirieran durante la noche. Se cambió el medio a DMEM y se trataron las células con factor de crecimiento epidérmico (EGF) recombinante a una concentración que oscilaba desde 5 nM hasta 1 micromolar. Se incubaron las células durante un periodo acumulativo de 72 horas. Se añadió EGF a las células una vez cada 24 horas. Las células control no se trataron con EGF. Se comparó la fracción superviviente de las células tratadas con EGF con la de las células no tratadas mediante el ensayo de MTT.

El ensayo se terminó añadiendo 100 microgramos (20 microlitros) de MTT a cada pocillo, entonces se incubó durante una hora adicional y finalmente se añadieron 50 microlitros de SDS al 10%-HCl 0,01 N a cada pocillo para lisar las células y disolver el formazán. Tras incubación durante una hora, se leyó la placa espectrofotométricamente a 540 nm y se calculó la fracción de supervivencia celular. Se obtuvo la concentración óptima de EGF que provoca la proliferación de las células pancreáticas. Se trataron las células de cáncer pancreático con la concentración óptima de EGF (5 nM) y las subcombinaciones de péptidos mostradas en la tabla 5, durante 72 horas, de tal manera que, en cada caso, la concentración de péptido final fue de 10^{-9} M.

Se añadieron la combinación de péptidos y EGF cada 24 horas. Se calculó la fracción de células supervivientes para cada combinación de péptidos mediante el ensayo de MTT descrito anteriormente. La tabla 5 a continuación muestra la fracción de supervivencia de las células tratadas con EGF y diferentes combinaciones de péptidos.

Se anuló la proliferación celular dependiente del factor de crecimiento epidérmico mediante las combinaciones de péptidos en diversos grados *in vitro*. Esta inhibición fue específica para EGF ya que los experimentos se llevaron a cabo en medio libre de cualquier otro factor de crecimiento. La tabla 5 muestra la fracción de supervivencia de células tratadas con diversas combinaciones de péptidos expresada como un porcentaje de las células control no tratadas. La inhibición máxima de la proliferación se bloqueó mediante la combinación de cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4.

TABLA 5

Células supervivientes en porcentaje en células pancreáticas humanas tratadas con factor de crecimiento epidérmico y combinaciones de péptidos

N° S.	COMBINACIONES DE PÉPTIDOS	Fracción de supervivencia de las células
1	SEQ ID NO: 1	90,6 ± 5,0
2	SEQ ID NO: 2	80,4 ± 6,0
3	SEQ ID NO: 4	96,9 ± 5,5
4	SEQ ID NO: 3	75,2 ± 4,0
5	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 1	55,9 ± 5,6
6	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4	60,4 ± 6,7
7	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4	10,5 ± 9,0

Ejemplo 7

Efecto de la combinación de péptidos sobre la actividad de tirosina fosfatasa en células cancerígenas de cáncer pancreático

Se llevó a cabo la cuantificación de tirosina fosfatasa colorimétricamente usando sus sustratos peptídicos fosforilados en las tirosinas marcados con biotina sintéticos. Se extinguió la reacción enzimática mediante la adición de un inhibidor específico, y se inmoviliza el sustrato fosforilado y desfosforilado uniéndolo a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Se determina la fracción del sustrato no metabolizado mediante su anticuerpo anti-fosfotirosina directamente conjugado a peroxidasa.

Se cultivaron las células en placas de 6 pocillos estériles a una densidad de $0,5 \times 10^6$ /pocillo en DMEM complementado con un 10% de FCS, y se dejó que se adhirieran durante la noche. Se cambió el medio a DMEM. Se trataron las células con concentraciones apropiadas del péptido y sus combinaciones mostradas en la tabla 6, durante 30 minutos, de tal manera que, en cada caso, la concentración de péptido final fue de 10^{-9} M.

Se lisaron las células en un tampón de lisis apropiado (Tris 50 mM, que contenía EDTA, PMSF 0,2 mM, pepstatina 1 microgramo/mililitro y leupeptina 0,5 microgramos/mililitro ajustado a pH 7,4). Se transfirieron los extractos celulares a tubos de microcentrifuga y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 xg.

Se realizó la cuantificación de la actividad de la enzima fosfatasa con 30 microlitros de sustratos específicos y se extinguió la reacción con la adición de ortovanadato de sodio 100 micromolar. Se añadió la mezcla de reacción a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Se lavaron meticulosamente los pocillos y se añadieron 75 microlitros de anticuerpo anti-fosfotirosina a la placa. Tras 3 lavados, se añadieron 100 microlitros del sustrato POD a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 405 nM.

La combinación de péptidos indujo actividad de tirosina fosfatasa en un plazo de 30 minutos en células de cáncer pancreático. La tabla 6 muestra la inducción en porcentaje de actividad de tirosina fosfatasa tras el tratamiento con las subcombinaciones en la línea celular de cáncer pancreático (MiaPaCa2). La inducción máxima de tirosina fosfatasa, 150%, en células de cáncer pancreático (MiaPaCa2) se produjo en la combinación de cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

TABLA 6

Inducción de actividad de tirosina fosfatasa expresada como el porcentaje de los valores control en células de cáncer pancreático (MiaPaCa2) tratadas con la combinación de péptidos

N° S.	COMBINACIÓN DE PÉPTIDOS	% de inducción de tirosina fosfatasa
1	SEQ ID NO: 4	15,6 ± 4,5
2	SEQ ID NO: 3	14,3 ± 3,5
3	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4	20,7 ± 2,5
4	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 3	30,3 ± 4,0
5	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4	62,0 ± 5,6

En los ejemplos 8-15, se comparan los resultados mostrado con los controles que son células no tratadas células.

Ejemplo 8

Efecto de la combinación de péptidos sobre la actividad de proteína cinasa activada por mitógeno

Se recogieron células de cáncer de colon (PTC) confluentes usando tripsina al 0,05% - EDTA 0,2 mM y se volvieron a cultivar en placa en RPMI complementado con un 10% de FCS, en placas de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo. Tras incubación durante la noche, se cambió el medio a RPMI complementado con un 2,5% de FCS. Después de eso, se incubaron las células con la combinación de péptidos a su concentración óptima (N) durante 15 minutos. La concentración óptima de la combinación de péptidos se define como una concentración 10^{-8} M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4. También se trataron las células con N/5 (un quinto de la concentración óptima) y N/10 (un décimo de la concentración óptima) de la combinación de péptidos. Se lavaron las células una vez con tampón de lisis que contenía Tris 10 mM / NaCl 150 mM / EDTA 2 mM / ditiotretol (DTT) 2 mM / ortovanadato 1 mM / fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM / Triton-X-100 al 1% (pH=7,4). Se precipitaron los restos celulares a 25.000 g y se conservó el sobrenadante para la estimación de MAPK.

Se inició la reacción mediante la adición de tampón ATP-magnesio que contenía γ - 32 P-ATP a una concentración de 200 μ Ci/microlitro en presencia del péptido sustrato. Se incubó la mezcla durante 30 minutos. Se terminó la reacción según las instrucciones del fabricante y se cargó la mezcla sobre láminas de unión tratadas, usando el kit de ensayo de MAP cinasa (Amersham Pharmacia Biotech, EE.UU.). Se calculó la actividad de MAP cinasa a partir de la tasa a la que se transfirió el grupo fosfato al péptido sustrato específico por minuto. La tabla 7 a continuación muestra la inhibición de la actividad de MAPK en células de cáncer de colon tratadas con diversas concentraciones de la combinación de péptidos.

TABLA 7

Inhibición en porcentaje de la actividad de MAPK en células de cáncer de colon tratadas con diversas concentraciones de la combinación de cuatro péptidos

Línea celular	Actividad de MAPK como porcentaje de los valores control		
	N/10	N/5	N
PTC (células de cáncer de colon)	36,2 ± 3,2	20,5 ± 3,1	10,1 ± 4,2

ES 2 288 640 T3

Se descubrió que el tratamiento de células de carcinoma de colon con SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4 provocaba una regulación por disminución sumamente significativa y dependiente de la dosis de la actividad de MAP cinasa constitutiva en un plazo de 15 minutos desde el tratamiento con el fármaco. Se redujo la actividad de MAPK en un 80 - 90% de la de las células no tratadas.

Ejemplo 9

Efecto de la combinación de péptidos sobre la inducción de la caspasa 3

Se cultivaron células cancerígenas PA-1 (ovario), MDA.MB.453 (mama), HT29 (colon) y A549 (pulmón) en matraces de cultivo tisular de 25 cm² a 37°C en una incubadora humidificada, que contenía un 5% de CO₂. Cuando los cultivos alcanzaron las preconfluencia, se añadieron los péptidos individuales de la combinación y diferentes combinaciones de los péptidos tal como se muestra en la tabla 8 a diferentes matraces de tal manera que la concentración final de cada péptido en el matraz era de 10⁻⁸ M. Los matraces no tratados sirvieron como controles. Se incubaron las células con fármaco durante 6 horas.

Tras 6 horas de incubación, se recogieron las células mediante tratamiento con tripsina seguido por centrifugación a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. Se retiró suavemente el sobrenadante y se desechó y se añadió tampón de lisis al sedimento celular (25 microlitros de tampón de lisis por 1x10⁴ células en un tubo cónico de 15 ml) y se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. Se transfirieron 50 microlitros de sobrenadante (lisado celular) a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se preparó tampón de reacción 2X añadiendo 10 microlitros de disolución madre de DTT nueva por 1 ml de tampón de reacción 2x. Se añadieron 50 microlitros de tampón de reacción 2x a cada pocillo seguido por la adición de 5 microlitros de sustrato colorimétrico de caspasa 3 (DEVD-pNA). Se incubó la placa durante 1-2 horas a 37°C. Tras la incubación, se leyó la placa en un lector de microplacas a una luz de longitud de onda de 405 nm, el nivel de actividad enzimática de la caspasa en el lisado celular era directamente proporcional a la reacción de color. Se calculó la inducción de actividad de caspasa por las subcombinaciones como un porcentaje del control usando la fórmula [(DO de la muestra/DO del control) -1] *100.

Se observó activación de la caspasa 3 con el tratamiento con péptidos ya a las 6 horas en células PA-1 (ovario). La tabla 8 muestra la inducción en porcentaje de la actividad de caspasa tras el tratamiento con subcombinaciones en líneas de células cancerígenas. Se observó la máxima inducción de caspasa del 86,5% (PA-1), 75,9 (HT29), 68,9 (A549) y 58,6% (MDA.MB.453) en la combinación de cuatro péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

TABLA 8

Efecto de la combinación de péptidos sobre la inducción de caspasa 3

N° S.	COMBINACIÓN DE PÉPTIDOS	% DE INDUCCIÓN			
		PA-1	MDA.MB453	HT29	549
1	SEQ ID NO: 4	34,8 ± 1,3	18,9 ± 1,0	18,6 ± 1,9	28,4 ± 2,8
2	SEQ ID NO: 3	46,2 ± 2,1	22,8 ± 3,8	28,4 ± 2,4	38,5 ± 3,8
3	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4	54,0 ± 3,5	48,2 ± 2,7	54,7 ± 5,3	46,2 ± 3,7
4	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 3	76,1 ± 4,3	54,3 ± 3,2	67,2 ± 3,8	54,9 ± 4,6
5	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 4	86,5 ± 5,8	58,6 ± 3,8	75,9 ± 6,2	68,9 ± 4,7

ES 2 288 640 T3

Ejemplo 10

Efecto de la combinación de péptidos sobre los niveles de la proteína bcl2 en células cancerígenas humanas

Se cultivaron células de adenocarcinoma humano (MiaPaCa2 (pancreático), MCF7 (mama), PTC (colon), y de células escamosas (KB, bucal)) hasta la confluencia y se sembraron en placa con RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS, en placas de cultivo tisular de 6 pocillos, a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células por pocillo. Se incubaron las células durante 24 horas para permitir la unión completa a los pocillos. Posteriormente, se cambió el medio a RPMI libre de sueros y se incubaron las células con la combinación de cuatro péptidos a su concentración óptima (N) durante 20 horas (en la que $N = 10^{-8}$ M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 respectivamente). Se retiró el sobrenadante y se rascaron las células y se lisaron a 4°C para extraer la proteína Bcl-2. Se cuantificó Bcl-2 mediante inmunoensayo enzimático intercalado (productos de Oncogene Research) según las instrucciones del fabricante. Tal como se muestra en la tabla 9, la combinación de cuatro péptidos redujo la expresión de la proteína antiapoptótica bcl2 tanto en los adenocarcinomas como en los carcinomas escamosos *in vitro*. Los niveles de bcl2 disminuyeron desde el 49-65% *in vitro* en diferentes líneas de células cancerígenas *in vitro*.

TABLA 9

Disminución en porcentaje de los niveles de la proteína bcl2 en células cancerígenas tratadas con la combinación de péptidos a una concentración "N"

Línea celular	Disminución en porcentaje de los niveles de bcl2
MiaPaCa2	$59 \pm 3,5$
MCF7	$49 \pm 4,0$
PTC	$65 \pm 6,5$
KB	$65 \pm 5,5$

Ejemplo 11

Efecto de la combinación de péptidos sobre los niveles de la proteína p53 en células cancerígenas humanas

Se cultivaron células de adenocarcinoma humano (MiaPaCa2 (pancreático), MCF7 (mama), Colo205 (colon), A549 (pulmón) y de células escamosas (KB, cáncer bucal) hasta confluencia y se sembraron placas con RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS, en placas de cultivo tisular de 6 pocillos, a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células por pocillo. Se incubaron las células durante 24 horas para permitir la unión completa a los pocillos. Posteriormente, se cambió el medio a RPMI libre de sueros y se incubaron las células con la combinación de péptidos a su concentración óptima (N) durante 5 horas (en la que $N = 10^{-8}$ M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 respectivamente). Se retiró el sobrenadante y se rascaron las células y se lisaron a 4°C para extraer la proteína p53 de tipo natural. Se cuantificó p53 mediante inmunoensayo enzimático intercalado (ELISA de formato rápido, Calbiochem) según las instrucciones del fabricante.

Tal como se muestra en la tabla 10, la combinación de cuatro péptidos indujo la proteína p53 de tipo natural tanto en adenocarcinomas como en el carcinoma escamoso *in vitro*. El aumento en los niveles varió desde el 10-60% en diferentes líneas celulares mediante 5 horas de tratamiento con fármaco.

TABLA 10

Aumento en porcentaje de los niveles de la proteína p53 en células cancerígenas tratadas con la combinación de péptidos

Línea celular	Aumento en porcentaje de los niveles de p53
	N
MiaPaCa2	$10,6 \pm 1,5$
MCF7	$15,5 \pm 2,5$
Colo205	$55,8 \pm 5,0$

ES 2 288 640 T3

A549	60,3 ± 5,5
KB	22,1 ± 4,0

Ejemplo 12

Citotoxicidad de células endoteliales

Se resuspendieron células ECV304 y EaHy.926 recogidas en la fase de crecimiento exponencial en medio (3,3 x 10⁶ células/ml en RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS). Se añadieron 150 microlitros de medio a los pocillos de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) seguido por 30 microlitros de suspensión celular. Se dejó la placa en una incubadora (37°C, 5% de CO₂) durante la noche. Se añadieron 20 microlitros de la combinación de péptidos a una concentración de N, N/10 y 10N (en las que N= 10⁻⁸ M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 respectivamente) a pocillos marcados de la placa de 96 pocillos. Se sembró en placa cada concentración por triplicado. Se añadieron 20 microlitros de medio solo a los pocillos control, mientras que los pocillos sin células sirvieron como blancos. Se garantizó un volumen total de 200 microlitros en cada pocillo y se dejó la placa en una incubadora (37°C, 5% de CO₂). Tras 72 horas de incubación, se realizó un ensayo de MTT y se calculó la inhibición en porcentaje en la proliferación de las células tratadas con respecto a las células control. La tabla 11 muestra la inhibición en porcentaje de las células endoteliales con el tratamiento con diferentes concentraciones de la combinación de péptidos.

TABLA 11

Inhibición en porcentaje de la proliferación de células endoteliales con el tratamiento con diferentes concentraciones de la combinación de péptidos

Línea celular	Inhibición en porcentaje de la proliferación (%)		
	N/10	N	10N
EaHy. 926	36,2 ± 3,2	44,4 ± 3,1	38,1 ± 4,2
ECV304	24,1 ± 4,1	31,0 ± 4,6	28,9 ± 3,8

Ejemplo 13

Actividad antimigratoria

Se usaron insertos Transwell de filtro de policarbonato (tamaño de 24 pocillos) con poros 8 micromolar (Nunc, Dinamarca) para el ensayo de migración. Se añadieron ECV304 (10⁴ células/200 microlitros de DMEM que contenía un 0,1% de BSA) a la cámara superior. La cámara inferior contenía 600 microlitros de DMEM con un 0,1% de BSA. Se añadió la combinación de péptidos a cinco concentraciones diferentes de N/100 (10⁻¹⁰ M), N/10 (10⁻⁹ M), N, 10N (10⁻⁷ M), y 100N (10⁻⁶ M), (en las que N= 10⁻⁸ M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 respectivamente), directamente al pocillo superior y se incubó la placa a 37°C durante 24 horas. Se observaron las células que migraron a la cámara inferior aleatoriamente a cinco campos microscópicos de contraste de fases diferentes y se contó el número total de células usando el sistema de análisis de imágenes Video Pro 32. La tabla 12 muestra la inhibición en porcentaje de la migración.

ES 2 288 640 T3

TABLA 12

Inhibición en porcentaje de la migración de células endoteliales tras el tratamiento con concentraciones variables de la combinación de péptidos

Péptido	Inhibición en porcentaje de la migración (%)				
	N/100	N/10	N	10N	100N
SEQ ID: 1,	0,00	93,4 ±	95,7 ±	97,3 ±	21,6 ±
SEQ ID: 2,		3,2	2,7	2,4	5,2
SEQ ID: 3 y					
SEQ ID: 4					

Ejemplo 14

Actividad anti-estructura similar a un tubo

Se puso Matrigel (350 microlitros) en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos a 4°C y se permitió que polimerizara mediante incubación a 37°C durante 30 min. Se sembraron ECV304 ($1,5 \times 10^4$) sobre el Matrigel en 500 microlitros de DMEM complementado con un 10% de FBS. Se añadieron cinco concentraciones diferentes de N/4, N/2, N, 2,5N y 5N, (en las que $N = 10^{-8}$ M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 respectivamente), de combinación de péptidos al pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 72 horas. Se formaron estructuras similares a un tubo, cuya longitud se contó individualmente a cinco campos microscópicos de contraste de fases diferentes usando el sistema de análisis de imágenes Video Pro 32. La tabla 13 muestra la inhibición en porcentaje de la longitud del tubo.

TABLA 13

Actividad inhibidora de la estructura similar a un tubo de la combinación de péptidos a diferentes concentraciones

Concentración de péptidos	Inhibición en porcentaje de la actividad TLS (%)
N/4	28,4 ± 3,2
N/2	39,3 ± 4,2
N	47,0 ± 5,6
2,5 N	42,0 ± 3,9
5 N	58,1 ± 6,2

Ejemplo 15

Efecto de la combinación de péptidos sobre la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular

Se cultivaron células de adenocarcinoma humano tales como MiaPaCa (páncreas), PC3 (próstata), HT29 (colon), HuTu80 (estómago), MDA.MB.453 (mama), PTC (colon), A549 (pulmón) y células endoteliales humanas (ECV304) a la densidad de $8-10 \times 10^5$ células por 2 ml en una placa de seis pocillos. Tras la incubación durante la noche de las células a 37°C, se añadió la combinación de péptidos (1N y 2N), en las que $N = 10^{-8}$ M para SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3 y SEQ ID: 4 respectivamente, a los pocillos. Los pocillos no tratados sirvieron como controles. Se incubaron las placas durante 4 horas a 37°C. Se recogió el medio de todos los pocillos (control y tratados) y se centrifugó a 2000 r.p.m para eliminar el material celular. Se recogió el sobrenadante y se usó para ELISA (Quantikine human VEGF, R&D Systems). El ensayo emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático intercalado. Se ha recubierto previamente un anticuerpo monoclonal específico para VEGF sobre una microplaca. Se pipetearon patrones y muestras en los pocillos y el VEGF presente se unió por el anticuerpo inmovilizado. Tras eliminar por lavado las sustancias no unidas, se añadió un anticuerpo policlonal unido a enzima específico para VEGF a los pocillos. Tras un lavado para

ES 2 288 640 T3

eliminar cualquier reactivo de anticuerpo-enzima no unido, se añadió una disolución de sustrato a los pocillos y se desarrolló color en proporción a la cantidad de VEGF unido en la etapa inicial. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo en un plazo de 30 minutos usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm y una longitud de onda de referencia de 540 nm.

Las células mostraron altos niveles de secreción de VEGF, que se inhibió mediante la adición de la combinación de péptidos. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la inhibición a concentraciones de 1N y 2N del fármaco. Se resumen los resultados del ensayo en la siguiente tabla 14 y se representan en la figura a continuación.

TABLA 14

Reducción en porcentaje de los niveles de VEGF en diferentes tipos de tumor con el tratamiento con la combinación de péptidos

N° S.	Línea celular	Reducción en porcentaje de los niveles de VEGF con el tratamiento con la combinación de péptidos	
		1N	10N
1	HT29 (colon)	42,1 ± 3,2	52,7 ± 5,3
2	MDA.MB.453 (mama)	38,2 ± 3,9	37,9 ± 2,8
3	MiaPaCa2 (páncreas)	36,8 ± 2,9	46,3 ± 4,2
4	PC3 (próstata)	27,7 ± 1,5	32,9 ± 1,2
5	A549 (pulmón)	33,2 ± 4,2	38,9 ± 2,1
6	HuTu80 (estómago)	17,6 ± 1,0	32,7 ± 3,2
7	ECV304 (endotelial)	23,9 ± 0,1	29,5 ± 2,9

Ejemplo 16

Actividad antitumoral in vivo de la combinación de péptidos sobre ratones con xenoinjerto de tumor primario (colon)

Se hicieron crecer xenoinjertos de tumor PTC en ratones Balb/c atímicos mediante inoculación subcutánea de una única suspensión celular de células PTC (15 X 10⁶ células/100 microlitros). Se dividieron los animales que llevan tumor en 4 grupos de tres animales, incluyendo cada uno un grupo que comprendía animales control no tratados. Se inició el tratamiento con la combinación de péptidos cuando los volúmenes tumorales promedio, medidos usando un calibrador Vernier, eran de entre 400 - 800 mm³. se prepararon las combinaciones de péptidos SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3 (en una razón de 1:1 p/p), SEQ ID: 1 + SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3 (en una razón de 3:1:1 p/p) y SEQ ID: 1 + SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3 + SEQ ID: 4 (en una razón de 3:1:1:2 p/p) y se administraron al grupo asignado de animales que llevan tumor a una dosis de 25 microgramos/día (i.v. seguido por i.m.) en dos dosis divididas equitativamente. Se continuó el tratamiento durante un periodo de 14 días.

Se monitorizó la actividad antitumoral de los compuestos midiendo los volúmenes tumorales cada cuatro días usando la fórmula $W \cdot W \cdot L \cdot 0,4$ (W = diámetro más pequeño, L = diámetro más grande). Se calculó la inhibición en porcentaje del crecimiento tumoral usando la fórmula $(1 - \text{volumen tumoral-tratado} / \text{volumen tumoral-control}) \cdot 100$. La tabla 15 muestra los volúmenes tumorales medios de los grupos individuales medidos hasta el día 26 tras la inoculación. La figura 1 muestra la cinética tumoral hasta el día 26 en los animales tratados y no tratados. Las tres combinaciones de péptidos mostraron una actividad antitumoral significativa sobre xenoinjertos PTC. La inhibición en porcentaje del crecimiento tumoral provocada por SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3, SEQ ID: 2 + SEQ ID: 1 + SEQ ID: 3 y SEQ ID: 1 + SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3 + SEQ ID: 4 en comparación con los controles en el día 26 fue del 67,8%, 85,1% y 97,1% respectivamente.

ES 2 288 640 T3

TABLA 16

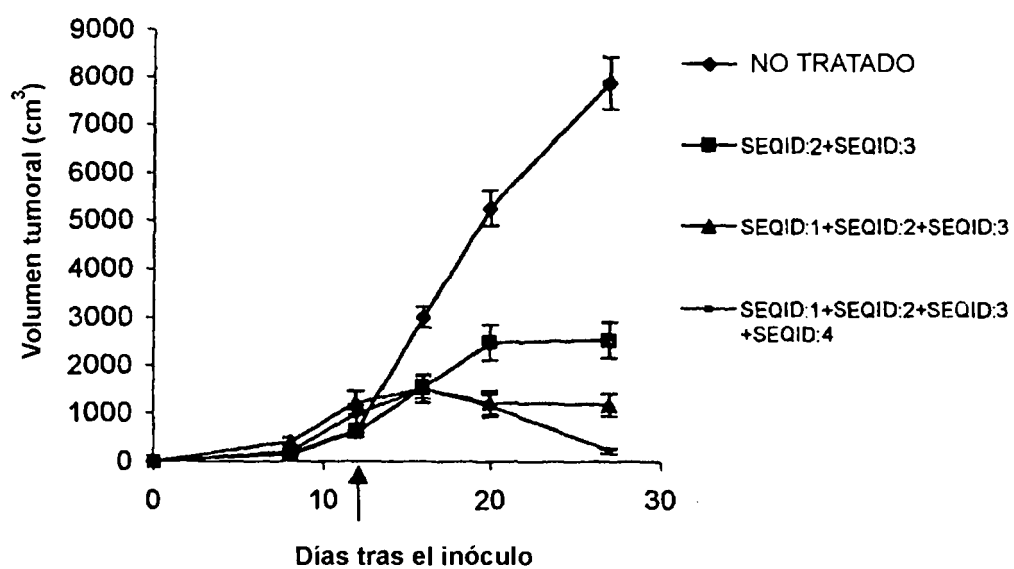
Cinética tumoral de los xenoinjertos tratados con la combinación de péptidos

Día	Volumen tumoral (mm ³)			
	No tratado	SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3	SEQ ID: 2 + SEQ ID: 1 + SEQ ID: 3	SEQ ID: 1 + SEQ ID: 2 + SEQ ID: 3 + SEQ ID: 4
0	0	0	0	0
8	165,5	148	402	212,7
12	629	602,1	1208	976,3
16	2991,2	1536	1507,7	1508,4
20	5254,2	2470	1209,2	1159,3
27	7873,2	2530,1	1166,4	221,6

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una combinación terapéuticamente eficaz de péptidos de SEQ ID NO:1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, SEQ ID NO:2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, SEQ ID NO:3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y SEQ ID NO:4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Composición según la reivindicación 1, que comprende además un vehículo, diluyente o disolvente farmacéuticamente aceptable.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que la concentración de cada péptido es de 10^{-6} M a 10^{-10} M, más preferiblemente 10^{-8} M.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que la razón de un péptido está entre 1 y 3 veces el peso de un segundo péptido, más preferiblemente 3:1:1:2 p/p.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una composición farmacéutica.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que se proporciona la composición farmacéutica en dosis unitarias.
7. Composición según la reivindicación 6, en la que el peso de los péptidos en una dosis única está entre 0,01 y 50,0 mg.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la forma de un comprimido, pastilla para chupar, cápsula, polvo, suspensión acuosa u oleosa, jarabe, elixir o disolución acuosa.
9. Uso, en la fabricación de un medicamento para
 - a. destruir células tumorales o cancerígenas; y/o
 - b. inhibir la proliferación y/o multiplicación de las células tumorales o cancerígenas; y/o
 - c. tratar un cáncer de colon, pulmón, mama, próstata, cervical, ovarios, estómago, duodeno, páncreas o bucal o leucemia o glioblastoma,de una combinación que comprende péptidos de SEQ ID:1, SEQ ID:2, SEQ ID:3 y SEQ ID:4 o sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) de los mismos.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que la concentración de cada péptido en la combinación es de 10^{-6} M a 10^{-10} M, más preferiblemente de 10^{-8} M.
11. Uso según la reivindicación 9, en el que el medicamento es para administrarse a un ser humano o un animal en una dosis de 0,05 a 500 microgramos/kg de peso corporal del ser humano o animal.
12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el medicamento modula moléculas intracelulares individuales o múltiples de las células tumorales o cancerígenas compitiendo con los receptores para el péptido intestinal vasoactivo, bombesina, somatostatina y sustancia P presentes en las células tumorales o cancerígenas.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que la molécula intracelular es factor de crecimiento epidérmico.
14. Uso según la reivindicación 12, en el que la molécula intracelular es AMPc.
15. Uso según la reivindicación 12, en el que la molécula intracelular es proteína cinasa activada por mitógeno.
16. Uso según la reivindicación 12, en el que la molécula intracelular es la proteína bcl2.
17. Uso según la reivindicación 12, en el que la molécula intracelular es caspasa 3.

**Cinética tumoral de xenoinjertos de tumor primario (colon)
en ratones desnudos**



ES 2 288 640 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Mukherjee, Rama
Burman, Anand
5 Singh, Anu
Jaggi, Manu
Prasad, Sudhanand
Dutt, Sarjana

10 <120> FÁRMACO QUE COMPRENDE ANÁLOGOS PEPTÍDICOS SINTÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO
DEL CÁNCER
<130> HSM-DAB-PEP
<140> -
15 <160> 4
<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
25 <220>
<223> Este péptido se generó sintéticamente

<400> 1
30 Leu Met Tyr Pro Thr Tyr Leu Lys
1 5

<210> 2
35 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
40 <220>
<223> Este péptido se generó sintéticamente

<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> /producto = D-fenilalanina/marcador = D-Phe

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
55 <223> /producto = ácido 2-amino-isobutírico/marcador = Aib

<400> 2
60 Xaa Gln Trp Ala Val Xaa His Leu
1 5

<210> 3
<211> 11
65 <212> PRT
<213> Artificial

ES 2 288 640 T3

<220>
 <223> Este péptido se generó sintéticamente

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> /producto = D-arginina/marcador = D-Arg

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 15 <223> /producto = D-fenilalanina/marcador = D-Phe

<220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> /producto = D-triptófano/marcador = D-Trp

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9) .. (9)
 <223> /producto = D-triptófano/marcador = D-Trp

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 35 <223> /producto = Ácido aminociclopentanocarboxílico/marcador = Ac5c

<400> 3

40 Xaa Pro Lys Pro Xaa Gln Xaa Phe Xaa Leu Xaa
 1 5 10

<210> 4
 45 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Este péptido se generó sintéticamente

<220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> /producto = D-fenilalanina/marcador = D-Phe

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 65 <223> /producto = D-triptófano/marcador = D-Trp

<220>

ES 2 288 640 T3

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> /producto = Ornitina/marcador = Orn

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

10

<223> /producto = Penicilamina/marcador = Pen

<400> 4

15

Xaa Cys Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Thr
1 5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65