

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 984**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2018 PCT/EP2018/077033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2019 WO19068822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2018 E 18779395 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3692051**

54 Título: **Péptidos anticancerígenos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

05.10.2017 EP 17382667

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

07.11.2023

73 Titular/es:

**SUIGENERIS FARMACOSMETICS, S.L. (100.0%)
C. Tuset, 34
08006 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

ROYO BARGUÉS, TERESA

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

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

ES 2 952 984 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 anticancerígenos y usos de los mismos

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al campo de los compuestos antineoplásicos, en particular a péptidos anticancerígenos y a composiciones anticancerígenas que comprenden dichos péptidos. La invención también se refiere al uso de dichos péptidos y dichas composiciones para el tratamiento profiláctico o terapéutico del cáncer de páncreas.

Estado de la técnica

El uso terapéutico de proteínas y péptidos que actúan intracelularmente es muy prometedor para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

El cáncer es un grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o extenderse a otras partes del cuerpo. El cáncer es una enfermedad multifactorial, es decir, es el resultado de la aparición de múltiples factores. Dichos factores normalmente convergen en la generación de mutaciones en protooncogenes que provocan un aumento de la proliferación celular. También pueden producirse mutaciones en genes supresores de tumores cuya función normal es regular la proliferación celular. También pueden producirse mutaciones en las enzimas de reparación del ADN, lo que afecta a la capacidad de la célula para reparar los daños antes de su proliferación, generando, por lo tanto, inestabilidad genómica.

En la actualidad, hay pocas opciones eficaces para el tratamiento de muchos tipos de cáncer comunes. El curso del tratamiento para un individuo determinado depende del diagnóstico, la etapa de desarrollo de la enfermedad y factores tales como la edad, el sexo y el estado de salud general del paciente. Las opciones más convencionales de tratamiento del cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Cada una de estas terapias tiene diversos grados de eficacia y va acompañada de diversos efectos secundarios. Estos efectos secundarios, junto con la resistencia a múltiples fármacos ya descubierta para la quimioterapia tradicional, han generado la necesidad urgente de nuevos enfoques terapéuticos o fármacos contra el cáncer.

Un tipo de cáncer particularmente mortal es el cáncer de páncreas. Este tipo de cáncer es un crecimiento maligno del páncreas que ocurre principalmente en las células de los conductos pancreáticos. Esta enfermedad es la novena forma más común de cáncer, sin embargo, es la cuarta y quinta causa principal de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente. El cáncer de páncreas casi siempre es mortal, con una tasa de supervivencia a cinco años inferior al 3 %.

Los síntomas más frecuentes del cáncer de páncreas son ictericia, dolor abdominal y pérdida de peso, que, junto con otros factores de manifestación, son de naturaleza inespecífica. Por tanto, diagnosticar el cáncer de páncreas en un estadio inicial de crecimiento tumoral suele ser difícil y requiere una amplia evaluación diagnóstica, incluyendo en ocasiones cirugía exploratoria.

La ecografía endoscópica y la tomografía computarizada son los mejores medios no invasivos disponibles en la actualidad para el diagnóstico del cáncer de páncreas. Sin embargo, la detección fiable de tumores pequeños, así como la diferenciación del cáncer de páncreas de la pancreatitis focal, resulta difícil.

La gran mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas son diagnosticados actualmente en un estadio tardío, cuando el tumor ya se ha extendido fuera de la cápsula para invadir los órganos circundantes y/o ha metastatizado mucho. La detección tardía de la enfermedad es habitual, y el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas es poco frecuente en el ámbito clínico.

Los procedimientos de tratamiento actuales disponibles para el cáncer de páncreas no han llevado a una cura, ni a una mejora sustancial del tiempo de supervivencia. La resección quirúrgica ha sido la única modalidad que ofrece una posibilidad de supervivencia. Sin embargo, debido a la gran carga tumoral, solo del 10 % al 25 % de los pacientes son candidatos a la "resección curativa". Para aquellos pacientes que se someten a un tratamiento quirúrgico, la tasa de supervivencia a cinco años sigue siendo baja, con un promedio de tan solo aproximadamente un 10 %. Por lo tanto, el cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer en donde existe una mayor necesidad de desarrollo de terapias eficaces.

Una de las alternativas terapéuticas más prometedoras contra el cáncer actualmente en desarrollo son los péptidos anticancerígenos. Estos péptidos presentan varias ventajas importantes frente a los agentes anticancerígenos tradicionales, como una actividad, especificidad y afinidad elevadas, y una interacción mínima fármaco-fármaco. Pueden utilizarse en combinación con la resección quirúrgica. También presentan varias ventajas con respecto a las terapias basadas en proteínas o anticuerpos; son de pequeño tamaño, fáciles de sintetizar, tienen la capacidad de

penetrar en las membranas celulares y su diversidad biológica y química es mínima. Una ventaja añadida del uso de péptidos como tratamiento es que no se acumulan en órganos específicos (por ejemplo, riñón o hígado), lo que puede ayudar a minimizar sus efectos secundarios tóxicos. También pueden sintetizarse rápidamente y modificarse con facilidad y son menos inmunogénicos que los anticuerpos o las proteínas recombinantes. Todas estas características hacen de la terapéutica peptídica un campo prometedor para los agentes anticancerígenos emergentes. El documento WO 2014/079943 divulga péptidos anticancerígenos que son útiles para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Sin embargo, los péptidos terapéuticos presentan algunos inconvenientes importantes, como su escasa estabilidad o su resistencia a las proteasas, lo que ha dificultado su desarrollo y llegada a la clínica. Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos realizados, continúa existiendo la necesidad en el campo clínico de las enfermedades neoplásicas de alternativas terapéuticas, tales como péptidos anticancerígenos eficaces.

Resumen de la invención

El presente inventor ha desarrollado varios péptidos con la capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas. Sorprendentemente, el inventor ha descubierto que la presencia de al menos un residuo de cisteína en un extremo terminal otorga a los péptidos de la invención una potente actividad inhibidora del cáncer. Es importante destacar que, los péptidos proporcionados en el presente documento también muestran una alta solubilidad y una alta estabilidad en soluciones congeladas, lo que los hace adecuados para composiciones terapéuticas. Todas estas características hacen de los péptidos de la invención una importante alternativa farmacológica en el tratamiento de tumores todavía prácticamente incurables, como los tumores pancreáticos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

25



en donde:

el grupo N-terminal del péptido es un monorradical de fórmula -NHR₁,
 el grupo C-terminal del péptido es un monorradical de fórmula -C(O)-R₂;
 R₁ es un monorradical seleccionado entre hidrógeno y -C(O)-alquilo (C₁-C₂₀);
 R₂ es un monorradical seleccionado entre -OH y un radical -NR₃R₄;
 R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo (C₁-C₁₀);
 "a" a "j" son números enteros de 0 a 1, con la condición de que al menos uno de "a" a "j" es 1; y
 X₁ representa cualquier aminoácido.

Como se muestra a continuación, los péptidos de la invención son altamente específicos, y son capaces de dirigirse específicamente a las células cancerosas. Es decir, los péptidos de la invención son capaces de "discriminar" entre células normales y células cancerosas. Esto supone un gran avance en el campo del cáncer ya que uno de los efectos secundarios más conocidos de las actuales terapias anticancerígenas son los efectos secundarios debido a su falta de especificidad. Esta especificidad hacia las células cancerosas también explica los datos experimentales proporcionados a continuación, que respaldan la no toxicidad de dichos péptidos cuando se administran a varios tipos de células primarias humanas.

45

Estas propiedades hacen que los péptidos de fórmula (I) de la invención sean adecuados como tratamientos contra el cáncer.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo del primer aspecto con al menos un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al péptido o la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

55

Y, finalmente, en un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el péptido o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neoplásica.

Breve descripción de los dibujos

60

La figura 1, relacionada con el Ensayo 1, son dos diagramas de barras que muestran el efecto inhibitor de varios péptidos de la invención con dos concentraciones diferentes sobre el crecimiento de células tumorales pancreáticas humanas (BXPC3) en comparación con las células tratadas de forma simulada. El eje y representa el número de células después de 72 h de tratamiento como porcentaje del número de células tratadas de forma simulada, al que se le otorga un valor del 100 %. (A) Las células se trataron con péptidos a una concentración de 20 µM. La primera

65

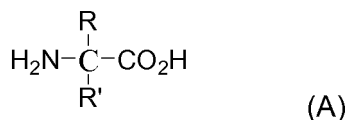
- columna (CONTROL), corresponde a células tratadas de forma simulada, la segunda columna (P1) corresponde al péptido P1 en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado; la tercera columna (P1C) corresponde a una variante del péptido P1 con una cisteína terminal en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado; la cuarta columna (P2) corresponde al péptido P2 en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado; la quinta columna (P2C) corresponde a una variante del péptido P2 con una cisteína terminal en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado; la sexta columna (P1A) corresponde a una variante del péptido P1C en donde el extremo N-terminal está libre (no acetilado) y el extremo C-terminal está amidado; y la séptima columna (P1B) corresponde a una variante del péptido P1C en donde el extremo N-terminal está acetilado, el extremo C-terminal está amidado, y la isoleucina está sustituida por una valina. (B) Las células se trataron con péptidos a una concentración de 40 µM. La primera columna (CONTROL), corresponde a células tratadas de forma simulada, la segunda, tercera, cuarta y quinta columnas corresponden a células tratadas con los péptidos P1, P1C, P1A y P1B, respectivamente. Las secuencias de los péptidos se detallan en el Ejemplo 2.
- 15 La figura 2, relacionada con el Ensayo 2, es un diagrama de barras que muestra el efecto de toxicidad del péptido P1C (Ac-CFEISKY-NH₂) en células endoteliales primarias de cordón umbilical humano (HUVEC) a diversas concentraciones en comparación con las células tratadas de forma simulada. El eje y representa el número de células después de 72 h de tratamiento como porcentaje del número de células tratadas de forma simulada (control), al que se le otorga un valor del 100 %. La primera columna (DMSO), corresponde a las células tratadas con el vehículo en el que se disuelven los péptidos. Las columnas segunda a quinta corresponden a las células tratadas con el péptido P1C a concentraciones de 10, 20, 30, 40 µM, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

- 25 Todos los términos y expresiones usados en la presente solicitud, a menos que se indique de otro modo, se entenderán en su significado habitual, como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas para determinados términos usados en la presente solicitud son las que se establecen a continuación, y tienen por objeto aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, a menos que una definición expresamente establecida proporcione una definición más amplia.
- 30 Como se expuso anteriormente, los inventores proponen un conjunto de péptidos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con potente actividad inhibitoria contra el cáncer.
- 35 Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable", cuando se refiere al péptido de la invención, se refiere a aquellas sales que, dentro del ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales no humanos sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y que son acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, no tóxicas son las sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos, tales como el ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o usando otros métodos utilizados en la técnica, tales como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, *p*-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales derivadas de bases adecuadas incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos y amonio. Sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea adecuado, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina formados utilizando contraiones, tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo.
- 55 En la presente invención, la expresión "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo.

Aminoácidos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, alfa-aminoácidos, tales como los isómeros L de los alfa-aminoácidos de los 20 alfa-aminoácidos comunes de origen natural: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; beta-aminoácidos naturales (por ejemplo, beta-alanina); y aminoácidos no naturales.

La expresión "aminoácido no natural" comprende los isómeros D de los 20 alfa-aminoácidos comunes de origen natural o aminoácidos de fórmula (A)



en donde R y R' tienen el significado que se indica en la Tabla 1 a continuación.

5

Alfa-aminoácidos no naturales ilustrativos	Cadenas laterales de aminoácidos adecuadas	
	R	R'
D-alanina	—H	—CH ₃
D-arginina	—H	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ -NHC(=NH)NH ₂
D-asparagina	—H	—CH ₂ C(=O)NH ₂
Ácido D-aspártico	—H	—CH ₂ CO ₂ H
D-cisteína	—H	—CH ₂ SH
Ácido D-glutámico	—H	—CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
D-glutamina	—H	—CH ₂ CH ₂ C(=O)NH ₂
D-histidina	—H	—CH ₂ -2-(1H-imidazol)
D-isoleucina	—H	—sec-butilo
D-leucina	—H	—iso-butilo
D-lisina	—H	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
D-metionina	—H	—CH ₂ CH ₂ SCH ₃
D-fenilalanina	—H	—CH ₂ Ph
D-prolina	—H	—2-(pirrolidina)
D-serina	—H	—CH ₂ OH
D-treonina	—H	—CH ₂ CH(OH)(CH ₃)
D-triptófano	—H	—CH ₂ -3-(1H-indol)
D-tirosina	—H	—CH ₂ -(p-hidroxifenil)
D-valina	—H	—isopropilo
Divinilo	—CH=CH ₂	—CH=CH ₂

Alfa-aminoácidos no naturales ilustrativos	R y R' son iguales a:	
α-metil-alanina (Aib)	—CH ₃	—CH ₃
α-metil-arginina	—CH ₃	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —NHC(=NH)NH ₂
α-metil-asparagina	—CH ₃	—CH ₂ C(=O)NH ₂
Ácido α-metil-aspártico	—CH ₃	—CH ₂ CO ₂ H
α-metil-cisteína	—CH ₃	—CH ₂ SH
Ácido α-metil-glutámico	—CH ₃	—CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
α-metil-glutamina	—CH ₃	—CH ₂ CH ₂ C(=O)NH ₂
α-metil-histidina	—CH ₃	—CH ₂ -2-(1H-imidazol)
α-metil-isoleucina	—CH ₃	-sec-butilo
α-metil-leucina	—CH ₃	-iso-butilo
α-metil-lisina	—CH ₃	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂

En la Tabla 2 se resumen otros ejemplos ilustrativos no limitantes de aminoácidos no naturales:

10

Tabla 2

Código de tres letras	Aminoácido
Aad	Ácido 2-aminoadípico
bAad	Ácido 3-aminoadípico
bAla	beta-alanina, Ácido beta-aminopropiónico
Abu	Ácido 2-aminobutírico
4Abu	Ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico
Acp	Ácido 6-aminocaproico
Ahe	Ácido 2-aminoheptanoico
Aib	Ácido 2-aminoisobutírico
bAib	Ácido 3-aminoisobutírico
Apm	Ácido 2-aminopimélico
Dbu	Ácido 2,4-diaminobutírico
Des	Desmosina
Dpm	Ácido 2,2'-diaminopimélico

(continuación)

Código de tres letras	Aminoácido
Dpr	Ácido 2,3-diaminopropiónico
EtGly	N-etilglicina
EtAsn	N-etilasparagina
Hyl	Hidroxilisina
aHyl	alo-hidroxilisina
3Hyp	3-hidroxiprolina
4Hyp	4-hidroxiprolina
Ide	Isodesmosina
alle	alo-isoleucina
Nva	Norvalina
Nle	Norleucina
Orn	Ornitina

Cada uno de los aminoácidos que forman el péptido de la invención puede tener, independientemente de los otros, configuración L o D.

5

Los aminoácidos utilizados en la preparación de los péptidos de la presente invención pueden prepararse por síntesis orgánica, u obtenerse por otras rutas, tales como, por ejemplo, degradación o aislamiento de una fuente natural.

En una realización particular del primer aspecto, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, X₁ se selecciona entre los aminoácidos Ala, Ile, Leu, Phe, Val, Pro y Gly. De manera más particular, X₁ es Ile o Val. Incluso más particularmente, X₁ es Ile.

10

En otra realización particular del primer aspecto, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, R₁ es -C(O)alquilo (C₁-C₁₀). De manera más particular, R₁ es -C(O)alquilo (C₁-C₅). Incluso más particularmente, R₁ es -C(O)-CH₃.

15

En otra realización particular del primer aspecto, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, R₂ es -NR₃R₄. De manera más particular, R₃ y R₄ son iguales o diferentes y se seleccionan entre hidrógeno y alquilo (C₁-C₅).

20

En la presente invención, el término "alquilo" abarca cadenas hidrocarbonadas tanto lineales como ramificadas.

Ejemplos ilustrativos no limitantes de "alquilo" son: metilo (C₁), etilo (C₂), propilo (C₃), isopropilo (C₃), isobutilo (C₄), sec-butilo (C₄), *terc*-butilo (C₄), pentilo (C₅), hexilo, (C₆), heptilo (C₇), octilo (C₈), nonilo (C₉) y decilo (C₁₀), entre otros.

25

En otra realización particular más, opcionalmente en combinación con cualesquiera realizaciones anteriores o posteriores, uno de "a" a "j" es 1 y los otros son 0. En particular, "a" es 1 y "b", "c", "d", "e", "f", "g", "h", "i" y "j" son 0.

Otra realización particular del primer aspecto comprende un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3, que se resumen en la Tabla 3.

30

Tabla 3

Péptido	SEQ ID	Secuencia
P1A	SEQ ID NO: 1	CFEISKY-NH ₂
P1B	SEQ ID NO: 2	CH ₃ -C(O)-CFEVSKY-NH ₂
P1C	SEQ ID NO: 3	CH ₃ -C(O)-CFEISKY-NH ₂

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse siguiendo protocolos rutinarios tales como por síntesis en fase sólida, en donde se realizan etapas sucesivas de (a) desprotección del aminoácido a unir, y (b) ciclos de acoplamiento de aminoácidos protegidos.

35

El grupo protector puede ser un grupo N-protector, un grupo C-protector o un grupo protector de cadena lateral. Existen grupos protectores disponibles comercialmente pertenecientes a las tres categorías.

40

Ejemplos ilustrativos no limitantes de grupos protectores de aminoácidos son los grupos N-protectores t-Boc (o Boc) y Fmoc. Cuando se utiliza t-Boc o Fmoc en la síntesis de un péptido, las cuatro etapas principales son: (a) el grupo protector se elimina de los aminoácidos finales (disponibles comercialmente) en una reacción de desprotección; (b) los reactivos de desprotección se eliminan por lavado para proporcionar un entorno de acoplamiento limpio, (c) los aminoácidos protegidos disueltos en un disolvente como la dimetilformamida (DMF) combinados con reactivos de acoplamiento se bombean a través de la columna de síntesis, y (d) los reactivos de acoplamiento se eliminan por

45

lavado para proporcionar un entorno de desprotección limpio. Dependiendo del grupo N-protector en particular, el reactivo de desprotección y el reactivo de acoplamiento es uno u otro. El experto en la materia, basándose en sus conocimientos generales, y por métodos rutinarios, puede optimizar las condiciones particulares, si fuera necesario.

5 Alternativamente, los péptidos de la invención pueden obtenerse mediante tecnología de ADN recombinante.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de FÓRMULA (I), una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con al menos un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

La expresión "composición farmacéutica" engloba tanto las composiciones destinadas a humanos como las destinadas a animales no humanos.

15 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad del péptido que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo, o aliviar en cierta medida, uno o más de los síntomas de la enfermedad que se está tratando. La dosis particular del compuesto administrado de acuerdo con la presente invención se determinará, por supuesto, según las circunstancias particulares del caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular que se está tratando y consideraciones similares.

20

La expresión "excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables" se refiere a materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con tejidos u órganos de seres humanos y animales no humanos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones correspondientes con una relación beneficio/riesgo razonable.

25

Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseable o la interacción de otro modo de forma perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de la presente invención.

30

Las cantidades relativas del principio activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán dependiendo de la identidad, el tamaño y/o el estado del sujeto tratado y, adicionalmente, dependiendo de la vía por la que ha de administrarse la composición.

40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tamponantes, agentes lubricantes y/o aceites. Excipientes tales como agentes colorantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes y aromatizantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

45

Las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido o el conjugado de la invención pueden presentarse en cualquier forma farmacéutica, por ejemplo, sólida o líquida, y pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, oral, parenteral, rectal, tópica, intranasal o sublingual, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica deseada, por ejemplo, formulaciones tópicas (pomada, cremas, lipogel, hidrogel, etc.), colirios, pulverizadores en aerosol, soluciones inyectables, bombas osmóticas, etc.

50

Diluyentes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio, lactosa fosfato de sodio, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo y combinaciones de estos.

55

Agentes de dispersión y/o granulación ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato sódico de almidón, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, polivinilpirrolidona reticulada (crospovidona), carboximetilalmidón sódico (glicolato sódico de almidón), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (Veegum), laurilsulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario y combinaciones

65

Agentes aglutinantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, goma arábiga, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscara de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, polivinilpirrolidona), silicato de aluminio y magnesio (Veegum) y arabogalactano de alerce); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; y combinaciones de estos.

10 Conservantes ilustrativos pueden incluir antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes alcohólicos, conservantes ácidos y otros conservantes. Antioxidantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, estearato de ascorbilo, oleato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y sulfito de sodio. Agentes 15 quelantes ilustrativos incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), monohidrato de ácido cítrico, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico y edetato trisódico.

20 Agentes tamponantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, soluciones de tampón citrato, soluciones de tampón acetato, soluciones de tampón fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glucobionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido D-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato cálcico, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato de potasio, cloruro potásico, gluconato de potasio, mezclas 25 potásicas, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua apirógena, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico o combinaciones de estos.

30 Agentes lubricantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, estearato magnésico, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behenato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, laurilsulfato de sodio y combinaciones de estos.

Como se ha descrito anteriormente, otro aspecto de la invención se refiere a un péptido o una composición 35 farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el péptido o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neoplásica, de manera más particular, en el tratamiento o la prevención del cáncer de páncreas. Este aspecto también puede formularse como el uso del péptido 40 o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad neoplásica.

Ejemplos ilustrativos no limitantes de enfermedades neoplásicas que pueden tratarse con el péptido y la composición farmacéutica de la invención incluyen, pero sin limitación, papilomas, adenomas, lipomas, osteomas, miomas, 45 angiomas, nevos, teratomas maduros, carcinomas, sarcomas, teratomas inmaduros, melanoma, mieloma, leucemia, linfoma de Hodgkin, basalioma, espinalioma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de esófago, hepatocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, etc. En una realización particular del quinto aspecto, la enfermedad neoplásica es el cáncer de páncreas. A partir de los datos proporcionados en el presente documento, el péptido y la 50 composición farmacéutica de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de otras enfermedades, tales como enfermedades metabólicas, neurológicas e inflamatorias.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender", y variaciones de esta palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Asimismo, la palabra "comprender" 55 engloba el caso de "consistir en". Objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden ser limitativos de la presente invención. Asimismo, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y 60 preferidas descritas en el presente documento.

EjemplosEjemplo 1: Síntesis de los péptidos de la invención.

Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis química utilizando la tecnología de síntesis en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés) siguiendo una estrategia clásica de Fmoc/tBu, bien mediante un sintetizador de péptidos automático o realizado de forma manual.

- 5 Se utilizó la resina Rink-amida para la síntesis y para los acoplamientos Fmoc-aminoácido N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como aditivo en dimetilformamida (DMF). La desprotección se llevó a cabo con una solución de piperidina al 20 % en DMF.

- En el caso de las secuencias acetiladas, la acetilación se llevó a cabo en fase sólida utilizando una solución de anhídrido acético (Ac₂O) con diisopropiletilamina (DIEA) en DMF justo antes de secar la resina. Las resinas peptídicas secas se trataron con un cóctel de ácido trifluoroacético (TFA) para escindir el péptido de la resina. Los crudos peptídicos obtenidos se purificaron mediante HPLC preparativa en fase inversa utilizando un sistema de purificación H₂O/acetoniitrilo (can) con TFA y las fracciones puras se liofilizaron. Los resultados del análisis por HPLC se resumen en la Tabla 4.

15

Tabla 4

Péptido	Identificación en el espectro MS	Pureza del péptido
P1	827,6 u.m.a.	90,54 %
P1A	887,4 u.m.a.	97,54 %
P1B	915,5 u.m.a.	97,45 %
P1C	930,7 u.m.a.	97,00 %
P2	678,4 u.m.a.	94,14 %
P2C	781,5 u.m.a.	99,12 %

Ejemplo 2: Cultivo celular y tratamiento de células con el péptido de la invención20 Cultivos celulares

La línea celular BXPC3 de adenocarcinoma primario de páncreas humano fue proporcionada por el Instituto de Investigación Biomédica (IRB) de Barcelona, y las células endoteliales primarias de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron obtenidas directamente por el investigador y almacenadas en nitrógeno líquido en el laboratorio. Las células BXPC3 se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) complementado con suero bovino fetal al 10 % y antibióticos. Las células HUVEC se mantuvieron en medio de cultivo M199 (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 20 %, suplemento de crecimiento celular endotelial (ECGS), heparina (Hep) y antibióticos. Los cultivos se mantuvieron en la incubadora de células en una atmósfera húmeda a 37 °C que contenía un 5 % de CO₂.

- 30 Los diferentes péptidos a analizar se disolvieron fácilmente en DMSO a una concentración de 50 mM y posteriormente se preparó una dilución intermedia 5 mM en PBS de Dulbecco, que se sometió a dos ciclos cortos de sonicación, lo que hizo que los péptidos fueran completamente solubles. A partir de esta última dilución, se prepararon los diferentes tratamientos a concentraciones de 10, 20, 30 y 40 uM en medio complementado. Los diferentes tratamientos se prepararon a doble concentración y se añadieron 100 µl de ellos al mismo volumen de medio de crecimiento celular en los pocillos para obtener las concentraciones finales anteriormente divulgadas.

35

Tratamientos celulares

- Los ensayos con los diferentes péptidos se realizaron siguiendo el protocolo que se explica a continuación. Las células se volvieron a suspender mediante digestión con tripsina/EDTA al 0,25 %-EDTA en el caso de las células BXPC3, y tripsina al 0,25 %-EDTA en el caso de las células HUVEC. Una vez resuspendidas en el medio de cultivo, se contaron en una cámara de Neubauer después de una dilución 1:1 con azul tripano. Esta tinción permite conocer el número de células vivas en la suspensión. A partir del recuento, se preparó una dilución adecuada de las células (5000 células/100 µl/pocillo para BXPC3 y 10000 células/100 µl/pocillo para HUVEC). Las células se dejaron 24 horas en cultivo dentro de la incubadora de células. Después de 24 horas de incubación, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución doblemente concentrada de los péptidos preparados tal como se ha explicado anteriormente. Se mantuvieron los tratamientos durante 72 horas manteniendo las células en la incubadora de células. Las secuencias de los péptidos utilizados en el ensayo se muestran en la Tabla 5.

50

Tabla 5

Péptidos de la invención	Secuencia	SEQ ID NO:
P1A	CFEISKY-NH ₂	SEQ ID NO: 1
P1B	CH ₃ -C(O)-CFEVSKY-NH ₂	SEQ ID NO: 2
P1C	CH ₃ -C(O)-CFEISKY-NH ₂	SEQ ID NO: 3
Péptido con fines comparativos	Secuencia	SEQ ID NO:
P1	CH ₃ -C(O)-FEISKY-NH ₂	SEQ ID NO: 4

(continuación)

Péptidos de la invención	Secuencia	SEQ ID NO:
P2	CH ₃ -C(O)-VFSTAL-NH ₂	SEQ ID NO: 5
P2C	CH ₃ -C(O)-CVFSTAL-NH ₂	SEQ ID NO: 6

Después de 72 horas, el medio de cultivo se eliminó mediante decantación, las células se lavaron dos veces con DPBS y después las células se fijaron con 100 µl de solución de paraformaldehído al 4 % durante 30 min. A continuación se realizaron dos lavados con 100 µl de H₂O mQ e inmediatamente se añadieron 50 µl de solución de cristal violeta al 0,25 %, preparada en agua destilada, y se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Al finalizar el tiempo de tinción, se realizaron varios lavados con agua destilada para eliminar completamente el exceso de cristal violeta, después las placas se secaron por completo en estufa a 37 °C.

10 Los valores de densidad óptica por pocillo se obtuvieron mediante un lector de microplacas multidetección Biotek Synergy™2, utilizando un filtro de 590 nm y mediante lectura por barrido, obteniendo los valores medios por pocillo.

RESULTADOS

15 Ensayo de proliferación *in vitro* para analizar la actividad inhibidora del crecimiento del cáncer de los péptidos

Con el fin de analizar el efecto anticancerígeno de los péptidos de la invención, se realizaron ensayos de proliferación en la línea celular de tumor pancreático humano BXPC3.

20 Como se puede observar en la Figura 1-A, cuando las células BXPC3 se trataron con péptidos a una concentración final de 20 µM, el péptido P1C (SEQ ID NO: 3) redujo el crecimiento de las células cancerosas hasta un 40 % en relación con el crecimiento de las células tratadas de forma simulada, al que se le otorgó un valor del 100 %. La notable capacidad inhibidora del péptido se mantuvo cuando se perdió la acetilación carboxiterminal del péptido P1C - péptido P1A (SEQ ID NO: 1) - o se substituyó el residuo de isoleucina por un residuo de valina - péptido P1B (SEQ ID NO: 2).

25 Cuando los péptidos se aplicaron a una concentración final de 40 µM (figura 1-B), sus efectos inhibidores del crecimiento fueron aún mayores.

No se observó inhibición del crecimiento de las células cancerosas con ninguno de los otros péptidos analizados.

30 Ensayo de proliferación *in vitro* para analizar la toxicidad de los péptidos de la invención

La administración del péptido P1C - que presenta la mayor actividad inhibidora del crecimiento en células cancerosas (véase el Ensayo 1) - no afectó al crecimiento de las células normales no transformadas. La falta de toxicidad se mantuvo independientemente de la dosis del péptido aplicada (que va desde 10 µM hasta 40 µM de concentración final, columnas dos a cinco de la figura 2).

Estos resultados demuestran sin ambigüedades el alto potencial terapéutico de los péptidos de la invención como agentes contra el cáncer dada su baja toxicidad en células no transformadas y su alta actividad inhibidora del crecimiento en células cancerosas.

40

Listado de citas

WO 2014/079943

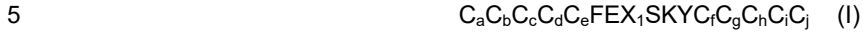
45 Copolovici D. M. *et al.*, "Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications", ACS Nano, 2014, 8(3): 1972-1994;

Ford K.G. *et al.*, "Protein transduction: an alternative to genetic intervention?" Gene Therapy, 2001; 8:1-4; y

50 Tandrup Schmidt S. *et al.*, "Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators", Pharmaceutics, marzo de 2016; 8(1).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde:

10 el grupo N-terminal del péptido es un monorradical de fórmula $-NHR_1$,
 el grupo C-terminal del péptido es un monorradical de fórmula $-C(O)-R_2$;
 R_1 es un monorradical seleccionado entre hidrógeno y $-C(O)$ -alquilo (C_1-C_{20});
 R_2 es un monorradical seleccionado entre $-OH$ y un radical $-NR_3R_4$;
 R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_{10});
 "a" a "j" son números enteros de 0 a 1, con la condición de que al menos uno de "a" a "j" es 1; y
 15 X_1 representa cualquier aminoácido.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X_1 se selecciona entre Ala, Ile, Leu, Phe, Val, Pro y Gly.

3. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde X_1 es Ile o Val.

20 4. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R_1 es $-C(O)$ alquilo (C_1-C_{10}).

5. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R_1 es $-C(O)-CH_3$.

25 6. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R_2 es $-NR_3R_4$.

7. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_3 y R_4 son hidrógeno.

30 8. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno de "a" a "j" es 1 y los otros son 0.

9. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde "a" es 1 y "b", "c", "d", "e", "f", "g", "h", "i" y "j" son 0.

35 10. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3.

40 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, con al menos un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un péptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o una composición farmacéutica definida en la reivindicación 11, para su uso como medicamento.

45 13. Un péptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neoplásica.

50 14. El péptido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad neoplásica es el cáncer de páncreas.

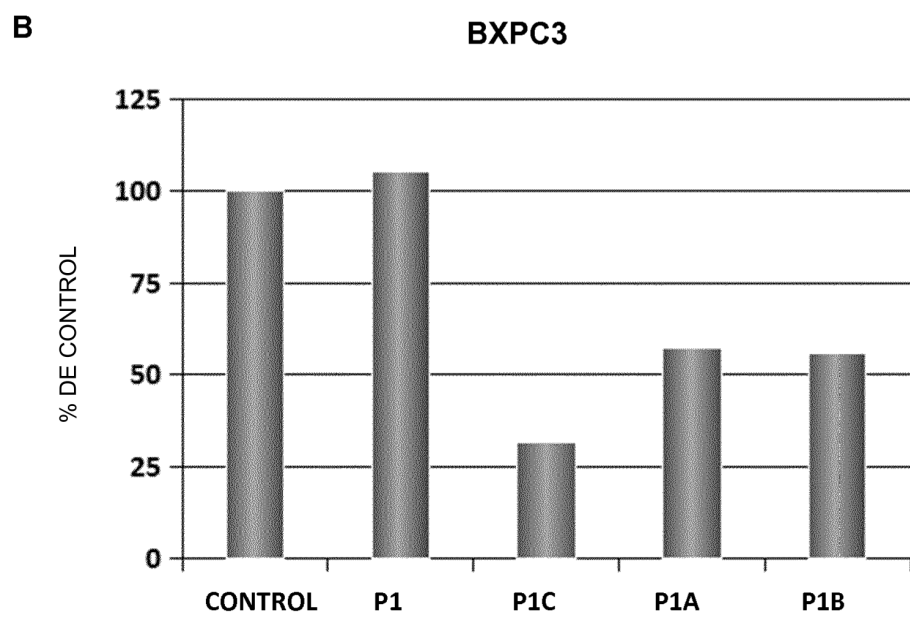
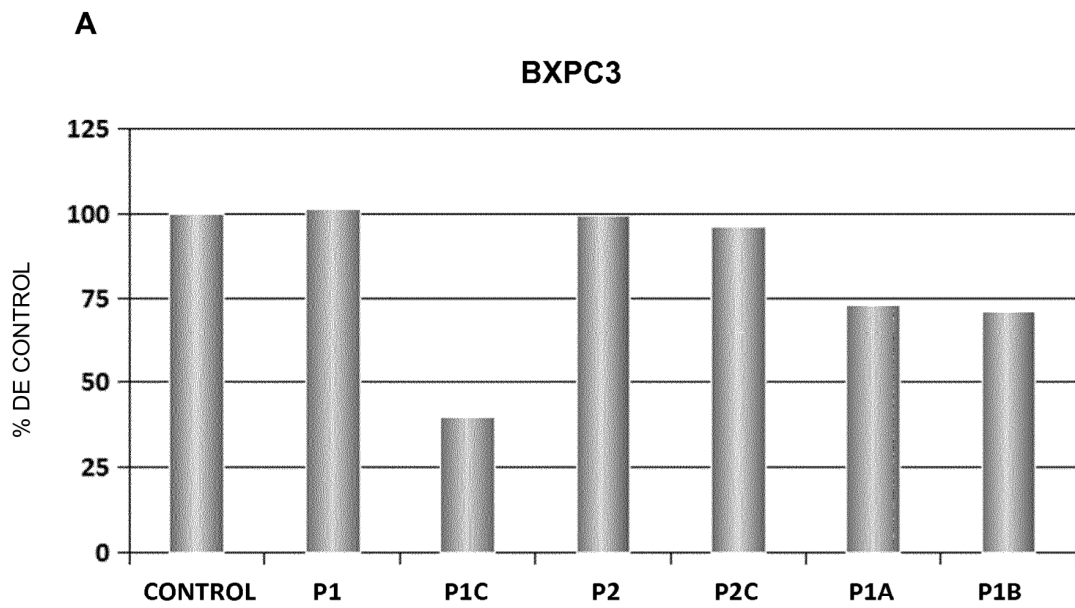


Fig. 1

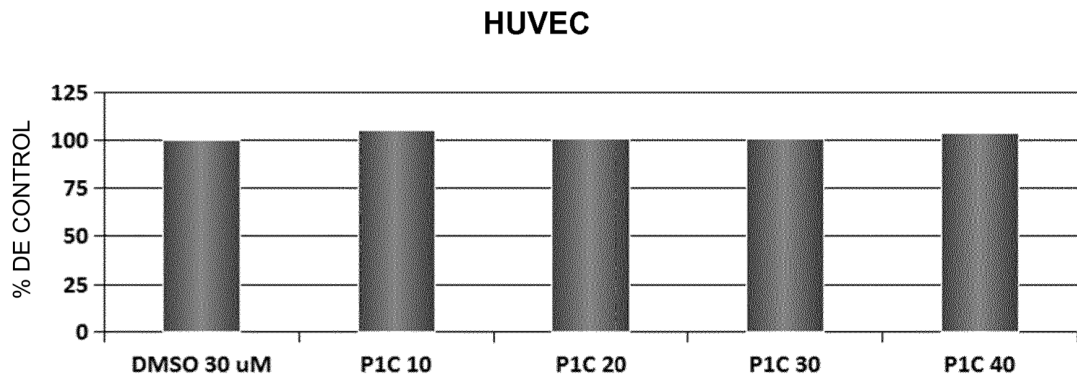


Fig. 2