



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 309**

51 Int. Cl.:
C12N 9/72 (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **98937112 .5**
86 Fecha de presentación : **24.07.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0950096**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.1999**

54 Título: **Fragmentos de uroquinasa anti-invasivos y anti-angiogénicos y su uso.**

30 Prioridad: **25.07.1997 US 900327**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es: **ANGSTROM PHARMACEUTICALS, Inc.**
665 San Rodolfo Dr. 124/119
Solana Beach, California 92075, US

72 Inventor/es: **Jones, Terence, R. y**
Mazar, Andrew, P.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Fragmentos de uroquinasa anti-invasivos y anti-angiogénicos y su uso.

5 **Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de la bioquímica, química orgánica y medicina y se refiere a compuestos péptidos y a métodos de uso de los mismos para tratar enfermedades y afecciones asociadas con el movimiento, migración y adherencia celular incluyendo las enfermedades que involucran angiogénesis como invasión tumoral y metástasis.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha demostrado que distintos procesos de enfermedades requieren la invasión o migración de células como parte de su patología. Estos incluyen invasión tumoral, metástasis tumoral, angiogénesis patológica, inflamación y endometriosis (Liotto *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 1996; Osborn, 1990; Mareel *et al.*, 1990; Aznavoorian *et al.*, 1993; Lennarz & Strittmatter, 1991; Fernandez-Shaw *et al.*, 1995).

En el caso de angiogénesis tumoral, las células endoteliales en reposo pueden volverse móviles como respuesta a distintos factores de crecimiento angiogénico así como a cambios en la membrana basal inducidos por células tumorales y distintas células accesorias que se encuentra en un tumor (Blood & Zetter, 1990; Liotto *et al.*, 1991; Odedra & Weiss, 1991). La neovascularización de un tumor permite la diseminación metastásica de células tumorales agresivas (1) al proporcionar una vía de escape para las células metastásicas así como (2) al nutrir el tumor proporcionando un entorno que favorece su crecimiento (Cornelius *et al.*, 1995; Blood & Zetter, 1990; Weaver *et al.*, 1997; Weinstat-Saslow & Steeg, 1994; Leek *et al.*, 1994).

El proceso de la metástasis tumoral puede considerarse como bidireccional, comprendiendo las siguientes etapas:

(1) las células endoteliales migran hacia un tumor como respuesta a un gradiente quimiotáctico producido por las células tumorales o por células accesorias (células estromales, leucocitos); y

(2) las células tumorales agresivas concomitantemente prosiguen su invasión hacia la neovasculatura en desarrollo.

Además, el proceso de invasión puede impulsar la angiogénesis mediante la liberación proteolítica de factores de crecimiento/angiogénicos ligados a la matriz extracelular (ECM), incluyendo el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), y el factor de crecimiento de hepatocito (HGF) así como otros factores incluyendo interleucina-8 (IL-8) y factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). También se generan fragmentos proteolíticos de ECM que son ellos mismos quimiotácticos tanto para las células tumorales como para las células endoteliales (Fox *et al.*, 1996; Leek *et al.*, 1994; Vlodavsky *et al.*, 1990; Sweeney *et al.*, 1991; Taipale y Keski-Oja, 1997).

Se ha sugerido que tan solo un 1-2% del total de las células en un tumor son capaces de metástasis. Como este enunciado se basa en una visión estática del fenotipo del tumor, probablemente es incorrecto. En realidad, la metástasis parece depender de células tumorales diseminadas que se exponen a un entorno que ayuda a su diseminación y supervivencia (Weaver *et al.*, 1997). En la mayoría de los pacientes que presentan un tumor primario clínicamente detectable, la metástasis ya ha sucedido (Welch, 1997). La enfermedad metastásica ocurre cuando los focos de células tumorales diseminadas colonizan un tejido que ayuda a su crecimiento y propagación, y esta diseminación secundaria de células tumorales es responsable de la morbilidad y mortalidad asociadas a la mayoría de los cánceres. El manejo clínico de la enfermedad metastásica es a menudo poco exitoso con las terapias citotóxicas convencionales. La metástasis difiere sustancialmente del crecimiento del tumor primario en que involucra el resultado simultáneo de muchos focos que son fenotípicamente similares desde el punto de vista de su agresividad. Este resultado depende de la capacidad de las células que han formado metástasis para invadir localmente y reclutar nuevos vasos sanguíneos.

Al evitar la interacción de las moléculas de adherencia, el importante proceso de migración/invasión celular y angiogénesis se puede disminuir o detener, con distintas consecuencias de importancia para esas enfermedades y afecciones que son causadas en parte por la migración celular, la invasión y la angiogénesis no deseada. Además del fenómeno vascular, esta migración/invasión celular es importante en la metástasis tumoral, que se puede evitar con las composiciones y métodos que se describen en esta memoria. La administración de cantidades efectivas de estas composiciones también interrumpirá las interacciones moleculares necesarias para la angiogénesis.

La técnica reconoce la necesidad de tratamientos novedosos para personas con cáncer, en particular para pacientes con cáncer metastásico que tienen los peores pronósticos. Tales tratamientos deben de carecer en la medida de lo posible de efectos secundarios no deseados, como los asociados con la quimioterapia convencional y algunas de las bioterapias experimentales. La presente invención tiene este objetivo. La inhibición de la invasión de células tumorales y la migración de células endoteliales (un importante componente del proceso angiogénico) proporciona un nuevo enfoque para tratar a personas que padecen de cáncer metastásico. Al inhibir la diseminación local de las células tumorales y la angiogénesis en los lugares metastásicos, debería inducirse la remisión de los focos metastásicos debido a la falta de su suministro de sangre favoreciendo así la subsiguiente expresión del programa apoptótico endógeno de las células.

Asimismo, la inhibición de la invasión de tejidos por los leucocitos y la angiogénesis resultante sería útil para tratar la inflamación y otros procesos de enfermedades en los que la invasión celular es parte del proceso patológico. Se sabe que la inflamación e invasión tumoral y metástasis y angiogénesis involucran mecanismos y factores extracelulares similares (Liotta *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 1996; Osborn, 1990; Mareel *et al.*, 1990; Aznavoorian *et al.*, 1993; Lennarz y Strittmatter, 1993).

Blasi *et al.* (publicación de EE.UU., 5.416.006) describen activadores de plasminógenos y su modificación química, en particular uPA y tPA fosforilados como agentes trombolíticos. Estos trabajadores examinaron uPA fosforilado generando fosfopéptidos tripticos a partir de este y se dieron cuenta de la existencia de KPSSPPEELK [SEC. ID N°:1:] (correspondiente a las posiciones 136-145 de uPA). No se analizó ninguna función de este decapeptido ni se le atribuyó propiedad de relevancia funcional alguna. Lo que es más importante, según se describe en la presente memoria, este péptido (no fosforilado), con o sin caperuza ("cap"), está inactivo en un ensayo *in vitro* de invasión celular.

Las menciones de los documentos anteriores no pretenden ser una admisión de que cualquiera de ellos se trata de un antecedente pertinente. Todas las declaraciones relativas a la fecha o las declaraciones sobre el contenido de estos documentos se basa en la información disponible para el solicitante y no constituye admisión alguna sobre la corrección de las fechas o el contenido de estos documentos.

Sumario de la invención

La presente solicitud describe métodos y composiciones para tratar enfermedades y procesos mediados por invasión celular y/o angiogénesis no deseada e incontrolada administrando a un animal una composición que comprende un oligopéptido o derivado químico en una dosificación suficiente para inhibir la invasión o angiogénesis. Esto es particularmente útil para tratar o suprimir el crecimiento de tumores. La administración de la composición a un ser humano o sujeto con tumores que han formado metástasis prevascularizadas evitará el crecimiento o expansión de esos tumores.

De esta manera, la presente invención se dirige a un compuesto péptido con la secuencia Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu (también abreviado en un código de aminoácidos como KPSSPPEE) [SEC. ID N°:2] o un derivado químico del mismo. El péptido o derivado tiene una "caperuza" ("cap") en el terminal amino y/o carboxilo, en donde (a) acetilo (abreviado como "Ac") se enlaza en a N en la terminal amino y (b) un grupo amido (abreviado como "Am") se enlaza a C en el grupo carboxilo terminal. En general, este péptido con caperuza se denominará por escrito como "Ac-KPSSPPEE-Am" a lo largo de este documento, utilizando el código de aminoácidos de una sola letra e indicando los grupos bloqueadores como Ac y Am.

El péptido o derivado de esta invención tiene una o más de las siguientes actividades:

(a) por lo menos aproximadamente un 20% de la actividad biológica de Ac-KPSSPPEE-Am en uno o más de los siguientes ensayos biológicos *in vitro*: (i) invasión en un ensayo Matrigel®; (ii) formación de tubo endotelial en Matrigel®, o (iii) formación de tubo endotelial en una matriz de fibrina en la presencia de factor de crecimiento de fibroblasto básico y factor de crecimiento de endotelio vascular; o

(b) actividad de unión de manera que compita con un Ac-KPSSPPEE-Am marcado para unirse a una célula o molécula que tiene un sitio de unión para Ac-KPSSPPEE-Am.

En una realización preferida, el péptido o la variante de péptido tiene caperuza en ambos extremos con un grupo acetilo en la terminal N y un grupo amida en la terminal C.

La invención además se dirige a una composición farmacéutica útil para inhibir la invasión de células tumorales o angiogénesis, que comprende (a) cualquiera de los péptidos o derivados químicos anteriores y (b) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en esta memoria un método para inhibir la invasión de células tumorales que comprende hacer que las células entren en contacto con una cantidad eficaz de péptido o derivado como se mencionó anteriormente.

También se describe un método para inhibir la invasión tumoral o metástasis en un sujeto que comprende administrar al sujeto cualquiera de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente.

También se describe un método para inhibir la migración celular, la invasión y la proliferación celular inducida por migración celular, o angiogénesis en un sujeto con una enfermedad o afección asociada con una migración celular no deseada, invasión, proliferación inducida por migración o angiogénesis que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica como se describe anteriormente. En cualquiera de los métodos antecedentes, la enfermedad o afección que se trata puede ser un crecimiento tumoral primario, una invasión o metástasis tumoral, aterosclerosis, reestenosis vascular posterior a angioplastia con implantación de balón, formación de neointima posterior a trauma vascular, reestenosis de injerto vascular, fibrosis asociada a un estado inflamatorio crónico, fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por quimioterapia, curación de heridas con cicatrices y fibrosis, psoriasis,

trombosis venosa profunda u otra enfermedad o afección en la que la angiogénesis sea patogénica. Los métodos de tratamiento son los más preferidos para el crecimiento tumoral, la invasión o la metástasis.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto inhibitorio de Ac-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am ($5 \mu\text{M}$) sobre la invasión *in vitro* de líneas celulares tumorales tanto humanas como de rata (Mat BIII) en un sistema de Matrigel® como se describe en los Ejemplos. La barra izquierda de cada par es el grupo control y la barra derecha representa células que responden en presencia del péptido. La figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de distintos péptidos sobre la invasión *in vitro* de células PC-3 en un sistema Matrigel® como se describe en los Ejemplos. Todos los compuestos se analizaron a $5 \mu\text{M}$. Se examinaron los siguientes péptidos: Ac-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am (Ac-KPSSPPEE-Am) (SEC. ID N°: 2), también denominada Å6, y las siguientes variantes: Ac-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am (Ac-KPSSPPE-Am), Ac-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am (Ac-PSSPPEE-Am) así como SEC. ID N°:1 (Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Leu-Lys) ya sea con caperuza (Ac-KPSSPPEELK-Am) o sin caperuza (KPSSPPEELK).

La figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de péptidos adicionales sobre la invasión *in vitro* de células PC3 como se mencionó anteriormente, a dos concentraciones diferentes. Además de (Ac-KPSSPPEE-Am) que tiene una notable actividad inhibitoria, los péptidos adicionales analizados son Å13 (KPSSPPEE, sin caperuza) y Å14 (Ac-KPPSSPPEEL-Am), ambos sin actividad inhibitoria, y Å15, (GGKPPSSPPEE-Am, con caperuza solo en el terminal C), que tiene una actividad inhibitoria baja a la mayor concentración. Los péptidos se comparan con un control negativo de factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF).

La figura 4 es un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación de células endoteliales *in vitro* mediante by Ac-KPSSPPEE-Am (Å6) a lo largo de un periodo de ensayo de tres días. Se vio crecimiento celular normal en la presencia de 2 ng/mL , siendo bFGF el control negativo, mientras que no sucedió una proliferación celular significativa en presencia de $50 \mu\text{M}$ del péptido Å6.

La figura 5 es un gráfico que muestra la inhibición relacionada con la dosis de la migración de células endoteliales humanas *in vitro* mediante Ac-KPSSPPEE-Am (Å6), siendo bFGF el control negativo.

La figura 6 es un gráfico que muestra la inhibición de la progresión del tumor (crecimiento) en ratas de la línea celular singénica de cáncer de mama de ratas MatBIII mediante el tratamiento con el péptido Å6.

La figura 7 es un gráfico que muestra que el péptido Å6 inhibe la metástasis de las células de cáncer de mama MatBIII en los nódulos linfáticos en ratas singénicas.

La figura 8 es un gráfico que muestra que el péptido Å6 frena el crecimiento de células de cáncer humano (línea MCA-MB-231) *in vivo* en un modelo de xenoinjerto en ratones atímicos.

La figura 9 es un gráfico que muestra que el péptido Å6 inhibe la diseminación metastásica de células de cáncer humano a nódulos linfáticos en ratones atímicos. Los ratones tratados con este péptido no tuvieron metástasis macroscópicas detectables en los pulmones o en los nódulos linfáticos.

Descripción de las realizaciones preferidas

Los presentes inventores han descubierto un nuevo péptido y derivados del mismo que actúan como inhibidores de la angiogénesis y la invasión y han ideado varios métodos para utilizar este péptido para el diagnóstico, terapia e identificación de receptores. El péptido es un inhibidor potente y específicos de (a) invasión celular, (b) angiogénesis en los sitios tumorales incluyendo los sitios de metástasis, y (c) las respuestas inflamatorias.

Además, el péptido y sus derivados están diseñados para ser altamente solubles en tampones acuosos y fluidos corporales, pero no en lípidos. Esta propiedad limita la división no específica en membranas. La división no específica de compuestos en y a través de membranas es una causa frecuente de toxicidad. Los compuestos de esta invención tienen una toxicidad mínima porque debido a su carga coulombica no se espera que se dividan en las células. El o los objetivos de las composiciones son extracelulares, y los métodos de esta invención se basan en las composiciones que actúan primero en el espacio extracelular. Por lo tanto, es deseable mantener el compuesto en el espacio extracelular.

Se obtienen ventajas farmacológicas importantes debido al alto límite de solubilidad de los compuestos, permitiendo su entrega en altas concentraciones en ausencia de codisolventes o excipientes extraordinarios. Los inventores de la presente invención han mostrado que los compuestos (véase el Ejemplo II) bloquean la invasión tanto de células tumorales humanas como de rata *in vitro* en el sistema Matrigel®.

Asimismo, bloquean la formación del tubo celular endotelial como respuesta a bFGF y VEGF ya sea en matriz de fibrina o cuando las células endoteliales están en una placa sobre Matrigel®.

Los compuestos de la invención también inhiben la metástasis experimental en modelos de xenoinjerto en ratones atímicos utilizando la línea celular del carcinoma prostático humano, PC-3, transfectada con proteína verde fluorescente como indicador. Finalmente los compuestos también inhiben la progresión del tumor, la metástasis espontánea y la angiogénesis en un modelo cáncer de mama de rata singénica.

Las composiciones péptidas

El péptido con caperuza inhibitorio original descubierto por los presentes inventores tiene 8 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 911 Da. Este péptido preferido está caracterizado por la secuencia: CH₃CO-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-NH₂ [SEC. ID N°:2].

Las terminales amino y carboxilo están preferentemente bloqueadas o tiene una caperuza con acetilo (CH₃CO-, enlazado al terminal amino N; también abreviada como "Ac") y amido (-NH₂ enlazado al grupo carboxilo terminal C; también abreviado como "Am"), respectivamente. También se hará referencia a este péptido más adelante utilizando el código de una sola letra que indica los grupos bloqueadores como grupos Ac y Am: Ac-KPSSPPEE-Am.

La función de caperuza en la terminal N está preferentemente en un enlace al grupo amino terminal y puede seleccionarse del grupo que consiste en:

formilo; alcanilo, con de 1 a 10 átomos de carbono, como acetilo, propionilo, butirilo; alquenoilo, con de 1 a 10 átomos de carbono, como hex-3-enoilo; alquinoilo, con de 1 a 10 átomos de carbono, como hex-5-inoilo; aroilo, como benzoilo o 1-naftoilo; heteroarilo, como 3-pirroilo o 4-quinoloilo; alquil-sulfonilo, como metanosulfonilo; arilsulfonilo, como benzenosulfonilo o sulfanilo; heteroarilsulfonilo, como piridin-4-sulfonilo; alcanilo sustituido, con de 1 a 10 átomos de carbono, como 4-aminobutirilo; alquenoilo sustituido, con de 1 a 10 átomos de carbono, como 6-hidroxi-hex-3-enoilo; alquinoilo sustituido, con de 1 a 10 átomos de carbono, como 3-hidroxi-hex-5-inoilo; aroilo sustituido, como 4-clorobenzoilo u 8-hidroxi-naft-2-oilo; heroarilo sustituido, como 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidro-3-metil-quinazolin-6-oilo; alquilsulfonilo sustituido, como 2-aminoetanosulfonilo; arilsulfonilo sustituido, como 5-dimetilamino-1-naftalensulfonilo; heteroarilsulfonilo sustituido, como 1-metoxi-6-isoquinolinsulfonilo; carbamoilo o tiocarbamoilo; carbamoilo sustituido (R'-NH-CO) o tiocarbamoilo sustituido (R'-NH-CS) en donde R' es alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, heteroarilo, alquilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo sustituido, arilo sustituido, o heteroarilo sustituido; carbamoilo sustituido (R'-NH-CO) y tiocarbamoilo sustituido (R'-NH-CS) en donde R' es alcanilo, alquenoilo, alquinoilo, aroilo, heteroarilo, alcanilo sustituido, alquenoilo sustituido, alquinoilo sustituido, aroilo sustituido, o heteroarilo sustituido, todos ellos según se ha definido anteriormente; Lys-(Gly)_n en donde n = 14; o Tyr-(Gly)_n en donde n = 14.

La función de caperuza de la terminal C puede estar en un enlace amida con el carboxilo terminal o en un enlace éster con el carboxilo terminal. Las funciones de caperuza que prevén un enlace amida se designan como NR¹R² en las que R¹ y R² pueden ser extraídos independientemente del siguiente grupo: hidrógeno; alquilo, preferentemente con de 1 a 10 átomos de carbono, como metilo, etilo, isopropilo; alquenoilo, preferentemente con de 1 a 10 átomos de carbono, como prop-2-enilo; alquinoilo, preferentemente con de 1 a 10 átomos de carbono, como prop-2-inilo; alquilo sustituido con de 1 a 10 átomos de carbono, como hidroxialquilo, alcoxialquilo, mercaptoalquilo, alquiltioalquilo, halogenoalquilo, cianoalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, alcanoilalquilo, carboxialquilo, carbamoilalquilo; alquenoilo sustituido con de 1 a 10 átomos de carbono, como hidroxialquenoilo, alcoxialquenoilo, mercaptoalquenoilo, alquiltioalquenoilo, halogenoalquenoilo, cianoalquenoilo, aminoalquenoilo, alquilaminoalquenoilo, dialquilaminoalquenoilo, alcanoilalquenoilo, carboxialquenoilo, carbamoilalquenoilo; alquinoilo sustituido con de 1 a 10 átomos de carbono, como hidroxialquinoilo, alcoxialquinoilo, mercaptoalquinoilo, alquiltioalquinoilo, halogenoalquinoilo, cianoalquinoilo, aminoalquinoilo, alquilaminoalquinoilo, dialquilaminoalquinoilo, alcanoilalquinoilo, carboxialquinoilo, carbamoilalquinoilo; aroilalquilo con hasta 10 átomos de carbono, como fenacilo o 2-benzoiletilo; arilo, como fenilo o 1-naftilo; heteroarilo, como 4-quinoloilo; alcanilo con de 1 a 10 átomos de carbono, como acetilo o butirilo; aroilo, como benzoilo; heteroarilo, como 3-quinoloilo; O' o NR'R'' en donde R' y R'' son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, acilo, aroilo, sulfonilo, sulfino, o SO₂-R''' o SO-R''' en donde R''' es alquilo, arilo, heteroarilo, alquenoilo, o alquinoilo sustituido o no sustituido. Las funciones de caperuza que prevén un enlace éster se denominan O, en las cuales R puede ser: alcoxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, heteroaralquilo, alcoxi sustituido; ariloxi sustituido; heteroariloxi sustituido; aralquilo sustituido; o heteroaralquilo sustituido.

Ya sea la función de capuchón del terminal N o del terminal C, o ambas, pueden tener una estructura tal que la molécula con caperuza funcione como profármaco (un derivado farmacológicamente inactivo de la molécula del fármaco madre) que sufre una transformación espontánea o enzimática en el cuerpo para liberar el fármaco activo y que tiene propiedades de entrega mejoradas en comparación con la molécula del fármaco madre (Bundgaard, 1985).

La elección juiciosa de los grupos caperuza permite agregar otras actividades al péptido. Por ejemplo, la presencia de un grupo sulfhidrido enlazado a la caperuza del terminal N o C permite conjugar el péptido derivatizado a otras moléculas.

*Producción de péptidos y derivados**Procedimientos generales de síntesis química*

5 Los péptidos de la invención pueden prepararse utilizando tecnología de ADN recombinante. No obstante, debido a su longitud, se preparan preferentemente utilizando síntesis de fase sólida, según describe de manera general Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85:2149-54 (1963), aunque también son útiles otras síntesis químicas equivalentes conocidas en la técnica. La síntesis de péptidos de fase sólida se puede iniciar desde el terminal C del péptido acoplando un aminoácido protegido a una resina adecuada. Ese material inicial se puede preparar acoplando un α -aminoácido
 10 mediante un enlace de éster a una resina clorometilada o a una resina hidroximetilada, o mediante un enlace amida a una resina BHA o MBHA.

La preparación de la resina hidroximetilada la describen Bodansky *et al.*, 1966. Las resinas clorometiladas están disponibles comercialmente de los laboratorios BioRad Laboratories, Richmond, California, y Lab. Systems, Inc. La
 15 preparación de esa resina la describen Stewart *et al.*, 1969. Los soportes de resina BHA y MBHA están disponibles comercialmente y por lo general se utilizan solo cuando el polipéptido deseado que se está sintetizando tiene una amida no sustituida en el terminal C.

Los aminoácidos se pueden acoplar a la cadena de péptidos en crecimiento utilizando métodos bien conocidos en
 20 la técnica para la formación de enlaces péptidos. Por ejemplo, un método involucra convertir el aminoácido en un derivado que volverá el grupo carboxilo del aminoácido más susceptible a reaccionar con el grupo amino de la terminal N de la cadena péptida en crecimiento. Específicamente, la terminal C del aminoácido protegido puede convertirse en un anhídrido mixto mediante la reacción de la terminal C con cloroformato de etilo, cloroformato de fenilo, cloroformato de sec-butilo, cloroformato de isobutilo, o cloruro de pivaloilo o cloruros ácidos similares. Alternativamente, la
 25 terminal C del aminoácido puede convertirse en un éster activo como un éster 2,4,5-triclorofenílico, un éster pentaclorofenílico, un éster pentafluorofenílico, un éster p-nitrofenílico, un éster N-hidroxisuccinimídico, o un éster formado a partir de 1-hidroxibenzotriazol. Otro método de acoplamiento involucra el uso de un agente de acoplamiento adecuado, como N,N'-diciclohexilcarbodiimida o N,N'-diisopropilcarbodiimida. Otros agentes de acoplamiento apropiados, evidentes para los expertos en la técnica, se muestran en Gross *et al.* 1979, que se incorpora a la presente memoria por
 30 referencia. El grupo α -amino de cada aminoácido utilizado en la síntesis del péptido debe estar protegido durante la reacción de acoplamiento para evitar reacciones colaterales que involucren su función α -amino activa. Determinados aminoácidos contienen grupos funcionales de cadena lateral reactivos (por ejemplo, sulfhidrilo, amino, carboxilo, e hidroxilo) y tales grupos funcionales también deben estar protegidos con grupos protectores adecuados para evitar que suceda una reacción química en (1) el sitio del grupo α -amino o en (2) un sitio de cadena lateral reactivo durante tanto
 35 la etapa de acoplamiento inicial como en la subsiguiente.

En la selección de un grupo protector determinado para utilizarlo para sintetizar los péptidos, se siguen típicamente las siguientes reglas generales. Específicamente, un grupo protector de α -amino (1) nunca debe volver inerte la función α -amino bajo las condiciones utilizadas en la reacción de acoplamiento, (2) debe ser fácilmente eliminable después de
 40 la reacción de acoplamiento bajo condiciones que no eliminen los grupos protectores de cadena lateral y no alterará la estructura del fragmento péptido, y (3) debe reducir sustancialmente la posibilidad de racemización con la activación, inmediatamente antes del acoplamiento.

Por otro lado, un grupo protector de cadena lateral (1) debe volver inerte al grupo funcional de cadena lateral
 45 bajo las condiciones utilizadas en la reacción de acoplamiento, (2) debe ser estable bajo las condiciones utilizadas para eliminar el grupo protector de α -amino, y (3) debe ser fácilmente eliminable del péptido totalmente ensamblado deseado bajo condiciones de reacción que no alteren la estructura de la cadena péptida.

Será evidente para los expertos en la técnica que los grupos protectores que se sabe que son útiles para la síntesis
 50 de péptidos varían en reactividad con los agentes utilizados para su eliminación. Por ejemplo, determinados grupos protectores, como trifenilmetilo y 2-(p-bifenil)isopropiloxicarbonilo, son muy lábiles y se pueden escindir bajo condiciones ácidas moderadas. Otros grupos protectores, como t-butiloxicarbonilo (BOC), t-amiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, y p-metoxibenziloxicarbonilo, son menos lábiles y requieren ácidos moderadamente fuertes para su eliminación, como trifluoroacético, clorhídrico, trifluoruro de boro en ácido acético. Sin embargo, otros grupos protectores,
 55 como benziloxicarbonilo (CBZ o Z), halobenziloxicarbonilo, p-ni-trobenziloxicarbonilo cicloalquiloxicarbonilo, e isopropiloxicarbonilo son incluso menos lábiles y requieren ácidos más fuertes, como fluoruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, o trifluoroacetato de boro en ácido trifluoroacético para su eliminación. Los grupos protectores adecuados, conocidos en la técnica se describen en Gross *et al.* 1981.

60 Entre las clases de grupos protectores de aminoácidos útiles para proteger el grupo α -amino o para proteger un grupo de cadena lateral se incluyen los siguientes.

(1) Para un grupo α -amino, las tres clases típicas de grupos protectores son:

65 (a) grupos protectores de tipo uretano aromáticos, como fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC), CBZ, y CBZ sustituido, como, p-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenziloxicarbonilo, p-bromobenziloxicarbonilo, y p-metoxibenziloxicarbonilo, o-clorobenziloxicarbonilo, 2,4-diclorobenziloxicarbonilo, 2,6-diclorobenziloxicarbonilo, y similares;

ES 2 275 309 T3

(b) grupos protectores de tipo uretano alifáticos, como BOC, t-amiloxicarbonilo, isopropiloxi-carbonilo, 2-(p-bifenil)isopropiloxicarbonilo, aliloxicarbonilo y similares; y

(c) grupos protectores de tipo uretano cicloalquilo, como ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, y ciclohexiloxicarbonilo.

Los grupos protectores de α -amino preferidos son BOC y FMOC.

(2) Para los grupos amino de cadenas laterales presentes en Lys, la protección puede ser mediante cualquiera de los grupos mencionados anteriormente en (1) como BOC, 2-clorobenziloxicarbonilo y similares.

(3) Para los grupos guanidino de Arg, la protección puede estar proporcionada por nitro, tosilo, CBZ, adamantiloxicarbonilo, 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo, 2,3,6-trimetil-4-metoxifenilsulfonilo, o grupos BOC.

(4) Para los grupos hidroxilo de Ser o Thr, la protección puede estar proporcionada, por ejemplo, por t-butilo; benzilo (BZL); o BZL sustituido, como p-metoxibenzilo, p-nitrobenzilo, p-clorobenzilo, o-clorobenzilo, y 2,6-diclorobenzilo.

(5) Para el grupo carboxilo de Asp o Glu, la protección puede ser, por ejemplo, por esterificación usando grupos como BZL, t-butilo, ciclohexilo, ciclopentilo, y similares.

(6) Para el nitrógeno del imidazol de His, el resto benziloximetilo (BOM) o tosilo se utiliza adecuadamente como un grupo protector.

(7) Para el grupo hidroxilo fenólico de Tyr, un grupo protector como tetrahidropiraniilo, terc-butilo, tritilo, BZL. Clorobenzilo, 4-bromobenzilo, y 2,6-diclorobenzilo se utilizan adecuadamente. El grupo protector preferido es bromobenziloxicarbonilo.

(8) Para el grupo amino de cadena lateral de Asn o Gin, se emplea preferentemente xantilo (Xan).

(9) Para Met, el aminoácido se deja preferentemente sin protección.

(10) Para el grupo tio de Cys, se emplea típicamente p-metoxibenzilo.

El primer aminoácido de la terminal C de la cadena de péptidos en crecimiento, por ejemplo, Glu, se protege típicamente en la posición α -amino mediante un grupo protector adecuadamente seleccionado como BOC. El BOC-Glu-(γ -ciclohexil)-OH puede ser acoplado primero a una resina benzilhidrilamina utilizando isopropilcarbodiimida a aproximadamente 25°C durante dos horas con agitación o a una resina clorometilada conforme al procedimiento establecido en Horiki *et al.*, 1978. Después del acoplamiento del aminoácido protegido con BOC al soporte de resina, el grupo protector de α -amino se elimina típicamente utilizando ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno o TFA solo. La reacción de desprotección del grupo α -amino puede suceder en un amplio intervalo de temperaturas, pero usualmente se realiza a una temperatura de entre 0°C y temperatura ambiente.

Otros reactivos de desprotección estándar del grupo α -amino, como HCl en dioxano, y las condiciones para la eliminación de grupos protectores de α -amino específicos son conocidos por los expertos en la técnica, como los descritos en Lubke *et al.*, 1975. Después de eliminar el grupo protector de α -amino, el grupo α -amino no protegido, generalmente con la cadena lateral todavía protegida, puede acoplarse por etapas en la secuencia pretendida.

Una alternativa al planteamiento en etapas es el método de condensación de fragmentos en el cual péptidos preformados de longitud corta, representando cada uno parte de la secuencia deseada, se acoplan a una cadena en crecimiento de aminoácidos enlazada a un soporte de fase sólida. Para este planteamiento en etapas, un reactivo de acoplamiento particularmente adecuado es N,N'-dicicloheailcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida. Asimismo, para el planteamiento de fragmentos, la selección del reactivo de acoplamiento, así como la elección del patrón de fragmentación necesario para acoplar fragmentos de la naturaleza y tamaño deseados son importantes para obtener éxito y son conocidos por los expertos en la técnica.

Cada aminoácido protegido o secuencia de aminoácidos protegida se introduce usualmente en el reactor de fase sólida en cantidades en exceso de las cantidades estequiométricas, y el acoplamiento se lleva a cabo adecuadamente en un disolvente orgánico, como dimetilformamida (DMF), CH₂Cl₂ o mezclas de los mismos. Si ocurre un acoplamiento incompleto, el procedimiento de acoplamiento habitualmente se repite antes de eliminar el grupo protector de N-amino en preparación del acoplamiento al siguiente aminoácido. Después de eliminar el grupo protector de α -amino, los restantes aminoácidos protegidos de α -amino y de la cadena lateral se pueden acoplar en etapas en la secuencia pretendida. El éxito de la reacción de acoplamiento en cada etapa de la síntesis se puede controlar. Un método preferido para controlar la síntesis es mediante la reacción de ninhidrina, según lo describen Kaiser *et al.*, 1970. Las reacciones de acoplamiento también se pueden realizar automáticamente utilizando métodos y dispositivos comerciales bien conocidos, por ejemplo, un sintetizador Beckman 990 Peptide Synthesizer.

Una vez completada la secuencia de péptidos deseada, el péptido protegido debe ser escindido del soporte de resina, y todos los grupos protectores deben ser eliminados. La reacción de escisión y eliminación de los grupos protectores se logra adecuadamente a la vez o de forma consecutiva a las reacciones de desprotección. Cuando el enlace que ancla el péptido a la resina es un enlace de éster, puede ser escindido por cualquier reactivo que sea capaz de romper un enlace de éster y de penetrar la matriz de resina. Un método especialmente útil es mediante el tratamiento con fluoruro de hidrógeno anhidro líquido. Este reactivo usualmente no solo escinde el péptido de la resina si no que también elimina todos los grupos protectores lábiles al ácido y, así, directamente proporcionará el péptido totalmente desprotegido. Cuando están presentes grupos protectores adicionales que no son lábiles al ácido, se deben realizar etapas de desprotección adicionales. Estas etapas se pueden realizar antes o después del tratamiento de fluoruro de hidrógeno descrito anteriormente, conforme a las necesidades y circunstancias específicas.

Cuando se utiliza una resina clorometilada, el tratamiento de escisión/desprotección de fluoruro de hidrógeno generalmente da como resultado la formación de los ácidos del péptido libres. Cuando se usa una resina de benzhidrilamina, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno generalmente da como resultado las amidas del péptido libres. La reacción con fluoruro de hidrógeno en presencia de anisol y dimetilsulfuro a 0°C durante una hora típicamente eliminará los grupos protectores de cadenas laterales y, concomitantemente liberará al péptido de la resina.

Cuando se desea escindir el péptido sin eliminar los grupos protectores, el péptido protegido-resina se puede someter a metanólisis, proporcionando así un péptido protegido en el cual el grupo carboxilo de la terminal C está metilado. Este éster metílico puede ser hidrolizado posteriormente bajo condiciones alcalinas moderadas para proporcionar el grupo carboxilo de la terminal C libre. Los grupos protectores en la cadena del péptido pueden entonces eliminarse mediante el tratamiento con un ácido fuerte, como fluoruro de hidrógeno líquido. Una técnica particularmente útil para la metanólisis es la de Moore *et al.*, 1977, en la cual el péptido protegido-resina se trata con metanol y cianuro de potasio en presencia de un éter de corona.

Otros métodos para escindir un péptido protegido de la resina cuando se emplea una resina clorometilada incluyen (1) amoniólisis y (2) hidrazinólisis. Si se desea, la amida o hidrazida de la terminal C resultante pueden hidrolizarse al resto carboxilo de la terminal C libre, y los grupos protectores se pueden eliminar convencionalmente. El grupo protector presente en el grupo α -amino de la terminal N puede eliminarse o antes o después de que el péptido protegido se escinde del soporte. La purificación de los péptidos de la invención se logra típicamente utilizando técnicas cromatográficas, como la HPLC preparativa (incluyendo la HPLC de fase reversa), permeación de gel, intercambio iónico, cromatografía de partición, cromatografía de afinidad (incluyendo columnas de anticuerpos monoclonales), y similares, u otras técnicas convencionales como la distribución contracorriente o similares.

35 Variantes de sustitución y adición de aminoácidos

También se describen en la presente memoria péptidos en los que por lo menos un residuo de aminoácido y preferentemente solo uno, ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Para una descripción detallada de la química y la estructura de la proteína véase Schulz, G.E. *et al.*, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1979, y Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1984. Los tipos de sustituciones que se pueden hacer en la molécula del péptido de la presente invención son sustituciones conservadoras y se define en esta memoria como intercambios con uno de los siguientes grupos:

1. Residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares: por ejemplo, Ala, Ser, Thr, Gly;
2. Residuos polares con carga negativa y sus amidas: por ejemplo, Asp, Asn, Glu, Gin;
3. Residuos polares con carga positiva: por ejemplo, His, Arg, Lys;

Pro, debido a su inusual geometría, restringe mucho la cadena. Los cambios sustanciales en las propiedades funcionales se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservadoras, como entre en vez de dentro de los grupos anteriores (o dos grupos de aminoácidos distintos que no se muestran arriba), que diferirán más significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena del péptido en el área de la sustitución (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. La mayoría de las sustituciones conforme a la presente invención son las que no producen cambios radicales en las características de la molécula del péptido. Incluso cuando es difícil predecir el efecto exacto de una sustitución antes de hacerla, un experto en la técnica apreciará que el efecto se puede evaluar mediante ensayos de detección de rutina, preferentemente los ensayos biológicos descritos más adelante. Las modificaciones de las propiedades de los péptidos incluyendo la estabilidad redox o térmica, la hidrofobicidad, la susceptibilidad a la degradación proteolítica o la tendencia a agregarse con los vehículos o en multímeros se ensayan mediante métodos bien conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

Un grupo de variantes de sustitución de KPSSPPEE tiene el Glu en la posición 7 u 8 (o ambas) de la SEC. ID N°:2 reemplazado por uno o dos cualquiera de Gin, Asp o Asn.

Otros derivados pueden incluir además la sustitución de Ser en la posición 3 ó 4 (o ambas) de la SEC. ID N°: 2 con uno o dos cualquiera de los siguientes: Thr, Ala, Gly, hSer o Val β OH.

Además, el Lys en la posición 1 de la SEC. ID N°:2 puede ser reemplazado por His, Arg, Gln, Orn, Cit o Hci.

Otros derivados tienen Pro en la posición 2, 5 ó 6 reemplazado por Hyp (hidroxiprolina).

5 También se describen en la presente memoria variantes de adición en las que dos o más residuos se agregan al terminal C después de Glu (o después de cualquiera de sus sustituyentes mencionados anteriormente) en el SEC. ID N°:2. Estos residuos pueden ser Leu-(Gly)_n, Ile-(Gly)_n, Val-(Gly)_n, Nva-(Gly)_n, o Nle-(Gly)_n, en los que Nva es norvalina, Nle es norleucina, y n = 1-10.

10 También se describen en la presente memoria variantes de adición en las que uno o más residuos es/son agregados a la terminal N antes de Lys (o de cualquiera de sus sustituyentes mencionados anteriormente) en la SEC. ID N°:2. estos residuos pueden ser Gly, Lys-(Gly)_n, Tyr-(Gly)_n, o Gly-(Gly)_n en los que n = 1-10.

15 Otro derivado es un variante de adición 9-mer en el que cualquiera de los siguientes aminoácidos se agrega al terminal C después de Glu (o de cualquiera de sus sustituyentes mencionados anteriormente) en la SEC. ID N°:2: Leu, He, Val, Nva, Nle, Met, Ala, o Gly.

Los péptidos sin caperuza de cualquiera de las secuencias anteriores con terminales N y C libres, por ejemplo, NH₂-KPSSPPEE-OH [SEC. ID N°:2].

20 *Derivados químicos*

Los “derivados químicos” de KPSSPPEE [SEC. ID N°:2] contienen restos químicos adicionales que normalmente no forman parte del péptido. Las modificaciones covalentes del péptido están incluidas en el alcance de esta invención. 25 Tales modificaciones se pueden introducir en la molécula haiceno reaccionar residuos de aminoácido objetivo del péptido con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales o los residuos terminales seleccionados.

30 Los péptidos con caperuza que se tratan anteriormente son ejemplos de los derivados químicos preferidos del péptido sin caperuza “natural”.

A continuación siguen otros ejemplos de derivados químicos del péptido.

35 Los residuos terminales lisinilo y amino se derivan con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con un anhídrido carboxílico cíclico tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar α-amino que contienen residuos incluyen imidoésteres como picolinimido de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2.4 pentanodiona; y la reacción catalizada con transaminasa con glioxilato.

40 Los grupos laterales carboxilo, aspártico o glutámico, pueden modificarse selectivamente mediante reacción con carbodiimidas (R-N=C=N-R') como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspártico y glutámico se pueden convertir en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con amoníaco.

45 Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilos de residuos serilo o treonilo, la metilación del grupo amino de lisina (Creighton, *supra*, pp. 79-86), la acetilación de la amina de la terminal N, y la amidación de los grupos carboxilo de la terminal C.

50 Para cada secuencia péptida individual que se informa en esta memoria, esta invención incluye la secuencia retro-inversa correspondiente, en la que la dirección de la cadena de péptidos se ha invertido y en la que todos los aminoácidos pertenecen a la serie D. Por ejemplo, el análogo retro-inverso del péptido de la serie L natural KPSSPPEE es EEPPSSPK que está compuesto de aminoácidos de la serie D y en el que E es la terminal N y K es la terminal C. Por ejemplo, el análogo retro-inverso del péptido con caperuza de la serie L natural Ac-KPSSPPEE-Am es Ac-EEPPSSPK-Am que está compuesto de aminoácidos de la serie D y en el que la terminal N, E, está acetilada y la terminal C, K, está amidada. Todo el rango completo de grupos de caperuza de terminal N y el rango completo de grupos de caperuza de terminal C especificados para los péptidos de la serie L también están previstos para los péptidos de la serie D. 55

60 También están incluidos los péptidos en los que uno o más D-aminoácidos ha/han sido sustituidos por uno o más L-aminoácidos. Adicionalmente, se pueden proporcionar aminoácidos modificados o derivados químicos de los aminoácidos de manera que el péptido contiene restos químicos o aminoácidos modificados adicionales que no forman parte normalmente de una proteína natural. Tales restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica, y similares. Los restos capaces de mediar tales efectos se informan, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania (1980).

65

Péptidos multiméricos

Se pueden producir péptidos más largos en los que la secuencia peptídica básica de aproximadamente 7-9 aminoácidos se repite desde aproximadamente dos hasta aproximadamente 100 veces, con o sin la intervención de espaciadores o enlazadores. Un multímero del péptido KPSSPPEE se muestra en la siguiente fórmula $(\text{KPSSPPEE-X}_m)_n$ -KPSSPPEE en la que $m = 0$ ó 1 , $n = 1$ -100. X es un grupo espaciador, preferentemente alquilo C_1 - C_{20} , alqueno C_1 - C_{20} , alquino C_1 - C_{20} , poliéter C_1 - C_{20} que contiene hasta 9 átomos de oxígeno o Gly_z . ($z = 1$ -10).

Se entiende que estos multímeros se pueden construir a partir de cualquiera de los péptidos descritos en esta memoria. Además, un multímero péptido puede comprender diferentes combinaciones de monómeros péptidos, tanto KPSSPPEE y las variantes informadas del mismo. Tales péptidos oligoméricos o multiméricos pueden realizarse mediante síntesis química o mediante técnicas de ADN recombinante, como se comenta en la presente memoria. Cuando se produce químicamente, los oligómeros preferentemente tienen de 2-8 repeticiones de la secuencia péptida básica. Cuando se producen recombinantemente, los multímeros pueden tener tantas repeticiones como lo permita el sistema de expresión, por ejemplo desde dos hasta aproximadamente 100 repeticiones.

Todos los péptidos y derivados químicos anteriores deben tener la actividad biológica o la actividad de unión de KPSSPPEE como sigue: por lo menos aproximadamente un 20% de la actividad de Ac-KPSSPPE-Am en un ensayo *in vitro* de invasividad celular o un ensayo *in vitro* assay de formación de tubo endotelial y/o angiogénesis. Estas actividades se caracterizan en mayor detalle a continuación. Alternativamente o adicionalmente, el péptido o los derivados químicos deben competir con Ac-KPSSPPEE-Am marcado para unirse a un ligando o socio de unión para Ac-KPSSPPEE-Am, ya sea este un receptor celular (analizado en un ensayo de unión con células enteras o fracciones de las mismas), un receptor aislado o cualquier otro Ac-KPSSPPEE-Am-molécula de unión.

Además, los péptidos o derivados de la presente invención no tienen actividades biológicas previamente asociadas con el activador de plasminógeno urocinasa (uPA). Es decir, no bloquean la unión de uPA al receptor de uPA. Estos péptidos carecen de actividad trombolítica, una característica distintiva de uPA.

Composiciones de diagnóstico y pronóstico

Asimismo, los péptidos pueden marcarse para ser detectados y se pueden utilizar, por ejemplo, para detectar un sitio de unión para el péptido en la superficie o en el interior de una célula. Así, puede seguirse el destino del péptido *in vitro* o *in vivo* utilizando el método adecuado para detectar el marcador. El péptido marcado también puede utilizarse *in vivo* para diagnóstico y pronóstico, por ejemplo para proporcionar una imagen de un foco metastásico oculto o para otros tipos de evaluaciones *in situ*.

Los ejemplos de marcadores detectables adecuados son marcadores radiactivos, fluorogénicos, cromogénicos u otros marcadores químicos. Los radiomarcadores útiles, que son detectados por un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autoradiografía incluyen ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C . Asimismo, ^{131}I también es útil como un isótopo terapéutico útil (véase a continuación).

Los marcadores fluorescentes comunes incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El fluoróforo, como el grupo dansilo, debe ser excitado por la luz de una determinada longitud de onda para emitir fluorescencia. Véase, por ejemplo, Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, O., 1996). En general, un reactivo fluorescente se selecciona basándose en su capacidad para reaccionar con rapidez con una función amino. Los ejemplos de estas sondas fluorescentes incluyen los fluoróforos Bodipy (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) que abarcan el espectro visible (publicación de los EE.UU. 4,774,339; publicación de los EE.UU. 5,187,288; publicación de los EE.UU. 5,248,782; publicación de los EE.UU. 5,274,113; publicación de los EE.UU. 5,433,896; publicación de los EE.UU. 5,451,663). Un miembro preferido de este grupo es 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3-ácido propiónico.

La fluoresceína, los derivados de fluoresceína y las moléculas similares a la fluoresceína como Oregon Green^{MR} y sus derivados, Rhodamine Green^{MR} y Rhodol Green^{MR}, se acoplan a los grupos de amina utilizando el isocianato, éster succinimidílico o los grupos reactivos diclorotriazinilo. Las rodaminas de longitud de onda larga, que son básicamente derivados de Rhodamine Green^{MR} con sustituyentes en los nitrógenos, están entre los reactivos de marcación fluorescente conocidos más fotoestables. Sus espectros no se ven afectados por cambios en el pH entre 4 y 10, una ventaja importante sobre las fluoresceínas para muchas aplicaciones biológicas. Este grupo incluye las tetrametilrodaminas, X-rodamina y los derivados Texas Red derivados. Otros fluoróforos preferidos para derivatizar el péptido conforme a esta invención son los que se excitan mediante luz ultravioleta. Los ejemplos incluyen el cascade blue, derivados de cumarina, naftalenos (a los que pertenece el cloruro de dansilo), pirenos y derivados de piridiloxazol.

En otro planteamiento más. Uno o más grupos amino se dejan reaccionar con reactivos que proporcionan productos fluorescentes, por ejemplo, fluorescamina, dialdehídos como o-ftaldialdehído, naftalen-2,3-dicarboxilato y antracen-2,3-dicarboxilato. Los derivados 7-ni-trobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), el cloruro y el fluoruro, son útiles para modificar aminas para producir productos fluorescentes.

Los expertos en la técnica reconocerán que los reactivos fluorescentes conocidos modifican grupos distintos de las aminas, como tioles, alcoholes aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y amidas. Por lo tanto, los sustratos fluorescentes pueden diseñarse y sintetizarse con facilidad utilizando estos otros grupos reactivos.

- 5 El péptido también puede marcarse para su detección utilizando metales emisores de fluorescencia como ^{152}Eu , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al péptido usando grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El péptido puede hacerse detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del péptido marcado con el quimioluminiscente luego se determina al detectar la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química.
- 10 Los ejemplos de quimioluminiscentes particularmente útiles son el luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato. De la misma manera, un compuesto bioluminiscente se puede utilizar para marcar el péptido. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica incrementa la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente está determinada mediante la detección de la presencia de luminiscencia. Los compuestos
- 15 bioluminiscentes importantes para los fines de marcado son la luciferina, luciferasa y aequorina.

En otro planteamiento más, se puede utilizar la detección colorimétrica, basándose en compuestos cromogénicos (cromóforos) con altos coeficientes de extinción.

- 20 La detección *in situ* del péptido marcado se puede lograr retirando una muestra histológica de un sujeto y examinándola en el microscopio bajo condiciones apropiadas para detectar el marcador. Las personas con experiencia ordinaria en la técnica se darán cuenta que se pueden modificar una amplia gama de métodos histológicos (como procedimientos de tinción) para lograr la detección *in situ*.

- 25 El término “marcado diagnósticamente” significa que el péptido tiene acoplado un marcador detectable. Hay muchos marcadores y métodos de marcado distintos conocidos por las personas con una experiencia ordinaria en la técnica. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen isótopos radiactivos, isótopos paramagnéticos, y compuestos que se pueden ver en imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET). Las personas con una experiencia ordinaria en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para
- 30 unirse a los péptidos utilizados en la invención, o serán capaces de determinar los mismos mediante experimentación de rutina. Además, la unión de estas etiquetas al péptido o derivado se puede realizar utilizando técnicas estándar conocidas por las personas con una experiencia ordinaria en la técnica.

- Para las radioimágenes *in vivo* diagnósticas, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor principal para seleccionar un radionucleido dado. El radionucleido elegido debe tener un tipo de desintegración que sea detectable por instrumentos de un tipo dado. En general, cualquier método convencional para visualizar imágenes de diagnóstico se puede utilizar de conformidad con esta invención. Otro factor al seleccionar un radionucleido para diagnóstico *in vivo* es que la vida media de un radionucleido debe ser lo suficientemente larga para que sea detectable todavía en el momento de máxima captación por la emisión objetivo, pero lo suficientemente corta como para que la
- 40 radiación nociva del anfitrión se minimice. En una realización preferida, un radionucleido utilizado para la visualización de imágenes *in vivo* no emite partículas, pero produce un gran número de fotones en un intervalo de 140-200 keV, que se puede detectar con facilidad mediante cámaras gamma convencionales.

- Para el diagnóstico *in vivo*, los radionucleidos se pueden unir al péptido ya sea directamente o indirectamente
- 45 utilizando un grupo intermediario funcional. Los grupos intermediarios funcionales que se usan a menudo para unir radioisótopos, que existen como iones metálicos, a los péptidos son los agentes quelantes, DTPA y EDTA. Los ejemplos de iones metálicos que pueden unirse a los péptidos son ^{99}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{125}I , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , y ^{201}Tl . Generalmente, la dosificación del péptido marcado para su detección para uso diagnóstico variará dependiendo de consideraciones como la edad, estado, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente, contraindicaciones, si las
- 50 hubiera, y otras variables, y será ajustada por el médico individual. La dosificación puede variar de 0,01 mg/kg hasta 100 mg/kg.

- En otro planteamiento, los péptidos o derivados de la presente invención se pueden usar como ligandos de afinidad para unir receptor del péptido en los ensayos, cromatografía de afinidad preparativa o separación de fase sólida. Estas
- 55 composiciones también se pueden usar para enriquecer, purificar o aislar células a las cuales se une el péptido o derivado, preferentemente mediante una interacción receptor-ligando específica. El péptido o derivado se inmoviliza utilizando métodos comunes conocidos en la técnica, por ejemplo unión a CNBr-Sepharose® o Agarose® activada, NHS-Agarose® o Sepharose®, Sepharose® o Agarose® epoxiactivada, EAH-Sepharose® o Agarose®, streptavidina-Sepharose® o Agarose® en conjunción con péptido o derivados biotinilados. En general, los péptidos o derivados de la invención pueden inmovilizarse mediante cualquier otro método que sea capaz de inmovilizar estos compuestos a una
- 60 fase sólida para los fines indicados. Véase, por ejemplo *Affinity Chromatography: Principles and Methods (Pharmacia LKB Biotechnology)*. De esta manera, una composición puede comprender cualquiera de los péptidos o derivados descritos en esta memoria, unido a un soporte sólido o a una resina. El compuesto puede estar unido directamente o mediante un espaciador, preferentemente una cadena alifática con aproximadamente 2-12 átomos de carbono.

- 65 Por “fase sólida” o “soporte sólido” o “vehículo” se pretende designar cualquier soporte o vehículo capaz de unirse al péptido o derivado. Los soportes o vehículos bien conocidos, además de la Sepharose® o Agarose® descritas anteriormente son vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y

modificadas como nitrocelulosa, poli(acrilamidas, difluoruro de polivinilideno, otras agarosas, y magnetita, incluyendo perlas magnéticas. El vehículo puede ser totalmente insoluble o parcialmente soluble. El material de soporte puede tener cualquier configuración estructural en tanto que la molécula acoplada sea capaz de unirse al material receptor. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo o un pocillo de microplaca, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente la superficie puede ser plana, como una lámina, una tira de prueba, la superficie del fondo de un pocillo de microplaca, etc.

Anticuerpos y sus usos

Se pueden producir anticuerpos que sean específicos para un epítipo definido por la secuencia péptida KPSSP-PEE o específicos para un derivado químico de la misma. Estos anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, biespecíficos, quiméricos o antiidiotípicos, e incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cualquier inmunoensayo conocido en la técnica se puede utilizar para detectar la unión de ese anticuerpo a un péptido, derivado químico del mismo u oligómero péptido conforme a esta invención. Los ensayos preferidos son inmunoensayos de enzimas o radioinmunoensayo. Las siguientes referencias describen la producción, purificación, análisis y uso de anticuerpos: Hartlow, E. *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Campbell, A., In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 13 (Burdon, R., *et al.*, eds.), Elsevier, Amsterdam (1984); Work, T.S. *et al.*, *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, North Holland Publishing Company, Nueva York, 1978; Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986; Butler, J.E. (ed.), *Immuno-chemistry of Solid-Phase Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, 1991; Butler, J.E., In: *STRUCTURE OF ANTIGENS*, Vol. 1, Van Regenmortel, M., ed., CRC Press, Boca Raton 1992, pp. 209-259; Butler, J.E., In: van Oss, C.J. *et al.*, (eds), *IMMUNOCHEMISTRY*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, pp.759-803; Voller. A. *et al.*(eds), *Immunoassays for the 1980's*, University Park Press, Baltimore, 1981.

Tales anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia o medir la cantidad de epítipo del péptido en un material biológico u otra muestra mediante inmunoensayo directo o competitivo. Los anticuerpos se pueden acoplar a un soporte sólido y utilizar en cromatografía de afinidad para aislar y purificar material que contiene epítipo del péptido. A la inversa, según se describe anteriormente, el péptido o derivado químico de esta invención, unido a un soporte sólido, se puede usar para enriquecer o purificar anticuerpos específicos. Se puede utilizar anticuerpos antiidiotípicos para obtener mayor conocimiento de la estructura de un péptido, variante o derivado químico de esta invención cuando se une a un receptor para este.

Ensayo biológico de actividad anti-invasiva

Las composiciones de la invención se analizan para determinar su capacidad anti-invasiva en un sistema de ensayo de invasión de Matrigel® según lo describe en detalle Kleinman *et al.*, 1986 y Parish *et al.*, 1992. El ensayo se realiza con una línea celular, más preferentemente con una línea de células tumorales, más preferentemente la línea de cáncer de mama de rata (Mat BIII) o la línea de cáncer de próstata humano (PC-3) (Xing y Rabbani, 1996; Hoosein *et al.*, 1991).

Matrigel® es una membrana basal reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparán como perlecan, que se une a y localiza a bFGF, vitronectina así como el factor de crecimiento de transformación -B (TGFB), activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), activador de plasminógeno de tejido (tPA), y teserpina conocida como inhibidor de activador de plasminógeno (PAI-I) (Chambers *et al.*, 1995).

Se acepta en la técnica que los resultados obtenidos en este ensayo para compuestos que tiene como objetivo receptores extracelulares o enzimas que son predictivas de la eficacia de estos compuestos *in vivo* (Rabbani *et al.*, 1995).

Ensayo biológico de actividad anti-angiogénica

Los compuestos de esta invención se analizan para detectar su actividad anti-angiogénica en uno de los dos sistemas de ensayo diferentes *in vitro*.

Se mezclan células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) o células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) que se pueden preparar u obtener comercialmente, a una concentración de 2×10^5 células/mL con fibrinógeno (5 mg/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en relación 1:1 (v/v). Se agrega trombina (5 unidades/mL de concentración final) y la mezcla se transfiere inmediatamente a una placa de 24 pocillos (0,5 mL por pocillo). Se deja que se forme el gel de fibrina y luego se agrega VEGF y bFGF a los pocillos (cada uno a 5 ng/mL de concentración final) ajunto con el compuesto de prueba. Las células se incuban a 37°C en CO₂ al 5% durante 4 días, momento en el cual se cuentan las células en cada pocillo y se clasifican como redondeadas, elongadas sin ramificaciones, elongadas con una ramificación, o elongadas con 2 o más ramificaciones. Los resultados se expresan como el promedio de 5 pocillos distintos para cada concentración de compuesto. Típicamente, en presencia de inhibidores angiogénicos, las células permanecen redondeadas o forman tubos no diferenciados (por ejemplo 0 ó 1 ramificación).

Este ensayo se reconoce en la técnica que es predictivo de eficacia angiogénica (o anti-angiogénica) *in vivo* (Min *et al.*, 1996).

En un ensayo alternativo, se observa formación de tubo celular endotelial cuando las células endoteliales se cultivan en Matrigel® (Schnaper *et al.*, 1995). Se transfieren células endoteliales (1×10^4 células/pocillo) a una placa de 24 pocillos recubierta de Matrigel®, y se cuantifica la formación de tubo después de 48 horas. Se analizan los inhibidores agregándolos ya sea al mismo tiempo que las células endoteliales o en distintos puntos de tiempo con posterioridad.

Este ensayo es un modelo de angiogénesis al presentar a las células endoteliales un tipo determinado de membrana basal, a saber la capa de matriz que las células endoteliales que migran y se diferencian se espera que encuentren primero. Además de unir factores de crecimiento, los componentes de la matriz que se encuentran en Matrigel® (y en membranas basales *in situ*) o productos proteolíticos de los mismos también pueden ser estimulantes para la formación de tubo celular endotelial lo que hace que este modelo sea complementario del modelo de angiogénesis de gel de fibrina descrito previamente (Blood y Zetter, 1990; Odedra y Weiss, 1991). Los componentes de esta invención inhiben la formación del tubo celular endotelial en ambos ensayos, lo que sugiere que los compuestos también tendrán actividad anti-angiogénica.

Prueba in vivo de composiciones en modelos animales de tumores humanos

Se prueban los péptidos, peptidomiméticos y conjugados para determinar su eficacia terapéutica en varios modelos de roedores bien establecidos que se considera que son altamente representativos de un amplio espectro de tumores humanos. Los planteamientos se describe en detalle en Geran, R. I. *et al.*, "Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems (Tercera edición)", *Canc. Chemother. Reports*, Parte 3, 3:1-112. Todos los procedimientos generales de evaluación de pruebas, mediciones y cálculos se realizaron de acuerdo con esta referencia, incluyendo tiempo de supervivencia medio, mediana del tiempo de supervivencia, cálculo del peso aproximado del tumor a partir de las mediciones de los diámetros de tumores con calibres venier; cálculo de los diámetros de los tumores: cálculo del peso promedio del tumor a partir de tumores extirpados; y relaciones entre grupos tratados y control para cualquier medición (relaciones T/C).

A. Modelo de rata de progresión del tumor

Los efectos de los compuestos se prueban en la progresión tumoral en un modelo de rata singénico de cáncer de mama (Xing y Rabbani, 1996). La línea celular MatBIII es una línea celular de tumor altamente agresivo que expresa niveles altos de uPA y uPAR y conduce a metástasis macroscópicas en los nódulos linfáticos cuando se inocula *in vivo*.

Las células de tumor de mama de rata Mat BIII, por ejemplo, 10^5 - 10^6 células in PBS, 0,1-0,2 mL por rata, se inoculan en las almohadillas de grasa mamaria de ratas Fisher hembra. El compuesto de prueba se disuelve en PBS (200 mM de solución madre), se filtra estéril y se dispensa *in vivo* a una dosis de hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, preferentemente a través de una minibomba osmótica Alza de 14 días implantada intraperitonealmente en el momento de la inoculación. Los animales control reciben solamente vehículo (PBS). Alternativamente, el compuesto de prueba se administra por inyección sistémica, preferentemente intraperitoneal (IP). Los animales se sacrifican en el día 14 y se examinan para detectar metástasis en el bazo, pulmones, hígado, riñones y nódulos linfáticos, preferentemente contando las lesiones macroscópicas. Los Tumores primarios y las metástasis pueden incluirse en parafina y procesarse para su análisis histológico o inmunohistoquímico por medios convencionales. El tamaño del tumor primario se puede medir con calibres.

B. Carcinoma pulmonar de Lewis 3LL: Crecimiento de tumor primario

Esta línea de tumor surgió espontáneamente en 1951 como carcinoma pulmonar en un ratón C57BL/6 (*Cancer Res* 15:2.9, 1955. Véase también Malave, I. *et al.*, *J. Natl. Canc. Inst.* 62:83-88 (1979)). Se propaga por pasaje en ratones C57BL/6 por inoculación subcutánea (sc) y se prueba en ratones C57BL/6 x DBA/2 F semialogénicos, o en ratones C3H alogénicos. Típicamente se utilizan seis animales por grupo para implante subcutáneo (sc), o diez para implante intramuscular (im). El tumor se puede implantar sc como un fragmento de 2-4 mm, o im o sc como un inóculo de células suspendidas de aproximadamente $0,5$ - 2×10^6 células. El tratamiento comienza 24 horas después del implante o se demora hasta que un tumor de un tamaño específico (usualmente aproximadamente 400 mg) se puede palpar. El compuesto de prueba se administra ip diariamente durante 11 días.

Se realiza el seguimiento de los animales pesando, palpando y midiendo el tamaño del tumor. El peso típico del tumor en receptores control no tratados en el día 12 después de la inoculación im es 500-2500 mg. El tiempo de supervivencia medio es de 18-28 días. Se utiliza un compuesto control positivo, por ejemplo ciclofosfamida a 20 mg/kg/inyección por día en los días 1 -11. Los resultados computados incluyen peso animal promedio, tamaño del tumor, peso del tumor, tiempo de supervivencia. Para una actividad terapéutica confirmada, la composición de prueba se debe ensayar en dos ensayos multidosis.

C. Carcinoma pulmonar de Lewis 3LL: Modelo de crecimiento primario y metástasis

Este modelo ha sido utilizado por varios investigadores. Véase, por ejemplo, Gorelik, E. *et al.*, *J. Nat'l. Canc. Inst.* 65:1257-1264 (1980); Gorelik, E. *et al.*, *Rec. esults Canc. Res.* 75:20-28 (1980); Isakov, N. *et al.*, *Invasion Metas.*

2:12-32 (1982); Talmadge J.E. *et al.*, *J. Nat'l. Canc. Inst.* 69:975-980 (1982); Hilgard, P. *et al.*, *Br. J. Cancer* 35:78-86(1977)). Los ratones de prueba son ratones C57BL/6 macho, de 2-3 meses de edad. Después del implante sc, im, o intra-almohadilla plantar, este tumor produce metástasis, preferentemente en los pulmones. Con algunas líneas del tumor, el tumor primario ejerce efectos anti-metastásicos y primero debe ser extirpado antes de estudiar la fase metastásica (véase también la publicación de los EE.UU. 5,639,725).

Se preparan suspensiones de una sola célula de tumores sólidos tratando tejido tumoral molido con una solución de tripsina al 0,3%. Se lavan las células 3 veces con PBS (pH 7.4) y se suspenden en PBS. La viabilidad de las células 3LL preparadas de esta manera generalmente es aproximadamente un 95-99% (por exclusión con tinción de azul tripano). Las células tumorales viables (3×10^4 - 5×10^6) suspendidas en 0,05 ml de PBS se inyectan subcutáneamente en la región dorsal o en una almohadilla plantar trasera de ratones C57BL/6. Los tumores visibles aparecen después de 3-4 días con posterioridad a la inyección sc dorsal de 10^6 células. El día de la aparición del tumor y los diámetros de los tumores establecidos se miden con calibre cada dos días.

El tratamiento se proporciona como una o dos dosis de péptido o derivado, por semana. En otra realización, el péptido se libera mediante minibomba osmótica.

En los experimentos que involucran extirpar los tumores dorsales, cuando los tumores alcanzan un tamaño de aproximadamente 1500 mm^3 , se dividen aleatoriamente los ratones en dos grupos: (1) se extirpa por completo el tumor primario; o (2) se realiza una cirugía simulada o el tumor se deja intacto. Aunque los tumores de $500\text{-}3000 \text{ mm}^3$ inhiben el crecimiento de metástasis, 1500 mm^3 es el tamaño mayor de tumor primario que se puede extirpar con alta supervivencia y sin nuevo crecimiento local. Después de 21 días, todos los ratones se sacrificaron y se les realizó una autopsia.

Los pulmones se retiraron y pesaron. Los pulmones se fijaron en solución de Bouin y se registró el número de metástasis visibles. Los diámetros de las metástasis también se midieron usando un estereoscopio binocular equipado con un ocular que contiene un micrómetro bajo ampliación de 8X. Basándose en los diámetros registrados, es posible calcular el volumen de cada metástasis. Para determinar el volumen total de metástasis por pulmón, el número medio de metástasis visibles se multiplica por el volumen medio de metástasis. Par determinar más el crecimiento metastásico, es posible medir la incorporación de $^{125}\text{IdUrd}$ en células pulmonares (Thakur, M.L. *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 59:217-228 (1977). Diez días después de la amputación del tumor se inocularon $25 \mu\text{g}$ de fluorodesoxiuridina en los peritoneos de los portadores de tumor (y, si se utilizan, de los ratones con tumores extirpados). Después de 30 minutos, se les administra a los ratones $1 \mu\text{Ci}$ de $^{125}\text{IdUrd}$ (yododesoxiuridina). Un día después se retiraron los pulmones y los bazo y se midió el grado de incorporación de $^{125}\text{IdUrd}$ utilizando un contador gamma.

En ratones con tumores en almohadillas plantares, cuando los tumores alcanzan aproximadamente 8-10 mm de diámetro, se dividen aleatoriamente en dos grupos: (1) se amputan las patas con tumores después de realizar una ligadura sobre las articulaciones de la rodilla; o (2) se dejan intactos los ratones como controles portadores de tumor no amputados. (La amputación de una pata exenta de tumor en un ratón portador de tumor no tiene efectos conocidos sobre la metástasis subsiguiente, descartando posibles efectos de anestesia, estrés o cirugía). Los ratones se sacrifican 10-14 días después de la amputación. Las metástasis se evalúan como se describió anteriormente.

Estadísticas: los valores que representan la incidencia de metástasis y su crecimiento no están distribuidos normalmente. Por lo tanto, se pueden utilizar para el análisis las estadísticas no paramétricas como la prueba U de Mann-Whitney

El estudio de este modelo realizado por Gorelik *et al.* (1980, *supra*) mostró que el tamaño del inóculo de células tumorales determinaba la medida del crecimiento metastásico. La velocidad de metástasis en los pulmones de los ratones operados fue distinta de la de los ratones portadores de tumores primarios. Así, en los pulmones de ratones en los que el tumor primario se había inducido por inoculación de dosis mayores de células 3LL ($1\text{-}5 \times 10^6$) seguida de remoción quirúrgica, el número de metástasis fue menor que en los ratones portadores de tumor no operados, aunque el volumen de metástasis fue mayor que en los controles no operados. Utilizando la incorporación de $^{125}\text{IdUrd}$ como medida de metástasis pulmonar, no se encontraron diferencias significativas entre los pulmones de los ratones con tumor extirpado y los ratones portadores de tumor originalmente inoculados con 1×10^6 de células 3LL. La amputación de tumores producidos después de la inoculación de 1×10^5 células tumorales aceleró dramáticamente el crecimiento metastásico. Estos resultados estuvieron de acuerdo con la supervivencia de ratones después de la extirpación de tumores locales. El fenómeno de aceleración del crecimiento metastásico después de la extirpación de tumores locales se ha observado repetidamente (por ejemplo, véase la publicación de los EE.UU. 5,639,725). Estas observaciones tienen implicaciones para el pronóstico de los pacientes que se someten a cirugía de cáncer.

D. Modelos de metástasis experimentales

Los compuestos de esta invención también se analizan para determinar la inhibición de metástasis tardías utilizando el modelo de metástasis experimental (Crowley *et al.*, 1993). Las metástasis tardías involucran las etapas de acoplamiento y extravasación de células tumorales, invasión local, siembra, proliferación y angiogénesis.

Las células de carcinoma prostático humano (PC-3) transfectadas con un gen indicador, preferentemente el gen de la proteína fluorescente verde (GFP), pero como alternativa con un gen que codifica las enzimas cloranfenicol acetil-

transferasa (CAT), luciferasa o LacZ. Esto permite la utilización de cualquiera de estos marcadores (la detección por fluorescencia de GFP o la detección colorimétrica histoquímica de la actividad enzimática) para realizar el seguimiento del destino de estas células. Se inyectan las células, preferentemente iv, y se identifica la metástasis después de aproximadamente 14 días, particularmente en los pulmones pero también en los nódulos linfáticos, fémures y cerebro. Esto imita el tropismo del órgano de la metástasis que sucede naturalmente del cáncer de próstata. Por ejemplo, las células PC-3 que expresan GFP (1×10^6 células por ratón) se inyectan iv en las venas de la cola de ratones atímicos (*nu/nu*). También se implantaron a los animales minibombas (subdermalmente en la espalda) que dispensaban el compuesto de prueba (por lo menos aproximadamente 100 mg/kg/día) o el vehículo. Los animales se sacrificaron después de 14 días y sus órganos se prepararon para su examen histológico. Se visualizaron y cuantificaron células metastásicas individuales y focos por microscopía fluorescente o histoquímica con microscopio de luz o triturando el tejido y con un ensayo colorimétrico del marcador detectable.

E. Xenoinjerto de tumor humano en ratones atímicos

Un modelo preferido utiliza una línea celular de cáncer de mama agresivo, MDA-MB-231. Esta línea es altamente invasiva *in vitro* y expresa niveles muy altos de uPA y uPAR. A pesar de su fenotipo agresivo *in vitro*, esta línea celular, como la mayoría de las restantes líneas celulares de cáncer de mama humano, crece poco y no forma metástasis de manera reproducible cuando se inocula subcutáneamente a ratones atímicos. Cuando se inocula conjuntamente MDA-MB-231 con Matrigel o fibroblastos en la almohadilla de grasa mamaria de un ratón atímico, el crecimiento el tumor y la metástasis se mejoran significativamente, dando como resultado un modelo útil (Price (1996) *Breast Cancer Research and Treatment* 39: 93-102).

Las células MDA-MB-231, por ejemplo, 1×10^5 células en 0,2 mL de Matrigel frío se inoculan en las almohadillas de grasa mamaria de ratones Balb/C hembra (*nu/nu*) y se deja que se implanten y crezcan durante un periodo, usualmente aproximadamente 25-30 días dependiendo de la dosis de células. El tratamiento con un compuesto de prueba se inicia mediante inyecciones IP, dos veces por día (En el Ejemplo que sigue a continuación, se suministraron 77 mg/kg/día del péptido Á6). Los animales 2-4 semanas después y se examinaron para detectar metástasis macroscópicas. Además, los tumores primarios se retiraron y se pesaron, y posiblemente se incluyeron en parafina para su evaluación histológica. La metástasis típicamente sucede en los nódulos linfáticos y se cuantifica por recuento de las lesiones macroscópicas.

Para que un compuesto sea útil de acuerdo con esta invención, debe demostrar su actividad anti-tumoral en los modelos anteriores, por ejemplo, bloqueando la progresión del tumor, la angiogénesis y/o metástasis.

Angiogénesis

La angiogénesis se mide determinando la densidad de los microvasos utilizando la inmunotinción para CD31 (también conocida como molécula de adhesión a células endoteliales-plaquetas o PECAM). Los resultados se informan como la densidad de microvasos promedio de 5 campos cada uno de 5 secciones diferentes (Penfold *et al.*, 1996). Típicamente se extirpa todo el tumor, se divide en secciones y las secciones se examinan histológicamente para determinar la densidad de los microvasos utilizando tinciones o indicadores adecuados para otros marcadores. La formación de tubo endotelial es otro ensayo que está relacionado con la angiogénesis, y se describe en los Ejemplos.

Composiciones farmacéuticas y terapéuticas y su administración

Los compuestos que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen todos los compuestos descritos anteriormente, así como las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos. Las sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención que contienen un grupo básico se forman cuando sea apropiado con ácidos orgánicos o inorgánicos, no tóxicos, fuertes o moderadamente fuertes en presencia de una amina básica por medios conocidos en la técnica. Los ejemplos de sales de adición ácida que se incluyen en la invención son maleato, fumarato, lactato, oxalato, metanosulfonato, etanosulfonato, benzenosulfonato, tartrato, citrato, hidrocloreto, bromhidrato, sulfato, fosfato y sales de nitrato.

Las sales de adición básica farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención que contienen un grupo ácido se preparan mediante métodos conocidos a partir de bases orgánicas e inorgánicas e incluyen, por ejemplo, metales alcalinos no tóxicos y bases alcalinotérreas, como hidróxido de calcio, sodio, potasio y amonio; y bases orgánicas no tóxicas como trietilamina, butilamina, piperazina, y tri(hidroximetil)metilamina.

Como se expuso anteriormente, los compuestos de la invención poseen la capacidad de inhibir la invasividad o angiogénesis, propiedades que se explotan en el tratamiento del cáncer, en particular el cáncer metastásico. Una composición de esta invención puede ser activa *per se*, o puede actuar como un "profármaco" que se convierte *in vivo* en la forma activa.

Los compuestos de la invención, así como cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptable, pueden incorporarse en formas de dosificación convenientes como cápsulas, obleas impregnadas, comprimidos o preparaciones inyectables. Se pueden utilizar vehículos farmacéuticamente aceptables sólidos o líquidos.

Preferentemente, los compuestos de la invención se administran sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección. Cuando se utiliza, la inyección se puede aplicar por cualquier vía conocida, preferentemente intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal o intraperitoneal. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones, formas sólidas adecuadas para su solución o suspensión en líquido antes de su inyección o como emulsiones.

Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidratado, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio y ácido esteárico. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, solución salina, agua, dextrosa, glicerol y similares. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de liberación prolongada, como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera. Cuando se utiliza un vehículo líquido la preparación debe estar en forma de jarabe, elixir, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril (por ejemplo, una solución), como unan ampolla, o una suspensión líquida acuosa o no acuosa. Se puede encontrar un resumen de estas composiciones farmacéuticas en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton Pensilvania (Gennaro 18ª ed. 1990).

Las preparaciones farmacéuticas se realizan siguiendo las técnicas convencionales de la química farmacéutica que involucran etapas tales como mezclar, granular y comprimir, cuando sea necesario para dar forma de comprimido, o mezclar, llenar y disolver los ingredientes, según sea adecuado, para proporcionar el producto deseado para la administración oral, parenteral, tópica, transdérmica, intravaginal, intranasal, intrabronquial, intracraneal, intraocular, intraaural y rectal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener cantidades menores de sustancia auxiliar no tóxicas como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH y etcétera.

Aunque las vías preferidas de administración son sistémicas, la composición farmacéutica se puede administrar tópicamente o transdérmicamente, por ejemplo, como un ungüento crema o gel; oralmente; rectalmente; por ejemplo, como un supositorio, parenteralmente, por inyección o continuamente por infusión; intravaginalmente; intranasalmente; intrabronquialmente; intracranealmente intraauralmente; o intraocularmente.

Para su aplicación tópica, el compuesto se puede incorporar a vehículos aplicados tópicamente como un ungüento o pomada. El vehículo para el ingrediente activo puede estar en forma pulverizable o no pulverizable. Las formas no pulverizables pueden ser formas semisólidas o sólidas comprendiendo un vehículo innato a la aplicación tópica y tener una dinámica de viscosidad preferentemente mayor que la del agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, de manera no taxativa, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, y similares. Si se desea, estas se pueden esterilizar o mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones, o sales para influir en la presión osmótica y similares. Los vehículos preferidos para las preparaciones tópicas no pulverizables incluyen bases de ungüentos, por ejemplo, polietilenglicol-1000 (PEG-1000); cremas convencionales como crema HEB; geles; así como vaselina y similares.

También son adecuadas para su aplicación tópica las preparaciones en aerosol pulverizables en las que el compuesto, preferentemente en combinación con un material de vehículo inerte sólido o líquido, está envasado en una botella exprimible o en mezcla agregada con un propelente volátil presurizado normalmente gaseoso. Las preparaciones en aerosol pueden contener disolventes, tampones surfactantes, perfumes, y/o antioxidantes además de los compuestos de la invención.

Para las aplicaciones tópicas preferidas, especialmente para los seres humanos, se prefiere administrar una cantidad eficaz del compuesto a un área infectada, por ejemplo, la superficie de la piel, la membrana mucosa, ojos, etc. Esta cantidad generalmente variará desde aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 1 g por aplicación, dependiendo del área a ser tratada, la gravedad de los síntomas y la naturaleza del vehículo tópico empleado.

Las composiciones de la invención además pueden comprender uno o más compuestos adicionales que son agentes antitumorales, como inhibidores mitóticos, por ejemplo, vinblastina; agentes alquilantes, por ejemplo, ciclofosfamida; inhibidores de folato, por ejemplo, metotrexato, piritrexima o trimetrexato; antimetabolitos, por ejemplo, 5-fluorouracilo y citosina arabinosida; antibióticos de intercalado, por ejemplo, adriamicina y bleomicina; enzimas o inhibidores de enzimas, por ejemplo, asparaginasa; inhibidores de topoisomerasa, por ejemplo, etopósido; o modificadores de respuesta biológica, por ejemplo, interferón. De hecho, las composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier terapéutica de cáncer conocida en combinación con los péptidos descritos en esta memoria están comprendidas dentro del alcance de esta invención.

La composición de la invención también puede comprender uno o más medicamentos, preferentemente antiinfecciosos como agentes antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, antivirales, y anticoccídicos. Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, por ejemplo, sulfonamidas como sulfametoxazol, sulfadiazina o sulfadoxina; inhibidores de DHFR como trimetoprima, bromodiprima o trimetrexato; penicilinas; cefalosporinas; aminoglicósidos; inhibidores bacteriostáticos de la síntesis de proteínas; los ácidos quinoloncarboxílicos y sus análogos isotiazol fusionados; y similares.

Otras composiciones terapéuticas

Los compuestos de esta invención pueden estar “conjugados terapéuticamente” y utilizarse para suministrar un agente terapéutico al sitio donde los compuestos se hospedan y se unen, como sitios de metástasis de tumores o fo-

cos de infección/inflamación. El término “conjugados terapéuticamente” significa que el compuesto, preferentemente un péptido, derivado de péptido, o peptidomimético, se conjuga con un agente terapéutico. Los agentes terapéuticos utilizados de esta manera están dirigidos a la causa subyacente o bien a los componentes de los procesos de invasión tumoral, angiogénesis o inflamación. Los ejemplos de agentes utilizados para tratar la inflamación son fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, muchos de los cuales inhiben la síntesis de prostaglandina.

Otros agentes terapéuticos que se pueden acoplar a los compuestos conforme al método de la invención son fármacos, radioisótopos, lectinas y otras toxinas. La dosificación terapéutica administrada es una cantidad que es terapéuticamente eficaz, y será conocida para una persona con una experiencia ordinaria en la técnica. La dosis también depende de la edad, salud, y peso del receptor, la calase de tratamiento concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado, como, por ejemplo, efectos antiinflamatorios o efecto antibacteriano.

Las lectinas son proteínas, comúnmente derivadas de plantas, que se unen a los carbohidratos. Entre otras actividades, algunas lectinas son tóxicas. Algunas de las sustancias más citotóxicas conocidas son toxinas de proteínas de origen bacteriano y vegetal (Frankel, A.E. *et al.*, *Ann. Rev. Med* 37: 125-142 (1986)). Estas moléculas se unen a la superficie celular e inhiben la síntesis de proteínas celulares. Las toxinas vegetales utilizadas más comúnmente son ricina y abrina; las toxinas bacterianas utilizadas más comúnmente son la toxina de la difteria y exotoxina A de *Pseudomonas*. En la ricina y abrina, las funciones de unión y tóxica están contenidas en dos subunidades de proteína separadas, las cadenas A y B. La cadena B de la ricina se une a los carbohidratos de la superficie celular y promueve la captación de la cadena A en la célula. Una vez en el interior de la célula, la cadena A de la ricina inhibe la síntesis de proteínas inactivando las subunidad 60S del ribosoma eucariótico; Endo, Y. *et al.*, *J Biol. Chem.* 262:5908-5912 (1987)). Otras toxinas derivadas de plantas, que son proteínas inhibitorias ribosomales de cadena simple, incluyen la proteína antiviral de *Phytolacca* o “pokeweed”, la proteína de germen de trigo, gelonina, diantinas, momorcarinas, tricosantina, y muchas otras (Strip, F. *et al.*, *FEBS Lett.* 795:1-8 (1986)). La toxina de la difteria y la exotoxina A de *Pseudomonas* también son proteínas de cadena simple y sus funciones de unión y toxicidad residen en dominios separados de la misma cadena de proteína con actividad de toxina completa que requiere la escisión proteolítica entre los dos dominios. La exotoxina A de *Pseudomonas* tiene la misma actividad catalítica que la toxina de la difteria. La ricina se ha utilizado terapéuticamente uniendo su α -cadena tóxica, a moléculas de acción selectiva (“targeting molecules”) como anticuerpos para permitir la liberación específica en el sitio de los efectos tóxicos. Las toxinas bacterianas también se han utilizado como conjugados antitumorales. Como se pretende en la presente memoria, un dominio o cadena péptida tóxica se une a un compuesto de esta invención y se libera de forma específica al sitio, en un sitio objetivo en que se desea la actividad tóxica, como un foco metastásico. La conjugación de toxinas con proteínas como anticuerpos u otros ligandos es conocida en la técnica (Olsnes, S. *et al.*, *Immunol. Today* 70:291-295 (1989); Vitetta, E.S. *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 3:197-212(1985)).

Los ejemplos de radioisótopos terapéuticos que se pueden enlazar al compuesto para su uso de acuerdo con los métodos de la invención, son ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Bi , ^{212}Pb , ^{47}Sc , y ^{109}Pd .

Los fármacos citotóxicos que interfieren con procesos celulares críticos incluyendo ADN, ARN, y síntesis de proteínas se han conjugado con anticuerpos y subsiguientemente se han utilizado para terapias *in vivo*. Tales fármacos, incluyendo de manera no taxativa daunorubicina, doxorubicina, metotrexato, y Mitomicina C también se acoplan a los compuestos de esta invención y se usan terapéuticamente en esta forma.

Métodos terapéuticos

Se describen en esta memoria métodos para inhibir la invasión celular, principalmente por células tumorales, o angiogénesis, inducida principalmente por células tumorales en un sujeto. Al inhibir la invasión celular o angiogénesis, el método da como resultado la inhibición de la metástasis tumoral. En este método, se le administra a un vertebrado, preferentemente a un mamífero, más preferentemente a un ser humano, una cantidad del compuesto eficaz para inhibir la invasión o angiogénesis. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable se administra preferentemente en forma de composición farmacéutica según se describió anteriormente.

Las dosis de los compuestos preferentemente incluyen unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad eficaz del péptido. El término cantidad eficaz significa una cantidad suficiente para lograr una concentración de estado estable *in vivo* que de como resultado una reducción mensurable de cualquier parámetro relevante de la enfermedad y puede incluir crecimiento del tumor primario o metastásico, cualquier índice aceptado de reactividad inflamatoria, o una prolongación mensurable del intervalo exento de enfermedad o de la supervivencia. Por ejemplo, una reducción en el crecimiento del tumor en un 20% de los pacientes se considera eficaz (Frei III, E., *The Cancer Journal* 3: 127-136 (1997)). Sin embargo, un efecto de esta magnitud no se considera que es un requisito mínimo para que la dosis sea eficaz de acuerdo con esta invención.

En una realización, una dosis eficaz es por lo menos igual a, preferentemente 10 veces más alta y más preferentemente 100 veces más alta que la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}) del compuesto en un ensayo *in vivo* según se describe en esta memoria.

La cantidad de compuesto activo que se va a administrar depende del péptido o derivado preciso seleccionado, la enfermedad o el estado, la vía de administración, la salud y peso del receptor, la existencia de otro tratamiento

concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento, la naturaleza del efecto deseado, por ejemplo, la inhibición de la metástasis tumoral, y del criterio del médico experto.

Una dosis preferida para tratar un sujeto, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, con un tumor es una cantidad de hasta aproximadamente 100 miligramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal.

Las dosis únicas típicas del péptido están entre aproximadamente 1 μ g y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Para la administración tópica, las dosis están en el intervalo de aproximadamente 0,01-20% de concentración del compuesto, preferentemente se sugiere 1-5%. Una dosificación total diaria en el intervalo de desde aproximadamente 10 miligramos hasta aproximadamente 7 gramos se prefiere para su administración oral. Sin embargo, los intervalos anteriores son sugerencias ya que el número de variables relativos a un régimen de tratamiento individual es muy grande y se esperan desviaciones considerables de estos valores recomendados.

Una cantidad o dosis eficaz del péptido para inhibir la invasión *in vitro* está en el intervalo de desde aproximadamente 1 picogramo hasta aproximadamente 0,5 nanogramos por célula. Las dosis eficaces y los intervalos de dosis óptimos se pueden determinar *in vitro* utilizando los métodos descritos en esta memoria.

Los compuestos de la invención se pueden caracterizar adicionalmente como productores de un efecto inhibitorio sobre la migración celular y la invasión, sobre la angiogénesis, sobre la metástasis tumoral o sobre las reacciones inflamatorias. Los compuestos son especialmente útiles para producir un efecto antitumoral en un mamífero anfitrión, preferentemente un ser humano, que aloja un tumor.

Las composiciones y métodos de tratamiento anteriores son útiles para inhibir la migración celular y la invasión o proliferación celular inducida por migración en un sujeto con una enfermedad o condición asociada con la invasión celular no deseada, la proliferación inducida por migración, la angiogénesis o la metástasis. Estas enfermedades o afecciones pueden incluir crecimiento primario o tumores sólidos o leucemias y linfomas, metástasis, invasión y/o crecimiento de metástasis tumorales, aterosclerosis, angiogénesis miocárdica, reestenosis vascular posterior a angioplastia con implantación de balón, formación de neoíntima posterior a trauma vascular, reestenosis de injerto vascular, formación colateral coronaria, trombosis venosa profunda, angiogénesis por lesión isquémica en miembro, telangiectasia, granuloma piogénico, enfermedades corneas, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética y otras retinopatías, fibroplasia retrolental, neovascularización diabética, degeneración macular, endometriosis, artritis, fibrosis asociada a estados de inflamación crónica incluyendo psoriasis, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por quimioterapia, curación de heridas con cicatrización y fibrosis; úlceras pépticas, fracturas, queloides, y trastornos de vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, menstruación, embarazo y placentación, o cualquier otra enfermedad o afección en la que la invasión o angiogénesis es patogénica.

Habiendo descrito la invención de manera general, esta se entenderá con mayor claridad mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan de manera ilustrativa y que no son limitativos para la presente invención, a menos que así se especifique.

Ejemplo I

Síntesis de Acetil-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-NH₂

El material inicial fue resina de p-metil-benzhidrilamina sustituida a nivel de 0,70 mEq por gramo de resina. Cada uno de los L-aminoácidos, comenzando con el ácido glutámico, se añadió en secuencia siguiendo un ciclo de síntesis consistente en las tres etapas de desprotección de TFA, acoplamiento y colocación de caperuza. El péptido completado se sometió a escisión de HF y luego se purificó.

1. Desprotección de TFA

La resina inicial se acondicionó antes de agregar el primer ácido glutámico, o, en el caso de ciclos subsiguientes, el grupo protector BOC se eliminó del nitrógeno de α -amino del material inicial tratando la resina con ácido trifluoroacético (TFA) al 50% en diclorometano (DCM) (dos a tres volúmenes por volumen de resina). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se escurrió. La resina luego se lavó una vez con un volumen igual de isopropanol durante un minuto y se lavó dos veces con un volumen igual de metanol, y cada lavado insumió un minuto.

2. Acoplamiento

La resina desprotegida se lavó dos veces con un volumen igual de trietilamina al 10% en DCM, insumiendo cada lavado un minuto, y se lavó dos veces con un volumen igual de metanol, insumiendo cada lavado un minuto, y se lavó dos veces con un volumen igual de DCM, insumiendo cada lavado un minuto. Un aminoácido protegido con BOC (tres equivalentes, disuelto en DCM o en una mezcla de DCM y N,N'-dimetilformamida (DMF)) y 1-hidroxibenzotriazol (solución 1M en DMF, tres equivalentes) se agregó a la resina, y la mezcla se agitó durante unos pocos segundos. Luego se agregó diciclohexilcarbodiimida (DCC) (solución 1M en DCM, tres equivalentes), y toda la mezcla se agitó durante 60-120 minutos. La resina se lavó dos veces con un volumen igual de metanol y luego se lavó dos veces

con un volumen igual de DCM. Se tomó una pequeña muestra para realizar un ensayo de ninhidrina para evaluar la compleción del acoplamiento. Generalmente, si está incompleto, se repite la etapa 2 de acoplamiento. Si está completo, se continúa la síntesis con la etapa tres de colocación de caperuza.

- 5 Todos los aminoácidos se utilizaron como derivados α -BOC. Los grupos protectores de cadenas laterales fueron los siguientes:

	Aminoácido	Grupo protector
10	Histidina	Benziloximetilo
	Asparagina	Xantilo
	Glutamina	Xantilo
15	Serina	O-benzilo
	Treonina	O-benzilo
	Tirosina	2-Bromo-Z
	Lisina	2-Cloro-Z
20	Ácido glutámico	Ciclohexilo
	Ácido aspártico	Ciclohexilo

3. Colocación de caperuza

- 25 La resina se agitó con un volumen igual de anhídrido acético (solución al 20% en DCM) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó dos veces con un volumen igual de metanol y luego se lavó dos veces con un volumen igual de DCM.

30 4. Escisión de HF

- La resina que tiene la secuencia de aminoácidos deseada (1,0 gramo) se colocó en un recipiente de reacción de Teflón, y se agregó anisol anhidro (1 mL). El recipiente se enfrió con N_2 líquido y se destiló HF anhidro (10 mL) en su interior. La temperatura se elevó con agua helada hasta 0°C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante una hora, y luego se destiló el HF a 0°C. El residuo se lavó con éter anhidro, y el péptido se extrajo con una mezcla 1:1 de $CH_3CN:H_2O$.

5. Purificación

- 40 El polvo liofilizado se disolvió en tampón de TFA al 0,1% y se cargó en una columna preparativa Waters C18 (2 pulgadas de diámetro, tamaño de partícula de 15-20 μm , tamaño de poro de 300Å). La columna cargada se eluyó con un eluyente de dos componentes aplicado como un gradiente lineal, comenzando con 0% de una solución A en la solución B y terminando con un 40% de la solución A en la solución B. La solución A fue TFA al 0,1% en H_2O , y la solución B fue TFA al 0,1% en CH_3CN . Las fracciones que mostraron una pureza igual o mejor a la deseada se combinaron para proporcionar el producto final como la sal de trifluoroacetato.

Ejemplo II

Actividad anti-invasiva de KPSSPPEE con caperuza y los péptidos relacionados

- 50 Varios péptidos se analizaron para determinar su capacidad anti-invasiva en un sistema de ensayo de invasión de Matrigel® como se indicó anteriormente (Kleinman *et al.*, *supra*; Parish *et al.*, *supra*).

- Se utilizaron células de la línea celular de cáncer de mama de rata Mat BIII y de la línea de cáncer de próstata humano PC-3. Las células tumorales ($5 \times 10^5/mL$, en un volumen de 200 μL) en medio RPMI 1640 exento de suero se agregaron a una cámara de invasión Transwell descartable recubierta con Matrigel® (Becton Dickinson, Lincoln Park, Nueva Jersey). Las cámaras de invasión se colocaron en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos llenas con RPMI-1640 exento de suero y las placas se colocaron en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire humidificado a 37°C durante 48-72 horas. Luego se retiraron las cámaras, se invirtieron y las células que habían invadido (y ahora aparecían en la cara inferior de la cámara de invasión) se fijaron y tiñeron utilizando Diff-Quik® (Scientific Products). Las células se contaron en 10 campos distintos en cada filtro y se obtuvo un promedio. Típicamente, se realizaron de 3-5 repeticiones a cada concentración del compuesto analizado.

- 65 Como se muestra en la Figura 1, el octapéptido con caperuza Ac-KPSSPPEE-Am (también denominado Å6), inhibió la invasión de la línea de células tumorales tanto de rata como la humana. Este péptido no fue citotóxico para las células ni inhibió la proliferación celular. Así el efecto observado no fue un efecto colateral de citotoxicidad y pudo atribuirse a un mecanismo de acción diferente al de agentes citotóxicos o citostáticos.

Se realizaron ensayos a péptidos con caperuza relacionados más cortos con la secuencia Ac-PSSPPEE-Am (una variante de supresión de la SEC. ID N°:2 que carece de Lys en la terminal N) y Ac-KPSSPPEE-Am (una variante de supresión de la SEC. ID N°:2 que carece de uno de los residuos Glu de la terminal C). También se analizaron un péptido más largo similar, KPSSPPEELK (SEC. ID N°: 1) (Blasi *et al.*, publicación de los EE.UU. 5.416.006) y su contraparte con caperuza, Ac-KPSSPPEELK-Am).

Es digno de mencionar que todos los péptidos distintos de Ac-KPSSPPEE-Am mostraron poca o ninguna actividad en este ensayo, lo que indica que la SEC. ID N°: 2 tenía el tamaño mínimo requerido para la actividad (Figura 2). Los resultados indicaron que la adición de Leu y Lys en la terminal de KPSSPPEE anulaban su actividad biológica, sin que bastara si los terminales tuvieran o no caperuza.

Los resultados adicionales se muestran en la Figura 3 para los péptidos designados Å13 (KPSSPPEE, sin caperuza), Å14 (Ac-KPSSPPEEL-Am), y Å15 (GGKPSSPPEE-Am, con caperuza solamente en la terminal C). Ni Å13 ni Å14 fueron inhibitorios, mientras que, a la mayor concentración analizada, Å15 mostró algo de actividad.

Ejemplo III

Inhibición de la proliferación y migración celular endotelial

Se realizaron estudios para evaluar la actividad del péptido Å6 como un inhibidor de la proliferación y migración *in vitro*. Estos formatos de ensayo se pueden utilizar para células tumorales o células endoteliales. En este caso, las células (20.000 por pocillo) se sembraron en una placa de 24 pocillos. El crecimiento celular se puede estimular utilizando suero, citocinas, o componentes de matriz recubiertos sobre las placas antes de agregar las células. Todos los ensayos de proliferación se realizaron durante la fase log del crecimiento (típicamente una confluencia de células <70%) que se establece determinando curvas de crecimiento para cada línea celular. El volumen típico en cada pocillo es de 0,5 mL y estos medios se cambian cada 48 horas (incluyendo el reemplazo de cualquier inhibidor que se esté analizando). Al finalizar el ensayo, cada pocillo se lava 3x con PBS (0,5 mL por pocillo durante 5 minutos) y se determina el número de células utilizando un ensayo colorimétrico, como el ensayo MTS (Promega) o CyQuant (Pierce), conforme a las instrucciones de los fabricantes. Cada condición (concentración del inhibidor, día del ensayo, etc.) se ensaya por triplicado y se muestran las medianas de los pocillos triplicados.

En este estudio se estimularon las células con 2 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF). Los resultados, que se muestran en la Figura 4, indican que Å6 fue un potente inhibidor de la proliferación celular.

Los ensayos de migración fueron similares a los descritos en el Ejemplo II anteriormente. Se recubrieron cámaras Transwell (Costar, 8,0 µm de tamaño de poro) fueron recubiertas con colágeno tipo I (50 µg/mL) agregando 200 µL de la solución de colágeno por cámara transwell, luego se incubaron durante la noche a 37°C. Las cámaras transwell se ensamblaron en una placa de 24 pocillos y se agregó un quimioattractor, en este caso bFGF, al fondo de la cámara en un volumen total de 0,8 mL en el medio F12K suplementado con FBS al 10% y antibióticos. Este es el medio adecuado para las células endoteliales vasculares humanas, pero se puede variar para otros tipos de células. Las células endoteliales, que se desprendieron del cultivo en monocapa utilizando tripsina, se diluyeron con medio exento de suero hasta una concentración final de 1×10^6 células/mL y 0,2 mL de esta suspensión celular se agregó a la cámara superior de cada cámara transwell. Los inhibidores analizados, el péptido Å6, se agregaron a la cámara superior e inferior, y se dejó que la migración siguiera su curso durante 5 horas en una atmósfera humidificada a 37°C. Las cámaras transwell se retiraron de la placa y la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón. Se agregó fijador a la cámara superior durante 5 minutos seguido de lavado (3x5 minutos por lavado) con PBS. Las células se tiñeron con azul de toluidina y se contaron bajo un campo de alta potencia (400x) para determinar el número de células que habían migrado.

Los resultados (Figura 5) muestran que, comparando con los controles de bFGF, la adición de Å6 en concentraciones entre 1 y 1000 µM ocasionaron una inhibición de migración de un 20-80%.

Ejemplo IV

Inhibición de angiogénesis in vivo mediante KPSSPPEE con caperuza (el péptido Å6) y compuestos relacionados

Se examina la angiogénesis inducida por el crecimiento y metástasis tumoral *in vivo* en los sistemas de modelo descritos anteriormente. Ratones inyectados con células 3LL se trataron con péptido o con vehículo y se sacrificaron en distintos puntos de tiempo. Se evaluó la angiogénesis determinando la densidad de los microvasos (MVD) utilizando un anticuerpo específico para endotelio microvascular u otros marcadores de crecimiento de vasos sanguíneos, como PECAM (CD31). Este anticuerpo se utiliza en métodos inmunohistológicos convencionales para inmunotear secciones de tejido como lo describen Penfold *et al.*, *supra*. Una gran cantidad de estos anticuerpos está disponible comercialmente, por ejemplo el JC70 mAb. Las MVD están correlacionadas con otras medidas del comportamiento tumoral incluyendo el estado de los nódulos linfáticos y el tamaño del tumor primario y la velocidad de crecimiento. En seres humanos, como informa Penfold *et al.*, *supra*, la MVD tumoral se correlaciona con la metástasis de nódulos linfáticos y es independiente del tamaño del tumor, la velocidad de crecimiento o el tipo de diferenciación histológica. Solamente la MVD mostró una asociación significativa con la metástasis de nódulos linfáticos.

Los compuestos se administran i.v., i.p., o mediante minibomba osmótica. Las dosificaciones típicas son 100-250 mg/kg/día. En distintos puntos de tiempo, se sacrifican dos animales, y el tejido tumoral y el tejido circundante se prepara para su examen histológico. Los resultados se informan como la densidad de microvasos promedio de 5 campos, cada uno de 5 secciones distintas. Se analizan los siguientes siete compuestos: Ac-KPSSPPEE-Am (SEC. ID N°:2), Ac-KPTTPPEE-Am (variante de disustitución en las posiciones 3 y 4), Ac-KPSSPPDD-Am (variante de disustitución en las posiciones 7 y 8), Ac-RPSSPPEE-Am (variante de sustitución en la posición 1), Ac-PSSPPEE-Am (variante de supresión, posición 1 de la SEC. ID N°:2 suprimida), Ac-KPSSPPE-Am (variante de supresión, posición 8 de la SEC. ID N°:2 suprimida), y Ac-KPPSSPPEELK-Am (SEC. ID N°:1).

Se obtuvieron los siguientes resultados. En las ratas tratadas con Ac-KPSSPPEE-Am, Ac-KPTTPPEE-Am, Ac-KPSSPPDD-Am y Ac-RPSSPPEE-Am, hay una reducción significativa en el número de microvasos en la región del tumor primario en el sitio de inoculación subcutáneo en comparación con los controles. Los péptidos Ac-PSSPPEE-Am, Ac-KPSSPPE-Am y Ac-KPPSSPPEELK-Am no tuvieron un efecto significativo sobre la angiogénesis. Por lo tanto, los cuatro compuestos indicados tienen actividad anti-angiogénica que es responsable, por lo menos en parte, de su efectividad como agentes antitumorales.

Ejemplo V

Inhibición de crecimiento y metástasis tumoral in vivo mediante KPSSPPEE con caperuza (el péptido Å6) y compuestos relacionados

El sistema de cáncer de mama singénico de rata utiliza células de cáncer de mama de rata Mat BIII. Se inoculan 1×10^6 células tumorales suspendidas en 0,1 mL de PBS en las almohadillas de grasa mamaria de 10 ratas Fisher hembra. En el momento de la inoculación, se implanta intraperitonealmente una minibomba osmótica de Alza de 14 días para dispensar el péptido. El péptido se disuelve en PBS (200 mM de solución madre), filtrada estéril y colocada en la minibomba para lograr una velocidad de dispensación de aproximadamente 100 mg/kg/día. Los animales control reciben solamente vehículo (PBS) en la minibomba. Se sacrifican los animales el día 14.

En el presente estudio, células MatBIII células (Xing y Rabbani, 1996) (1×10^5 células en 0,2 mL de PBS estéril) se inocularon en las almohadillas de grasa mamaria de ratas Fisher hembra. Se administró Å6 mediante infusión continua utilizando minibombas implantadas quirúrgicamente o, en un segundo experimento, por administración por ruta IP. La dosis total (77 mg/kg/día) fue idéntica en ambos estudios aunque en el estudio IP, los animales recibieron la mitad de la dosis total en cada inyección IP dos veces por día. Las ratas se sacrificaron el día 15 y se examinaron para detectar metástasis macroscópicas. Estas metástasis, así como los tumores resultantes del desafío primario, se embebieron en parafina y se prepararon secciones para su análisis histológico e inmunohistoquímico. Los tumores resultantes del desafío primario se evaluaron utilizando calibres y las metástasis se evaluaron por recuento simple.

Los resultados del crecimiento del tumor primario se muestran en la Figura 6. El péptido Å6 proporcionó una inhibición altamente significativa del crecimiento local del tumor de mama como se observa a lo largo de tres puntos de tiempo. La Figura 7 muestra que la diseminación del tumor a los nódulos linfáticos fue inhibida completamente por el péptido.

El análisis histológico mostró que el tratamiento con Å6 indujo la apoptosis masiva de células tumorales, probablemente a través de un mecanismo de acción anti-angiogénico, que priva a las células tumorales de factores de supervivencia al inhibir la formación de nuevos vasos. Esto está respaldado por el hecho de que el péptido Å6 no fue ni citotóxico ni indujo la apoptosis en células tumorales *in vitro*.

En otros estudios se esperan resultados posteriores. En las ratas tratadas con Ac-KPSSPPEE-Am, Ac-KPTTPPEE-Am, Ac-KPSSPPDD-Am y Ac-RPSSPPEE-Am, hay una reducción significativa en el tamaño del tumor primario y en la cantidad de metástasis en bazo, pulmones, hígado riñón y nódulos linfáticos (enumerados como focos discretos). Con el análisis histológico e inmunohistoquímico se observa que en los animales tratados hay un incremento de la necrosis y signos de apoptosis. Se ven grandes áreas necróticas en regiones tumorales carentes de neovascularización.

En contraste, el tratamiento con los péptidos Ac-PSSPPEE-Am, Ac-KPSSPPE-Am y Ac-KPPSSPPEELK-Am no logra ocasionar un cambio significativo en la metástasis o tamaño del tumor.

Ejemplo VI

Inhibición de crecimiento y metástasis de células tumorales humanas xenoinjertadas

Utilizando el modelo descrito anteriormente (véase también Price, *supra*), se inocularon células MDA-MB-231 (1×10^5 células en 0,2 mL de Matrigel frío) en las almohadillas de grasa mamaria de ratones (atímicos) Balb/C hembra. Se dejó que las células tumorales se implantaran y crecieran durante 27 días. El día 28, el tratamiento con el péptido Å6 comenzó. El péptido se administró dos veces por día por inyección IP a una dosificación de 75 mg/kg/día. El crecimiento del tumor primario se midió cada 2 días. Los ratones se sacrificaron el día 50 y se examinaron para

detectar metástasis macroscópicas. Los tumores primarios se retiraron y se pesaron, luego se incluyeron en parafina para su evaluación histológica. Las metástasis se observaron en los nódulos linfáticos y se cuantificaron contando las lesiones macroscópicas.

Los resultados son los que se muestran en las Figuras 8 y 9. El péptido Å6 fue altamente efectivo para frenar el crecimiento de estas células tumorales agresivas (Figura 8). Los ratones tratados con el péptido Å6 no tuvieron metástasis macroscópicas en ninguno de los sitios examinados. La cuantificación de las metástasis en nódulos linfáticos es la que se muestra en la Figura 9.

Justo como en el modelo de rata, el análisis histológico mostró que el tratamiento con Å6 indujo la apoptosis masiva de células tumorales que estuvo mediada por un mecanismo anti-angiogénico.

Así, se concluyó que el péptido Ac-KPSSPPEE-Am es un agente anticancerígeno a nivel del tumor primario y, lo que es más importante para los seres humanos, suprime el desarrollo de metástasis.

Ejemplo VIII

Inhibición de metástasis experimental de células tumorales in vivo

Los compuestos péptidos descritos en los Ejemplos anteriores se analizaron para determinar la efectividad *in vivo* en el modelo 3LL (también descrito anteriormente).

En otro modelo, las células PC-3 trasfectadas con el gen que codifica la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) se inocularon i.v. en ratones a dosis de 1×10^6 células por ratón. A estos ratones se les implantó una minibomba, como en el caso anterior, que dispensa 100 mg/kg/día del péptido o del vehículo a lo largo de un periodo de 14 o 21 días. Al finalizar el tratamiento, se sacrificaron los animales y la sonda marcadora de tumor se ensayó en los nódulos linfáticos regionales, los fémures, pulmones y cerebro.

Se obtuvieron los siguientes resultados. En los ratones tratados con Ac-KPSSPPEE-Am, Ac-KPTTPPEE-Am, Ac-KPSSPPDD-Am y Ac-RPSSPPEE-Am, la metástasis se inhibió notablemente. Estos resultados indican que estos compuestos interfieren con el proceso metastásico. En contraste, los ratones tratados con péptidos Ac-PSSPPEE-Am, Ac-KPSSPPE-Am y Ac-KPPSSPPEELK-Am no tuvieron reducción en la metástasis.

Ejemplo IX

El péptido Å6 inhibe la formación de tubo endotelial in vitro

Para este ensayo se agregó Matrigel (0,375 mg/mL; 250 µl/pocillo) a una placa de cultivo celular de 24 pocillos y se dejó que se formara el gel durante 30 minutos a 37°C. Se agregaron células endoteliales a 20.000/pocillo en F12K/FBS al 10%/medio antibiótico (véase arriba) a esos pocillos recubiertos. Se agregó un estimulador angiogénico, en este caso bFGF a determinados pocillos de prueba. Se agregó un compuesto que se estaba analizando para determinar la actividad inhibitoria en el tiempo 0, o se puede agregar en cualquier momento con posterioridad. El medio y los inhibidores se reemplazaron cada 24 horas si se dejaba que el ensayo durara tanto tiempo. La formación de tubo se cuantificó midiendo la longitud total de tubo en cada pocillo, utilizando detección microscópica.

Los resultados indican que el péptido Å6 bloqueó significativamente la formación de tubo endotelial y también fomentaron la disociación de los tubos preformados. Esto es una prueba adicional de la potencia de este péptido y otros péptidos de esta invención como agentes anti-angiogénicos.

Documentos Citados

Diversos documentos se citan solo en el texto anterior (en cita completa). Otros, que se citan de manera abreviada en el texto, se citan ahora de forma completa a continuación.

Aznavorian, S., Murphy, A. N., Stetler-Stevenson, W. G. & Liotta, L. A. (1993) "Molecular aspects of malignancy" *Cancer* 71(4): 1368-1383.

Blood, C. H. & Zetter, B. R. (1990) "Tumor interactions with the vasculature: Angiogenesis and tumor metastasis" *Biochim. Biophys. Acta* 1032: 89-118.

Bundgaard H, Ed: Design of Prodrugs, Elsevier, Amsterdam, 1985.

Chambers, S. K., Wang, Y., Gertz, R. E. & Kacinski, B. M. (1995) "Macrophage colony-stimulating factor mediates invasion of ovarian cancer cells through urokinase" *Canc. Res.* 55:1578-1585.

Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Roby, J. D., Parks, W. C. & Welgus, H. G. (1995) "Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metallo-proteinases in response to angiogenic factors and migration" *J. Invest. Dermatol.* 105: 170-176.

5 **Crowley, C.W., Cohen, R.L., Lucas, B.K., Liu, G., Shuman, M.A. & Levinson, A.D. (1993)** "Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 5021-5025.

Fernandez-Shaw, S., Marshall, J. M. & Hicks, B. (1995) "Plasminogen activators in ectopic and uterine endometrium" *Fertil. and Steril.* 63 (1): 45-51.

10 **Fox, S.B., Gatter, K.C. & Harris, A.L. (1996)** "Tumour angiogenesis" *J. Pathol.* 179:232-237.

Gross et al., The Peptides: Analysis, Structure, Biology, Vol. 1: Major Methods of Peptide Bond Formation, Academic Press, New York, 1979.

15 **Gross et al., The Peptides: Analysis, Structure, Biology, Vol. 3: Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis**, Academic Press, New York, 1981.

20 **Hoosein, N. M., Boyd, D. D., Hollas, W. J., Mazar, A., Henkin, J. & Chung, L. W. K. (1991)** "Involvement of urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines" *Cancer Comm.* 3 (8): 255-264.

Horiki et al., Chem. Lett. 165:168 (1978).

25 **Kaiser et al., Anal. Biochem.** 34:595 (1970).

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W. & Martin, G. R. (1986) "Basement membrane complexes with biological activity" *Biochemistry* 25:312-318.

30 **Leek, R. D., Harris, A. L. & Lewis, C. E. (1994)** "Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis" *J. Leukocyte Biol.* 56:423-435.

Lennarz, W. J. & Strittmater, W. J. (1991) "Cellular functions of metallo-endoproteinases" *Biochim. Biophys. Acta* 1071:149-158.

35 **Liotta, L. A., Steeg, P. S. & Stetler-Stevenson, W. G. (1991)** "Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive y negative regulation" *Cell* 64:327-336.

Lübke et al., Chemie und Biochemie der Aminosäuren. Peptide und Proteine I, Chapter 11-1, 102-117 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975).

40 **Mareel, M. M., Van Roy, F. M. & De Baetselier, P. (1990)** "The invasive phenotypes" *Cancer and Metastasis Rev.* 9: 45-62.

45 **Min, H. Y., Doile, L. V., Vitt, C. R., Zandonella, C. L. Stratton-Thomas, J. R., Shuman, M. A. & Rosenberg, S. (1996)** "Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor crecimiento in syngeneic mice" *Cancer Res.* 56: 2428-2433.

Moore et al., Péptidos, Proc. Fifth Amer. Pept. Symp., Goodman et al., eds., 1977, pp 518-521.

50 **Odedra, R. & Weiss, J. B. (1991)** "Low-molecular weight angiogenesis factors" *Pharmac. Ther.* 49. 111-124.

Osborn, L. (1990) "Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation" *Cell* 62:3-6. Parish, C. R., Jakobsen, K. B. & Coombe, D. R. (1992) "A basement-membrane permeability assay which correlates with the metastatic potential of tumor cells" *Int. J. Cancer* 52:378-383.

55 **Penfold, C. N., Partridge, M., Rojas, R. & Langdon J. D. (1996)** "The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma" *Brit J Oral y Maxill. Surg.* 34: 37-41.

60 **Rabbani, S.A., Harakidas, P., Davidson, D., Henkin, J., & Mazar, A.P. (1995)** "Prevention of prostate cancer metastasis *in vivo* by a novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA)" *Int. J Cancer* 63:840-845a

Schnaper, H. W., Barnathan, E.S., Mazar, A.P., Maheshwari, S., Ellis, S., & Kleinman, H.K. (1995) "Plasminogen activators augment endothelial cell organization *in vitro* by two distinct pathways." *J Cell. Phys.* 165: 107-118.

Sweeney, T. M., Kibbey, M. C, Zain, M., Fridman, R. & Kleinman, H. K. (1991) "Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases" *Cancer and Metastasis Rev.* 10:245-254.

Taipale, J. & Keski-Oja, J. (1997) "Growth factors in the extracellular matrix" *FASEB J* 11: 51-59.

Vlodavsky, I., Korner, G., Ishai-Michaeli, R., Bashkin, P., Bar-Shavit, R. & Fuks, Z. (1990) "Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis" *Cancer & Metastasis Rev.* 9: 203-226.

Weaver, V.M., Petersen, O. & Bissell, M. (1997) *J. Cell Biol.* 137: 231-246.

Weinstat-Saslow, D. & Steeg, P. S. (1994) "Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances" *FASEB J.* 8: 401-407.

Welch, D. R. (1997) "Technical considerations for studying cancer metastasis *in vivo*" *Clin. Exp. Metastasis* 15: 272-306.

Xing, R. H. & Rabbani, S. A. (1996) "Overexpression of urokinase receptor in breast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and metastasis" *Int. J. Cancer* 67:423-429.

Habiendo descrito por completo esta invención, los expertos en la técnica podrán apreciar que la misma se puede realizar en una amplia gama de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin alejarse del espíritu y el alcance de la invención y sin experimentación indebida.

A pesar de que esta invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de la misma, se debe entender que son posibles modificaciones adicionales. Esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención que siga, en general, los principios de la invención e incluir los desvíos de la presente divulgación según sea conocido o práctica habitual en la técnica a la que la invención pertenece y según se pueda aplicar a las características esenciales anteriormente establecidas como sigue en el alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que no sucede naturalmente con la secuencia:

5 Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu (SEC. ID N°: 2), que tiene caperuza en el terminal N y/o el terminal C, en el que dicho péptido tiene una o más de las siguientes actividades:

10 (a) tiene por lo menos aproximadamente un 20% de la actividad biológica de Ac-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am en uno o más de los siguientes ensayos biológicos *in vitro*: (i) invasión en un ensayo de Matrigel®; (ii) formación de tubo endotelial en Matrigel®, o (iii) formación de tubo endotelial en una matriz de fibrina en presencia de factor de crecimiento de fibroblasto básico y factor de crecimiento endotelial vascular; o

15 (b) compite con Ac-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am marcado por unirse a una célula o molécula que tiene un sitio de unión para Ac-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Am.

2. El péptido de la reivindicación 1 que está acetilado en el terminal amino y amidado en el terminal carboxi.

3. El péptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido está marcado.

20 4. El péptido de la reivindicación 3, en el que dicho marcador se selecciona de un marcador radiactivo, fluorogénico, cromogénico, u otro marcador químico.

5. El péptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que ese péptido está conjugado con un agente terapéutico.

25 6. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

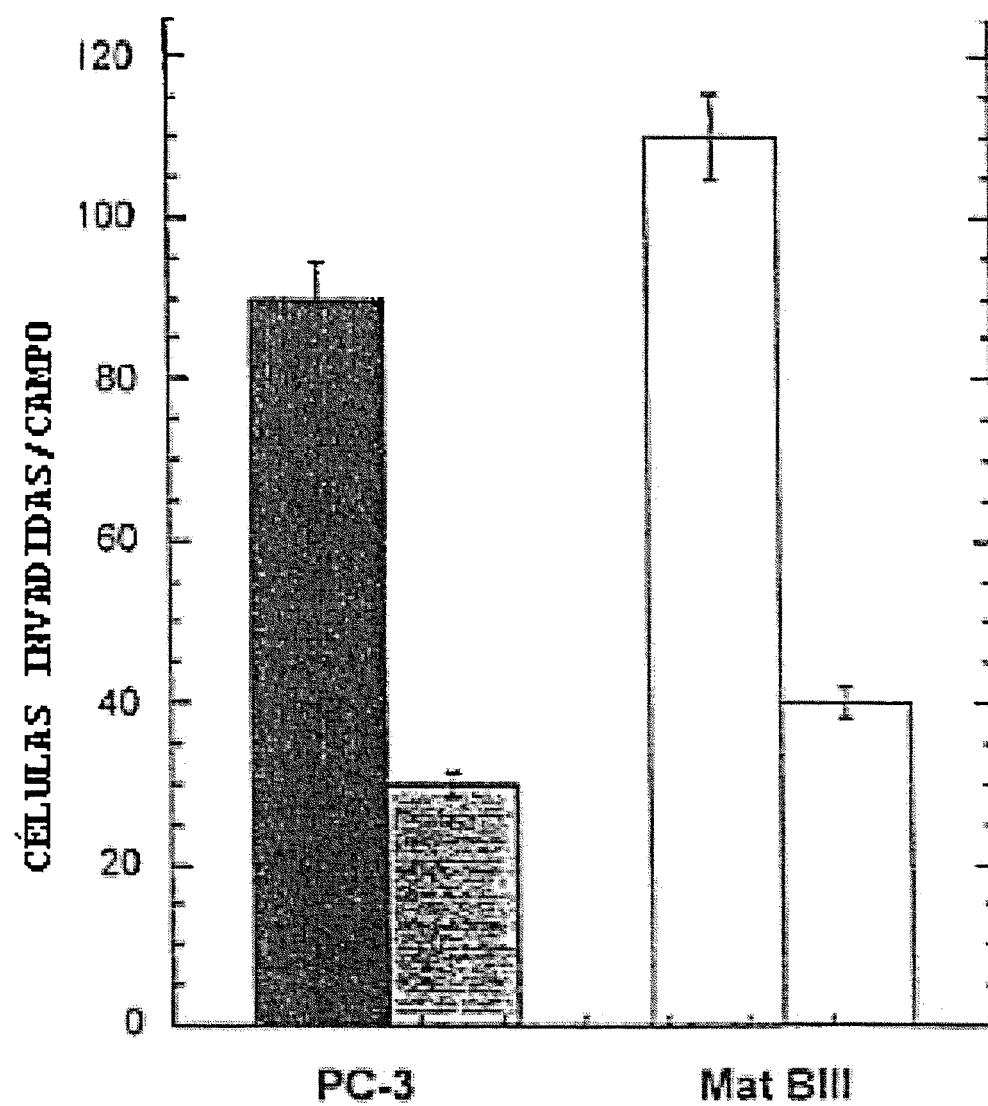


FIG. 1

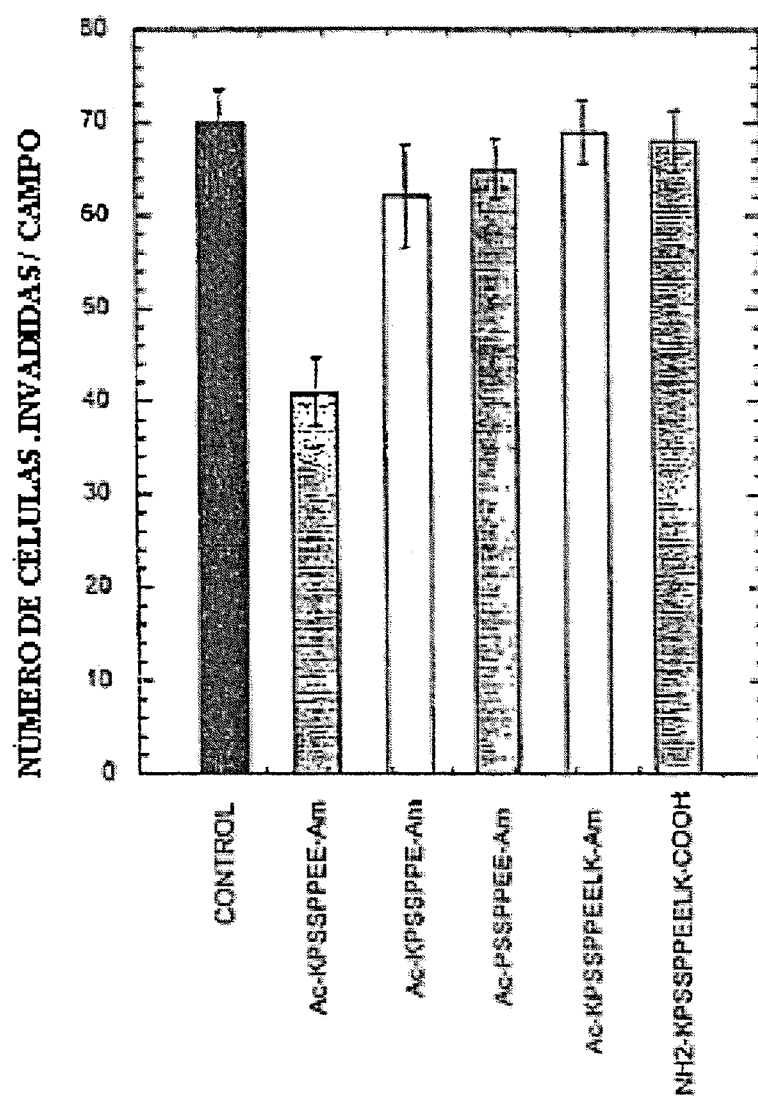


FIG. 2

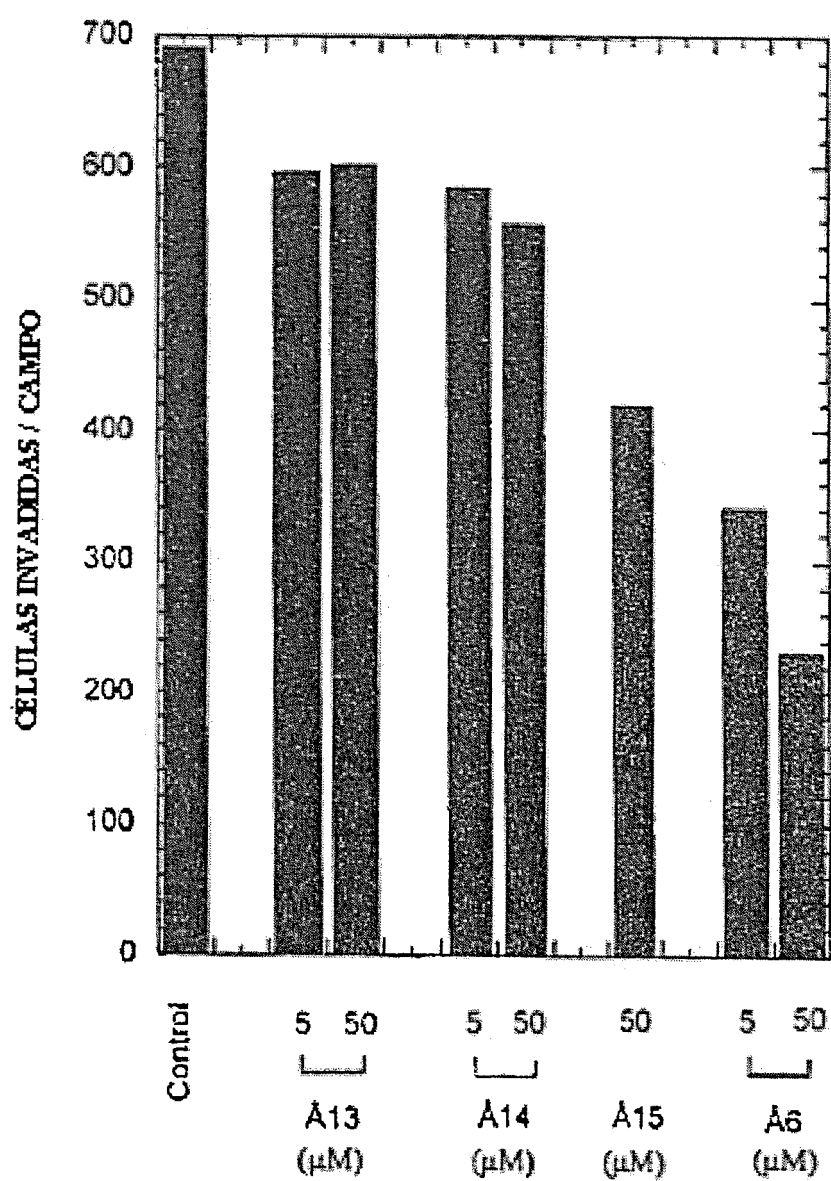


FIG. 3

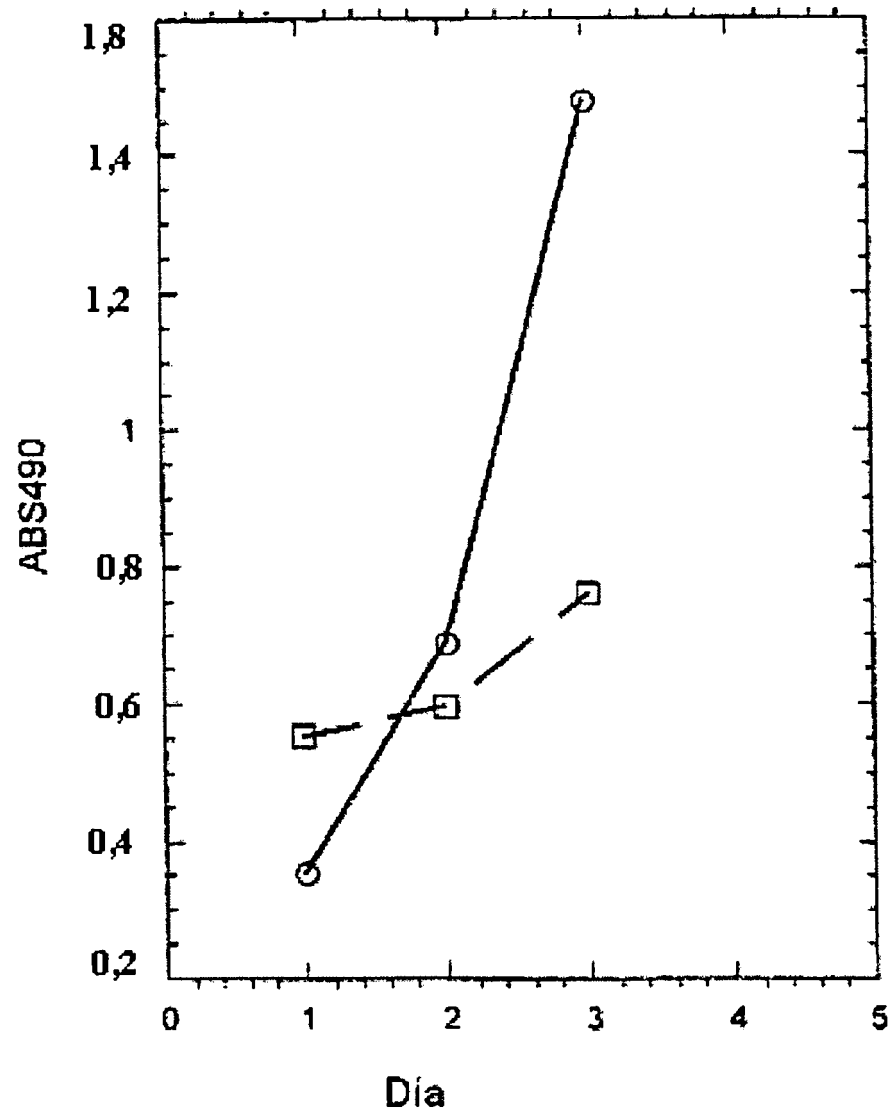


FIG. 4

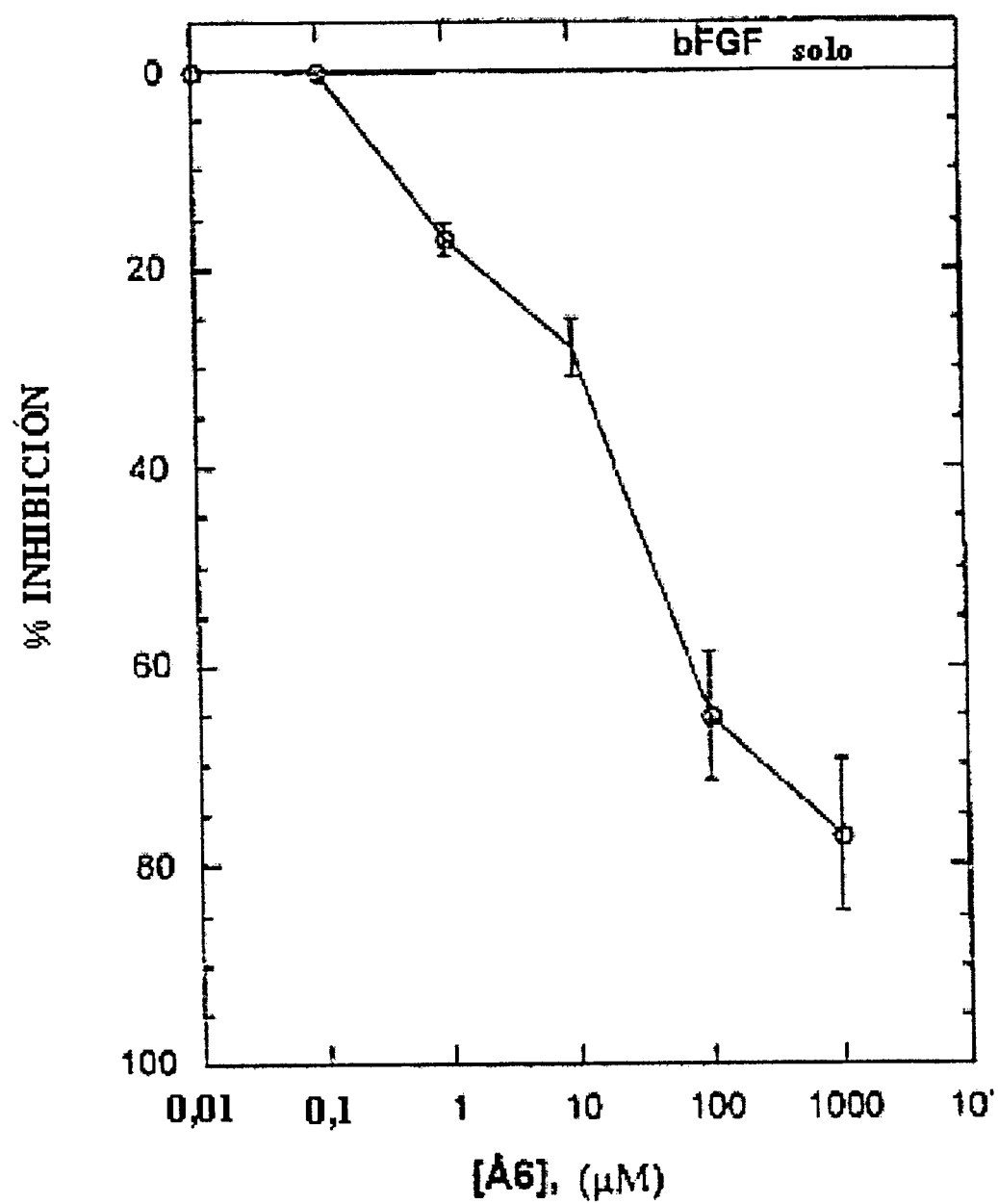


FIG. 5

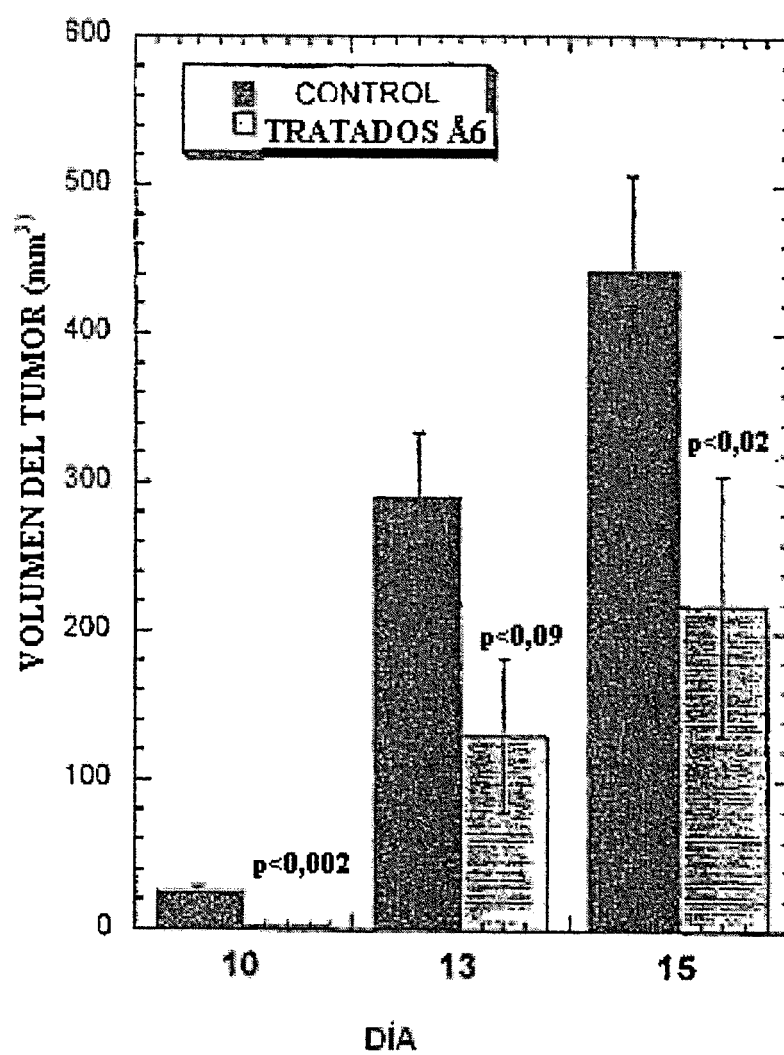


FIG. 6

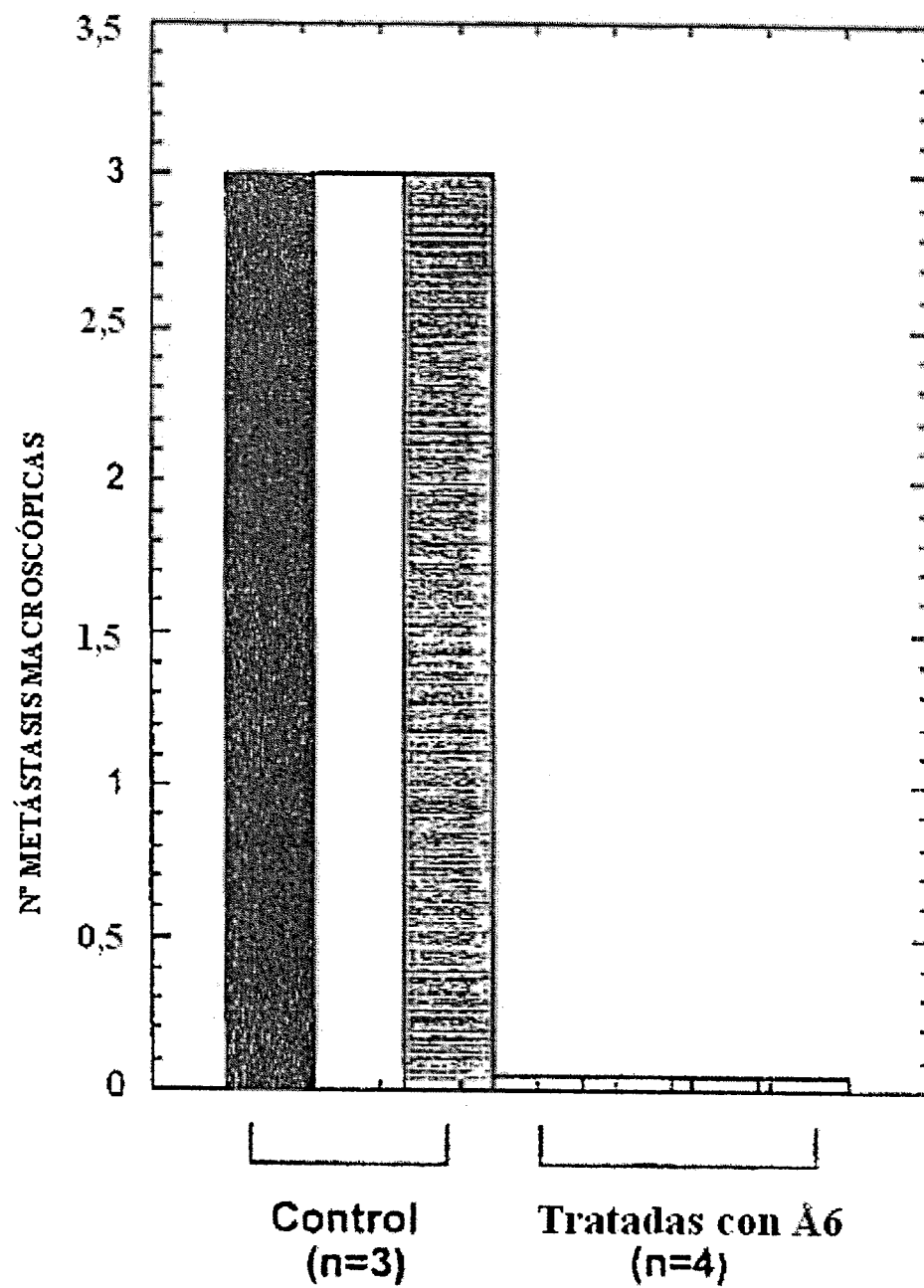


FIG. 7

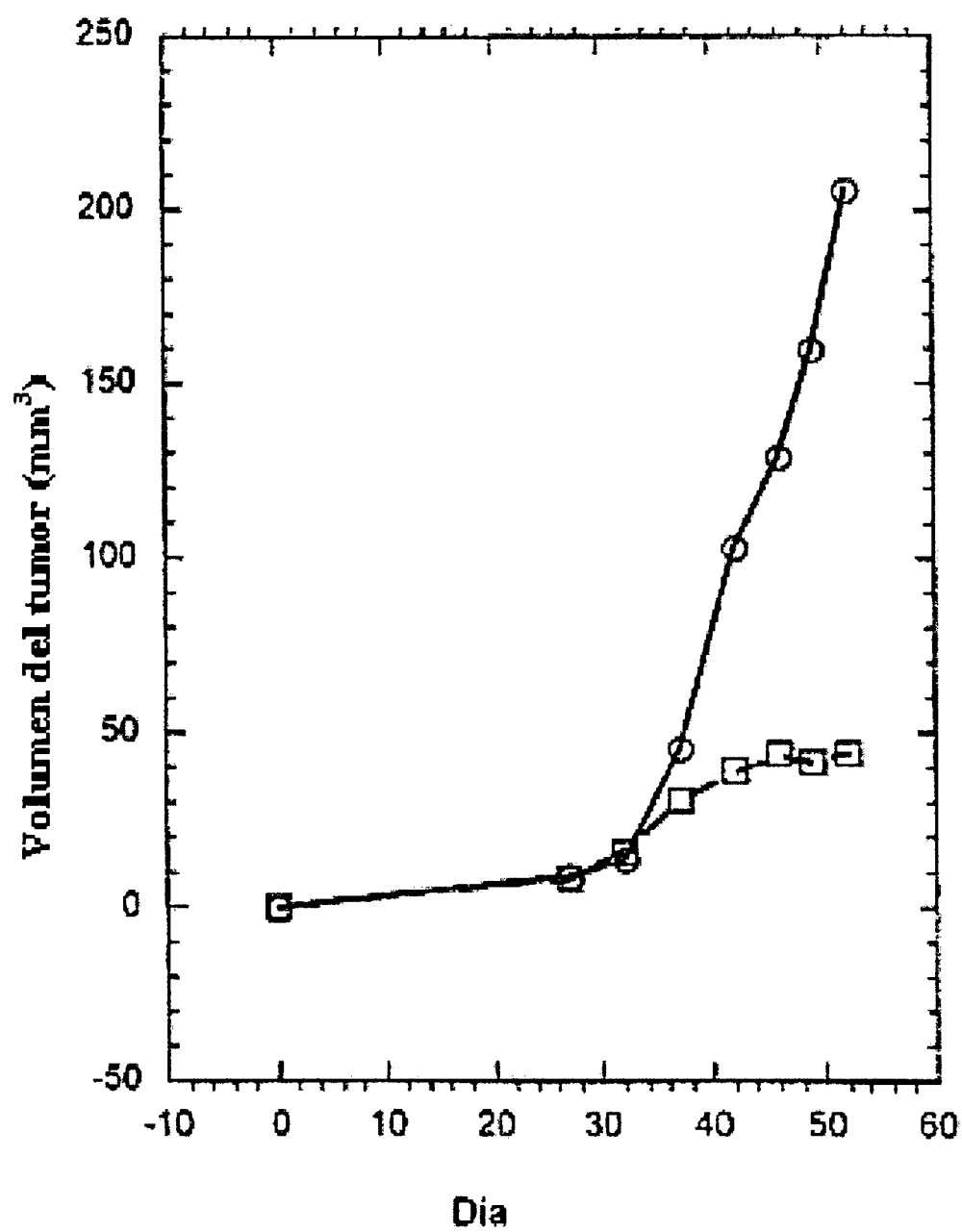


FIG. 8

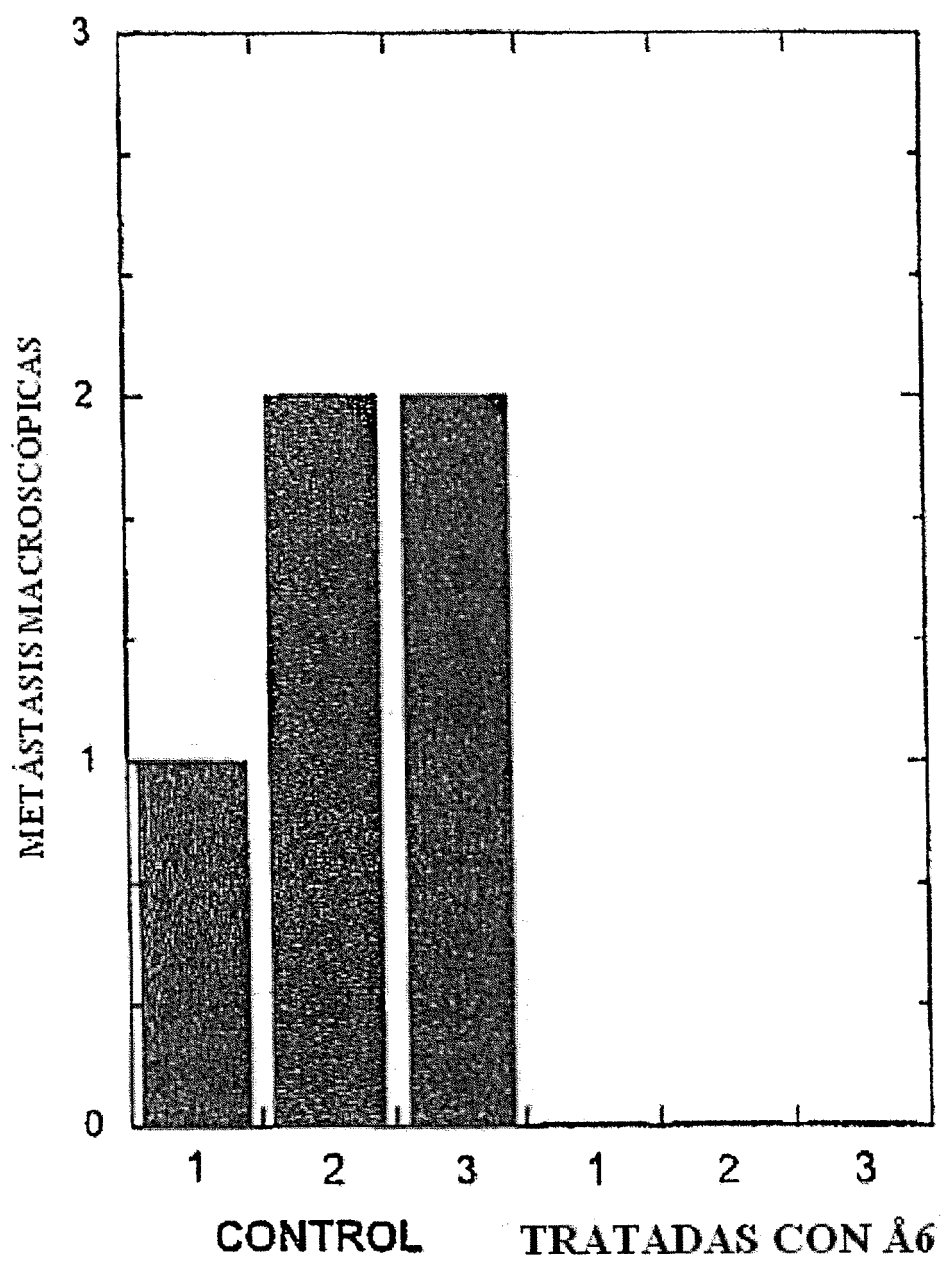


FIG. 9