

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 506**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08

(2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012** **E 19165438 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024** **EP 3560509**

54 Título: **Péptidos derivados de saposina-A y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579095 P

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

27.06.2024

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)**

**55 Shattuck Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

WATNICK, RANDOLPH S

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 974 506 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de saposina-A y usos de los mismos

5 Apoyo gubernamental

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo R01 CA135417 otorgado por los National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a péptidos aislados que consisten en secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en DWLPKPNMS (SEQ ID NO: 12), CDWLPKPNM (SEQ ID NO: 13), TCDWLPKPN (SEQ ID NO: 14), KTCWLPKPN (SEQ ID NO: 15), EKTCDWLPK (SEQ ID NO: 16), LEKTCDWLP (SEQ ID NO: 17), o variantes de los mismos que tienen una sustitución de aminoácido conservadora por un aminoácido que flanquea la secuencia DWLP, y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

20 La diseminación de células cancerosas desde el sitio del tumor primario a órganos distantes se conoce como metástasis. La progresión del cáncer humano a una enfermedad metastásica es el principal factor que contribuye a su letalidad. La metástasis se ha considerado uno de los aspectos más intrigantes de la patogénesis del cáncer. La metástasis de tumores cancerosos, o también conocida como enfermedad metastásica, es responsable de la mayoría de los fracasos terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad, ya que los pacientes sucumben al crecimiento de múltiples tumores, lo que representa más del 90% de las muertes humanas relacionadas con el cáncer. Véase, por ejemplo, Cancer, A Comprehensive Treatise, F. F. Becker (editor), Volume 4, Chapter 3, Plenum Press, Nueva York, 1975.

30 Para que un tumor forme metástasis letales debe adquirir la capacidad de llevar a cabo una serie compleja de pasos. Estos pasos incluyen: obtener acceso a la vasculatura o al sistema linfático (intravasación), sobrevivir durante el tránsito, salir de los canales vasculares o linfáticos (extravasación) y proliferar en el sitio metastásico. Uno de los pasos que limitan la tasa de proliferación de tumores, tanto en el sitio primario como en el metastásico, es la adquisición del fenotipo angiogénico (Folkman, 1971). La inducción de la angiogénesis no sólo permite que los tumores crezcan más allá del límite de tamaño impuesto por el límite de difusión del oxígeno, sino que también proporciona un conducto a través del cual las células tumorales pueden viajar y colonizar órganos distantes (Brown et al., 1999; MacDougall y Matrisian, 1995). Una vez que las células tumorales llegan al sitio metastásico, también deben inducir la neovascularización para crecer más allá de un tamaño microscópico. Sin embargo, se ha documentado que las colonias metastásicas pueden permanecer en un estado microscópico o latente y no progresar más allá de este tamaño durante meses o años después de la colonización inicial (Fidler, 2003).

40 La presencia de micrometástasis latentes o latentes indica que el crecimiento y la proliferación tumoral no se rigen únicamente por procesos celulares autónomos y que las condiciones presentes en el microambiente que permitieron la proliferación en el sitio primario no pueden existir en el sitio metastásico. Por tanto, la capacidad de un tumor para comunicarse con el estroma circundante, compuesto por fibroblastos, células inmunes y endotelio, debe restablecerse al llegar al sitio metastásico. Una forma en que la señalización heterotípica tumor-estroma podría afectar el crecimiento tumoral es a través de la regulación de la producción y secreción de proteínas pro y antiangiogénicas por los fibroblastos estromales y las células endoteliales circundantes.

45 Se han estudiado bien los eventos moleculares y genéticos que facilitan el escape del sitio primario y el retorno al sitio metastásico. Se ha demostrado en un modelo murino de metástasis de cáncer de mama que el escape del sitio primario dependía en gran medida de la actividad del factor de transcripción Twist (Yang et al., 2004). Además, los análisis de microarreglos de células metastásicas de cáncer de mama humano, obtenidas mediante inyección en serie en ratones inmunocomprometidos, revelaron conjuntos de genes cuya expresión se correlacionaba con su destino metastásico preferido de hueso o pulmón (Kang et al., 2003; Minn et al., 2005). Estos estudios, aunque arrojaron información clave sobre dos pasos críticos de la metástasis tumoral, es decir, la intravasación y la localización, no abordaron los requisitos para el establecimiento y crecimiento del tumor en el sitio metastásico.

50 Se ha demostrado previamente que las células tumorales pueden estimular la expresión de la proteína proangiogénica VEGF en el estroma circundante (Dong et al., 2004; Fukumura et al., 1998). Sin embargo, la regulación de la trombospondina (Tsp-1), una de las proteínas antiangiogénicas endógenas más potentes, en el estroma asociado a tumores no se ha estudiado tan bien (Kalas et al., 2005).

60 Una nueva investigación sobre los eventos de señalización de célula a célula entre los tumores metastásicos y el estroma circundante puede generar estrategias novedosas para tratar la enfermedad metastásica. Todavía existe la necesidad de métodos para tratar la enfermedad metastásica que tengan menos toxicidad sistémica que los tratamientos estándar actuales que comprenden quimioterapia y/o radioterapia.

El estándar de oro para el tratamiento del cáncer es la quimioterapia, que se dirige ampliamente a todas las células en división y tiene muchos efectos secundarios adversos.

5 Los tratamientos más nuevos se dirigen a proteínas discretas (por ejemplo, VEGF, Her2, VEGFR, EGFR, Bcr-Abl, etc.), pero se limitan a apuntar a proteínas/vías individuales. Por tanto, existe eficacia en un subconjunto limitado de pacientes y la resistencia generalmente ocurre debido a mutaciones o compensación.

No existen medicamentos aprobados por la FDA que traten eficazmente los cánceres avanzados/agresivos. Por tanto, existe la necesidad de una terapia contra el cáncer que evite estas limitaciones, pueda inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis y pueda conducir a una mayor supervivencia del paciente.

Resumen de la invención

10 La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una colección de fotografías de resultados de experimentos que indican que los péptidos de 6 unidades y 18 unidades derivados de la saposina A estimulan la Tsp-1 *in vivo*.

15 La Fig. 2 proporciona fotografías de resultados experimentales que indican que los péptidos de 5 y 4 aminoácidos mostrados en ella exhiben actividad *in vitro*.

La Fig. 3 proporciona fotografías de resultados experimentales que indican que los péptidos de 5 y 4 aminoácidos que se muestran en ella exhiben actividad Psap estimuladora de Tsp-1 *in vivo*.

La Fig. 4 proporciona fotografías de resultados experimentales que indican mediante análisis de sustitución de alanina que sólo el residuo de leucina no es necesario para la actividad de los péptidos indicados.

20 La Fig. 5 proporciona dos fotografías de resultados experimentales realizados para estudiar el análisis conservador de sustitución de aminoácidos de los péptidos indicados.

La Fig. 6 es un gráfico de barras de resultados experimentales que indican que los fragmentos de Psap probados inhiben significativamente el crecimiento del tumor de próstata.

25 La Fig. 7 es un gráfico lineal de resultados experimentales que indican que los fragmentos de Psap analizados inhiben significativamente el crecimiento del melanoma.

La Fig. 8 es un gráfico lineal de resultados experimentales que indican que el fragmento de Psap analizado inhibe significativamente la metástasis.

30 La Fig. 9 es una fotografía de los resultados experimentales obtenidos del análisis de transferencia Western. Las letras minúsculas indican D-aminoácidos. El aumento en veces es Tsp-1/actina normalizado en relación con los no tratados. Los resultados experimentales indican que los péptidos sustituidos con D-aminoácido aumentaron aún más la expresión de Tsp-1 *in vivo* pero no *in vitro*.

La Fig. 10 es un gráfico de resultados experimentales que indican que los péptidos de sustitución de D-aminoácidos eran más estables en plasma humano.

35 La Fig. 11 es una gráfica de resultados experimentales que indican que el péptido Psap Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132, DWLP con D-aminoácidos D y L) induce la expresión de Tsp-1.

La Fig. 12 es una fotografía de resultados experimentales mediante tinción de tejido que indica que las células PC3 estimulan la Tsp-1 en células derivadas de BM *in vivo*.

La Fig. 13 es una tabla, una fotografía de tejido teñido y una fotografía de una transferencia Western que indica que Psap se correlaciona clínicamente con la progresión del cáncer de próstata.

40 La Fig. 14 es una tabla de datos clínicos que indican que los niveles de prosaposina se correlacionan con la recurrencia y la supervivencia del paciente.

La Fig. 15 son tres gráficos y dos fotografías de resultados experimentales que indican que Psap se correlaciona con la supervivencia del paciente y el fallo bioquímico.

45 La Fig. 16 es un gráfico de resultados experimentales que indican que el crecimiento del melanoma B16-B16 es inhibido por un péptido dWIP (SEQ ID NO: 130) derivado de prosaposina.

La Fig. 17 es una serie de fotografías de tinción de tejido que indican que el tratamiento con péptido Psap estimula Tsp-1 en células GR1 en melanomas primarios.

La Fig. 18 es una fotografía y gráficos de datos experimentales que indican que el tratamiento con péptido Psap inhibe la metástasis del cáncer de mama.

La Fig. 19 es un gráfico y una tabla de resultados experimentales que indican que los niveles de Psap se correlacionan con la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de ovario.

- 5 La Fig. 20 es un gráfico de resultados experimentales que indican que el péptido Psap hace retroceder el cáncer de ovario metastásico.

La Fig. 21 es una serie de gráficos de datos de FACS que indican que la ascitis del cáncer de ovario recluta células derivadas de Cd11b+/Gr1+ BM.

- 10 La Fig. 22 es una fotografía y un gráfico de datos experimentales que indican que un péptido Psap inhibe la metástasis pulmonar.

La Fig. 23 es una fotografía de tejido teñido y un gráfico de datos experimentales que indican que un péptido Psap estimula Tsp-1 en células derivadas de BM in vivo.

- 15 La Fig. 24 es una serie de fotografías que muestran que los ratones inyectados con medios condicionados de células MDA-MB-231 débilmente metastásicas tenían Tsp-1 aumentada en tejido pulmonar en comparación con los ratones inyectados con medios condicionados de células LM2 altamente metastásicas.

La Fig. 25 muestra una fotografía de una transferencia Western y una tinción Ponceau S que demuestra que DWLPK (SEQ ID NO: 4) aumento de la expresión de Tsp-1 en los glóbulos blancos.

Descripción detallada de la invención

- 20 Anteriormente se ha demostrado que las células tumorales ligeramente metastásicas o no metastásicas secretan una proteína que estimula la expresión de trombospondina (Tsp-1) en el entorno circundante de las células tumorales, es decir, el estroma compuesto por fibroblastos y células endoteliales. También hubo una fuerte correlación entre la metástasis, la expresión de Psap y Tsp-1 en las células tumorales y la expresión de Psap y Tsp-1 en el estroma del tumor. Además, hubo una fuerte correlación entre la metástasis y el nivel de Psap en el plasma y/o plaquetas de pacientes con cánceres metastásicos. Tanto el plasma como las plaquetas de pacientes con cánceres no metastásicos
- 25 contenían niveles elevados de Psap en comparación con los de individuos normales sin diagnóstico de cáncer. Por el contrario, el plasma y las plaquetas de pacientes con cánceres metastásicos contienen niveles de Psap que son comparables a los de individuos normales sin cánceres diagnosticados. Si bien no deseamos limitarnos a ninguna teoría, el cambio de niveles elevados de Psap a niveles normales o inferiores a los normales indica la transición de un cáncer no metastásico a un cáncer metastásico. Además, se cree que el aumento de la expresión de Tsp-1 en el estroma evita que las células tumorales metastaticen. La Tsp-1 es un potente factor antiangiogénico endógeno que se ha explorado previamente como terapia contra el cáncer. Abbott Laboratories desarrolló un péptido Tsp-1 que mostró eficacia preclínica y no mostró toxicidad en los ensayos clínicos de Fase I, pero fracasó en la fase II (sin eficacia significativa). La estimulación de la expresión de Tsp-1 por parte de la proteína derivada del tumor se realiza mediante la activación del supresor de tumores p53. El supresor de tumores p53 es un activador de la transcripción de la
- 30 expresión de Tsp-1. Esta proteína asociada a tumores secretada por células tumorales no metastásicas o débilmente metastásicas es la prosaposina (Psap). Además, dos fragmentos peptídicos de la Saposina A, siendo la Saposina A un producto de escisión de Psap, también fueron capaces de estimular la expresión de Tsp-1 *in vitro* e *in vivo*. Estos dos fragmentos peptídicos fueron CDWLPPKPNMSASC (SEQ ID NO: 41) y LEKTCDWLPKPNMSASCKE (SEQ ID NO: 37). En el presente documento se describen experimentos que indican, sorprendentemente, que fragmentos de Saposina A tan pequeños como cuatro aminoácidos conservan la actividad de la proteína Saposina A y los fragmentos
- 35 previamente identificados.
- 40

La prosaposina (Psap) es la proteína precursora de la saposina compuesta por aproximadamente 524-527 aminoácidos que incluye un péptido señal de 16 aminoácidos. El polipéptido precursor de 53 kDa de longitud completa sufre glicosilación cotraduccional y modificación en el retículo endoplásmico y el sistema de Golgi para producir una

45 proteína precursora de 70-72 kDa. Después del transporte al lisosoma, la catepsina D participa en su procesamiento proteolítico para producir formas moleculares intermedias de 35 a 53 kDa y luego a una glicoproteína de 13 kDa y finalmente a las formas maduras parcialmente glicosiladas de 8-11 kDa de moléculas de saposina individuales. (O'Brien JS y Kishimoto Y, The FASEB J., 5: 301-8, 1991; Kishimoto Y. et al., J. Lipid Res. 33:1255-67, 1992). Actualmente existen tres variantes de empalme conocidas de la proteína precursora; isoformas a, b y c.

- 50 La psap y las proteínas saposinas individuales se expresan mediante una amplia variedad de tipos de células que se originan en las capas germinales ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas, incluyendo, entre otros, pulmón, piel, fibroblastos, células estromales, huesos, músculo liso, músculo esquelético, músculo cardíaco, placenta, glóbulos rojos y blancos, páncreas, sistema linforreticular (bazo, timo, hígado), sistema micro y macrovascular, sistema genitourinario (por ejemplo, próstata, testículos, vesícula seminal) y sistema nervioso central y periférico. La prosaposina y las saposinas también están presentes como proteínas solubles en el espacio/líquido extracelular, incluyendo el líquido pleural, el líquido cefalorraquídeo, el líquido seminal, la leche y el suero (Campana WM., et al., 1999; Kishimoto Y. et al., 1992).
- 55

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estroma" o "estroma tumoral" se refiere a la estructura del tejido conectivo y a las células no tumorales de un tumor. Ejemplos de algunas células no tumorales que se encuentran en el estroma tumoral son los fibroblastos y las células endoteliales.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tumor" significa una masa de células transformadas que se caracterizan, al menos en parte, por contener vasculatura angiogénica. Las células transformadas se caracterizan por una multiplicación celular neoplásica incontrolada que es rápida y continúa incluso después de que ha cesado el estímulo que inició el nuevo crecimiento. El término "tumor" se utiliza ampliamente para incluir las células parenquimatosas tumorales así como el estroma de soporte, incluyendo los vasos sanguíneos angiogénicos que infiltran la masa de células parenquimatosas tumorales. Aunque un tumor generalmente es un tumor maligno, es decir, un cáncer que tiene la capacidad de metastatizar (es decir, un tumor metastásico), un tumor también puede ser no maligno (es decir, carecer de la capacidad de metastatizar). Los tumores son características del cáncer, una enfermedad neoplásica cuyo curso natural es fatal. Las células cancerosas exhiben propiedades de invasión y metástasis y son altamente anaplásicas.
- 10
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "metástasis" o "tumor metastásico" se refiere a la progresión de un tumor en el sitio original de desarrollo del tumor (conocido como tumor primario) a una ubicación secundaria. Un tumor de este tipo en la ubicación secundaria se denomina "tumor secundario" porque crece por separado en otras partes del cuerpo del tumor primario y ha surgido a partir de células transportadas y desprendidas, en donde el tumor primario es un tumor sólido. El tumor primario, como se usa en el presente documento, se refiere a un tumor que se originó en la ubicación u órgano en donde está presente y no hizo metástasis a esa ubicación desde otra ubicación.
- 20

Tal como se utiliza en el presente documento, un "tumor maligno" es uno que tiene las propiedades de invasión y metástasis y que muestra un alto grado de anaplasia. La anaplasia es la reversión de células a una forma inmadura o menos diferenciada y ocurre en la mayoría de los tumores malignos.

- 25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "recurrencia" de una enfermedad o trastorno angiogénico se refiere a la remanifestación/nuevo desarrollo de síntomas conocidos asociados con la enfermedad o trastorno angiogénico después de un tratamiento previo exitoso de la enfermedad o trastorno angiogénico. Por ejemplo, una "recurrencia" de un tumor se refiere al agrandamiento de un tumor existente cuyo crecimiento se había detenido o reducido durante una terapia anticancerígena, o la aparición de un tumor en el sitio original (primario) del descubrimiento del tumor después de que el tumor original se haya extirpado o reducido de tamaño. La recurrencia de un tumor también puede significar el crecimiento de nuevos tumores del mismo tipo de tumor que el tumor original en un sitio diferente del sitio original de descubrimiento del tumor. Esto puede ser una indicación de que el tumor primario original se ha diseminado a otras ubicaciones o que el tumor primario ha surgido como una forma resistente a los antiangiogénicos. Por ejemplo, una recurrencia de la artritis reumatoide puede incluir hinchazón localizada, dolor/rigidez de las articulaciones e ingreso elevado de leucocitos después de un período de remisión de la enfermedad y sin síntomas.
- 30
- 35

- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inhibir" o "inhibición" significa la reducción o atenuación de un fenómeno, tal como el crecimiento tumoral y/o la metástasis tumoral y/o la angiogénesis. La inhibición incluye la desaceleración de una tasa de progresión (por ejemplo, de crecimiento tumoral y metástasis). La tasa se puede reducir en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 125 %, aproximadamente 150 % o más en comparación con un control apropiado (por ejemplo, un tumor no tratado del mismo tipo). La inhibición también puede significar una reducción de los síntomas generales (por ejemplo, reducción del tamaño de un tumor). La reducción puede ser de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100% o más en comparación con un control apropiado.
- 40
- 45

- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mejorar", "que mejora", "estimular" o "estimular" significa el aumento de un fenómeno, tal como la expresión de Tsp-1. Este aumento puede ser de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 125 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 500 %, o más en comparación con un control apropiado (por ejemplo, una célula, tumor, porción de un tumor, estroma que rodea un tumor, plasma, sangre completa o un fibroblasto con expresión de Tsp-1 basal o mínima). Estos términos también abarcan el aumento de un fenómeno desde un estado cero (por ejemplo, expresión de Tsp-1 nula o indetectable en una célula, tumor, porción de un tumor, estroma que rodea un tumor, plasma, sangre completa o un fibroblasto) a un estado distinto de cero (por ejemplo, cierta expresión de Tsg-1 o expresión detectable de Tsp-1 en una célula, tumor, porción de un tumor, estroma que rodea un tumor, plasma, sangre completa o un fibroblasto).
- 50
- 55

- El término "prevención", tal como se usa para referirse al crecimiento tumoral y/o metástasis, significa que no habrá ningún aumento adicional en el tamaño de los tumores desde el momento del inicio de la administración del tratamiento. La prevención también significa el status quo de que no se detecten nuevos tumores metastásicos (es
- 60

decir, que no se propague más el cáncer) y/o una mayor cantidad de marcadores tumorales detectados mediante métodos conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que es segura y suficiente para producir un resultado clínicamente beneficioso en un sujeto. Tales resultados son, por ejemplo, prevención o retraso del desarrollo y mayor propagación de metástasis en un paciente con cáncer, curar o hacer que el cáncer entre en remisión, retardar el curso de la progresión del cáncer, retardar o inhibir el crecimiento del tumor, retardar o inhibir la metástasis del tumor, retardar o inhibir el establecimiento de tumores secundarios en sitios metastásicos, o inhibir la formación de nuevas metástasis tumorales.

El término "tratar" o "tratamiento" se refiere a obtener un beneficio terapéutico o paliativo para un sujeto, en donde el objetivo es ralentizar y/o detener el desarrollo o empeoramiento de, o revertir la progresión de una enfermedad (por ejemplo, propagación de una tumor). Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos a quienes ya se les ha diagnosticado la enfermedad o trastorno, así como aquellos que probablemente desarrollen la enfermedad o una forma secundaria de la enfermedad (por ejemplo, tumores secundarios debido a metástasis).

El término "angiogénesis", como se usa en el presente documento, se refiere al surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, caracterizado por la proliferación y migración de células endoteliales desencadenadas por ciertas condiciones patológicas, tales como el crecimiento de tumores sólidos y metástasis.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis" se refiere a enfermedades o trastornos que dependen de un rico suministro de sangre y proliferación de vasos sanguíneos para la progresión patológica de la enfermedad (por ejemplo, tumores metastásicos) o enfermedades o trastornos que son el resultado directo de una proliferación aberrante de vasos sanguíneos (por ejemplo, retinopatía diabética y hemangiomas). Los ejemplos incluyen proliferación vascular anormal, formación de ascitis, psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia tiroidea, preeclampsia, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Alzheimer, obesidad, derrame pleural, aterosclerosis, endometriosis, diabetes y otras retinopatías, neovascularizaciones oculares tal como glaucoma neovascular y neovascularización corneal.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN.

El término "vector" utilizado en el presente documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se perpetúa a sí misma y que puede recibir y perpetuar secuencias de ácido nucleico heterólogas. Los vectores normalmente contienen un origen de replicación y otras secuencias que son necesarias para la replicación por parte de un organismo huésped. Los vectores útiles incluyen, sin limitaciones, vectores virales, plásmidos, bacteriófagos, cromosomas artificiales bacterianos o cromosomas artificiales de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante o un vector que se integra en un genoma huésped. Un vector puede ser procariota, eucariota o ambos. Puede diseñarse un vector para su uso en células bacterianas y/o de mamífero. Un vector puede ser además un "vector de expresión", que se refiere a la incorporación de secuencias codificantes enlazadas operativamente a las secuencias de expresión/reguladoras que funcionan en la expresión de las secuencias codificantes cuando están en el contexto apropiado (por ejemplo, en una célula procariótica o eucariota). Los vectores de expresión pueden ser bacterianos o de mamíferos o ambos. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante suelen tener la forma de "plásmidos" que se refieren a bucles circulares de ADN bicatenario que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. Se pueden usar otros vectores de expresión en diferentes realizaciones de la divulgación, por ejemplo, pero no se limitan a, plásmidos, episomas, bacteriófagos o vectores virales, y dichos vectores pueden integrarse en el genoma del huésped o replicarse de forma autónoma en la célula particular. También se pueden utilizar otras formas de vectores de expresión conocidas por los expertos en la técnica que cumplen funciones equivalentes. Los vectores de expresión pueden ser para la expresión estable o transitoria del producto proteico codificado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector viral" se refiere a un constructo de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen viral e incluye elementos suficientes para o que permiten empaquetar en una partícula de vector viral. Un vector viral puede contener la secuencia codificante de una proteína Psap en lugar de genes virales no esenciales. El vector y/o partícula se puede utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos al interior de las células *in vitro* o *in vivo*. En la técnica se conocen numerosas formas de vectores virales. En algunas realizaciones, el vector viral está diseñado para la expresión de las secuencias codificantes incorporadas (por ejemplo, un vector de expresión viral) cuando está en el contexto apropiado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pronóstico" abarca predicciones y análisis de probabilidad de la progresión de la enfermedad, particularmente recurrencia tumoral, diseminación metastásica y recaídas de la enfermedad. El método de pronóstico descrito en el presente documento está destinado al uso clínico en la toma de decisiones relativas a las modalidades de tratamiento, incluyendo las intervenciones terapéuticas, los criterios de diagnóstico tales como la estadificación de la enfermedad y el seguimiento y vigilancia de la enfermedad para detectar metástasis o recurrencia de una enfermedad neoplásica.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "muestra" se refiere a una porción, pieza, parte, segmento o fracción de un tejido que se obtiene o extrae de un tejido u órgano intacto de un sujeto o de un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, orina, saliva) obtenida del sujeto, preferiblemente un sujeto humano.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "muestra de tumor" se refiere a una porción, pieza, parte, segmento o fracción de un tumor, por ejemplo, un tumor que se obtiene o extirpa de un sujeto (por ejemplo, extirpado o extraído de un tejido de un sujeto), preferiblemente un sujeto humano.

Los términos "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de aminoácidos. Estos términos no connotan una longitud específica de un polímero de aminoácidos. Así, por ejemplo, el término incluye péptidos oligoméricos, formados por dos o más péptidos enlazados físicamente, ya sean producidos usando técnicas recombinantes, síntesis química o enzimática, o de origen natural.

El término "heterólogo" cuando describe una pluralidad de polipéptidos o proteínas se usa para referirse a dos o más secuencias de aminoácidos diferentes que normalmente se encuentran en la naturaleza dentro de proteínas separadas, diferentes y distintas. Como cuando dos polipéptidos naturalmente no relacionados se enlazan mediante modificación en un laboratorio.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "variante" cuando se usa en referencia a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que tiene una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos del isómero D). Los términos "variante de sustitución", "variante de péptido" y "variante de sustitución de aminoácidos" se utilizan indistintamente en el presente documento. El término "variante de empalme" abarca una definición separada, como se conoce en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido sin Psap" se usa para referirse a una proteína o polipéptido que no es la proteína Psap (no tiene la secuencia de aminoácidos de la proteína Psap intacta), y para referirse a una proteína o polipéptido con una secuencia de aminoácidos que de otro modo no se deriva de la secuencia de aminoácidos de la proteína Psap.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína Psap" se refiere a las diversas isoformas codificadas por los ácidos nucleicos de Psap (No. de acceso a Genbank NM_002778, NM_001042465 o NM_001042466). Por ejemplo, la preproteína de isoforma A de prosaposina humana de longitud completa variante de empalme (Nos. de acceso de Genbank: NM_002778, NP_002769.1; UniProtKB/Swiss-Prot P07602, UniProtKB/TrEMBL Q53Y86), la preproteína de isoforma B de prosaposina humana de longitud completa variante de empalme (Nos. de acceso de Genbank: NM_001042465.1, NP_001035930.1); UniProtKB/Swiss-Prot entrada P07602), y la preproteína de isoforma C de prosaposina humana de longitud completa variante de empalme (Nos. de acceso de Genbank: NM_001042466.1, NP_001035931.1); GenPept/UniProtKB/TrEMBL: O75905, P07602.2, Q53FJ5, Q59EN5, Q5BJH1, Q5JQ36 y Q5JQ37.

El término "polipéptido modificado" o "polipéptido derivatizado" se refiere a polipéptidos que tienen características adicionales distintas al contenido de aminoácidos. Tal como se utiliza en el presente documento, una "modificación" o "derivado" de un péptido produce un polipéptido modificado o derivatizado, que es una forma de un péptido determinado que está modificado químicamente con respecto al péptido de referencia, incluyendo la modificación, entre otras, oligomerización o polimerización, modificaciones de residuos de aminoácidos o cadena principal peptídica, entrecruzamiento, ciclación, conjugación, pegilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, fusión con secuencias de aminoácidos heterólogas adicionales u otras modificaciones que alteren sustancialmente la estabilidad, solubilidad u otras propiedades del péptido mientras se conserva sustancialmente la actividad estimulante de la expresión de Tsp-1 descrita en el presente documento.

Por "PEGilado" se entiende la unión covalente de al menos una molécula de polietilenglicol a una molécula biológicamente activa. El peso molecular promedio del PEG reactivo está preferiblemente entre aproximadamente 3,000 y aproximadamente 50,000 daltons, más preferiblemente entre aproximadamente 10,000 y aproximadamente 40,000 daltons, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 15,000 y aproximadamente 30,000 daltons. Son particularmente preferidos los PEG que tienen tamaños promedio nominales de aproximadamente 20,000 y aproximadamente 25,000 daltons. El método de unión no es crítico, pero preferiblemente no altera, o sólo altera mínimamente, la actividad de la molécula biológicamente activa. Preferiblemente, el aumento de la vida media es mayor que cualquier disminución de la actividad biológica. Un método preferido de unión es mediante un enlace N-terminal a un polipéptido o péptido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucosilado diferencialmente" se refiere a diferencias en la glicosilación en los sitios de glicosilación disponibles de Psap de longitud completa. Hay cinco sitios de glicosilación en la proteína de longitud completa. Por ejemplo, una Psap de longitud completa puede tener entre cero y hasta cinco grupos glucosilados. Además, el término también se refiere a la presencia de diferentes grupos de azúcares en un polipéptido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido mimético" o "peptidomimético" se refiere a un agente sintético o molécula que imita biológicamente la actividad de un péptido descrito en el presente documento, tal como la estimulación de la expresión de Tsp-1 y/o p53. Por "mimético biológicamente" se entiende que un derivado peptidomimético de un péptido como se describe en el presente documento tiene al menos 50 % de la actividad biológica del propio péptido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a cualquiera de diversas neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y hacer metástasis en nuevos sitios del cuerpo, así como a las condiciones patológicas caracterizadas por tales crecimientos neoplásicos malignos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "rápida" se refiere a cualquier momento dentro de un mes después de que los resultados positivos de las pruebas de laboratorio confirmen la presencia de células cancerosas.

Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "desarrollo de cáncer" o "desarrollo de cáncer" se refiere al desarrollo de cáncer primario o inicial, el desarrollo de metástasis de tumores benignos y/o malignos, y/o el desarrollo de malignidad a partir de tumores benignos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a una proteína creada uniendo contiguamente dos genes heterólogos o dos proteínas/polipéptidos heterólogos o porciones de los mismos juntos, típicamente mediante ingeniería genética, para producir de ese modo una proteína contigua. Por "heterólogo" en referencia a genes y proteínas se entiende que los genes o proteínas son dos entidades diferentes y no similares. Por ejemplo, dos genes heterólogos codifican respectivamente dos proteínas diferentes y no similares. Así, una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" es una proteína quimérica, formada por al menos dos tipos diferentes de proteínas o porciones de las mismas. En el laboratorio, una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se logra mediante la creación de un gen de fusión que se realiza, por ejemplo, mediante la eliminación del codón de parada de una secuencia de ADN de la primera proteína y luego uniendo la secuencia de ADN de la segunda proteína en marco. La secuencia de ADN resultante puede luego ser transcrita y traducida por una célula en una sola proteína. Alternativamente, en una proteína de fusión, las dos proteínas heterólogas se pueden unir con un enlazador o péptido espaciador añadido entre las dos proteínas. Este péptido enlazador o espaciador a menudo puede contener sitio(s) de escisión de proteasa para facilitar la separación de las dos proteínas diferentes después de la expresión y purificación. La elaboración de proteínas de fusión como técnica se utiliza comúnmente para la identificación y purificación de proteínas mediante la fusión de una proteína GST, un péptido FLAG o un péptido hexa-His.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "enlazador peptídico" es una secuencia corta de aminoácidos que no forma parte de la secuencia de ninguno de los dos péptidos que se unen para formar una proteína de fusión o un polipéptido de fusión. Un enlazador peptídico está unido en su extremo amino terminal a un polipéptido o dominio polipeptídico y en su extremo carboxilo terminal a otro polipéptido o dominio polipeptídico. Ejemplos de péptidos enlazadores útiles incluyen, entre otros, polímeros de glicina ((G)_n), incluyendo polímeros de glicina-serina y glicina-alanina (por ejemplo, una repetición (Gly4Ser)_n donde n=1-8, preferiblemente, n= 3, 4, 5 o 6). El enlazador peptídico puede ser un enlazador flexible, en el sentido de que la secuencia peptídica no adopta ninguna estructura secundaria conocida en proteínas, por ejemplo, hélices alfa. Estos enlazadores flexibles están formados predominantemente por residuos de aminoácidos apolares, no cargados y son hidrófobos. Las estructuras de proteínas secundarias pueden determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, dicroísmo circular. Un ejemplo de un enlazador peptídico flexible es LGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 1). Alternativamente, el enlazador peptídico puede tomar la forma de una hélice α hidrofílica monomérica, por ejemplo, AEAAAKEAAKEA (SEQ ID NO: 2).

En un sentido, el término "que comprende" en referencia a las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se refiere a los componentes respectivos de las mismas, como esenciales para las composiciones y métodos, pero abiertos a la inclusión de elementos no especificados, esenciales o no.

En algunas realizaciones, otros elementos que pueden incluirse en la descripción de la composición, método o componente respectivo de la misma se limitan a aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o componente respectivo de la misma. A esto se hace referencia utilizando el término "que consiste esencialmente en". Esto se aplica igualmente a los pasos dentro de un método descrito, así como a las composiciones, péptidos y componentes del mismo. En otras realizaciones, los péptidos, composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos, descritos en el presente documento, pretenden ser exclusivos de cualquier elemento no mencionado con respecto a esa composición, elemento, componente o método. A esto se hace referencia utilizando el término "que consiste en".

- La parte "esencial" de un polipéptido descrito en el presente documento es la secuencia polipeptídica que tiene la actividad, como mínimo, de estimulación de la expresión de Tsp-1 (por ejemplo, en los ensayos descritos en el presente documento), y también puede estimular la expresión de p53. Dicha actividad se observa en los 4-6 mers descritos en el presente documento. Otras posibles actividades esenciales incluyen una o cualquier combinación de la inhibición de la angiogénesis, la inhibición del crecimiento tumoral, la inhibición de la invasividad tumoral y la inhibición de la metástasis tumoral, como se describe en el presente documento. Los componentes no esenciales de las composiciones descritas en el presente documento serían aportados, por ejemplo, por secuencias polipeptídicas heterólogas que son polipéptidos sin Psap, porción de fusión de una proteína de fusión peptídica que no es Psap y cualquier modificación (por ejemplo, postraducciona) al polipéptido.
- El término "reducir la probabilidad" en referencia al desarrollo de ciertas afecciones se refiere a una reducción de al menos 20 % en comparación con cuando no se realiza ningún tratamiento o administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína Psap o un vector descrito en el presente documento. La reducción también puede ser de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, incluyendo todo el porcentaje entre 20% y 100%.
- Los ejemplos de la divulgación descrita en el presente documento surgen de la identificación de péptidos/polipéptidos cortos (entre 4 y 6 aminoácidos) que exhiben la actividad (algunos de los cuales exhiben actividad aumentada) de la Saposina A, en el sentido de que estimulan la expresión de Tsp-1, e inhibe el crecimiento tumoral, la invasividad y la metástasis. Estos polipéptidos se denominan en el presente documento "los 4-6 mers". Estos 4-6 mers exhiben actividad biológica como polipéptidos aislados, polipéptidos cíclicos y también en el contexto de polipéptidos de fusión más grandes. Como tal, la presente divulgación se refiere a estos 4-6 mers, proteínas de fusión que comprenden estos 4-6 mers enlazados a polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos que codifican los 4-6 mers (por ejemplo, aislados y/o purificados), ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión, y composiciones farmacéuticas que comprenden estos polipéptidos y/o ácidos nucleicos de 4-6 mers. Se abarcan además los métodos de tratamiento descritos en el presente documento que utilizan estas composiciones.
- En algunos casos, los 4-6 mers o proteínas de fusión descritos en el presente documento se modifican o derivatizan.
- Los 4-6 mers que exhiben la actividad de la saposina A incluyen polipéptidos con la secuencia de aminoácidos CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), DWLP (SEQ ID NO: 5), DWAP (SEQ ID NO: 6), DYLPK (SEQ ID NO: 7), DWVPK (SEQ ID NO: 8), DWLPR (SEQ ID NO: 9), DWAPK (SEQ ID NO: 10), y DYLP (SEQ ID NO: 11). Además, cualquiera de estos polipéptidos que tiene una sustitución de aminoácido conservadora por Leucina (L) o una Alanina (A) o Glicina (G) por Leucina (L) también se considera un 4-6 mer como se describe en el presente documento. Además, cualquiera de estos polipéptidos que tiene una o más sustituciones de D-aminoácidos (por ejemplo, en Triptófano (W) y Prolina (P) y/o Ácido Áspártico (D) y Leucina (L)) también se considera un 4-6 mer como se describe en el presente documento.
- Los ejemplos de la divulgación se refieren a un péptido/polipéptido que consiste en los 4-6 mers descritos en el presente documento. Otros casos de la divulgación se relacionan con el ácido nucleico que codifica el polipéptido que consiste en los 4-6 mers descritos en el presente documento.
- Un aspecto de la divulgación se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o DWLP (SEQ ID NO: 5), o una variante de sustitución de aminoácidos del mismo, en donde la sustitución de aminoácidos es a) Tirosina (Y) por Triptófano (W); b) una sustitución de aminoácido conservadora por Leucina (L); c) Arginina (R) por Lisina (K); o d) un isómero D de Ácido Aspártico (D) para el isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) para el isómero L de Leucina (L); e) o un isómero D de Triptófano (W) para el isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para el isómero L de Prolina (P); o f) una Alanina (A) o Glicina (G) por Leucina (L).
- Los ejemplos de la divulgación se relacionan con un polipéptido que consiste esencialmente en los 4-6 mers descritos en el presente documento. Otros casos de la divulgación se relacionan con el ácido nucleico que codifica el polipéptido que consiste esencialmente en los 4-6 mers descritos en el presente documento.
- En algunos casos, la presente divulgación describe las secuencias de aminoácidos identificadas en el presente documento como que tienen actividad de Saposina A (por ejemplo, el 4-6 mer) y los ácidos nucleicos que las codifican, en el contexto de secuencias flanqueantes heterólogas. Dicho de otra manera, las secuencias polipeptídicas específicas descritas en el presente documento (por ejemplo, CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), DWLP (SEQ ID NO: 5)) o el ácido nucleico que los codifica, cuando están en el contexto de un polipéptido más grande, están presentes en ese péptido más grande en ausencia de secuencias directamente adyacentes (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más secuencias directamente adyacentes aminoácidos o ácido nucleico que codifica dichos aminoácidos) que se encuentran en la naturaleza en ese contexto. A modo de ejemplo, los polipéptidos (CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), DWLP (SEQ ID NO: 5), DWAP (SEQ ID NO: 6), DYLPK (SEQ ID NO: 7), DWVPK (SEQ ID NO: 8), DWLPR (SEQ ID NO: 9), DWAPK (SEQ ID NO: 10), y DYLP (SEQ ID NO: 11)) se encuentran típicamente en la naturaleza en el contexto de los aminoácidos flanqueantes de una proteína completa (por ejemplo, Saposina A). Los ácidos nucleicos que codifican los 4-6mers se encuentran típicamente en la naturaleza en forma de cromosoma o ARNm, con secuencias de ácido nucleico flanqueantes que codifican la proteína completa (por ejemplo, la proteína

Saposina A) y secuencias reguladoras. Dichas formas no heterólogas de estas secuencias polipeptídicas específicas no se consideran parte de esta realización de la presente divulgación.

En algunos casos, el péptido/polipéptido de la presente divulgación que incluye un 4-6 mer descrito en el presente documento (por ejemplo, como parte esencial) no tiene más de 4-6 aminoácidos de longitud, respectivamente (por ejemplo, CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o DWLP (SEQ ID NO: 5), o variantes de los mismos descritos en el presente documento). Dicho de otra manera, no hay aminoácidos adicionales distintos de los 4, 5 o 6 aminoácidos especificados en el presente documento. En algunos casos, el polipéptido de la presente divulgación que incluye los 4-6 mers descritos en el presente documento no tiene más de 7 aminoácidos de longitud, no más de 8 aminoácidos de longitud o no más de 9 aminoácidos de longitud. En algunos casos, el polipéptido de la divulgación tiene 9 o menos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido/polipéptido de la presente divulgación tiene una o más actividades de estimulación de la expresión de Tsp-1, activación de p53, inhibición de la angiogénesis, inhibición del crecimiento tumoral, inhibición de la invasividad tumoral e inhibición de la metástasis tumoral.

Un ejemplo de la divulgación se refiere a un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o DWLP (SEQ ID NO: 5), o una variante de sustitución de aminoácidos del mismo, en donde la sustitución de aminoácidos es a) Tirosina (Y) por Triptófano (W); b) una sustitución de aminoácido conservadora por Leucina (L); c) Arginina (R) por Lisina (K); o d) un isómero D de Ácido aspártico (D) para el isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) para el isómero L de Leucina (L); o e) o un isómero D de Triptófano (W) para el isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para el isómero L de Prolina (P); o f) una Alanina (A) o Glicina (G) por Leucina (L).

Isómeros de aminoácidos

Como se describe en el presente documento, también se demostró que los polipéptidos que tienen sustituciones de D-aminoácidos tienen la actividad de la Saposina A. Como tales, se abarcan además variantes de sustitución de aminoácidos resultantes de la sustitución de uno o más D-aminoácidos por L-aminoácidos similares por el término 4-6 mer. En algunas realizaciones, está presente una sustitución de D-aminoácido. En algunas realizaciones, están presentes 2 o más sustituciones de D-aminoácidos. En algunas realizaciones, están presentes 3, 4 o 5 sustituciones de D-aminoácidos. En algunas realizaciones, las sustituciones de D-aminoácidos están espaciadas uniformemente, por ejemplo, cada dos aminoácidos, del 4-6 mer. En algunas realizaciones, la sustitución de D-aminoácido es por Triptófano (W) y/o Prolina (P). En algunas realizaciones, la sustitución de D-aminoácido es por Ácido Aspártico (D) y/o Leucina (L).

De los α -aminoácidos estándar, todos menos la glicina puede existir en cualquiera de los dos isómeros ópticos, llamados aminoácidos L o D, que son imágenes especulares entre sí. Mientras que los L-aminoácidos representan todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas durante la traducción en el ribosoma, los D-aminoácidos se encuentran en algunas proteínas producidas por modificaciones postraduccionales de las enzimas después de la traducción y la translocación al retículo endoplásmico. La convención L y D para la configuración de aminoácidos no se refiere a la actividad óptica del aminoácido en sí, sino más bien a la actividad óptica del isómero de gliceraldehído a partir del cual ese aminoácido puede, en teoría, sintetizarse (D-gliceraldehído es dextrógiro; L-gliceraldehído es levógiro).

Polipéptidos de fusión/quiméricos

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un polipéptido quimérico/fusión que comprende al menos una primera porción y al menos una segunda porción, en donde la primera porción es un polipéptido que consiste en un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y la segunda porción es otro polipéptido heterólogo (por ejemplo, un polipéptido sin Psap). En el presente documento se describen segundas porciones útiles del polipéptido de fusión. Un 4-6mer que se produce dentro del contexto de un polipéptido de origen natural no está abarcado por polipéptidos de fusión como se describe en el presente documento.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica los polipéptidos de fusión de la invención. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden estar en el contexto de un vector. Como tal, otro aspecto de la divulgación se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la invención.

Ejemplos no limitantes de segundas porciones útiles del polipéptido de fusión de la presente divulgación son transferrina sérica o porciones de la misma, albúmina, transtiretina, dominio Fc de IgG (ver, por ejemplo, GM Subramanian, (2007), Nature Biotechnology 25, 1411 - 141). En algunas realizaciones, la segunda porción comprende un dominio Fc de anticuerpo o un anticuerpo. En algunas realizaciones, la segunda porción que comprende un dominio Fc de anticuerpo o un anticuerpo no tiene la secuencia de aminoácidos de ninguna de las SEQ ID NO: 120-123. En algunos casos, el polipéptido de fusión/quimérico comprende al menos una primera porción que consiste en 4-6 mers como se describe en el presente documento o un polipéptido de 9 o menos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) residuos de aminoácidos como se describe en el presente documento que no está contenido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo y una segunda porción que comprende un dominio Fc de anticuerpo.

La segunda porción puede ser otra molécula terapéutica. En algunas realizaciones del polipéptido de fusión, la segunda porción comprende una secuencia de aminoácidos o un polímero que mejora la vida media en suero de la primera porción. En algunas realizaciones del polipéptido de fusión aislado, la segunda porción es una molécula terapéutica. En algunas realizaciones, la segunda porción es otra molécula antiangiogénica.

- 5 Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden fusionarse con otros factores antiangiogénicos y/o agentes anti-VEGF como la segunda porción de una proteína de fusión, por ejemplo, angiostatina o endostatina para mejorar la potencia antiangiogénica. Las fusiones o conjugados de dichos péptidos tienen funciones duales: activar p53 e inducir la expresión de Tsp-1, así como actividad antiangiogénica. En el presente documento se describen métodos para determinar la actividad activadora de p53 y la actividad inductora de la expresión de Tsp-1. La determinación de actividades antiangiogénicas es bien conocida por un experto en la técnica, por ejemplo mediante un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo.

- 10 Los polipéptidos, polipéptidos de fusión, multímeros y ácidos nucleicos descritos en el presente documento (por ejemplo, utilizados para preparar las composiciones descritas en el presente documento) pueden estar en una forma sustancialmente purificada. Esto se refiere al hecho de que el polipéptido o ácido nucleico en una preparación en donde más del 90%, por ejemplo 95 %, 98 % o 99 % de la proteína o ácido nucleico en la preparación es el polipéptido o ácido nucleico descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la composición de polipéptido o polipéptido de fusión descrita en el presente documento puede ser una forma diferencialmente glicosilada.

- 20 En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o menos aminoácidos de longitud.

Sustituciones de aminoácidos

- 25 También se prevén polipéptidos que retienen sustancialmente la actividad de los 4-6 mers, resultantes de la sustitución conservadora de aminoácidos de los 4-6 mers descritos en el presente documento. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga, tamaño, polaridad, hidrofobicidad similar o una combinación de los mismos. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

- 30 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos normalmente no cambian la estructura general del péptido y/o el tipo de cadenas laterales de aminoácidos disponibles para formar enlaces de van der Waals con una pareja de unión. En algunas realizaciones, una sustitución conservadora de la Leucina es Valina.

- 35 En algunas realizaciones, se contemplan sustituciones conservadoras o no conservadoras de Leucina. En algunas realizaciones, la sustitución de leucina es Valina, Glicina o Alanina. En algunas realizaciones, la sustitución de Leucina es Glicina o Alanina. En algunas realizaciones, la sustitución de Leucina es Alanina. En algunas realizaciones, una sustitución de Leucina es Glicina. En algunas realizaciones, una sustitución de Leucina es Glicina o Valina. En algunas realizaciones, una sustitución conservadora de Leucina no es Alanina.

- 40 En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende una sustitución de Alanina por Leucina no es: DWAPK (SEQ ID NO: 10), DWAPIK (SEQ ID NO: 48), DWAPIPK (SEQ ID NO: 49), DWAPIPCK (SEQ ID NO: 50), DWAPIPCSK (SEQ ID NO: 51), o DWAPIPCAK (SEQ ID NO: 52). En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende una sustitución de Alanina por Leucina consiste en 4 aminoácidos. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o DWLP (SEQ ID NO: 5) no es: DWAPK (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos (a) que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) o (b) que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos CDWLPK (SEQ ID NO: 3), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o DWLP (SEQ ID NO: 5) que comprende una sustitución de Alanina por Leucina es DWAP (SEQ ID NO: 6). En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de Alanina por Leucina no es: DWAPIPCSMK (SEQ ID NO: 53), DWAPIPCSLK (SEQ ID NO: 54), DWAPIPCASK (SEQ ID NO: 55), o QPLRHHQDWAPD (SEQ ID NO: 56). En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de alanina por leucina consiste en 11 aminoácidos. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de alanina por leucina consiste en 11 o 13 o más aminoácidos.

En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o polipéptido quimérico que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende una sustitución de alanina por leucina no es un polipéptido como se describe en la Patente de EE.UU. No. 7476509 o Patente de EE.UU. No. 7892770. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de alanina por leucina no es un polipéptido como se describe en Patente de EE.UU. No. 7476509 o Patente de EE.UU. No. 7892770.

En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una Tirosina (Y) por un Triptófano (W). En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos que comprenden una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no es una de (o ninguna de) las SEQ ID NOs: 57-65. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o polipéptido quimérico que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) que consiste en 4-8 residuos de aminoácidos. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o polipéptido quimérico que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no tiene 9 residuos de aminoácidos de longitud. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) es 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 o más aminoácidos de longitud pero menos de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 aminoácidos de longitud. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no consiste en 10, 15, 107, 178, 253, 322 o 328 residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no es una de (o ninguna de) las SEQ ID NO: 66-123. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no es una proteína 158P3D2 de longitud completa, una variante de la misma, o una fragmento del mismo como se describe en Patente de EE.UU. No. 7811575 (que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o polipéptido quimérico que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no es un polipéptido como se describe en Patente de EE. UU. No. 7811575, Patente de EE. UU. No. 7005503, o Patente de EE. UU. No. 5948763. En algunos casos, un polipéptido variante de sustitución de aminoácidos o un polipéptido quimérico que consiste en 10 o más aminoácidos que comprende una sustitución de una Tirosina (Y) por un Triptófano (W) no es un polipéptido como se describe en Patente de EE. UU. No. 7811575, Patente de EE. UU. No. 7005503, o Patente de EE. UU. No. 5948763.

La sustitución de aminoácidos se puede lograr durante la síntesis química del péptido agregando el aminoácido sustituto deseado en la secuencia apropiada en el proceso de síntesis. Alternativamente, se pueden utilizar métodos de biología molecular. También se incluyen las sustituciones no conservativas en la medida en que retengan sustancialmente las actividades de los péptidos descritos en el presente documento.

El polipéptido sustituido con aminoácidos conservará sustancialmente la actividad del polipéptido no sustituido. Por "retener sustancialmente" se indica que una o más actividades de la variante son al menos 50 % en comparación con la actividad del polipéptido original en un ensayo similar, en condiciones similares; preferiblemente la actividad es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces o mayor actividad en comparación con el polipéptido original.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado como se define en la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácidos es a) Tirosina (Y) por Triptófano (W); b) una sustitución de aminoácido conservadora por Leucina (L); c) un isómero D de Ácido Aspártico (D) para un isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) para un isómero L de Leucina (L); d) un isómero D de Triptófano (W) para un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para un isómero L de Prolina (P); o e) Alanina (A) o Glicina (G) por Leucina (L). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es a) Tirosina (Y) por Triptófano (W); c) un isómero D de Ácido Aspártico (D) para un isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) para un isómero L de Leucina (L); o d) un isómero D de Triptófano (W) para un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para un isómero L de Prolina (P). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es Tirosina (Y) por Triptófano (W). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservadora por Leucina (L) o Alanina (A) o Glicina (G) por Leucina (L). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservadora por Leucina (L). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es c) un isómero D de Ácido Aspártico (D) por un isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) por un isómero L de Leucina (L), o d) un isómero D de Triptófano (W) para un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para un isómero L de Prolina (P). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es un isómero D de Ácido Aspártico (D) por un isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) por un isómero L de Leucina (L). En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es un isómero D de Triptófano (W) por un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) por un isómero L de Prolina (P).

Modificaciones y Derivadas

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden modificarse o derivatizarse además. Los polipéptidos modificados o derivatizados típicamente retendrán sustancialmente la actividad del polipéptido base (premodificado/derivatizado). Ejemplos de modificaciones y derivados son pegilación, glicosilación, acetilación, amidación y fosforilación. Los métodos de acetilación (por ejemplo, acetilación N-terminal) y amidación (por ejemplo, amidación C-terminal) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las modificaciones, derivados y métodos de derivatización de polipéptidos se describen en la Solicitud Internacional Publicada WO 2010/01461 6.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden conjugarse o unirse covalentemente de otro modo a otras moléculas (por ejemplo, usando un enlazador químico). Una de esas formas de unión es a través de un enlace no amida (por ejemplo, un enlace disulfuro). En algunas realizaciones, el polipéptido o polipéptido de fusión está enlazado a un polímero que mejora la vida media en suero de la primera porción. En algunas realizaciones, el polipéptido está unido covalentemente (por ejemplo, a través de una molécula enlazadora) a un anticuerpo o un dominio del mismo adecuado para mejorar la vida media de la molécula (por ejemplo, uno o más dominios constantes en un dominio Fc). En algunas realizaciones, el polipéptido está enlazado a un dominio Fc (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD o IgE).

En algunas realizaciones, el polipéptido de la presente divulgación está enlazado a un polímero que no es un aminoácido. Se pueden utilizar polímeros tales como polietilenglicol con el fin de mejorar la vida media en suero. Los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido divinileter maleico, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, polioli polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, poliviniléteres y α, β -poli(2-hidroxietil)-DL-aspartamida y similares, o mezclas de los mismos. Un polímero de este tipo puede tener o no su propia actividad biológica. Los polímeros pueden estar conjugados de forma covalente o no covalente con el polipéptido. Los métodos de conjugación para aumentar la vida media en suero y para radioterapia se conocen en la técnica, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nos.: 5,180,816, 6,423,685, 6,884,780, y 7,022,673.

En algunas realizaciones, el polipéptido está conjugado con una molécula terapéutica. En algunas realizaciones, la molécula terapéutica es una molécula terapéutica antiangiogénica, por ejemplo, angiostatina y endostatina. Se conocen en la técnica numerosas moléculas terapéuticas antiangiogénicas, incluyendo, entre otras, bevacizumab, sunitinib, talidomida, lenalidomida y sorafenib. En algunas realizaciones, la molécula terapéutica es un agente anti-VEGF. En otra realización, la molécula terapéutica puede ser una toxina, una molécula de radioterapia o un medicamento anticancerígeno tal como talidomida y lenalidomida. De nuevo, se conocen en la técnica numerosas moléculas terapéuticas antiangiogénicas.

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento están modificados por acilación terminal de NH_2 , por ejemplo, acetilación o amidación del ácido tioglicólico, mediante carboxilamidación terminal, por ejemplo, con amoniaco, metilamina y modificaciones terminales similares que se conocen en la técnica. Las modificaciones terminales son útiles para reducir la susceptibilidad por digestión con proteinasas y, por lo tanto, sirven para prolongar la vida media de los péptidos en soluciones, particularmente fluidos biológicos donde pueden estar presentes proteasas. En algunas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento comprende un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal. En algunas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos del presente documento comprende un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal. En algunas realizaciones, el polipéptido es Ac-dWIP-Amida o Ac-DWLP-Amida (Ac = grupo acetilo, D minúscula y L indican D-aminoácidos, SEQ ID NO: 132 y 133, respectivamente).

En algunas realizaciones, el polipéptido o polipéptido de fusión descrito en el presente documento está enlazado a un polímero que mejora la vida media en suero.

En algunas realizaciones, el polipéptido o polipéptido de fusión descrito en el presente documento es un péptido cíclico. Los péptidos cíclicos (o proteínas cíclicas) son cadenas polipeptídicas cuyos términos amino y carboxilo están enlazados entre sí mediante un enlace peptídico u otro enlace covalente, formando una cadena circular. En algunas realizaciones, el polipéptido contiene residuos de aminoácidos de cisteína amino y carboxilo terminal. Las cisteínas facilitan la formación de enlaces disulfuro S-S. En algunas realizaciones, el polipéptido contiene residuos de aminoácidos de cisteína adicionales, en donde los residuos de aminoácidos de cisteína están cerca de los términos pero no necesariamente al final. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos de cisteína están dentro de cinco residuos de aminoácidos en los términos del polipéptido. Los métodos de diseño y síntesis de péptidos cíclicos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Patentes de EE. UU. Nos. 5,596,078; 5,990,273; 7,589,170 y Solicitud de Patente de EE.UU No. 20080287649. Un experto en la técnica sería capaz de modificar y aplicar fácilmente los métodos y técnicas para la síntesis de un polipéptido descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, el polipéptido o polipéptido de fusión descrito en el presente documento, ya sea monomérico, oligomérico o cíclico, está PEGilado. La PEGilación es el proceso de unión covalente de cadenas poliméricas de polietilenglicol a otra molécula, normalmente un medicamento o una proteína terapéutica. La PEGilación se logra habitualmente mediante la incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula objetivo. La unión

covalente de PEG a un medicamento o proteína terapéutica puede "enmascarar" el agente del sistema inmunológico del huésped (immunogenicidad y antigenicidad reducidas) y aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente que prolonga su tiempo circulatorio al reducir el aclaramiento renal. La PEGilación también puede proporcionar solubilidad en agua a medicamentos y proteínas hidrofóbicos. La PEGilación, al aumentar el peso molecular de una molécula, puede impartir varias ventajas farmacológicas significativas sobre la forma no modificada, tales como: solubilidad mejorada del medicamento, frecuencia de dosificación reducida, sin disminución de la eficacia con toxicidad potencialmente reducida, vida circulante prolongada, mayor estabilidad del medicamento y protección mejorada contra la degradación proteolítica. Además, los medicamentos pegilados tienen mayores oportunidades para nuevos formatos de administración y regímenes de dosificación. Los métodos de PEGilación de moléculas, proteínas y péptidos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. No. 5,766,897; 7,610,156; 7,256,258 y la Solicitud Internacional No. WO/1998/032466.

En algunas realizaciones, los polipéptidos o polipéptidos de fusión descritos en el presente documento se modifican adicionalmente dentro de la secuencia, tales como modificación por acilación terminal de NH₂, por ejemplo, acetilación o amidación del ácido tioglicólico, por carboxilamidación terminal, por ejemplo, con amoníaco, metilamina y modificaciones terminales similares. Las modificaciones terminales son útiles, y son bien conocidas, para reducir la susceptibilidad a la digestión con proteinasas y, por lo tanto, sirven para prolongar la vida media de los polipéptidos en soluciones, particularmente fluidos biológicos donde pueden estar presentes proteasas.

Todas las combinaciones de las diferentes modificaciones y derivatizaciones están previstas para los polipéptidos y los polipéptidos de fusión y polipéptidos oligómeros descritos en el presente documento.

Se espera que las diversas versiones de polipéptidos descritos en el presente documento, y las modificaciones y derivatizaciones abarcadas por la presente divulgación, retengan una cantidad significativa de la actividad biológica exhibida por los 4-6 mers (por ejemplo, como se informa en la sección de Ejemplos del presente documento). En algunas realizaciones, aproximadamente 100 % de la actividad se retiene en un ensayo determinado. En algunas realizaciones, se retiene aproximadamente 90 %, 80 %, 70 %, 60 % o 50 % de la actividad. Una de esas actividades es la capacidad de estimular la expresión de Tsp-1. La estimulación de la expresión es una cantidad significativa y reproducible de aumento de la expresión que se produce por el contacto del polipéptido descrito en el presente documento con una célula objetivo apropiada, en comparación con una célula objetivo idéntica o suficientemente similar (célula objetivo de control) que no se ha puesto en contacto con el polipéptido. Otra de esas actividades es la capacidad de activar p53. Otra actividad de este tipo es la capacidad de prevenir la angiogénesis en un sistema modelo o un sujeto. Los métodos para determinar la actividad activadora de p53 y la actividad de inducción de la expresión de Tsp-1 se describen en el presente documento y también son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a una composición peptídica que comprende la repetición de 4-6 unidades mer descritas en el presente documento, por ejemplo, unidades enlazadas concamatéricamente. La unión de una pluralidad de dichas unidades, por ejemplo mediante un enlazador molecular, da como resultado un oligómero de polipéptidos. En algunas realizaciones, el oligómero es un polipéptido que consiste en, o que consiste esencialmente en, los 4-6 mers descritos en el presente documento. Dichos polipéptidos oligómeros pueden modificarse o derivatizarse adicionalmente como se describe en el presente documento. La composición puede comprender un polipéptido oligomérico que es un dímero de dos polipéptidos, un trímero de tres polipéptidos, un tetramero de cuatro polipéptidos o un pentámero de cinco polipéptidos, etc. En algunas realizaciones, el polipéptido oligomérico es un dímero de dos polipéptidos y/o un trímero de tres polipéptidos. En algunas realizaciones, el polipéptido oligomérico es un polipéptido homooligomérico, que comprende polipéptidos idénticos de acuerdo con la divulgación en el presente documento. También se contemplan péptidos heterooligoméricos que comprenden diferentes polipéptidos.

En algunas realizaciones, el enlazador molecular que une los polipéptidos para formar un polipéptido oligomérico puede ser una molécula enlazadora peptídica o un enlazador químico. La molécula enlazadora peptídica puede comprender, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos de aminoácidos y preferiblemente menos de 50 residuos de aminoácidos.

En algunas realizaciones, la composición también puede incluir el polipéptido monomérico junto con un péptido oligomérico. Se contempla que todas las combinaciones posibles de polipéptidos monoméricos, diméricos, triméricos, tetraméricos y pentaméricos, y polipéptidos homooligoméricos, así como polipéptidos heterooligoméricos que comprenden los 4-6 mers descritos en el presente documento, están potencialmente abarcados por la presente divulgación.

En algunas realizaciones, el enlazador molecular usado para formar los polipéptidos oligoméricos es una molécula enlazadora peptídica. En algunas realizaciones, la molécula de enlace peptídico comprende al menos un residuo de aminoácido que enlaza al menos dos péptidos de acuerdo con la divulgación. El enlazador peptídico comprende, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos de aminoácidos y preferiblemente menos de 50 residuos de aminoácidos. La molécula de enlace peptídico puede acoplar polipéptidos o proteínas de forma covalente o no covalente. Los residuos de aminoácidos típicos usados para el enlace son glicina, tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico y aspártico, o similares. Un enlazador peptídico está unido en su extremo amino terminal a un péptido, polipéptido o dominio polipeptídico (por ejemplo, un péptido C) y en su extremo carboxilo terminal a otro péptido, polipéptido o dominio polipeptídico (de nuevo, por ejemplo, un péptido C). Ejemplos de péptidos enlazadores útiles

incluyen, entre otros, polímeros de glicina ((G)_n), incluyendo polímeros de glicina-serina y glicina-alanina (por ejemplo, una repetición (Gly4Ser)_n donde n=1-8, preferiblemente, n= 3, 4, 5 o 6). Otros ejemplos de moléculas enlazadoras peptídicas se describen en Patente de EE.UU. No. 5,856,456

5 En otra realización, el enlazador molecular es un enlazador químico tal como enlaces por enlaces disulfuro entre residuos de aminoácidos de cisteína o mediante puentes químicos formados por entrecruzadores de amina, por ejemplo, glutaraldehído, bis(imidoéster), bis(succinimidil ésteres), diisocianatos y cloruros de diácidos. Se puede encontrar información detallada sobre agentes químicos entrecruzadores en Molecular Probe de INVITROGEN en la sección 5.2.

10 En algunas realizaciones, el péptido oligomérico se puede preparar enlazando polipéptidos aislados individuales. Los polipéptidos individuales se pueden preparar mediante métodos químicos conocidos en la técnica o mediante métodos recombinantes también conocidos en la técnica. Para los métodos recombinantes, la secuencia codificante de ADN de un polipéptido se puede obtener mediante amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden utilizar cebadores de PCR especialmente diseñados que incorporan sitios de digestión de enzimas de restricción y/o residuos de aminoácidos espaciadores o marcadores adicionales para facilitar la ligadura del ADN, la expresión de proteínas recombinantes y la purificación de proteínas. Para facilitar el enlace de los polipéptidos entre sí, se pueden añadir residuos de aminoácidos adicionales a los polipéptidos, a través de la secuencia codificante de ADN. Por ejemplo, se pueden añadir el grupo tiol que contiene el aminoácido cisteína y el grupo amina que contiene el aminoácido lisina. El grupo tiol y el grupo amina proporcionan grupos reactivos útiles para reacciones de entrecruzamiento. En algunas realizaciones, los aminoácidos adicionales se añaden en los extremos de los polipéptidos. Los aminoácidos adicionales se pueden diseñar en la secuencia codificante usando métodos de biología molecular recombinante estándar que se conocen en la técnica. Además, se pueden agregar aminoácidos adicionales que constituyen una etiqueta para facilitar la expresión y purificaciones de polipéptidos. Ejemplos de tales etiquetas incluyen los primeros 105 aminoácidos de tioredoxina, la etiqueta de seis histidina en tándem, la etiqueta HA y la etiqueta bandera.

25 Las secuencias de ADN que codifican los diferentes polipéptidos individuales se pueden ligar en vectores de expresión que luego se transfectan en células huésped de expresión apropiadas y se inducen a expresar el péptido recombinante. Posteriormente, el péptido recombinante expresado puede aislarse (y opcionalmente purificarse) y luego usarse en entrecruzamiento para formar las composiciones de polipéptidos oligoméricos diméricos, trímeros, tetraméricos o pentaméricos descritos en el presente documento mediante métodos conocidos en la técnica.

30 En el caso en que el polipéptido no contenga ningún grupo tiol reactivo disponible para el entrecruzamiento químico, hay varios métodos disponibles para introducir grupos tiol en proteínas y péptidos, incluyendo, entre otros, la reducción de disulfuros intrínsecos, así como la conversión de grupos amina o ácido carboxílico al grupo tiol. Los expertos en la técnica conocen dichos métodos y existen muchos kits comerciales para ese fin, tal como los de la división Molecular Probes de Invitrogen Inc. y Pierce Biotechnology.

35 En otra realización, el péptido oligomérico se puede preparar mediante métodos recombinantes sin la necesidad de enlazar polipéptidos aislados individuales mediante entrecruzamiento químico. Se pueden usar métodos recombinantes para sintetizar una única secuencia de ADN codificante que comprende las diversas secuencias codificantes de un péptido. Por ejemplo, se ligan en tándem dos y hasta cinco secuencias codificantes. Se pueden añadir secuencias codificantes de aminoácidos adicionales, que codifican, por ejemplo, de 2-10 aminoácidos, entre cada par de polipéptidos contiguos como secuencias espaciadoras. Cuando el ADN codificante único se transcribe y traduce, el polipéptido expresado puede contener repeticiones en tándem de péptidos, cada una separada por, por ejemplo, 2-10 aminoácidos adicionales. Los residuos de aminoácidos típicos usados para espaciar secuencias son glicina, tirosina, cisteína, lisina, prolina, ácido glutámico y aspártico, o similares. En una realización preferida, el polipéptido oligomérico se expresa en una configuración en tándem de aminocarboxilaminocarboxilo. De manera similar, el polipéptido oligomérico sintetizado puede incluir una secuencia de aminoácidos etiqueta para facilitar la expresión, identificación y purificaciones del polipéptido oligomérico. Dichos métodos recombinantes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Peptidomiméticos

50 La presente divulgación también abarca peptidomiméticos basados en las secuencias polipeptídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, péptidos D, péptidos β y peptoides). Los peptidomiméticos utilizados pueden abarcar toda la longitud del péptido descrito en el presente documento, o sólo una porción del péptido. En algunas realizaciones, el péptido descrito en el presente documento está representado por un peptidomimético y ese imitador está unido covalentemente a un segundo polipéptido (por ejemplo, una molécula terapéutica) como se describe en el presente documento.

60 En algunas realizaciones, el polipéptido está en forma de un peptidomimético que es un peptoid (Patente de EE.UU. No. 5,811,387; Simon et al. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, (1992), 89(20), 9367-9371). Los peptoides son glicinas poli-N-sustituidas. En los peptoides, la cadena lateral está conectada al nitrógeno del esqueleto peptídico, en lugar del carbono α como en los péptidos. Se están desarrollando diversas modificaciones de peptoides para adoptar la estructura secundaria de las secuencias peptídicas. En algunas realizaciones, el peptoid contiene

unidades de monómero nitroaromático (Fowler et al., J Org Chem. 2009 Feb 20;74(4):1440-9). En algunas realizaciones, el peptóide está N-sustituido con cadenas laterales aromáticas alfa-quirales (Gorske et al., J Am Chem Soc. 2006 Nov 8;128(44):14378-87) en uno o más residuos.

Otras modificaciones de polipéptidos

Debe entenderse que las versiones modificadas de los péptidos descritos en el presente documento están abarcadas en la presente divulgación. Las sustituciones conservadoras se analizan más arriba en el presente documento. Las sustituciones no conservadoras están abarcadas en la medida en que retengan sustancialmente las actividades de esos péptidos. La modificación de un polipéptido descrito en el presente documento se puede realizar como se describe en Solicitud publicada en EE. UU. 20080090760 y/o Solicitud publicada en EE. UU. 20060286636, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Lo siguiente proporciona una discusión no limitante de diversas otras modificaciones peptídicas abarcadas dentro del alcance de la divulgación.

La presente divulgación abarca derivados químicos de un polipéptido descrito en el presente documento, siempre que conserve sustancialmente las actividades del polipéptido no derivatizado. Un "derivado químico" es un subconjunto de derivados peptídicos como se describe en el presente documento y se refiere a un polipéptido en cuestión que tiene uno o más residuos derivatizados químicamente mediante la reacción de un grupo lateral funcional. Además de las derivatizaciones de grupos laterales, un derivado químico puede tener una o más modificaciones de la cadena principal que incluyen sustituciones alfa-amino tales como N-metilo, N-etilo, N-propilo y similares, y sustituciones alfa-carbonilo tales como tioéster, tioamida, guanidino y similares. Tales moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que se han derivatizado grupos amino libres para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluensulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno imidazol de la histidina se puede derivatizar para formar N-imbencilhistidina. También se incluyen como derivados químicos aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. También se incluyen como derivados químicos aquellos péptidos que contienen uno o más aminoácidos no naturales no limitantes, los ejemplos incluyen aquellos disponibles para la síntesis de péptidos de proveedores comerciales (por ejemplo Bachem Catalog, 2004 pp. 1-276). Por ejemplo: la prolina puede sustituirse por 4-hidroxi prolina; la lisina puede sustituirse por 5-hidroxis lisina; la histidina puede sustituirse por 3-metilhistidina; la serina se puede sustituir por homoserina; la lisina puede sustituirse por ornitina; la alanina puede sustituirse por β -alanina; la norleucina puede sustituirse por leucina; la fenilalanina se puede sustituir por fenilglicina y el triptófano se puede sustituir por ácido L-1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico o por triptófano H- β -(3-benzotienil)-Ala-OH.

En determinadas realizaciones, las modificaciones químicas del péptido incluyen, entre otras, la inclusión de alquilo, alcoxi, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcoxicarbonilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, amino, alquilamino, aminoalquilo, dialquilamino, aminodialquilo, halógeno, heteroátomo, grupos carbociclo, carbociclilo, carbociclo, carbocíclico, arilo, aralquilo, aralcoxi, ariloxialquilo, heterociclo, heterociclilo, heterocíclico, heteroarilo y/o alifáticos.

Los términos "alquilo", "alcoxi", "hidroxialquilo", "alcoxialquilo" y "alcoxicarbonilo", usados solos o como parte de una fracción mayor, incluyen cadenas tanto lineales como ramificadas que contienen de uno a doce átomos de carbono. Los términos "alqueno" y "alquino" usados solos o como parte de una fracción mayor incluirán cadenas tanto lineales como ramificadas que contienen de dos a doce átomos de carbono. El término "cicloalquilo" usado solo o como parte de una fracción mayor incluirá hidrocarburos cíclicos C3-C12 que están completamente saturados o que contienen una o más unidades de insaturación, pero que no son aromáticos. Alquilo inferior se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1-6 carbonos.

El término "amino" se refiere a un grupo NH₂. El término "alquilamino" o "aminoalquilo" se refiere a un grupo amino en donde uno de los átomos de hidrógeno está reemplazado por un grupo alquilo. El término "dialquilamino" o "aminodialquilo" se refiere a un grupo amino en donde los átomos de hidrógeno están reemplazados por grupos alquilo, en donde el grupo alquilo puede ser igual o diferente. El término "halógeno" significa F, Cl, Br o I. El término "heteroátomo" significa nitrógeno, oxígeno o azufre con una estructura de anillo de carbono e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno y azufre, y la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico. También el término "nitrógeno" incluye un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico. Como ejemplo, en un anillo saturado o parcialmente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre o nitrógeno, el nitrógeno puede ser N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR⁺ (como en pirrolidinilo N-sustituido). Los términos "carbociclo", "carbociclilo", "carbociclo" o "carbocíclico", tal como se usan en el presente documento, significan un sistema de anillos alifático que tiene de tres a catorce miembros. Los términos "carbociclo", "carbociclilo", "carbociclo" o "carbocíclico", ya sean saturados o parcialmente insaturados, también se refieren a anillos que están opcionalmente sustituidos. Los términos "carbociclo", "carbociclilo", "carbociclo" o "carbocíclico" también incluyen anillos alifáticos que están fusionados a uno o más anillos aromáticos o no aromáticos, tales como en un decahidronaftilo o tetrahidronaftilo, donde el radical o punto de unión es en el anillo alifático.

El término "arilo", usado solo o como parte de una fracción mayor como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a grupos de anillos aromáticos que tienen de seis a catorce miembros, tales como fenilo, bencilo, fenetilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antracilo y 2-antracilo. El término "arilo" también se refiere a anillos que están opcionalmente

sustituídos. El término "arilo" puede usarse indistintamente con el término "anillo de arilo". "Arilo" también incluye sistemas de anillos aromáticos policíclicos fusionados en los que un anillo aromático está fusionado a uno o más anillos. Los ejemplos incluyen 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antracilo y 2-antracilo. También se incluye dentro del alcance del término "arilo", como se usa en el presente documento, un grupo en donde un anillo aromático está fusionado a uno o más anillos no aromáticos, tal como en un indanilo, fenantridinilo o tetrahidronaftilo, donde el radical o punto de unión está en el anillo aromático.

El término "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico" como se usa en el presente documento incluye sistemas de anillos no aromáticos que tienen de cuatro a catorce miembros, preferiblemente de cinco a diez, en los que uno o más carbonos del anillo, preferiblemente de uno a cuatro, están reemplazados cada uno por un heteroátomo. Ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen 3-1H-bencimidazol-2-ona, (1-sustituido)-2-oxo-bencimidazol-3-ilo, 2-tetrahidro-furanilo, 3-tetrahidrofuranilo, 2-tetrahidropiranilo, 3-tetrahidropiranilo, 4-tetrahidropiranilo, [1,3]-dioxalanilo, [1,3]-ditiolanilo, [1,3]-dioxanilo, 2-tetra-hidro-tiofenilo, 3-tetrahidrotiofenilo, 2-morfolinilo, 3-morfolinilo, 4-morfolinilo, 2-tiomorfolinilo, 3-tiomorfolinilo, 4-tiomorfolinilo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 4-tiazolidinilo, diazolonilo, diazolonilo N-sustituido, 1-ftalimidinilo, benzoxanilo, benzopirrolidinilo, benzopiperidinilo, benzoxolanilo, benzotiolanilo y benzotianilo. También se incluye dentro del alcance del término "heterociclilo" o "heterocíclico", como se usa en el presente documento, un grupo en donde un anillo que contiene un heteroátomo no aromático está fusionado a uno o más anillos aromáticos o no aromáticos, tales como en un indolinilo, cromanilo, fenantridinilo o tetrahidroquinolinilo, donde el radical o punto de unión está en el anillo que contiene heteroátomos no aromáticos. El término "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico", ya sea saturado o parcialmente insaturado, también se refiere a anillos que están opcionalmente sustituidos.

El término "heteroarilo", usado solo o como parte de una fracción más grande como en "heteroaralquilo" o "heteroarilalcoxi", se refiere a grupos de anillos heteroaromáticos que tienen de cinco a catorce miembros. Ejemplos de anillos heteroarilo incluyen 2-furanilo, 3-furanilo, 3-furazanilo, N-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-oxadiazolilo, 5-oxadiazolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 1-pirazolilo, 2-pirazolilo, 3-pirazolilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-pirimidilo, 3-piridazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 5-tetrazolilo, 2-triazolilo, 5-triazolilo, 2-tienilo, 3-tienilo, carbazolilo, bencimidazolilo, benzotienilo, benzofuranilo, indolilo, quinolinilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, bencimidazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, isoindolilo, acridinilo y benzoisoxazolilo. También se incluye dentro del alcance del término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, un grupo en donde un anillo heteroatómico está fusionado a uno o más anillos aromáticos o no aromáticos donde el radical o punto de unión está en el anillo heteroaromático. Los ejemplos incluyen tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo y pirido[3,4-d]pirimidinilo. El término "heteroarilo" también se refiere a anillos que están opcionalmente sustituidos. El término "heteroarilo" puede usarse indistintamente con el término "anillo heteroarilo" o el término "heteroaromático".

Un grupo arilo (incluyendo aralquilo, aralcoxi, ariloxialquilo y similares) o heteroarilo (incluyendo heteroaralquilo y heteroarilalcoxi y similares) puede contener uno o más sustituyentes. Ejemplos de sustituyentes adecuados en cualquier átomo de carbono insaturado de un grupo arilo, heteroarilo, aralquilo o heteroaralquilo incluyen un halógeno, -R0, -OR0, -SR0, 1,2-metilen-dioxi, 1,2-etilendioxi, OH protegido (como aciloxi), fenilo (Ph), Ph sustituido, -O(Ph), -O(Ph) sustituido, -CH2(Ph), -CH2(Ph) sustituido, CH2CH2(Ph), sustituido-CH2CH2(Ph), -NO2, -CN, -N(R0)2, -NR0C(O)R0, NR0C(O)N(R0)2, NR0CO2R0, -NR0NR0C(O)R0, -NR0NR0C(O)N(R0)2, -NR0NR0C2R0, C(O)C(O)R0, C(O)CH2C(O)R0, -CO2R0, -C(O)R0, -C(O)N(R0)2, -OC(O)N(R0)2, S(O)2R0, -SO2N(R0)2, -S(O)R0, -NR0SO2N(R0)2, -NR0SO2R0, -C(=S)N(R0)2, C(=NH)N(R0)2, (CH2)yNHC(O)R0, y -(CH2)yNHC(O)CH(V-R0)(R0); en donde cada R0 se selecciona independientemente de hidrógeno, un grupo alifático sustituido o no sustituido, un anillo heteroarilo o heterocíclico no sustituido, fenilo (Ph), Ph sustituido, O(Ph), -O(Ph) sustituido, -CH2(Ph), o -CH2(Ph) sustituido; y es 0-6; y V es un grupo enlazador. Ejemplos de sustituyentes en el grupo alifático o el anillo fenilo de R0 incluyen amino, alquilamino, dialquilamino, aminocarbonilo, halógeno, alquilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquilaminocarboniloxi, dialquilaminocarboniloxi, alcoxi, nitro, ciano, carboxi, alcocixicarbonilo, alquilcarbonilo, hidroxi, haloalcoxi, y haloalquilo.

Un grupo alifático o un anillo heterocíclico no aromático o un anillo arilo o heteroarilo fusionado puede contener uno o más sustituyentes. Ejemplos de sustituyentes adecuados en cualquier carbono saturado de un grupo alifático o de un anillo heterocíclico no aromático o un anillo arilo o heteroarilo fusionado incluyen los enumerados anteriormente para el carbono insaturado de un grupo arilo o heteroarilo y los siguientes: =O, =S, =NNHR*, =NN(R*)2, =N-, =NNHC(O)R*, =NNHCO2(alquilo), =NNHSO2(alquilo), o =NR*, donde cada R* se selecciona independientemente de hidrógeno, un grupo alifático no sustituido o un grupo alifático sustituido. Ejemplos de sustituyentes en el grupo alifático incluyen amino, alquilamino, dialquilamino, aminocarbonilo, halógeno, alquilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquilaminocarboniloxi, dialquilaminocarboniloxi, alcoxi, nitro, ciano, carboxi, alcocixicarbonilo, alquilcarbonilo, hidroxi, haloalcoxi y haloalquilo.

Los sustituyentes adecuados en el nitrógeno de un anillo heterocíclico no aromático incluyen R+, -N(R+)2, -C(O)R+, -CO2R+, -C(O)C(O)R+, -C(O)CH2C(O)R+, -SO2R+, -SO2N(R+)2, C(=S)N(R+)2, -C(=NH)-N(R+)2, and -NR+SO2R+; en donde cada R+ se selecciona independientemente de hidrógeno, un grupo alifático, un grupo alifático sustituido, fenilo (Ph), Ph sustituido, -O(Ph), -O(Ph) sustituido, -CH2(Ph), -CH2(Ph) sustituido, o un anillo heteroarilo o heterocíclico no sustituido. Ejemplos de sustituyentes en el grupo alifático o el anillo fenilo incluyen amino, alquilamino, dialquilamino, aminocarbonilo, halógeno, alquilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo,

alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alcoxi, nitro, ciano, carboxi, alcocarbonilo, alquilcarbonilo, hidroxi, haloalcoxi y haloalquilo.

En determinadas realizaciones, los monómeros peptídicos descritos en el presente documento se dimerizan o multimerizan mediante unión covalente a al menos una fracción enlazadora. La fracción enlazadora es preferiblemente, aunque no necesariamente, una fracción enlazadora C1-12 opcionalmente terminada con uno o dos enlaces $-NH-$ y opcionalmente sustituido en uno o más átomos de carbono disponibles con un sustituyente alquilo inferior. Preferiblemente, el enlazador comprende $-NH-R-NH-$ en donde R es un alquilo inferior (C1-6) sustituido con un grupo funcional, tal como un grupo carboxilo o un grupo amino, que permite la unión a otra fracción molecular (por ejemplo, como puede estar presente en la superficie de un soporte sólido durante la síntesis de péptidos o en un agente modificador farmacocinético tal como PEG). En determinadas realizaciones, el enlazador es un residuo de lisina. En ciertas otras realizaciones, el enlazador une los términos C de dos monómeros peptídicos, mediante unión simultánea al aminoácido C-terminal de cada monómero. En otras realizaciones, el enlazador une los péptidos uniéndose a las cadenas laterales de aminoácidos que no están en los términos C. Cuando el enlazador se une a una cadena lateral de un aminoácido que no está en el término C de los péptidos, la cadena lateral contiene preferiblemente una amina, tal como las que se encuentran en la lisina, y el enlazador contiene dos o más grupos carboxi capaces de formar un enlace amida con los péptidos.

Los monómeros peptídicos de la divulgación se pueden oligomerizar usando el sistema biotina/estreptavidina. La oligomerización puede mejorar una o más actividades de los péptidos como se describe en el presente documento. Los análogos biotinilados de monómeros peptídicos se pueden sintetizar mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los monómeros peptídicos pueden estar biotinilados en el extremo C-terminal. Estos monómeros biotinilados luego se oligomerizan mediante incubación con estreptavidina (por ejemplo, en una proporción molar de 4:1 a temperatura ambiente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio RPMI tamponado con HEPES (Invitrogen) durante 1 hora). En una variación de este proceso, los monómeros peptídicos biotinilados pueden oligomerizarse mediante incubación con cualquiera de varios anticuerpos anti-biotina disponibles comercialmente [por ejemplo, IgG anti-biotina de cabra de Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, D.C.)].

En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden enlazarse físicamente en tándem para formar un polímero. Los polipéptidos que constituyen dicho polímero pueden estar separados entre sí mediante un enlazador peptídico. Un "enlazador peptídico" es una secuencia corta (por ejemplo, aproximadamente 1-40, por ejemplo, 1-20 aminoácidos) de aminoácidos que no forma parte de la secuencia flanqueante de Saposina A. Un péptido enlazador está unido en su extremo amino terminal a un polipéptido o dominio polipeptídico y en su extremo carboxilo terminal a otro polipéptido o dominio polipeptídico. Ejemplos de péptidos enlazadores útiles incluyen, entre otros, polímeros de glicina ((G)_n), incluyendo polímeros de glicina-serina y glicina-alanina (por ejemplo, una repetición (Gly4Ser)_n donde n=1-8, preferiblemente, n= 3, 4, 5 o 6). Los polipéptidos descritos en el presente documento también pueden unirse mediante enlaces de enlaces químicos, tales como enlaces mediante enlaces disulfuro o mediante puentes químicos. Se pueden usar técnicas de biología molecular que son bien conocidas por los expertos en la técnica para crear un polímero de los polipéptidos. En algunas realizaciones, se encuentra en el polímero una combinación de un polipéptido y un péptido variante. Las secuencias peptídicas de la presente divulgación también se pueden enlazar entre sí usando entrecruzadores no peptídicos (Pierce 2003-2004 Applications Handbook and Catalog, Chapter 6) u otros armazones tales como HPMA, polidextrano, polisacáridos, etilenglicol, polietilenglicol, glicerol, azúcares y alcoholes de azúcar (por ejemplo, sorbitol, manitol).

En algunas realizaciones, el polietilenglicol (PEG) puede servir como un enlazador que dimeriza dos monómeros polipeptídicos: por ejemplo, un único resto de PEG que contiene dos grupos funcionales reactivos puede unirse simultáneamente a los términos N de ambas cadenas peptídicas de un dímero peptídico. Estos péptidos se denominan en el presente documento "péptidos enlazados a PEG". Aún en otra realización, una fracción enlazadora puede comprender una molécula que contiene dos ácidos carboxílicos y opcionalmente sustituida en uno o más átomos disponibles con un grupo funcional adicional tal como una amina capaz de unirse a una o más moléculas de PEG. Una molécula de este tipo se puede representar como: $-CO-(CH_2)_n-uX-(CH_2)_m-CO-$ donde n es un número entero entre cero y 10, m es un número entero entre uno y 10, X se selecciona entre O, S, N(CH₂)pNR₁, NCO(CH₂)pNR₁ y CHNR₁, R₁ se selecciona de H, Boc (tert-butiloxycarbonilo), Cbz y p es un número entero entre 1 y 10. En determinadas realizaciones, un grupo amino de cada uno de los péptidos forma un enlace amida con el enlazador. En ciertas otras realizaciones, el grupo amino del péptido unido al enlazador es la amina épsilon de un residuo de lisina o la alfa amina del residuo N-terminal, o un grupo amino de una molécula espaciadora opcional. En algunas realizaciones, se usa un enlazador para ciclar péptidos. En otra realización, se puede usar un espaciador además de una molécula enlazadora para separar fracciones según se desee. En algunas realizaciones, tanto n y m son uno, X es NCO(CH₂)pNR₁, p es dos y R₁ es Boc. Opcionalmente, el grupo Boc puede eliminarse para liberar un grupo amina reactivo capaz de formar un enlace covalente con una especie de PEG adecuadamente activada tal como mPEG-SPA-NHS o mPEG-NPC (Nektar Therapeutics, San Carlos CA). Opcionalmente, el enlazador contiene más de una amina reactiva capaz de derivatizarse con una especie de PEG adecuadamente activada. Opcionalmente, el enlazador contiene una o más aminas reactivas capaces de derivatizarse con un agente modificador farmacocinético (PK) adecuadamente activado tal como un ácido graso, un péptido localizador, un agente de transporte, un agente de penetración celular, un agente dirigido a órganos, o un agente quelante.

Un monómero, dímero, multímero u oligómero polipeptídico como se describe en el presente documento puede comprender además una o más fracciones enlazadoras y/o espaciadoras. En algunas realizaciones, la fracción enlazadora es una fracción enlazadora C1-12 opcionalmente terminado con enlaces --NH-- o grupos carboxilo (--COOH), y opcionalmente sustituido en uno o más átomos de carbono disponibles con un sustituyente alquilo inferior.

En algunas realizaciones, el enlazador es R--COOH en donde R es un alquilo inferior (C1-6) opcionalmente sustituido con un grupo funcional tal como un grupo carboxilo o un grupo amino que permite la unión a otra fracción molecular. Por ejemplo, el enlazador puede ser un residuo de glicina (G) o un ácido aminohexanoico (Ahx) tal como el ácido 6-aminohexanoico. En otras realizaciones, el enlazador es --NH--R--NH-- en donde R es un alquilo inferior (C1-6) sustituido con un grupo funcional tal como un grupo carboxilo o un grupo amino que permite la unión a otra fracción molecular. Por ejemplo, el enlazador puede ser un residuo de lisina (K) o una lisina amida (K--NH_2 , un residuo de lisina en donde el grupo carboxilo se ha convertido en una fracción amida --CONH_2).

En algunas realizaciones, la fracción enlazadora tiene la siguiente estructura: $\text{--NH--(CH}_2\text{)}_a\text{--[O--(CH}_2\text{)}_b\text{]}_g\text{--O d--(CH}_2\text{)}_e\text{--Y--}$ donde a, b, g, d y e son cada uno números enteros cuyos valores se seleccionan de forma independiente. En algunas realizaciones, a, b y e son cada uno números enteros cuyos valores se seleccionan independientemente entre uno y aproximadamente seis, d es cero o uno, g es un número entero seleccionado entre cero y aproximadamente diez, excepto que cuando g es mayor que uno, b es dos, e Y se selecciona de NH o CO. En algunas realizaciones, a, b y e son cada uno igual a dos, tanto g como d son iguales a 1 e Y es NH. En otra realización, g y d son cero, a y e juntos suman cinco e Y es CO.

Los monómeros, dímeros o multímeros polipeptídicos como se describen en el presente documento pueden comprender además una o más fracciones poliméricas solubles en agua. Preferiblemente, estos polímeros están unidos covalentemente a los compuestos peptídicos de la divulgación. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero es farmacéuticamente aceptable. Un experto en la técnica podrá seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones tales como si el conjugado polímero-péptido se usará terapéuticamente y, de ser así, la dosis deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. El polímero soluble en agua puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinil-pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno y polioles polioxiethylados. Un polímero soluble en agua preferido es PEG.

El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. Un PEG preferido para su uso en la presente divulgación es PEG lineal no ramificado que tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 60 kDa (el término "aproximadamente" indica que en preparaciones de PEG, algunas moléculas pesarán más, y algo menos que el peso molecular indicado). Más preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa, e incluso más preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de 20 a 30 kDa. Se pueden usar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, duración de la liberación sostenida deseada; efectos, si los hay, sobre la actividad biológica; facilidad de manipulación; grado de falta de antigenicidad; y otros efectos del PEG sobre un péptido terapéutico conocido a un experto en la técnica).

El número de moléculas de polímero unidas puede variar; por ejemplo, se pueden unir uno, dos, tres o más polímeros solubles en agua a un péptido de la divulgación. Los múltiples polímeros unidos pueden ser fracciones químicas iguales o diferentes (por ejemplo, PEG de diferente peso molecular).

En determinadas realizaciones, el PEG se puede unir a al menos un término (término N o término C) de un monómero o dímero peptídico. En otras realizaciones, se puede unir PEG a una fracción enlazadora de un monómero o dímero peptídico. En una realización preferida, el PEG está unido a la fracción enlazadora de un dímero peptídico. Opcionalmente, el enlazador contiene más de una amina reactiva capaz de derivatizarse con una especie de PEG adecuadamente activada.

Se pueden usar métodos para estabilizar péptidos conocidos en la técnica con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, el uso de D-aminoácidos, el uso de enlaces amida reducidos para la cadena principal peptídica y el uso de enlaces no peptídicos para enlazar las cadenas laterales, incluyendo, entre otros, pirrolinona y miméticos de azúcar, pueden proporcionar estabilización. El diseño y la síntesis de miméticos peptídicos de andamios de azúcar se describen por Hirschmann et al. (J. Med. Chem., 1996, 36, 2441-2448). Además, los miméticos peptídicos basados en pirrolinona presentan el farmacóforo peptídico sobre un fondo estable que tiene características de biodisponibilidad mejoradas (ver, por ejemplo, Smith et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 11037-11038).

En el presente documento se incluyen conjugados del polipéptido descrito en el presente documento o de una variante de sustitución de aminoácidos conservadora o derivado del mismo. Estos péptidos se pueden conjugar con otros polímeros además del polietilenglicol (PEG). El polímero puede tener o no su propia actividad biológica. Otros ejemplos de conjugación de polímeros incluyen, entre otros, polímeros tales como polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido maleico de divinileter, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, poliol polioxiethylado, heparina, fragmentos de heparina,

polisacáridos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, éteres de polivinilileno y α,β -poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida y similares, o mezclas de los mismos. La conjugación con un polímero puede mejorar la vida media sérica, entre otros efectos. Se pueden utilizar diversos agentes quelantes para

5 conjuguar los péptidos descritos en el presente documento. Estos agentes quelantes incluyen, entre otros, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilenglicol-0,0'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N,N'-bis(hidroxibencil)etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido trietilentetraminahexaacético (TTTA), ácido 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotridecano-1,4,7,10-tetraacético (TITRA), ácido 1,4,8,11-tetraazacicloten-adecono-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA) y 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (TETRA). Los métodos de conjugación son bien conocidos en

10 la técnica, por ejemplo, P. E. Thorpe, et. al, 1978, Nature 271, 752 - 755; Harokopakis E., et. al., 1995, Journal of Immunological Methods, 185:31-42; S. F. Atkinson, et. al., 2001, J. Biol. Chem., 276:27930-27935; y Pat. de EE.UU. Nos.:5,601,825, 5,180,816, 6,423,685, 6,706,252, 6,884,780, y 7,022,673,

En algunas realizaciones, los polipéptidos, proteínas de fusión o conjugados descritos en el presente documento incluyen modificaciones dentro de la secuencia, tales como modificación mediante acilación de NH₂ terminal, por

15 ejemplo, acetilación o amidación del ácido tioglicólico, mediante carboxilamidación terminal, por ejemplo, con amoníaco, metilamina, y modificaciones de terminales similares.

También se pueden modificar los extremos amino y/o carboxi de los péptidos descritos en el presente documento. Las modificaciones terminales son útiles para reducir la susceptibilidad por digestión con proteinasas y, por lo tanto, pueden

20 servir para prolongar la vida media de los polipéptidos en solución, particularmente en fluidos biológicos donde pueden estar presentes proteasas. Las modificaciones del término amino incluyen metilación (por ejemplo, -NHCH₃ o -N(CH₃)₂), acetilación (por ejemplo, con ácido acético o un derivado halogenado del mismo, tal como ácido a-cloroacético, ácido a-bromoacético o ácido a-yodoacético), añadiendo un grupo benciloxicarbonilo (Cbz), o bloqueando el término amino con cualquier grupo bloqueante que contenga una funcionalidad carboxilato definida por

25 RCOO- o una funcionalidad sulfonilo definida por R-SO₂-, donde R se selecciona del grupo que consiste en alquilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo y similares, y grupos similares. También se puede incorporar un desaminoácido en el término N (de modo que no haya ningún grupo amino N-terminal) para disminuir la susceptibilidad a las proteasas o restringir la conformación del compuesto peptídico. En determinadas realizaciones, el término N está acetilado con ácido acético o anhídrido acético.

Las modificaciones del término carboxi incluyen reemplazar el ácido libre con un grupo carboxamida o formar una

30 lactama cíclica en el término carboxi para introducir restricciones estructurales. También se pueden ciclar los péptidos descritos en el presente documento, o incorporar un residuo desamino o descarboxi en los términos del péptido, de modo que no haya ningún grupo amino o carboxilo terminal, para disminuir la susceptibilidad a las proteasas o restringir la conformación del péptido. Los métodos de síntesis de péptidos circulares se conocen en la técnica, por ejemplo, en

35 Solicitud de Patente de EE.UU. No. 20090035814; Muralidharan y Muir, 2006, Nat Methods, 3:429-38; y Lockless y Muir, 2009, Proc Natl Acad Sci USA. Jun 18, Epub. Los grupos funcionales C-terminales de los péptidos descritos en el presente documento incluyen amida, amida alquilo inferior, amida di(alquilo inferior), alcoxi inferior, hidroxilo y carboxi, y sus derivados de éster inferior, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se pueden reemplazar las cadenas laterales naturales de los aminoácidos codificados genéticamente (o los aminoácidos D estereoisoméricos) con otras cadenas laterales, por ejemplo con grupos tales como alquilo, alquilo

40 inferior (C1-6), alquilo cíclico de 4-, 5-, 6- a 7- miembros, amida, amida, alquilamida inferior, di(alquilo inferior), alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi y sus derivados éster inferior, y con 4-, 5-, 6 -, a heterociclos de 7 miembros. En particular, se pueden emplear análogos de prolina en los que el tamaño del anillo del residuo de prolina se cambia de 5 miembros a 4, 6 o 7 miembros. Los grupos cíclicos pueden saturarse o insaturados y, si son insaturados, pueden ser aromáticos

45 o no aromáticos. Los grupos heterocíclicos contienen preferiblemente uno o más heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Ejemplos de tales grupos incluyen furazano, furilo, imidazolidinilo, imidazolidilo, imidazolinilo, isotiazolidilo, isoxazolidilo, morfolinilo (por ejemplo, morfolino), oxazolidilo, piperazinilo (por ejemplo, 1-piperazinilo), piperidilo (por ejemplo, 1-piperidilo, piperidino), piranilo, grupos pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo (por ejemplo, 1-pirrolidinilo), pirrolinilo, pirrolilo, tiadiazolidilo, tiazolidilo, tienilo, tiomorfolinilo (por

50 ejemplo, tiomorfolino) y triazolidilo. Estos grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos o no sustituidos. Cuando un grupo está sustituido, el sustituyente puede ser alquilo, alcoxi, halógeno, oxígeno o fenilo sustituido o no sustituido.

También se pueden modificar fácilmente los péptidos mediante fosforilación y otros métodos (por ejemplo, como se describe en Hruby, et al. (1990) Biochem J. 268:249-262).

Los compuestos polipeptídicos descritos en el presente documento también sirven como modelos estructurales para

55 compuestos no peptídicos con actividad biológica similar. Los expertos en la técnica reconocen que hay una variedad de técnicas disponibles para construir compuestos con la misma o similar actividad biológica deseada que los 4-6 mers descritos en el presente documento, pero con una actividad más favorable que los 4-6 mers con respecto a la solubilidad, estabilidad y susceptibilidad a la hidrólisis y proteólisis (Ver, Morgan y Gainor (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243-252). Estas técnicas incluyen, entre otras, la sustitución del esqueleto peptídico por un esqueleto compuesto

60 de fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminos secundarios y N-metilaminoácidos.

Polipéptidos más grandes

Otro ejemplo de la divulgación se refiere a los hallazgos de que los polipéptidos derivados de la Saposina A que contienen los 4-6 mers centrales descritos en el presente documento y tienen 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) de la secuencia de saposina A nativa, exhibe una o más de las actividades de estimular p53, estimular la expresión de Tsp-1, inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la invasividad tumoral e inhibir la metástasis tumoral. Como tal, algunos casos de la divulgación se relacionan con un polipéptido que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende la secuencia de aminoácidos del núcleo activo DWLP (SEQ ID NO: 5), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o CDWLPK (SEQ ID NO: 3), o una variante de sustitución de aminoácidos del mismo. En algunos casos, la divulgación se refiere a un polipéptido que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende la secuencia de aminoácidos del núcleo activo DWLP (SEQ ID NO: 5) o DWLPK (SEQ ID NO: 4), o una variante de sustitución de aminoácidos del mismo. En algunos casos, la divulgación se refiere a un polipéptido que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende la secuencia de aminoácidos del núcleo activo DWLP (SEQ ID NO: 5), o una variante de sustitución de aminoácidos del mismo. El polipéptido tiene una o más de las actividades de estimular p53, estimular la expresión de Tsp-1, inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la invasividad tumoral e inhibir la metástasis tumoral, según se determina mediante los métodos descritos en el presente documento. Algunos casos de la divulgación se refieren a un polipéptido que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos que comprenden un núcleo activo que es una variante de sustitución de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos DWLP (SEQ ID NO: 5), DWLPK (SEQ ID NO: 4), o CDWLPK (SEQ ID NO: 3). En algunos casos, la divulgación se refiere a un polipéptido que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende la secuencia de aminoácidos del núcleo activo DWLP (SEQ ID NO: 5) o DWLPK (SEQ ID NO: 4). En algunos casos, la divulgación se refiere a un polipéptido que consiste en 9 o menos residuos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) que comprende la secuencia de aminoácidos del núcleo activo DWLP (SEQ ID NO: 5). En el presente documento se describen sustituciones de aminoácidos específicas. El polipéptido tiene una o más de las actividades de estimular p53, estimular la expresión de Tsp-1, inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la invasividad tumoral e inhibir la metástasis tumoral, según se determina mediante los métodos descritos en el presente documento.

Los péptidos de la invención incluyen DWLPKPNMS (SEQ ID NO: 12), CDWLPKPNM (SEQ ID NO: 13), TCDWLPKPN (SEQ ID NO: 14), KTCWLPKP (SEQ ID NO: 15), EKTCDWLPK (SEQ ID NO: 16), y LEKTCDWLP (SEQ ID NO: 17).

También se describen en el presente documento polipéptidos de 9 o menos aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) descritos en el presente documento, en los que las secuencias no centrales (los aminoácidos que flanquean el DWLP) tienen una o más sustituciones de aminoácidos (es decir, conservador, D-aminoácido y combinaciones de los mismos), en donde el polipéptido tiene una o más de las actividades de estimular p53, estimular la expresión de Tsp-1, inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la invasividad tumoral e inhibir la metástasis tumoral, según lo determinado por los métodos descritos en el presente documento.

Las modificaciones a los polipéptidos descritas en el presente documento (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, derivatizaciones, etc.) se pueden aplicar igualmente a este polipéptido de 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4). Las proteínas de fusión, las proteínas quiméricas y otras composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) descritas en el presente documento pueden prepararse de manera similar a partir de este polipéptido de 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4) por parte del profesional experto. Los 9 o menos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 7, 6, 5 o 4), las proteínas de fusión y otras composiciones se pueden usar además en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas

Otros aspectos de la divulgación se relacionan con composiciones que comprenden los polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en el presente documento. Dicha composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) puede comprender un polipéptido, polipéptido de fusión, polipéptido oligomérico, ácido nucleico o vector que comprende el ácido nucleico descrito en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido, polipéptido de fusión, polipéptido oligomérico, ácido nucleico o vector que comprende el ácido nucleico, descrito en el presente documento, se pueden usar en diversos métodos de tratamiento.

Métodos de tratamiento

Una composición farmacéutica que comprende uno o más de los diversos polipéptidos descritos en el presente documento conserva la actividad de los 4-6 mers contenidos en ella y, como tal, es útil para al menos lo siguiente: (1) el tratamiento de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis; (2) el tratamiento del cáncer; (3) la inhibición de la recurrencia de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis; (4) la inhibición de la recurrencia del cáncer; (5) la inhibición de la metástasis de cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer; (6) la inhibición de la recurrencia del cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer; (7) la inhibición del desarrollo del cáncer en un sujeto con riesgo de desarrollar cáncer; (8) la inhibición de la metástasis del cáncer en un sujeto previamente diagnosticado con cáncer; (9) la inhibición del desarrollo de cáncer maligno en un sujeto previamente diagnosticado con cáncer; (10) la inhibición de la angiogénesis en un sujeto que la necesita; y (11) la estimulación de la expresión

de Tsp-1 en un sujeto que la necesita. Sin querer limitarse a ninguna teoría, se espera que la administración conduzca a un aumento significativo de Tsp1 en el sitio objetivo de la enfermedad o trastorno específico. Dicho sitio es un sitio de angiogénesis que está asociado con la enfermedad o trastorno y se considera perjudicial para el sujeto en el contexto de la enfermedad o trastorno. Ejemplos son el sitio del tumor primario, el sitio del tumor secundario o el sitio potencial del tumor secundario en un sujeto diagnosticado con un tumor, como en el caso del cáncer. Por lo tanto, nuevamente sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el tratamiento de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis; el tratamiento del cáncer; la inhibición de la recurrencia de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis; la inhibición de la recurrencia del cáncer; la inhibición de metástasis de cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer; la inhibición de la recurrencia del cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer; la inhibición del desarrollo del cáncer en un sujeto con riesgo de desarrollar cáncer; la inhibición de la metástasis del cáncer en un sujeto previamente diagnosticado con cáncer; y la inhibición del desarrollo de cáncer maligno en un sujeto previamente diagnosticado con cáncer se puede lograr mediante la estimulación de Tsp-1 y/o la inhibición de la angiogénesis.

Como tal, un aspecto de la divulgación se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los polipéptidos descritos (por ejemplo, los 4-6 mers) en forma de una composición farmacéutica a un sujeto con fines terapéuticos. Otro aspecto de la divulgación se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos descritos en el presente documento que consisten esencialmente en 4-6 mers, en forma de una composición farmacéutica a un sujeto con fines terapéuticos. Otro aspecto de la divulgación se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento que contienen los 4-6 mers, en forma de una composición farmacéutica a un sujeto con fines terapéuticos. Otro aspecto de la divulgación se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, en forma de una composición farmacéutica, a un sujeto con fines terapéuticos.

En algunos casos, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

En algunos casos, la divulgación proporciona un método para inhibir la recurrencia de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento.

La enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis se selecciona de, pero no se limita a, un grupo que consiste en cáncer, formación de ascitis, psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia tiroidea, preeclampsia, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad de Alzheimer, obesidad, derrame pleural, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), endometriosis, retinopatías diabéticas/otras, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), hemangiomas y neovascularización corneal.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que se sabe que responde a terapias basadas en p53. En algunas realizaciones, la administración de la composición farmacéutica bloquea el crecimiento de un tumor primario, previene o inhibe la metástasis o produce una combinación de dichos efectos. Uno de esos usos de las composiciones descritas en el presente documento es tratar un tumor primario inoperable (inoperable debido a la ubicación del tumor o la salud del sujeto) y al mismo tiempo tratar o prevenir la metástasis. Los tipos de tumores que se consideran que responden de manera óptima a dicha terapia se describen en el presente documento e incluyen, sin limitación, tumores con contenido estromal aumentado.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es cáncer, donde las células cancerosas neoplásicas que se dividen rápidamente requieren un suministro de sangre eficiente para sostener el crecimiento continuo del tumor. Tal como se utiliza en el presente documento, cáncer se refiere a cualquiera de varias neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y hacer metástasis en nuevos sitios del cuerpo y también se refiere a la condición patológica caracterizada por dichos crecimientos neoplásicos malignos. Los vasos sanguíneos proporcionan conductos para hacer metástasis y diseminarse a otras partes del cuerpo. Al llegar al sitio metastásico, las células cancerosas trabajan para establecer una nueva red de suministro de sangre. Se espera que la administración de la composición farmacéutica descrita en el presente documento conduzca a un aumento del inhibidor de la angiogénesis Tsp-1 en el estroma circundante del tumor. Como resultado, en algunas realizaciones, la administración de la composición farmacéutica inhibe la angiogénesis. Al inhibir la angiogénesis en el sitio del tumor primario y en el sitio del tumor secundario, las realizaciones de la divulgación sirven para detener, prevenir y limitar la progresión de la enfermedad. Cualquier tumor sólido que requiera un suministro de sangre eficiente para seguir creciendo es un objetivo candidato. Por ejemplo, los candidatos para el tratamiento descrito en el presente documento incluyen carcinomas y sarcomas que se encuentran en el ano, vejiga, conducto biliar, hueso, cerebro, mama, cuello uterino, colon/recto, endometrio, esófago, ojo, vesícula biliar, cabeza y cuello, hígado, riñón, laringe, pulmón, mediastino (pecho), boca, ovarios, páncreas, pene, próstata, piel, intestino delgado, estómago, médula espinal, coxis, testículos, tiroides y útero. Los tipos de carcinomas incluyen papiloma/carcinoma, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, teratoma, adenoma/adenocarcinoma, melanoma, fibroma, lipoma, leiomioma, rabdomioma, mesotelioma, angioma, osteoma, condroma, glioma, linfoma/leucemia, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinomas indiferenciados de células grandes,

carcinoma de células basales y carcinoma indiferenciado sinonasal. Los tipos de sarcomas incluyen sarcoma de tejidos blandos tales como sarcoma alveolar de partes blandas, angiosarcoma, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfomasarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial y tumor de Askin, sarcoma de Ewing (tumor neuroectodérmico primitivo), hemangioendotelio maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma y condrosarcoma. La acumulación anormal y el crecimiento de vasos sanguíneos en la piel o en órganos internos en forma de hemangiomas también se pueden tratar de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis es degeneración macular relacionada con la edad. Se sabe que el VEGF contribuye al crecimiento anormal de vasos sanguíneos desde la capa corioidea del ojo hacia la retina, similar a lo que ocurre durante la forma húmeda o neovascular de degeneración macular relacionada con la edad. La degeneración macular, a menudo llamada AMD o ARMD (degeneración macular relacionada con la edad), es la principal causa de pérdida de visión y ceguera en los estadounidenses de 65 años o más. Nuevos vasos sanguíneos crecen (neovascularización) debajo de la retina y pierden sangre y líquido. Esta fuga causa daño permanente a las células de la retina sensibles a la luz, que mueren y crean puntos ciegos en la visión central o la mácula.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno angiogénico es retinopatía diabética: crecimiento anormal de vasos sanguíneos asociado con enfermedades oculares diabéticas. La activación de Tsp-1 a través de la prosaposina sirve para antagonizar el VEGF, una sustancia producida naturalmente en el cuerpo que promueve la formación de vasos sanguíneos. Liberado por la retina (tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo) cuando los vasos sanguíneos normales son dañados por pequeños coágulos de sangre debido a la diabetes, el VEGF activa su receptor, iniciando una reacción en cadena que culmina en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, los vasos sanguíneos de respaldo están defectuosos; se filtran, sangran y favorecen el tejido cicatricial que desprende la retina, lo que provoca una pérdida grave de la visión. Este crecimiento es el sello distintivo de la retinopatía diabética, la principal causa de ceguera entre los jóvenes de los países desarrollados. En algunas realizaciones, el sujeto que necesita tratamiento puede ser un mamífero, tal como un perro o un gato, preferiblemente un ser humano.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es artritis reumatoide. La artritis reumatoide (RA) se caracteriza por inflamación del tejido sinovial, entrada de leucocitos y angiogénesis, o crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Se cree que la enfermedad se produce como una respuesta inmunológica a un antígeno aún no identificado. La expansión del revestimiento sinovial de las articulaciones en la artritis reumatoide (RA) y la posterior invasión por el pannus del cartílago y hueso subyacentes requieren un aumento en el suministro vascular a la membrana sinovial, para hacer frente al aumento de las necesidades de oxígeno y nutrientes. La angiogénesis ahora se reconoce como un evento clave en la formación y mantenimiento del pannus en la RA (Paleolog, E. M., 2002). Incluso en la RA temprana, algunas de las primeras observaciones histológicas son los vasos sanguíneos. Un infiltrado mononuclear caracteriza el tejido sinovial junto con una vasculatura exuberante. La angiogénesis es parte integral de la formación del pannus inflamatorio y sin angiogénesis; no se pudo producir el ingreso de leucocitos (Koch, A. E., 2000). La interrupción de la formación de nuevos vasos sanguíneos no sólo impediría al administración de nutrientes al sitio inflamatorio, sino que también podría reducir la inflamación de las articulaciones debido a la actividad adicional del VEGF, un potente factor proangiogénico en la RA, como factor de permeabilidad vascular.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis es la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común de demencia en todo el mundo. La AD se caracteriza por un depósito excesivo de amiloide cerebral que conduce a la degeneración de las neuronas y, finalmente, a la demencia. Aún se desconoce la causa exacta de la AD. Estudios epidemiológicos han demostrado que el uso prolongado de antiinflamatorios no esteroides, estatinas, bloqueadores de los receptores H2 de histamina o bloqueadores de los canales de calcio, todos ellos medicamentos cardiovasculares con efectos antiangiogénicos, parecen prevenir enfermedad de Alzheimer y/o influir en el resultado de los pacientes con AD. Por lo tanto, se ha especulado que en la AD la angiogénesis en la vasculatura cerebral puede desempeñar un papel importante en la AD. En la enfermedad de Alzheimer, el endotelio cerebral secreta el sustrato precursor de la placa beta-amiloide y un péptido neurotóxico que mata selectivamente las neuronas corticales. Además, el depósito de amiloide en la vasculatura conduce a la apoptosis de las células endoteliales y a su activación, lo que conduce a la neovascularización. La formación de vasos podría ser bloqueada por el antagonista de VEGF SU 4312, así como por las estatinas, lo que indica que las estrategias antiangiogénesis pueden interferir con la activación de las células endoteliales en la EA (Schultheiss C., et al., 2006; Grammas P., et al., 1999) y puede usarse para prevenir y/o tratar la AD.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es la obesidad. Se ha demostrado que el inhibidor de la angiogénesis, TNP-470, fue capaz de prevenir la obesidad genética e inducida por la dieta en ratones (Ebba Brakenhielm et al., Circulation Research, 2004, 94:1579). TNP-470 redujo la vascularización en el tejido adiposo, inhibiendo así la tasa de crecimiento del tejido adiposo y el desarrollo de la obesidad.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis es endometriosis. La angiogénesis endometrial excesiva se propone como un mecanismo importante en la patogénesis de la endometriosis (Healy, DL., et al., 1998). El endometrio de pacientes con endometriosis muestra una mayor proliferación de células endoteliales.

Además, hay una expresión elevada de la molécula de adhesión celular integrina $\alpha_3\beta_1$ en más vasos sanguíneos en el endometrio de mujeres con endometriosis en comparación con mujeres normales. Se pueden utilizar estrategias que inhiben la angiogénesis para tratar la endometriosis.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). La IBD es un grupo de afecciones inflamatorias del colon y el intestino delgado. Los principales tipos de IBD son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es un tipo de IBD, por ejemplo, la enfermedad de Crohn. Varios estudios han demostrado alteraciones en la anatomía y fisiología vascular en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), lo que indica un aspecto angiogénico de la enfermedad (ver, por ejemplo, *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Jun;12(6):515-23. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA y *World J Gastroenterol.* 2011 Feb 7;17(5):578-93. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS.). Se cree que la inflamación en la IBD depende al menos parcialmente de la angiogénesis (ver, por ejemplo, *Gastroenterology.* 2006 Jun;130(7):2060-73. La angiogénesis como componente novedoso de la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, Pola R, Rutella S, Willis J, Gasbani A, Fiocchi C). Se demostró que los pacientes con enfermedad de Crohn activa a los que se les administró infliximab (un agente anti-TNF- α) tuvieron remisión clínica, lo que se asoció con una reducción significativa de la densidad microvascular (*Am J Gastroenterol.* 2011 Abr;106(4):762-70. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. Rutella S, Fiorino G, Vetrano S, Correale C, Spinelli A, Pagano N, Arena V, Maggiano N, Repici A, Malesci A, Danese S). Los científicos que realizaron el estudio propusieron que el tratamiento con infliximab mejoraba la angiogénesis provocada por la inflamación en la mucosa intestinal y contribuía a la eficacia terapéutica del bloqueo del TNF- α . También se ha demostrado que los compuestos antiangiogénicos son eficaces en el tratamiento de modelos animales de IBD (ver, por ejemplo, Publicación de patente de EE. UU. 20090312243). Por consiguiente, se pueden usar estrategias que inhiben la angiogénesis para tratar la IBD. Los métodos descritos en el presente documento se pueden aplicar a una variedad de cánceres (por ejemplo, cualquier carcinoma o sarcoma). Por ejemplo, papiloma/carcinoma, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, teratoma, adenoma/adenocarcinoma, melanoma, fibroma, lipoma, leiomioma, rhabdomioma, mesotelioma, angioma, osteoma, condroma, glioma, linfoma/leucemia, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, carcinomas indiferenciados de células grandes, carcinoma de células basales, carcinoma indiferenciado sinonasal, sarcoma de tejido blando tal como sarcoma alveolar de partes blandas, angiosarcoma, dermatofibrosarcoma, tumor desmóide, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, síndrome de Kaposi sarcoma, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rhabdomiomasarcoma, sarcoma sinovial y tumor de Askin, sarcoma de Ewing (tumor neuroectodérmico primitivo), hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma y condrosarcoma, que se encuentran en el ano, vejiga, conducto biliar, hueso, cerebro, mama, cuello uterino, colon/recto, endometrio, esófago, ojo, vesícula biliar, cabeza y cuello, hígado, riñón, laringe, pulmón, mediastino (pecho), boca, ovarios, páncreas, pene, próstata, piel, intestino delgado, estómago, médula espinal, coxis, testículos, tiroides y útero.

En algunas realizaciones, el método para tratar el cáncer o inhibir o prevenir la metástasis se realiza inmediatamente después de la detección del cáncer. Tal como se utiliza en el presente documento, la rapidez se refiere a cualquier momento dentro de un mes después de que los resultados positivos de las pruebas de laboratorio confirmen la presencia de células cancerosas. El diagnóstico y la detección de células cancerosas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las pruebas de laboratorio pueden ser en forma de histología y/o biomarcadores que se conocen en la técnica pero no se limitan a estos ejemplos. Algunas pruebas de laboratorio incluyen pruebas de biomarcadores de cáncer tal como el antígeno canceroso (CA) 15-3, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y HER-2 para el cáncer de mama, las oncoproteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV) para el cáncer de cuello uterino, la alfafetoproteína (AFP), fracciones de AFP L3, P4/5 y la banda +II, y ecografía para carcinoma hepatocelular (HCC), antígeno prostático específico (PSA) para cáncer de próstata y CA-125 sérico para ovario y HCC. La biopsia de tejido y la histología generalmente se realizan para confirmar y tipificar el tejido del tipo de célula cancerosa original.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis de cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende el polipéptido o quimérico polipéptido o ácido nucleico descrito en el presente documento). Al sujeto se le puede diagnosticar un tumor benigno o maligno. La composición farmacéutica se puede administrar para inhibir el establecimiento de un tumor secundario a partir del tumor benigno o maligno inicialmente descubierto.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral (por ejemplo, tumor primario o secundario) en un sujeto diagnosticado con un tumor, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. Al sujeto se le puede diagnosticar un tumor benigno o maligno.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, tal como un perro o un gato, preferiblemente un ser humano, al que previamente se le ha diagnosticado cáncer. El cáncer puede ser benigno o maligno y puede haber metastatizado o no. Como se usa en el presente documento, individuo y sujeto se usan indistintamente.

- En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para inhibir la recurrencia del cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento. Al sujeto se le puede diagnosticar un cáncer benigno o maligno. La composición farmacéutica se puede administrar para inhibir el nuevo crecimiento del tumor primario, el desarrollo de tumores no relacionados con el tumor primario y/o el establecimiento de tumores secundarios a partir del tumor benigno o maligno inicialmente descubierto.
- En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para reducir la probabilidad de desarrollo de cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se puede administrar para prevenir el desarrollo de cáncer, el desarrollo de metástasis y/o el desarrollo de malignidad. Por ejemplo, para un sujeto que está predispuesto o en riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, antecedentes familiares de cáncer de colon-rectal de aparición temprana, exposición previa a la hepatitis B o C, o el sujeto porta algunas mutaciones genéticas que están asociadas con ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, BRCA1 y BRCA2), la composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar al sujeto para inhibir el desarrollo del cáncer en este sujeto. Para un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor benigno, el tumor benigno se puede extirpar mediante cirugía. La composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar al sujeto para inhibir que cualquier célula tumoral benigna existente restante se convierta en un cáncer maligno, así como para inhibir el desarrollo de metástasis. Para un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor maligno, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar al sujeto para inhibir el tumor maligno de metástasis adicionales.
- Por consiguiente, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para reducir la probabilidad de desarrollo de tumor en un sujeto con riesgo de desarrollar tumor o cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento.
- En otra realización, la divulgación proporciona un método para reducir la probabilidad del desarrollo de un tumor maligno en un sujeto previamente diagnosticado con un tumor o cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento.
- En otra realización, la divulgación proporciona un método para reducir la probabilidad de metástasis de cáncer en un sujeto previamente diagnosticado con cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento.
- En algunas realizaciones, la administración descrita en el presente documento se realiza junto con un agente de reactivación de p53.
- En algunas realizaciones, la administración descrita en el presente documento se realiza junto con quimioterapia, radioterapia y/o un agente citostático.
- En algunas realizaciones, la administración descrita en el presente documento es junto con un agente anti-VEGF o un factor anti-angiogénesis.
- Por consiguiente, en el presente documento se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento para tratar de ese modo la enfermedad o trastorno.
- En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para tratar la psoriasis, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento para tratar de ese modo la psoriasis.
- En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método para inhibir la recurrencia de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento para inhibir de ese modo la recurrencia de la enfermedad o trastorno.
- En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método para inhibir la metástasis de cáncer en un sujeto diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento para inhibir de ese modo la metástasis del cáncer.
- En otra realización, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar en combinación con otras opciones de tratamiento disponibles para la enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis. Por ejemplo, los métodos de tratamiento descritos en el presente documento se pueden administrar junto con quimioterapia, radioterapia y/o un agente citostático. Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento se administran

junto con anti-VEGF o factor antiangiogénico y/o agente de reactivación de p53. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen, entre otros, irinotecán (CPT-11); erlotinib; gefitinib (Iressa™); mesilato de imatinib (Gleevec); oxalipatina; antraciclinas: idarrubicina y daunorrubicina; doxorubicina; agentes alquilantes tales como melfalán y clorambucilo; cisplatino, metotrexato y alcaloides como vindesina y vinblastina. Un agente citostático es cualquier agente capaz de inhibir o suprimir el crecimiento y la multiplicación celular. Ejemplos de agentes citostáticos utilizados en el tratamiento del cáncer son paclitaxel, 5-fluorouracilo, 5-fluorouridina, mitomicina-C, doxorubicina y zotarolimus. Otras terapias contra el cáncer incluyen inhibidores de metaloproteinasas de matriz tales como marimastat, antagonistas del factor de crecimiento, inhibidores de la transducción de señales e inhibidores de la proteína quinasa C.

Otra opción de tratamiento disponible para la enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis es la inmunoterapia y/o las vacunas contra el cáncer. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden utilizar en combinación con dichas opciones de tratamiento.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran junto con un agente anti-VEGF. Algunos ejemplos de agentes anti-VEGF incluyen bevacizumab (Avastin™), trampa VEGF, CP-547,632, AG13736, AG28262, SU5416, SU11248, SU6668, ZD-6474, ZD4190, CEP-7055, PKC 412, AEE788, AZD-2171, sorafenib, vatalanib, pegaptanib octasodio, IM862, DC101, an gjozima, Sirna-027, caplostatina, neovastat, ranibizumab, talidomida y AGA-1470, un análogo sintético de fumagilina (nombres alternativos: Amebacilin, Fugillin, Fumadil B, Fumadil) (AG Scientific, catálogo #F1028), un compuesto angioinhibidor secretado por *Aspergillus fumiga*.

Tal como se utiliza en el presente documento el término "agente anti-VEGF" se refiere a cualquier compuesto o agente que produce un efecto directo sobre las vías de señalización que promueven el crecimiento, la proliferación y la supervivencia de una célula mediante la inhibición de la función de la proteína VEGF, incluyendo la inhibición de la función de proteínas receptoras de VEGF. El término "agente" o "compuesto" como se usa en el presente documento significa cualquier molécula orgánica o inorgánica, incluyendo ácidos nucleicos modificados y no modificados tales como ácidos nucleicos antisentido, agentes de ARNi tales como ARNip o ARNsh, péptidos, peptidomiméticos, receptores, ligandos y anticuerpos. Los inhibidores de VEGF preferidos incluyen, por ejemplo, AVASTIN® (bevacizumab), un anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc. de South San Francisco, CA, VEGF Trap (Regeneron/Aventis). Los inhibidores de VEGF adicionales incluyen CP-547,632 (3-(4-Bromo-2,6-difluoro-benciloxi)-5-[3-(4-pirrolidin 1-il-butil)-ureido]-isotiazol-4-amida del ácido carboxílico. clorhidrato; Pfizer Inc., NY), AG13736, AG28262 (Pfizer Inc.), SU5416, SU11248 y SU6668 (anteriormente Sugem Inc., ahora Pfizer, Nueva York, Nueva York), ZD-6474 (AstraZeneca), ZD4190 que inhibe VEGF-R2 y -R1 (AstraZeneca), CEP-7055 (Cephalon Inc., Frazer, PA), PKC 412 (Novartis), AEE788 (Novartis), AZD-2171), NEXAVAR® (BAY 43-9006, sorafenib; Bayer Pharmaceuticals y Onyx Pharmaceuticals), vatalanib (también conocido como PTK-787, ZK-222584; Novartis y Schering: AG), MACUGEN® (pegaptanib octasodio, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (glufanida disódica, Cytran Inc. de Kirkland, Washington, EE. UU.), anticuerpo monoclonal selectivo para VEGFR2 DC101 (ImClone Systems, Inc.), angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme (Boulder, Colorado) y Chiron (Emeryville, California), Sima-027 (un inhibidor de VEGFR1 basado en ARNip, Sirna Therapeutics, San Francisco, CA) Caplostatina, ectodominios solubles de los receptores de VEGF, Neovastat (Aeterna Zentaris Inc; Ciudad de Quebec, CA) y combinaciones de los mismos.

Los factores o terapias antiangiogénesis incluyen cualquier agente que inhiba, prevenga y detenga directa o indirectamente la angiogénesis y/o la neovascularización. Los factores antiangiogénesis incluyen el agente anti-VEGF. Otros factores antiangiogénesis incluyen, entre otros, angiostatina, endostatina y antitrombina III escindida, antiplasmina alfa-2 (fragmento), angiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina III antiangiogénica, inhibidor derivado del cartilago (CDI), fragmento del complemento CD59, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), fragmento de fibronectina, gro-beta (una quimiocina C-X-C), heparinasas, fragmento de hexasacárido de heparina, gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón alfa/beta/gamma, proteína inducible por interferón (IP-10), interleucina-12, kringle 5 (fragmento de plasminógeno), beta-tromboglobulina, EGF (fragmento), inhibidor de VEGF, endostatina, fibronectina (fragmento de 45 kD), cininógeno de alto peso molecular (dominio 5), fragmentos NK1, NK2, NK3 de HGF, PF-4, inhibidor de la serpinina proteinasa 8, TGF-beta-1, p53, angioarrestina, inhibidores de metaloproteinasas (TIMP), 2-metoxiestradiol, inhibidor de la ribonucleasa placentaria, inhibidor del activador del plasminógeno, fragmento de prolactina de 16 kD, proteína relacionada con la proliferina (PRP), retinoides, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) tetrahidrocortisol-S, pamidronato talidomida, TNP470, la familia de los bifosfonatos tal como el aminobisfosfonato del ácido zoledrónico. Antagonistas del péptido liberador de bombesina/gastrina (GRP) tales como RC-3095 y RC-3940-II (Bajo1 AM, et al., British Journal of Cancer (2004) 90, 245-252), terapias con anticuerpos monoclonales dirigidas contra factores de crecimiento proangiogénicos específicos y/o sus receptores: y/o sus receptores: ejemplo: bevacizumab (AVASTIN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX™) y trastuzumab (HERCEPTIN®); inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) de molécula pequeña de múltiples receptores del factor de crecimiento proangiogénico. Los tres TKI que actualmente están aprobados como terapias contra el cáncer son erlotinib (TARCEVA®), sorafenib (NEXAVAR®), y sunitinib (SUTENT®); e inhibidores de mTOR (objetivo de la rapamicina en mamíferos) tales como temsirolimus (TORICEL™) bortezomib (VELCADE®), talidomida (THALOMID®) y doxiciclina.

Los métodos para determinar la actividad anti-VEGF y/o la actividad antiangiogénesis son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de fosforilación de células endoteliales de la vena umbilical humana y

el ensayo de proliferación inducida por VEGF como se describe por Holash et al., 2002, en Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 99:11393-98, se puede utilizar para determinar la actividad inhibidora anti-VEGF de un agente anti-VEGF.

El VEGF₁₆₅ humano puede utilizarse como control positivo en los ensayos de fosforilación y proliferación celular. El ensayo de fosforilación celular detecta la fosforilación de tirosina, que es un indicador de la activación de la vía de señalización del VEGF. El ensayo de proliferación celular detecta la proliferación inducida por la activación de la vía de señalización de VEGF. Un agente anti-VEGF que bloquea la activación de la vía de señalización de VEGF dará como resultado una fosforilación de tirosina reducida y una proliferación celular reducida en estos ensayos en comparación con los resultados cuando el VEGF₁₆₅ humano se utiliza como control positivo.

En otra realización más, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran junto con un agente de reactivación de p53. Aproximadamente la mitad de todos los tumores humanos portan mutaciones de p53, en su mayoría mutaciones puntuales que anulan la actividad de transactivación y unión al ADN específica de p53. La mutación p53 se asocia con una respuesta terapéutica y un pronóstico deficientes. Los tumores que portan p53 de tipo silvestre a menudo tienen otras alteraciones en la vía de p53 que eliminan la respuesta de supresión tumoral de p53. Se han diseñado varias estrategias para restaurar la función de p53 en tumores humanos, incluyendo la terapia génica de p53, la reactivación de p53 mutante y la activación de p53 de tipo silvestre mediante la inhibición del MDM2 antagonista de p53. En todos los casos, el objetivo es eliminar el tumor mediante la inducción de apoptosis masiva (Bykov VJ y Wiman KG. 2003).

Un agente de reactivación de p53 es cualquier compuesto químico orgánico o inorgánico, incluyendo proteínas y moléculas de ácido nucleico, que puede restaurar la respuesta de p53 de una célula tumoral. El agente de reactivación de p53 puede ser un agente de terapia génica, tal como un vector, que porta un gen de p53 de tipo silvestre para su reconstitución en células tumorales con deleciones en el gen p53, es decir, introducción de una copia de ADNc intacta del gen p53 usando un vector viral adecuado, típicamente uno basado en adenovirus (Adp53) (Wiman, 2006) o ADVEXIN (Introgen Inc.). El resultado final es tener una expresión funcional de la proteína p53 en las células tumorales. El p53 funcional realizará las actividades de supresión de tumores que son bien conocidas en la técnica.

Algunas células cancerosas portan el gen p53 de tipo silvestre y deberían expresar la proteína p53 teóricamente funcional, pero el crecimiento del tumor no está regulado por la p53 expresada (Gurova, et al., 2004). Se especula que p53 está de alguna manera desactivado. Una observación frecuente en los tumores portadores del gen p53 de tipo silvestre es la sobreexpresión de MDM2. Se ha demostrado que la desactivación de p53 es el resultado de la ubiquitinación de p53 mediada por MDM2 y la desregulación de HDM-2, que se une a p53 y lo dirige a la degradación proteasomal. Se ha demostrado que la desactivación de p53 también está mediada por la supresión de la actividad de NF- κ B, ya que se demostró que la actividad supresora de tumores de p53 se restablecía mediante la expresión ectópica de un superrepresor de I κ B tal como la 9-aminoacridina (9AA), sus derivados y el medicamento contra la malaria quinacrina (Gurova, et al., 2004). Los agentes de reactivación de P53 que activan p53 bloqueando las interacciones proteína-proteína p53/MDM2 y p53/HDM-2 para prevenir la degradación de p53 son inhibidores de MDM-2 e inhibidores de HDM-2. Algunos ejemplos incluyen un grupo de compuestos de imidazolina denominados Nutlins (Vassilev LT et al., 2004) que encajan perfectamente en el pequeño bolsillo donde MDM-2 hace contacto con p53 y evitan la interacción entre las dos proteínas.

Las proteínas p53 mutantes tienen mutaciones puntuales que anulan la actividad de transactivación y unión al ADN específica de p53. Estos p53 mutantes a menudo se pliegan de manera anormal y, por lo tanto, pierden la capacidad de regular sus genes objetivo. Nuevas moléculas pequeñas que ayudan a estas proteínas p53 mutantes a plegarse de manera más normal han logrado reactivar la proteína p53 mutante. Ejemplos son los nuevos compuestos RITA (Issaeva N., et al., 2004; Espinoza-Fonseca LM. 2005), los relacionados PRIMA-1 y MIRA-1 (Rehman, A. 2005) y CP-31398 (Tanner S y Barberis A., 2004; Ho CK y Li G., 2005). Para tumores con mutaciones en p53 que suprimen la actividad de unión al ADN en p53, un agente de reactivación de p53 puede ser uno que facilite la unión al ADN del p53 mutante, permitiendo así que el p53 mutante funcione nuevamente como un activador de la transcripción. Un ejemplo de dicho agente de reactivación de p53 se describe en Roth, J. et al., 2003, donde una proteína adaptadora quimérica hecha de las porciones de unión al ADN y de tetramerización del homólogo de p53 p73 (es decir, que tiene efectos supresores de tumores) fusionadas al dominio de oligomerización de p53 permite que el p53 mutante se una a sus respectivos elementos de respuesta de p53 e inicie la apoptosis. Además, también se contemplan medicamentos que imitan los efectos de p53 en la activación de la transcripción genética. Además, también se pueden usar agentes que aumentan la producción, expresión y/o estabilidad de p73, el homólogo de p53, en combinación con los métodos descritos en el presente documento. El aumento de la producción, expresión y/o estabilidad de p73 en células tumorales sirve para promover la apoptosis.

En el presente documento se describen métodos para analizar los efectos de un polipéptido descrito en el presente documento sobre la expresión de Tsp-1 y p53. Brevemente, se aplica una Psap de control junto con un polipéptido de prueba a un cultivo celular de fibroblastos de próstata. Los medios condicionados de células PC3M-LN4 (LN4) y PC3 se utilizan como controles, con PC3 como control positivo/estimulante y LN4 como controles negativos/inhibidores. Después de un período de incubación (-16 h), las células se recogen, se lavan y se lisan. Los lisados se analizan para determinar el nivel de expresión de Tsp-1 y p53 mediante análisis de transferencia Western, con β -actina como control interno de carga de proteína del lisado.

En otra realización más, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran junto con terapias, fisioterapia y/o psicoterapia conductual utilizadas en el tratamiento de la artritis reumatoide, la obesidad, la endometriosis y la enfermedad de Alzheimer.

Como ejemplos de tratamientos de la artritis reumatoide, existen medicamentos terapéuticos que disminuyen el dolor y la inflamación local, incluyendo la aspirina y los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos o AINE (tal como el ibuprofeno o el naproxeno) y otros medicamentos inmunosupresores que disminuyen el dolor y la inflamación al mismo tiempo que disminuyen el crecimiento de tejido sinovial anormal (el tejido que recubre el interior de la articulación). Estos medicamentos incluyen metotrexato y dosis bajas de corticosteroides (tal como prednisona o cortisona). Otros medicamentos utilizados para tratar la artritis reumatoide incluyen: medicamentos contra la malaria (tal como hidroxiquina), oro, sulfasalazina, penicilamina, ciclofosfamida, ciclosporina, minociclina y antagonistas del receptor de interleucina y anticuerpos anti-IL2.

El tratamiento para la enfermedad de Alzheimer incluye, entre otros, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), estrógeno, esteroides como prednisona, vitamina E, menantina, donepezilo, rivastigmina, tacrina y galantamina. La medicina holística incluye ejemplos tales como los extractos de nueces de ginkgo.

El tratamiento de la endometriosis incluye, entre otros, una combinación de anticonceptivos orales (estrógeno más una progestina), progestinas (tales como medroxiprogesterona, danazol (una hormona sintética relacionada con la testosterona), agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (agonistas de GnRH, tales como buserelina, goserelina, leuprolida y nafarelina) y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) para el control del dolor.

Ejemplos de opciones de tratamiento para la obesidad incluyen asesoramiento dietético y nutricional, régimen de ejercicio, cirugía de bypass gástrico y medicamentos tal como una combinación de fenfluramina y fentermina (a menudo llamada fen-phen), orlistat, sibutramina, fentermina, benzofetamina, dietilpropión, mazindol, y fendimetrazina.

Generación de péptidos funcionales

Los polipéptidos funcionales descritos en el presente documento se pueden sintetizar y aislar químicamente mediante métodos bioquímicos que son bien conocidos en la técnica, tales como la síntesis de péptidos en fase sólida usando el grupo protector t-Boc (tert-butiloxycarbonilo) o FMOC (9-fluorenilmetoxycarbonilo) descrito en "Peptide synthesis and applications" en Methods in molecular biology Vol. 298, Ed. por John Howl y "Chemistry of Peptide Synthesis" por N. Leo Benoiton, 2005, CRC Press, (ISBN-13: 978-1574444544) y "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins" por P. Lloyd-Williams, et al., 1997, CRC-Press, (ISBN-13: 978-0849391422). Solid phase peptide synthesis, developed by R. B. Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85 (14): 2149-2154, supuso un gran avance que permitió la síntesis química de péptidos y pequeñas proteínas. Se utiliza un soporte polimérico insoluble (resina) para anclar la cadena peptídica a medida que se une cada alfa-aminoácido adicional. Este soporte polimérico está construido con partículas de 20-50 µm de diámetro que son químicamente inertes a los reactivos y disolventes utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida. Estas partículas se hinchan mucho en disolventes, lo que hace que los brazos enlazadores sean más accesibles.

Los enlazadores orgánicos unidos al soporte polimérico activan los sitios de resina y fortalecen el enlace entre el aminoácido y el soporte polimérico. Se ha descubierto que los enlazadores de clorometilo, que se desarrollaron primero, no son satisfactorios para péptidos más largos debido a una disminución en el rendimiento de los pasos. La resina PAM (fenilacetamidometilo), debido al poder de extracción de electrones del grupo amida ácida del anillo de fenileno, proporciona un enlace mucho más estable que la resina clásica. Otra resina alternativa para péptidos en condiciones típicas de síntesis de péptidos es la resina Wang. Esta resina se utiliza generalmente con el grupo protector lábil FMOC.

Un grupo lábil protege el grupo alfa-amino del aminoácido. Este grupo debe eliminarse fácilmente después de cada reacción de acoplamiento para poder añadir el siguiente aminoácido protegido con alfa-amino. Los grupos protectores lábiles típicos incluyen t-Boc y FMOC t-Boc es un grupo lábil muy satisfactorio que es estable a temperatura ambiente y se elimina fácilmente con soluciones diluidas de ácido trifluoroacético (TFA) y diclorometano. FMOC es un grupo protector básico lábil que se elimina fácilmente mediante soluciones concentradas de aminas (generalmente 20-55% de piperidina en N-metilpirrolidona). Cuando se utilizan alfa-aminoácidos FMOC, se desea una resina lábil a los ácidos (o estable a las bases), tal como una resina de éter.

El grupo bloqueante estable protege el grupo funcional reactivo de un aminoácido y previene la formación de cadenas secundarias complicadas. Este grupo bloqueador debe permanecer unido durante toda la síntesis y puede eliminarse una vez completada la síntesis. Al elegir un grupo bloqueador estable, se debe considerar el grupo protector lábil y el procedimiento de escisión que se utilizará.

Después de la generación del péptido sintético unido a la resina, se eliminan los grupos bloqueantes estables y el péptido se escinde de la resina para producir un péptido "libre". En general, los grupos bloqueadores estables y los enlazadores orgánicos son lábiles frente a ácidos fuertes tal como el TFA. Después de que el péptido se escinde de la resina, la resina se elimina por lavado y el péptido se extrae con éter para eliminar materiales no deseados tales como los eliminadores utilizados en la reacción de escisión. Luego el péptido se congela y liofiliza para producir el

péptido sólido. Luego se caracteriza por HPLC y MALDI antes de utilizarse. Además, el péptido debe purificarse mediante HPLC hasta obtener una pureza mayor antes de su uso.

Hay máquinas sintetizadoras de péptidos comerciales disponibles para la síntesis de péptidos en fase sólida. Por ejemplo, el sintetizador de péptidos múltiples Advanced Chemtech modelo 396 y un sintetizador de péptidos Applied Biosystems modelo 432A. Hay empresas comerciales que fabrican péptidos sintéticos personalizados por encargo, por ejemplo, Abbiotec, Abgent, AnaSpec Global Peptide Services, LLC., INVITROGEN™ y rPeptide, LLC.

Síntesis de proteínas polipeptídicas

Los polipéptidos y polipéptidos de fusión descritos en el presente documento se pueden sintetizar y aislar mediante métodos moleculares que son bien conocidos en la técnica. Generalmente se utilizan métodos de biología molecular y sistemas de expresión de proteínas heterólogas recombinantes. Por ejemplo, la proteína recombinante puede expresarse en células de bacterias, mamíferos, insectos, levaduras o plantas. En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento son polipéptidos aislados. En algunas realizaciones, los polipéptidos aislados son polipéptidos purificados.

En algunas realizaciones, los polipéptidos y/o polipéptidos de fusión se producen a partir de fragmentos de las moléculas de prosaposina de longitud completa. Un ejemplo de expresión, aislamiento y purificación de la prosaposina humana se describe en Gopalakrishnan, MM, et al., 2004 y en Patente de EE.UU. No. 5,700,909. La purificación de prosaposina de rata se describe en Morales, CR., 1998. Un experto en la técnica puede aplicar el enfoque a la purificación de proteínas Psap humanas.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y/o polipéptidos de fusión descritos en el presente documento pueden introducirse en células huésped (opcionalmente en forma de vectores) para permitir la expresión de los polipéptidos codificados. Alternativamente, pueden usarse sistemas de expresión libres de células. Utilizando un sistema de expresión apropiado, los polipéptidos se pueden producir en la forma deseada. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser producidos por microorganismos tales como bacterias o levaduras, por células de insectos cultivadas (que pueden estar infectadas por baculovirus), por células de mamíferos (tales como células CHO) o por animales transgénicos que, por ejemplo, secretan los polipéptidos en la leche (ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO88/00239). Cuando se desea la glicosilación, se prefieren los sistemas de expresión eucarióticos (por ejemplo, mamíferos o insectos).

Los polipéptidos producidos y los polipéptidos de fusión deben conservar la actividad estimulante de la expresión de TSP-1 y también pueden conservar la actividad estimulante de la expresión de p53. La verificación de que esta actividad se conserva se puede realizar después de la síntesis/purificación. Tal como se utiliza en el presente documento, la actividad estimulante de la expresión de Tsp-1 y p53 se refiere a la capacidad de inducir un aumento en los niveles de expresión de Tsp-1 y p53 en el estroma tumoral circundante o en las células de fibroblastos. La actividad retenida también puede incluir efectos sobre células tumorales y no tumorales observadas con prosaposina y fragmentos activos de la misma. La detección de tales actividades se ejemplifica en el presente documento. El profesional experto puede idear otros métodos de detección de esta actividad.

En la divulgación se incluye un vector que porta un ADNc que codifica los polipéptidos o polipéptidos de fusión descritos en el presente documento. Se pueden usar técnicas de clonación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales para generar la secuencia de ADNc completa, usando, por ejemplo, los cebadores de PCR que flanquean la región codificante de los polipéptidos descritos en el presente documento en la correspondiente prosaposina de longitud completa.

Se pueden diseñar cebadores específicos para que correspondan a la región codificante deseada del ADNc de prosaposina. Los ADNc se pueden clonar en un vector de clonación de uso general tal como los vectores pUC19, pBR322, pBluescript (Stratagene Inc.) o PCR TOPO® de Invitrogen Inc. Por ejemplo, el ADNc se puede subclonar en el vector pDNR-dual. El vector recombinante resultante que porta la secuencia de ADNc puede usarse luego para manipulaciones biológicas moleculares adicionales tales como mutagénesis dirigida al sitio para generar las sustituciones de aminoácidos deseadas. Los productos de ácido nucleico finales se pueden subclonar en vectores de expresión de proteínas o vectores virales para la síntesis de proteínas en una variedad de sistemas de expresión de proteínas usando células huésped seleccionadas del grupo que consiste en líneas celulares de mamíferos, líneas celulares de insectos, levaduras y células vegetales. En el siguiente ejemplo, Cre recombinasa para mover el ADNc al pCMVneo para su expresión.

Ejemplos de otros vectores de expresión y células huésped son los vectores pET (Novagen), vectores pGEX (Amersham Pharmacia) y vectores pMAL (New England labs. Inc.) para la expresión de proteínas en células huésped de E. coli tales como BL21, BL21(DE3) y AD494(DE3)pLysS, Rosetta (DE3) y Origami(DE3) (Novagen); los fuertes vectores pcDNA3.1 (Invitrogen) y pCIneo (Promega) basados en el promotor de CMV para la expresión en líneas celulares de mamíferos como CHO, COS, HEK-293, Jurkat y MCF-7; vectores de vectores adenovirales incompetentes para la replicación pAdeno X, pAd5F35, pLP-Adeno-X-CMV (Clontech), pAd/CMV/V5-DEST, vector pAd-DEST (Invitrogen) para la transferencia y expresión de genes mediada por adenovirus en células de mamíferos; Vectores de retrovirus pLNCX2, pLXSN y pLAPSN para usar con sistema Retro-X™ de Clontech para la transferencia y expresión

de genes mediada por retrovirus en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión de genes mediada por lentivirus en células de mamíferos; vectores de expresión de virus asociados a adenovirus tales como pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP y vector pAAV-RC (Stratagene) para la transferencia y expresión de genes mediada por virus adenoasociados en células de mamíferos; baculovirus BACpak6 (Clontech) y pFastBac™ HT (Invitrogen) para la expresión en líneas celulares de insectos *Spodopera frugiperda* 9 (Sf9) y Sf11; pMT/BiP/V5-His (Invitrogen) para la expresión en células S2 de *Drosophila Schneider*; Vectores de expresión de Pichia pPICZa, pPICZ, pFLDa y pFLD (Invitrogen) para expresión en Pichia pastoris y vectores pMETa y pMET para expresión en P. Metanolica; Vectores pYES2/GS y pYD1 (Invitrogen) para expresión en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los avances recientes en la expresión a gran escala de proteínas heterólogas en Chlamydomonas reinhardtii son descritos por Griesbeck C. et al., 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33 and Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5. Se insertan secuencias codificantes heterólogas extrañas en el genoma del núcleo, cloroplasto y mitocondrias mediante recombinación homóloga. El vector de expresión de cloroplasto p64 que lleva el marcador seleccionable de cloroplasto más versátil aminoglucósido adenil transferasa (aadA), que confiere resistencia a espectinomicina o estreptomycin, se puede utilizar para expresar proteínas extrañas en el cloroplasto. Se utiliza el método de pistola de genes biolísticos para introducir el vector en las algas. Al entrar en los cloroplastos, el ADN extraño se libera de las partículas del arma genética y se integra en el genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga.

Puede usarse mutagénesis dirigida a un sitio específico de la secuencia de ADNc de Psap apropiada en un vector para crear sustituciones de aminoácidos específicas descritas en el presente documento. La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo utilizando kit QUIKCHANGE® de mutagénesis dirigida al sitio de Stratagene de acuerdo con las instrucciones del fabricante o cualquier método conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento vectores de expresión que transportan el ADNc que codifica el polipéptido descrito en el presente documento para la expresión y purificación del polipéptido recombinante producido a partir de un sistema de expresión de proteínas eucariotas usando células huésped seleccionadas del grupo que consiste en mamíferos, insectos, levaduras o células vegetales.

En los métodos descritos en el presente documento se contemplan específicamente proteínas de fusión. Por ejemplo, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden fusionarse con transferrina, IgG o albúmina, por nombrar algunos, para mejorar la vida media en suero y la farmacocinética en el individuo que está siendo tratado. Los polipéptidos también se pueden fusionar a una proteína etiqueta tal como residuos de histidina en tándem (6xHis), GST, myc, tioredoxina primers 105 aminoácidos o etiqueta HA para la purificación y/o mejorar la solubilidad de la proteína recombinante expresada en un sistema heterólogo. La digestión enzimática con serina proteasas tal como trombina y enteroquinasa escinde y libera el polipéptido de la histidina o etiqueta myc, liberando el polipéptido recombinante de la resina de afinidad mientras que las etiquetas de histidina y myc se dejan unidas a la resina de afinidad.

Se presenta un sistema simplificado para generar adenovirus recombinantes por He TC. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95:2509-2514, 1998. El gen de interés se clona primero en un vector lanzadera, por ejemplo, pAdTrack-CMV. El plásmido resultante se linealiza mediante digestión con endonucleasa de restricción Pme I y posteriormente se cotransforma en E. coli. Células BJ5183 con un plásmido principal adenoviral, por ejemplo, pAdEasy-1 del sistema de vectores adenovirales AdEasy™ de Stratagene. Los vectores de adenovirus recombinantes se seleccionan por su resistencia a la kanamicina y la recombinación se confirma mediante análisis de endonucleasas de restricción. Finalmente, el plásmido recombinante linealizado se transfecta en líneas celulares empaquetadoras de adenovirus, por ejemplo células HEK 293 (células de riñón embrionarias humanas transformadas con E1) o 911 (células de retina embrionarias humanas transformadas con E1) (Human Gene Therapy 7:215-222, 1996). Los adenovirus recombinantes se generan dentro de las células HEK 293.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un lentivirus recombinante para la administración y expresión de un polipéptido en células de mamíferos en división o no en división. El lentivirus basado en VIH-1 puede transducir eficazmente una gama de huéspedes más amplia que los sistemas retrovirales basados en el Virus de la Leucemia de Moloney (MoMLV). La preparación del lentivirus recombinante se puede lograr utilizando los vectores pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ o pLenti junto con los sistemas de expresión lentiviral ViraPower™ de Invitrogen.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para la expresión de un polipéptido. En algunas realizaciones, el vector rAAV que codifica un polipéptido de la presente divulgación se administra para retardar, inhibir o prevenir el crecimiento de cáncer y tumores tales como glioma. Utilizando vectores rAAV, los genes se pueden administrar a una amplia gama de células huésped, incluidas muchas líneas celulares o tejidos humanos y no humanos diferentes. Debido a que el AAV no es patógeno y no provoca una respuesta inmune, una multitud de estudios preclínicos han informado excelentes perfiles de seguridad. Los rAAV son capaces de transducir una amplia gama de tipos de células y la transducción no depende de la división activa de la célula huésped. Títulos altos, $> 10^8$ partículas virales/ml, se obtienen fácilmente en el sobrenadante y 10^{11} - 10^{12} partículas virales/ml se pueden obtener con mayor concentración. El transgén se integra en el genoma del huésped, por lo que la expresión es estable y a largo plazo.

El uso de serotipos de AAV alternativos distintos del AAV-2 (Davidson et al (2000), PNAS 97(7)3428-32; Passini et al (2003), J. Virol 77(12):7034-40) ha demostrado diferentes tropismos celulares y mayores capacidades de transducción. Con respecto a los cánceres de cerebro, el desarrollo de nuevas técnicas de inyección en el cerebro, específicamente la administración mejorada por convección (CED; Bobo et al (1994), PNAS 91(6):2076-80; Nguyen et al (2001), Neuroreport 12(9):1961-4), ha mejorado significativamente la capacidad de transducir grandes áreas del cerebro con un vector AAV.

La preparación a gran escala de vectores AAV se realiza mediante una cotransfección de tres plásmidos de una línea celular empaquetadora: Vector AAV que lleva la secuencia codificante de ADN Psap, vector AAV RC que contiene genes rep y cap de AAV, y plásmido auxiliar de adenovirus pDF6, en placas de 50 × 150 mm de células 293 subconfluentes. Las células se recolectan tres días después de la transfección y los virus se liberan mediante tres ciclos de congelación y descongelación o mediante sonicación.

A continuación, los vectores de AAV se aíslan mediante dos métodos diferentes dependiendo del serotipo del vector. El vector AAV2 se aísla mediante el método de purificación en columna de flujo por gravedad de un solo paso en función de su afinidad por la heparina (Auricchio, A., et al., 2001, Human Gene therapy 12:71-6; Summerford, C. y R. Samulski, 1998, J. Virol. 72:1438-45; Summerford, C. y R. Samulski, 1999, Nat. Med. 5: 587-88). Los vectores AAV2/1 y AAV2/5 se aíslan actualmente mediante tres gradientes secuenciales de CsCl.

Composiciones terapéuticas y administración

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o polipéptido de fusión o ácido nucleico (por ejemplo, en un vector de expresión) descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende el ingrediente activo en forma de un virus de terapia génica (por ejemplo, en forma de adenovirus, virus adenoasociado o lentivirus).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a la formulación del agente activo (por ejemplo, polipéptido, polipéptido de fusión o ácido nucleico, etc. descrito en el presente documento) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además agentes adicionales (por ejemplo, para administración específica, vida media creciente u otros agentes terapéuticos). La composición farmacéutica no incluye medios de cultivo de tejidos ni suero.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, auxiliar de fabricación líquido o sólido (por ejemplo, lubricante, talco, magnesio, estearato de calcio o zinc, o ácido estérico), o material encapsulante de disolvente, involucrado en llevar o transportar el ingrediente agente activo desde un sitio (por ejemplo, el sitio de administración) del cuerpo, a otro sitio (por ejemplo, órgano, tejido o porción del cuerpo). Un vehículo farmacéuticamente aceptable es "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el tejido del paciente (por ejemplo, fisiológicamente compatible, estéril, pH fisiológico, etc.). Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de carga, tales como polipéptidos y aminoácidos; (23) componentes séricos, tales como albúmina sérica, HDL y LDL; (22) alcoholes C2-C12, tales como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. En la formulación también pueden estar presentes agentes humectantes, agentes colorantes, agentes desmoldeantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los términos tales como "excipiente", "vehículo", "vehículo farmacéuticamente aceptable" o similares se usan indistintamente en el presente documento.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la composición farmacéutica comprende una pluralidad de polipéptidos descritos en el presente documento, en donde los polipéptidos no son idénticos.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la composición farmacéutica comprende un multímero de polipéptidos descritos en el presente documento, en donde los péptidos son idénticos. Los polipéptidos pueden estar enlazados de forma concatamérica.

Cuando se usa en terapia, la composición farmacéutica de la divulgación se puede administrar en cualquier vehículo conveniente que sea fisiológicamente aceptable. La vía de administración administrará una cantidad eficaz de la

composición terapéutica a un sitio de angiogénesis potencialmente dañina. Las vías de administración apropiadas las determina el profesional experto.

Los compuestos se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluyendo la administración sistémica, tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición. En cada caso, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica para inhibir la progresión, o la recaída o recurrencia de la enfermedad o trastorno. El polipéptido o los ácidos nucleicos generalmente se combinan con un vehículo, cuya forma dependerá de la naturaleza del modo de administración y de las formas de dosificación. Las formas de dosificación típicas incluyen tabletas, polvos, preparaciones líquidas que incluyen suspensiones, emulsiones y soluciones, gránulos, cápsulas y supositorios, así como preparaciones líquidas para inyecciones.

La administración de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se realiza para administrar el ingrediente activo en la ubicación deseada en el cuerpo de un sujeto (por ejemplo, un lugar donde se espera que la inhibición de la angiogénesis sea beneficiosa según la enfermedad o trastorno específico). Dicha administración puede ser local o sistémica, o una combinación de las mismas, cuya forma óptima la determinará el profesional experto. En algunas realizaciones, la administración administra el ingrediente activo de la composición farmacéutica a uno o más sitios objetivo en el sujeto de manera que el ingrediente activo entre en contacto con las células (por ejemplo, células tumorales o células estromales circundantes) del sitio objetivo. En algunas realizaciones, la administración es un método que administra el ingrediente activo a un tumor de un sujeto. En algunas realizaciones, la administración es al exterior que rodea las células del tumor. En algunas realizaciones, la administración es al estroma que rodea el tumor. En algunas realizaciones, la administración es a una combinación de sitios que involucran un tumor (por ejemplo, el propio tumor combinado con el estroma que rodea al tumor y/o sitios potenciales de metástasis). Otros sitios objetivo útiles son sitios o sitios potenciales de metástasis en el sujeto. En algunas realizaciones, el sitio objetivo es el estroma tisular (por ejemplo, que rodea un tumor o en un sitio potencial de metástasis). En algunas realizaciones, la administración es tal que el ingrediente activo entra en contacto con las células de fibroblastos en el sitio objetivo.

La administración local puede realizarse mediante cualquier método conocido para administrar local y específicamente la composición en la región deseada, tal como tópico (por ejemplo, externo) o intratumoral, etc.). La administración sistémica puede realizarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica.

La vía de administración puede ser intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.), subcutánea (S.C.), intradérmica (I.D.), intraperitoneal (I.P.), intratecal (.I.T.), intrapleuraleal, intrauterina, rectal, vaginal, tópica, intratumoral, oral y similares. Los compuestos de la divulgación se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo y se pueden administrar por medios peristálticos.

La administración puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, se pueden usar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede realizarse, por ejemplo, mediante pulverizadores nasales o mediante supositorios. Para la administración oral, los compuestos de la divulgación se formulan en formas de administración oral convencionales tales como cápsulas, tabletas y tónicos.

Para enfermedades o trastornos que son accesibles externamente en la piel, tales como hemangiomas dérmicos y lesiones de cáncer de piel (melanoma), las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden aplicar tópicamente al hemangioma o sitio de la lesión cancerosa en una cantidad terapéuticamente eficaz, en forma de composiciones farmacéuticas tópicas. Tales composiciones incluyen soluciones, suspensiones, lociones, geles, cremas, ungüentos, emulsiones, parches para la piel, etc. Todas estas formas de dosificación, junto con los métodos para su preparación, son bien conocidas en la técnica farmacéutica y cosmética. HARRY'S COSMETICOLOGY (Chemical Publishing, 7th ed. 1982); REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., 18th ed. 1990). Normalmente, dichas formulaciones tópicas contienen el ingrediente activo en un intervalo de concentración de 0.1 a 100 mg/ml, en mezcla con vehículos adecuados. Para los virus de terapia génica, la dosis oscila de 10^6 a 10^{14} partícula por aplicación. Otros ingredientes deseables para usar en dichas preparaciones incluyen conservantes, codisolventes, agentes formadores de viscosidad, vehículos, etc. El propio vehículo o un componente disuelto en el vehículo puede tener propiedades paliativas o terapéuticas propias, incluyendo propiedades hidratantes, limpiadoras o antiinflamatorias/antipicazón. Los potenciadores de la penetración pueden ser, por ejemplo, agentes tensioactivos; ciertos disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido y otros sulfóxidos, dimetilacetamida y pirrolidona; ciertas amidas de aminas heterocíclicas, glicoles (por ejemplo, propilenglicol); carbonato de propileno; ácido oleico; alquilaminas y derivados; diversos agentes tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros; y similares.

Para la administración tópica, la composición farmacéutica se puede formular en forma de pomadas, ungüentos, geles o cremas, como se conoce generalmente en la técnica. La administración tópica puede utilizar sistemas de administración transdérmica bien conocidos en la técnica. Un ejemplo es un parche dérmico. Alternativamente, se puede utilizar el método de administración de pistola de genes biológicos. La pistola genética es un dispositivo para inyectar información genética a las células, diseñado originalmente para la transformación de plantas. La carga útil es

una partícula elemental de un metal pesado recubierta con ADN plasmídico. Esta técnica a menudo se denomina simplemente biolística. Otro instrumento que utiliza tecnología biolística es el sistema de administración de partículas PDS-1000/He. La composición descrita en el presente documento se puede recubrir sobre diminutas partículas de oro, y estas partículas recubiertas se "disparan" en tejidos biológicos tales como hemangiomas y melanoma bajo alta presión. Se describe un ejemplo de método basado en pistola genética para la vacunación de ganado basada en ADN mediante Loehr B. I. et al., J. Virol. 2000, 74:6077-86.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar directamente mediante inyección intratumoral. Si los tumores sólidos y los hemangiomas son accesibles mediante inyección, la composición farmacéutica se puede administrar mediante inyección directamente a la masa tumoral. La formulación preferida también es solución salina estéril o solución de Ringer lactato. La solución de Ringer lactato es una solución isotónica con la sangre y está destinada a la administración intravenosa.

En el tratamiento y prevención de la retinopatía diabética y la degeneración macular húmeda, la composición farmacéutica de la presente divulgación se puede aplicar al ojo mediante inyección intravital o intraocular. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una solución de colirio para aplicación directa en los ojos.

Además de la terapia tópica, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también se pueden administrar sistémicamente. Las vías sistémicas incluyen, entre otras, oral, parenteral, inhalación nasal, intratraqueal, intratecal, intracraneal e intrarrectal. La composición farmacéutica es un líquido, preferiblemente en solución salina estéril, solución de Ringer lactato o solución de Hank. Además, la composición farmacéutica puede estar en formas sólidas y volver a disolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen las formas liofilizadas.

Para aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación aceptable, incluyendo aquellas que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarterial, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. La composición farmacéutica se puede infundir aguas arriba del sitio de las células cuya actividad se va a modular. Bombas de medicamentos implantables, como por ejemplo bombas INFUSAID® (Infusaid, Inc.) son útiles para la administración intraarterial de liberación retardada. Una realización preferida es la inyección intramuscular de vectores virales de AAV.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también se administran adecuadamente por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos tanto locales como sistémicos. Se espera que la vía intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores de ovario. Para estos usos, pueden requerirse preferiblemente preparaciones farmacéuticas convencionales adicionales tales como tabletas, gránulos, polvos, cápsulas y aerosoles. En tales formulaciones también pueden ser necesarios otros aditivos convencionales tales como agentes aglutinantes, agentes humectantes, propulsores, lubricantes y estabilizadores.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento toma la forma de una formulación de liposomas catiónicos como los descritos para el tratamiento de terapia génica intratraqueal del tratamiento temprano del cáncer de pulmón (Zou Y. et al., Cancer Gene Ther. 2000, 7(5):683-96). Las formulaciones de liposomas son especialmente adecuadas para uso en aerosol en pacientes con cáncer de pulmón. La composición farmacéutica puede estar contenida dentro de una partícula o vesícula lipídica, tal como un liposoma o microcristal, que también es adecuada para administración parenteral. Las partículas pueden ser de cualquier estructura adecuada, tal como unilaminar o plurilaminar, siempre que contengan composiciones. El ADN vectorial y/o el virus pueden quedar atrapados en 'partículas de lípidos plásmidos estabilizados' (SPLP) que contienen el lípido fusogénico dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), niveles bajos (5-10 % en moles) de lípido catiónico y estabilizados con un recubrimiento de polietilenglicol (PEG) (Zhang Y. P. et al., Gene Ther. 1999, 6:1438-47). Los lípidos cargados positivamente tales como metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio o "DOTAP" son particularmente preferidos para tales partículas y vesículas. La preparación de tales partículas lipídicas es bien conocida. Ver, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 4,880,635; 4,906,477; 4,911,928; 4,917,951; 4,920,016; y 4,921,757. También se pueden utilizar otros componentes de vehículo basados en lípidos no tóxicos para facilitar la absorción de un vector por la célula. Otras técnicas para formular vectores de expresión y virus como terapéuticos se encuentran en "DNA-Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA Vaccination and Immunotherapy" por Martin Schleef (Editor) December 2005, Wiley Publisher, y "Plasmids for Therapy and Vaccination" por Martin Schleef (Editor) Can 2001. En algunas realizaciones, la dosis para vectores virales es 10^6 a 1×10^{14} partículas de vectores virales por aplicación por paciente.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos, o las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, sales biliares y derivados del ácido fusídico para administración transmucosa. Además, se pueden utilizar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de aerosoles nasales, por ejemplo, así como formulaciones adecuadas para la administración por inhalación o supositorios. Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden

tomar la forma de administración oral convencional así como formas de administración oral de liberación retardada tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

La vía de administración, la forma de dosificación y la cantidad eficaz varían de acuerdo con la potencia de las composiciones farmacéuticas, sus características fisicoquímicas y de acuerdo con el lugar de tratamiento. La selección de la dosis adecuada está dentro de la capacidad de un médico experto habitual. Las formulaciones tópicas se pueden administrar hasta cuatro veces al día.

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación se administran convencionalmente como una dosis unitaria, por ejemplo. El término "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición farmacéutica de la presente divulgación se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, transportista o vehículo.

Las composiciones farmacéuticas se administran de una manera compatible con la formulación posológica y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar y el momento dependen del sujeto que se va a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo que deben administrarse dependen del criterio del médico y son peculiares de cada individuo.

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa y polietilenglicol. Los vehículos para formas tópicas o en gel de proteínas Psap incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa o metilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera para madera. Para todas las administraciones, se utilizan adecuadamente formas de depósito convencionales. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, apósitos, formas para inhalación, pulverizadores nasales, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación sostenida. Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida, ver Patente de EE.UU. No. 3,773,919 y 3,887,699, EP 58,481A y EP 158,277A, Patente Canadiense No. 1176565, U. Sidman et al., Biopolymers 22:547 (1983) y R. Langer et al., Chem. Tech. 12:98 (1982). Los ingredientes activos normalmente se formularán en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a 100 mg/ml y un vector de expresión debe estar en el intervalo de 10^6 a 1×10^{14} partículas de vectores virales por aplicación por paciente.

En algunas realizaciones, se pueden agregar otros ingredientes a las composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento, tales como antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; y alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0.2 micrómetros). Alternativamente, se pueden usar conservantes para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Son bien conocidos diversos conservantes e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Los ingredientes activos y/o las composiciones farmacéuticas normalmente se almacenarán en forma liofilizada o como una solución acuosa si es altamente estable a la desnaturalización térmica y oxidativa. El pH de las preparaciones normalmente será de aproximadamente 6 a 8, aunque en ciertos casos también pueden apropiarse valores de pH más altos o más bajos.

La concentración localizada o cantidad administrada a un sujeto se puede determinar empíricamente y dependerá del propósito de la administración, el área que se va a tratar, la eficacia de la composición y la forma de administración. La concentración localizada en el sitio de las células objetivo estará deseablemente en el intervalo de aproximadamente 0.05 a 50 μ M, o más particularmente de 0.2 a 5 μ M, aunque se pueden emplear dosificaciones mayores o menores según sea apropiado. Para la administración a un sujeto tal como un ser humano, normalmente se puede emplear una dosificación de aproximadamente 0.01, 0.1 o 1 mg/kg hasta 50, 100 o 150 mg/kg o más.

Aplicaciones de tratamiento de los péptidos y polipéptidos de fusión y ácidos nucleicos y métodos de diagnóstico, pronóstico y teranósticos relacionados con los niveles de Psap

Otros aspectos de la divulgación se relacionan con métodos de pronóstico y teranósticos. En un aspecto, se proporcionan métodos para determinar si es probable que un sujeto que tiene cáncer responda al tratamiento con una composición farmacéutica descrita en el presente documento, por ejemplo, porque el tratamiento con la composición farmacéutica dará como resultado un efecto clínico deseado, tal como la regresión del tumor, retraso de la progresión

tumoral o inhibición de la formación de tumores, inhibición de la angiogénesis, inhibición de la metástasis o inhibición de la recurrencia tumoral.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un método de evaluación teranóstica en un individuo diagnosticado con cáncer que comprende realizar una evaluación de pronóstico basada en los niveles de Psap en la muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo, en donde un nivel de Psap inferior al 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 % o 50 % de un nivel de Psap de referencia indica que el individuo es probable que responda al tratamiento con una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende determinar los niveles de Psap en la muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo y comparar los niveles de Psap con un nivel de Psap de referencia. En algunas realizaciones, determinar los niveles de Psap comprende medir los niveles de Psap usando un ensayo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende además determinar que es probable que el individuo responda al tratamiento con una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un método para tratar a un individuo diagnosticado con cáncer que comprende realizar una evaluación de pronóstico basada en los niveles de Psap en una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo" y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento si el nivel de Psap es inferior al 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, o 50% de un nivel de Psap de referencia. En algunos casos, el método comprende determinar los niveles de Psap en la muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo y comparar los niveles de Psap con un nivel de Psap de referencia. En algunas realizaciones, determinar los niveles de Psap comprende medir los niveles de Psap usando un ensayo descrito en el presente documento.

Un nivel de referencia de Psap es, por ejemplo, el obtenido a partir de una muestra de control de células sanas no tumorales en el mismo tipo de tejido u tipo de órgano del que se extirpó una muestra de tumor. El nivel de Psap de referencia está normalizado al 100%.

En algunas realizaciones, el nivel de Psap de referencia es el promedio de los niveles de Psap obtenidos de una población de individuos sanos y el nivel de Psap de referencia se normaliza al 100 %.

En algunas realizaciones, el nivel promedio de Psap de una población de individuos sanos es para un tipo de tejido o tipo de órgano específico, por ejemplo, el hígado o los pulmones. Por ejemplo, el nivel medio de Psap se obtiene a partir de los niveles de Psap hepáticos de una población de individuos sanos. El nivel de Psap de referencia está normalizado al 100%.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pronóstico" pretende abarcar predicciones y análisis de probabilidad de la progresión de la enfermedad, en particular la recurrencia tumoral, la diseminación metastásica y la recaída de la enfermedad. Los métodos de pronóstico de la divulgación están destinados a usarse clínicamente en la toma de decisiones relativas a las modalidades de tratamiento, incluyendo la intervención terapéutica, los criterios de diagnóstico tales como la estadificación de la enfermedad y el seguimiento y vigilancia de la enfermedad para detectar metástasis o recurrencia de una enfermedad neoplásica.

En algunas realizaciones, el método para la evaluación del pronóstico se lleva a cabo en muestras de tejido extraídas de un sujeto en un procedimiento quirúrgico, por ejemplo, en una biopsia. Preferiblemente, el método se lleva a cabo usando muestras de tumores de pacientes con cáncer humano, o muestras de pacientes humanos que se sospecha que tienen cáncer o que tienen crecimiento o lesiones anormales. Los expertos en la técnica conocen varios métodos de recolección de una muestra de tejido e incluyen, por ejemplo, aspiración con aguja fina, aspiración con aguja central guiada por imágenes, liposucción, microdissección por captura láser y aspiración con aguja central guiada por ultrasonido, por nombrar algunos. Preferiblemente, las muestras se conservan, por ejemplo, en parafina y se preparan para análisis histológico e inmunohistoquímico. Alternativamente, las muestras se pueden preparar para otros métodos de determinación y cuantificación de niveles de expresión de proteínas que son bien conocidos en la técnica. Las muestras de tejidos a menudo se disuelven en reactivo TRIZOL™ para prevenir la degradación y preservar la integridad de los ácidos nucleicos y proteínas. Luego se pueden extraer y aislar moléculas de ácido nucleico de la muestra disuelta TRIZOL™ usando cualquiera de varios procedimientos, que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el enfoque más común es la precipitación de ácidos nucleicos con sales alcohólicas.

En algunas realizaciones, al individuo se le diagnostica un tumor benigno o maligno. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para determinar si un tumor o cáncer es metastásico o benigno, por ejemplo, la medición de biomarcadores tales como la bomba de metaloproteinasa-1 (Patente de EE.UU. No. 5,726,015), CA125, o CEA.

En algunas realizaciones, no es necesario que la muestra obtenida del individuo sea una muestra de tumor. En algunas realizaciones, la muestra obtenida del individuo es una muestra de tejido de biopsia o una muestra de fluido tal como una muestra de sangre.

En algunas realizaciones, el método de evaluación del pronóstico descrito en el presente documento no se limita a los análisis de Psap. También se contemplan análisis de los niveles de c-Myc y Tsp-1. También se contempla que los

niveles de una variedad de factores de crecimiento angiogénicos e inhibidores de la angiogénesis son relevantes para el pronóstico, y los expertos en la técnica conocen métodos para evaluarlos.

En otra realización, el tratamiento se administra junto con quimioterapia, radioterapia, un agente citostático, un agente anti-VEGF, un factor antiangiogénesis y/o un agente de reactivación de p53.

- 5 En otro aspecto, se proporcionan métodos de pronóstico para determinar si es probable que un sujeto que tiene un cáncer tenga progresión de la enfermedad, particularmente recurrencia del tumor, diseminación metastásica y/o recaída de la enfermedad. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un método para realizar una evaluación de pronóstico basada en los niveles de Psap en una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo, en donde un nivel de Psap un nivel de
- 10 Psap inferior a un nivel de referencia indica un mal pronóstico (es decir, es probable que el sujeto tenga progresión de la enfermedad, particularmente recurrencia del tumor, diseminación metastásica y/o recaída de la enfermedad). En algunas realizaciones, el método comprende determinar los niveles de Psap en la muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo y comparar los niveles de Psap con un nivel de Psap de referencia. En algunas realizaciones, determinar los niveles de Psap comprende medir los niveles de Psap usando
- 15 un ensayo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende además identificar o diagnosticar que un sujeto tiene un mal pronóstico (es decir, es probable que el sujeto tenga progresión de la enfermedad, particularmente recurrencia tumoral, diseminación metastásica y/o recaída de la enfermedad) con base en los niveles de Psap.

- 20 En algunas realizaciones, el método para diagnosticar metástasis en un individuo diagnosticado con cáncer comprende determinar el nivel de expresión de Psap en una muestra obtenida de un individuo diagnosticado con cáncer, en donde cuando el nivel de Psap en la muestra es igual o menor que un nivel de Psap de referencia, existe una mayor probabilidad de metástasis de cáncer y/o recurrencia de enfermedad neoplásica y, por tanto, un mal pronóstico. La muestra puede ser sangre, preferiblemente plaquetas, suero o plasma. Los métodos para recoger y aislar plaquetas, suero o plasma son bien conocidos en la técnica. El nivel de Psap de referencia es el nivel promedio
- 25 de Psap en las plaquetas, suero o plasma correspondientes de individuos sanos normales a los que no se les ha diagnosticado ningún cáncer. Los niveles de Psap de referencia están normalizados al 100%. Los niveles de Psap en las plaquetas, suero o plasma de pacientes que tienen cáncer no metastásico son más altos que los niveles de Psap de referencia, por ejemplo, al menos 5% más altos. Por otro lado, los niveles de Psap en plaquetas, suero o plasma de pacientes con cáncer metastásico tienden a ser comparables, e incluso pueden ser inferiores a los niveles de Psap de referencia. Por lo tanto, cuando una muestra obtenida de un individuo recientemente diagnosticado con cáncer
- 30 tiene un nivel de Psap en plasma ligeramente inferior en comparación con el nivel de Psap de referencia, existe una mayor probabilidad de que el cáncer del individuo ya haya hecho metástasis.

- 35 En algunas realizaciones, el método para la evaluación de pronóstico de un individuo diagnosticado con cáncer comprende determinar el nivel de expresión de Psap en una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor y/o estroma tumoral y/o sangre) obtenida del individuo diagnosticado con cáncer, en donde cuando el nivel de Psap en la muestra de tumor es inferior a un nivel de Psap de referencia, existe una mayor probabilidad de metástasis de cáncer y/o recurrencia de enfermedad neoplásica y, por tanto, un mal pronóstico.

- 40 En algunas realizaciones, el método para la evaluación de pronóstico en un individuo diagnosticado con cáncer comprende: (a) determinar el nivel de expresión de Psap en una muestra obtenida de un individuo diagnosticado con cáncer en un primer momento; (b) determinar el nivel de expresión de Psap en una muestra obtenida de un individuo diagnosticado con cáncer en un segundo momento, estando el primer momento antes del segundo momento; y (c) comparar los niveles de Psap de los puntos temporales con un nivel de Psap de referencia; en donde cuando el nivel de Psap en el segundo momento llega a ser inferior al nivel de Psap de referencia, es probable que el cáncer haya hecho metástasis.

- 45 En algunas realizaciones, la muestra es sangre, plaquetas, suero o plasma.

- 50 En algunas realizaciones, el método descrito en el presente documento hace una predicción sobre la probabilidad de metástasis del cáncer, recurrencia y recaída de la enfermedad neoplásica en un sujeto diagnosticado con cáncer comparando el nivel de Psap en el tumor con un nivel de referencia de Psap. Un nivel de referencia de Psap puede ser el obtenido de una muestra de control de células sanas no tumorales en el mismo tipo de tejido u tipo de órgano del que se extirpó una muestra de tumor. El nivel de Psap de referencia está normalizado al 100%. Un nivel inferior de Psap determinado en una muestra en comparación con un nivel de Psap de referencia es aproximadamente del 95 % al 0 % del nivel de Psap de referencia, incluyendo todos los porcentajes entre 95 % y 0 %, es decir, aproximadamente 95 %, 90 %, 80 %, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% a 0% del nivel de Psap de referencia. Por ejemplo, si el pronóstico es de cáncer de mama en una mujer, el nivel de Psap de referencia se determina utilizando
- 55 tejido mamario sano de una mujer. Este nivel de Psap mamario de referencia se compara con un nivel de Psap determinado en una muestra de tejido de cáncer de mama. Si la muestra de tejido de cáncer de mama tiene un nivel de Psap del 65 % de un nivel de Psap de referencia encontrado en una muestra de tejido de mama sano, el pronóstico es una mayor probabilidad de metástasis de cáncer y/o recurrencia de enfermedad neoplásica y, por tanto, un mal pronóstico.

En algunas realizaciones, el método para la evaluación pronóstica de un individuo diagnosticado con cáncer comprende además: (a) determinar el nivel de expresión de Psap en el estroma tumoral; y (b) determinar el nivel de expresión de Tsp-1 en el estroma tumoral, en donde cuando los niveles de Psap y Tsp-1 en el estroma tumoral son inferiores a un nivel de Psap de referencia y a un nivel de Tsp-1 de referencia respectivamente, hay una mayor probabilidad de metástasis de cáncer y/o recurrencia de enfermedad neoplásica y, por tanto, un mal pronóstico. El método descrito en el presente documento hace una predicción sobre la probabilidad de metástasis del cáncer, recurrencia y recaída de la enfermedad neoplásica en un sujeto diagnosticado con cáncer comparando los niveles de Psap y Tsp-1 en el estroma del tumor con niveles de referencia de Psap y Tsp-1. Los niveles de referencia de Psap y Tsp-1 son los obtenidos de una muestra de control de células sanas no tumorales en el mismo tipo de tejido u órgano del que se extirpó una muestra de tumor. Los niveles de referencia de Psap y Tsp-1 están normalizados al 100%. Los niveles más bajos de Psap y Tsp-1 en una muestra en comparación con los niveles de Psap y Tsp-1 de referencia son aproximadamente del 95% al 0% del nivel de Psap de referencia, incluyendo todos los porcentajes entre 95% y 0%, es decir, aproximadamente 95%, 90%, 80%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% o 0% de los niveles de Psap o Tsp-1 de referencia. Por ejemplo, si el pronóstico es de cáncer de pulmón en un sujeto masculino, los niveles de referencia de Psap y Tsp-1 se determinan utilizando tejido pulmonar sano de un sujeto masculino. Estos niveles de Psap y Tsp-1 pulmonares de referencia se comparan luego con los niveles de Psap y Tsp-1 determinados en una muestra de tejido de cáncer de pulmón. Si la muestra de tejido de cáncer de pulmón tiene un nivel de Psap del 25 % y un nivel de Tsp-1 del 5 % en comparación con los niveles de referencia respectivos de Psap y Tsp-1 encontrados en tejido pulmonar sano, el pronóstico es una mayor probabilidad de metástasis de cáncer y/o recurrencia de la enfermedad neoplásica y, por tanto, un mal pronóstico. Dado que los tumores altamente metastásicos prácticamente no tienen Tsp-1 y Psap detectables, niveles extremadamente bajos (es decir, aproximadamente 30% - 0% de los niveles de referencia) o cantidades indetectables de Psap y Tsp-1 en la muestra de tejido canceroso indican claramente metástasis de cáncer definitiva y/o recurrencia de la enfermedad neoplásica y, por lo tanto, un mal pronóstico y requeriría un plan de tratamiento agresivo. Sobre la base del pronóstico y los niveles de Tsp-1 y Psap en una muestra de tejido canceroso, un médico experto en la técnica puede diseñar un plan de tratamiento personalizado para un individuo afectado. El plan de tratamiento puede incluir la administración de la composición farmacéutica descrita en el presente documento junto con la extirpación quirúrgica de tumores o tejido con lesiones cancerosas, quimioterapia, radioterapia, un agente citostático, un agente anti-VEGF, un factor antiangiogénesis y/o un agente de reactivación de p53. La administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica aumenta sistémicamente el nivel de Psap y, en consecuencia, el de Tsp-1 y p53 en las células cancerosas, el tejido circundante y los sitios metastásicos potenciales a los que puede dirigirse una célula cancerosa metastásica. Esto puede prevenir futuras metástasis y también el establecimiento de tumores secundarios. La administración se realiza mediante uno o más métodos conocidos en la técnica, determinados por el profesional experto, por ejemplo inyectado intratumoralmente.

En otra realización, el método para monitorizar o vigilar el desarrollo de metástasis en un individuo diagnosticado con cáncer comprende determinar el nivel de expresión de Psap en una muestra obtenida de un individuo en un primer momento, determinar el nivel de expresión de Psap en una muestra obtenida del individuo en un segundo momento, siendo el primer momento anterior al segundo momento; comparar los niveles de Psap de los puntos de tiempo con un nivel de Psap de referencia, en donde cuando los niveles de Psap en el segundo punto de tiempo son más bajos que el nivel de Psap de referencia, por ejemplo, 95% o menos, se considera probable que el cáncer se haya desarrollado en un cáncer metastásico y por lo tanto evidencia un mal pronóstico. La muestra puede ser sangre, preferiblemente plaquetas, suero o plasma. El nivel de Psap de referencia es el nivel promedio de Psap en las plaquetas, suero o plasma correspondientes de individuos sanos normales a los que no se les ha diagnosticado ningún cáncer. Los niveles de Psap de referencia están normalizados al 100%. Los niveles de Psap en plaquetas, suero o plasma de pacientes diagnosticados de cáncer no metastásico son superiores a los niveles de Psap de referencia, al menos 5% más altos. Por otro lado, los niveles de Psap en plaquetas, suero o plasma de pacientes que tienen cáncer metastásico pueden ser iguales y/o inferiores a los niveles de Psap de referencia. El nivel de Psap en la muestra se puede utilizar como biomarcador de la progresión de la enfermedad a la forma metastásica. Por ejemplo, en una paciente a la que recientemente se le ha diagnosticado cáncer de mama. Se encontró y extirpó una única masa tumoral. No había indicios de que el tumor hubiera hecho metástasis. Se recolecta una muestra de su plasma en este diagnóstico inicial y se determina el nivel de Psap en su plasma y se compara con el nivel de Psap de referencia. Durante los próximos años, se pueden realizar muestreos periódicos de su nivel de Psap en plasma, por ejemplo, cada tres meses inicialmente durante los primeros dos años, luego cada seis meses durante los siguientes cinco años si permanece libre de cáncer en los primeros dos años. Estas muestras del nivel de Psap en plasma se pueden comparar con el nivel de Psap de referencia y representar gráficamente a lo largo del tiempo. Cuando hay una caída en su nivel de Psap en plasma en comparación con el nivel de Psap de referencia, al menos 5 %, esto es una indicación de que posiblemente el cáncer ha recurrido y es de forma metastásica. Luego, su médico puede realizar un examen exhaustivo para detectar la recurrencia del cáncer. El método descrito en el presente documento proporciona un método de evaluación del pronóstico en un individuo diagnosticado con cáncer.

Algunos aspectos de esta divulgación proporcionan métodos para determinar o identificar si un sujeto que tiene un cáncer responde al tratamiento con una molécula terapéutica distinta de un polipéptido Psap ("tratamiento sin Psap"), por ejemplo, en ese tratamiento con tratamiento sin Psap da como resultado un efecto clínico deseado, tal como regresión tumoral, retraso de la progresión tumoral o inhibición de la formación de tumores o recurrencia del tumor. En el presente documento se describen moléculas terapéuticas. En consecuencia, la expresión "que responde al

tratamiento con un tratamiento sin Psap" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un sujeto en donde la administración del tratamiento sin Psap tendrá un efecto deseado. Por ejemplo, un sujeto que tiene un cáncer y se identifica que responde al tratamiento con un tratamiento sin Psap, por ejemplo, mediante un método de diagnóstico proporcionado en el presente documento, es un sujeto que se beneficia clínicamente de la administración del tratamiento sin Psap. Por ejemplo, el sujeto puede beneficiarse de la administración de un tratamiento sin Psap en el sentido de que la administración de una cantidad eficaz del tratamiento sin Psap puede dar como resultado una o más de una reversión, una inhibición o un retraso en el desarrollo del tumor, formación de tumores, crecimiento tumoral, vascularización tumoral, angiogénesis tumoral, supervivencia tumoral, progresión tumoral, recurrencia tumoral o metástasis.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos para evaluar si un sujeto responde al tratamiento con un tratamiento sin Psap. En algunas realizaciones, el método comprende determinar un nivel de Psap en una muestra obtenida del sujeto y comparar el nivel de Psap determinado en una muestra obtenida del sujeto con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, si el nivel determinado en una muestra obtenida del sujeto es mayor que el nivel de referencia se identifica que el sujeto responde a un tratamiento sin Psap. En algunas realizaciones, si el nivel determinado en una muestra obtenida del sujeto es igual o inferior al nivel de referencia, se identifica que el sujeto no responde a un tratamiento sin Psap.

Algunos aspectos de esta divulgación proporcionan métodos in vitro para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento con un tratamiento sin Psap. En algunas realizaciones, el método comprende determinar un nivel de Psap en una muestra obtenida del sujeto; y comparar el nivel de Psap determinado en la muestra con un nivel de referencia, en donde si el nivel determinado en la muestra es mayor que el nivel de referencia, se identifica que el sujeto responde al tratamiento con el tratamiento sin Psap; o si el nivel determinado en la muestra es igual o inferior al nivel de referencia, se identifica que el sujeto no responde al tratamiento sin Psap.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de Psap determinado en una muestra (por ejemplo, tejido o sangre) obtenida del sujeto en un momento diferente. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de Psap en una muestra (por ejemplo, tejido o sangre) de un sujeto sano. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de Psap esperado u observado en una muestra obtenida de un sujeto sano, o un nivel agregado o promedio de Psap esperado u observado en muestras de una población de sujetos sanos. Un sujeto sano es un sujeto que no presenta signos ni síntomas de enfermedad y/o un sujeto, cuando lo examina un profesional médico, se identifica que no tiene evidencia de enfermedad.

En algunas realizaciones, el nivel de Psap se determina en una muestra obtenida del sujeto que comprende o se sospecha que comprende células malignas, por ejemplo, células tumorales. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal. En algunas realizaciones, la muestra de tejido comprende tejido tumoral o células tumorales. En algunas realizaciones, el fluido corporal es sangre, plasma, suero, linfa, esputo, líquido cefalorraquídeo u orina.

Muestreo de plasma, suero y plaquetas

La sangre del paciente se puede extraer directamente con anticoagulantes que contienen citrato, EDTA, PGE y teofilina. La sangre completa debe separarse en la porción de plasma, las células y las plaquetas mediante centrifugación refrigerada a 3500 g, 2 minutos. Dado que las plaquetas tienen tendencia a adherirse al vidrio, se prefiere que el tubo de recogida esté siliconado. Después de la centrifugación, el sobrenadante es el plasma. El plasma se filtra a través de un filtro de 0.2 µm para eliminar las plaquetas residuales y se mantiene a -20°C antes de realizar las mediciones.

Alternativamente, el suero se puede extraer de la sangre entera. Recoger la sangre en un tubo de vidrio o plástico duro; la sangre no se coagulará en plástico blando. Extraer 15 ml de sangre total para 6 ml de suero. La sangre entera se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos a 2 horas hasta que se forme un coágulo. Separar con cuidado el coágulo de las paredes del recipiente utilizando una varilla de vidrio o un aplicador de madera y dejarlo toda la noche a 4°C. Después de lo cual, decantar el suero, centrifugar y/o utilizando una pipeta Pasteur, retirar el suero en un tubo limpio. Clarificar el suero por centrifugación a 2000-3000 rpm durante 10 minutos. El suero se almacena a -20° o -80°C y se realiza la medición. La descripción detallada de la obtención de suero utilizando tubos de recolección se puede encontrar en Patente de EE. UU. No. 3,837,376. Los tubos de extracción de sangre también se pueden adquirir en BD Diagnostic Systems, Greiner Bio-One y Kendall Company.

Las plaquetas se pueden separar de la sangre total. Cuando se centrifuga sangre completa como se describe en el presente documento para separar las células sanguíneas del plasma, se forma un sedimento al final de la centrifugación, con el plasma encima. La centrifugación separa los componentes sanguíneos (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) según sus distintas densidades. Los glóbulos rojos (RBCs) son más densos y serán los primeros en pasar al fondo del tubo de recolección/centrifugación, seguidos por los glóbulos blancos más pequeños y finalmente las plaquetas. La fracción de plasma es la menos densa y se encuentra encima del sedimento. La "capa leucocitaria" que contiene la mayoría de las plaquetas se intercalará entre el plasma y encima de los RBCs. La centrifugación de sangre total (con anticoagulante, PGE y teofilina) puede producir una "capa leucocitaria" aislada, rica en plaquetas, que se encuentra justo encima de la boya. La capa "leucocítica" contiene plaquetas concentradas y glóbulos blancos.

Las plaquetas se pueden separar de la sangre de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4,656,035 usando lectina para aglutinar las plaquetas en sangre total. Alternativamente, los métodos y aparatos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 7,223,346 se puede utilizar implicando un dispositivo de recogida de plaquetas que comprende un recipiente separador por rotación centrífugo con una cavidad que tiene una superficie interior longitudinal para recoger la "capa leucocitaria" enriquecida con plaquetas después de la centrifugación. Como otra alternativa, se pueden utilizar los métodos y aparatos descritos en el documento WO/2001/066172.

Las plaquetas se pueden aislar mediante los dos métodos descritos en AL Copley y RB Houlihan, Blood, 1947, 2:170-181. Ambos métodos se basan en el principio de que la capa de plaquetas se puede obtener mediante centrifugación fraccionada repetida.

La sangre completa se puede separar primero en plasma rico en plaquetas y células (glóbulos blancos y rojos). El plasma rico en plaquetas (PRP) se puede aislar a partir de la centrifugación de sangre entera citratada a 200xG durante 20 minutos. Luego, el plasma rico en plaquetas se transfiere a un tubo de polietileno nuevo. Luego, este PRP se centrifuga a 800 X G para sedimentar las plaquetas y el sobrenadante (plasma pobre en plaquetas [PPP]) se puede guardar para su análisis por parte de ELIZA en una etapa posterior. A continuación, las plaquetas pueden resuspenderse suavemente en un tampón tal como el tampón Tyrodes que contiene 1 U/ml de PGE2 y sedimentarse nuevamente mediante centrifugación. El lavado se puede repetir dos veces de esta manera antes de eliminar la fracción de membrana de las plaquetas mediante centrifugación con Triton X y lisar el sedimento de plaquetas para análisis de Psap. Las plaquetas se pueden lisar usando Tris HCL 50 mM, NaCl 100-120 mM, EDTA 5 mM, Igepal al 1% y tableta inhibidora de proteasa (mezcla TM completa, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Para el análisis del ARNm de Psap, el sedimento de plaquetas se puede disolver en TRIZOL® inmediatamente después de la separación del plasma.

Determinación del nivel de expresión midiendo el ARNm

La PCR en tiempo real es una técnica de amplificación que se puede utilizar para determinar los niveles de expresión de ARNm. (Ver, por ejemplo, Gibson et al., Genome Research 6:995-1001, 1996; Heid et al., Genome Research 6:986-994, 1996). La PCR en tiempo real evalúa el nivel de acumulación del producto de la PCR durante la amplificación. Esta técnica permite la evaluación cuantitativa de los niveles de ARNm en múltiples muestras. Para los niveles de ARNm, el ARNm se extrae de una muestra biológica, por ejemplo, un tumor y tejido normal, y se prepara ADNc utilizando técnicas estándar. La PCR en tiempo real se puede realizar, por ejemplo, utilizando un instrumento Prism 7700 de Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, California). Pueden diseñarse cebadores coincidentes y sondas fluorescentes para genes de interés usando, por ejemplo, el programa de expresión de cebadores proporcionado por Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, California). Las concentraciones óptimas de cebadores y sondas pueden ser determinadas inicialmente por aquellos expertos en la técnica, y los cebadores y sondas de control (por ejemplo, beta-actina) pueden obtenerse comercialmente de, por ejemplo, Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, California). Para cuantificar la cantidad del ácido nucleico específico de interés en una muestra, se genera una curva estándar utilizando un control. Se pueden generar curvas estándar utilizando los valores de Ct determinados en la PCR en tiempo real, que están relacionados con la concentración inicial del ácido nucleico de interés utilizado en el ensayo. Diluciones estándar que van desde 10^1 - 10^6 copias del gen de interés generalmente son suficientes. Además, se genera una curva estándar para la secuencia de control. Esto permite la estandarización del contenido inicial del ácido nucleico de interés en una muestra de tejido con respecto a la cantidad de control con fines de comparación.

Los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando sondas TaqMan son bien conocidos en la técnica. Los protocolos detallados para la PCR cuantitativa en tiempo real se pueden encontrar en, por ejemplo, para ARN en Gibson et al., 1996, Genome Res., 10:995-1001 y para el ADN en Heid et al., 1996, Genome Res., 10:986-994.

Los ensayos basados en TaqMan utilizan una sonda de oligonucleótido fluorogénico que contiene un tinte fluorescente en 5' y un agente de apagado en 3'. La sonda se hibrida con un producto de PCR, pero no puede extenderse debido a un agente bloqueante en el extremo 3'. Cuando el producto de la PCR se amplifica en ciclos posteriores, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq, da como resultado la escisión de la sonda TaqMan. Esta escisión separa el colorante fluorescente 5' y el agente de apagado 3', lo que da como resultado un aumento de la fluorescencia en función de la amplificación (ver, por ejemplo, www2.perkin-elmer.com).

En otra realización, la detección de transcritos de ARN se puede lograr mediante transferencia Northern, en donde se procesa una preparación de ARN en un gel de agarosa desnaturante y se transfiere a un soporte adecuado, tal como celulosa activada, nitrocelulosa o membranas de vidrio o nailon. Luego se hibrida ADNc o ARN marcado (por ejemplo, radiomarcado) con la preparación, se lava y se analiza mediante métodos tales como la autorradiografía.

La detección de transcritos de ARN se puede lograr además utilizando métodos de amplificación conocidos. Por ejemplo, está dentro del alcance de la presente divulgación transcribir de forma inversa el ARNm en ADNc seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); o, usar una sola enzima para ambos pasos como se describe en Patente de EE.UU. No. 5,322,770, o transcribir de forma inversa el ARNm en ADNc seguido de una reacción en cadena de lipasa con brecha simétrica (RT-AGLCR) como se describe en R. L. Marshall, et al., PCR Methods and Applications 4: 80-84 (1994). Un método adecuado para detectar transcripciones de ARNm de enzimas se describe en la referencia Pabic et al., Hepatology, 37(5): 1056-1066, 2003,

Otros métodos de amplificación conocidos que se pueden utilizar en el presente documento incluyen, entre otros, la técnica denominada "NASBA" o "3SR" descrita en PNAS EE.UU. 87: 1874-1878 (1990) y también descrito en Nature 350 (No. 6313): 91-92 (1991); Amplificación Q-beta como se describe en publicaciones Solicitud de Patente Europea (EPA) No. 4544610; amplificación por desplazamiento de cadena (como se describe en G. T. Walker et al., Clin. Chem. 42: 9-13 (1996) y Solicitud de Patente Europea No. 684315; y amplificación mediada por objetivos, como se describe en Publicación PCT WO 9322461.

También se puede emplear la visualización de hibridación *in situ*, en donde una sonda de ARN antisentido marcada radiactivamente se hibrida con una sección delgada de una muestra de biopsia, se lava, se escinde con RNasa y se expone a una emulsión sensible para autorradiografía. Las muestras se pueden teñir con hematoxilina para demostrar la composición histológica de la muestra, y la formación de imágenes de campo oscuro con un filtro de luz adecuado muestran la emulsión desarrollada. También se pueden utilizar marcadores no radiactivos como la digoxigenina.

Alternativamente, la expresión de ARNm se puede detectar en un arreglo, chip o microarreglo de ADN. Los oligonucleótidos correspondientes a la enzima se inmovilizan en un chip que luego se hibrida con ácidos nucleicos marcados de una muestra de prueba obtenida de un paciente. La señal de hibridación positiva se obtiene con la muestra que contiene transcritos enzimáticos. Los métodos para preparar arreglos de ADN y su uso son bien conocidos en la técnica. (Ver, por ejemplo Patente de EE. UU. Nos. 6,618,679; 6,379,897; 6,664,377; 6,451,536; 548,257; Solicitud de Patente de EE.UU. No. 20030157485 y Schena et al., 1995 Science 20:467-470; Gerhold et al., 1999 Trends in Biochem. Sci. 24, 168-173; y Lennon et al. 2000 Drug discovery Today 5: 59-65,

También se puede realizar el análisis en serie de la expresión genética (SAGE) (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de EE.UU. 20030215858).

Para controlar los niveles de ARNm, por ejemplo, se extrae ARNm de la muestra de tejido que se va a analizar, se transcribe de forma inversa y se generan sondas de ADNc marcadas con fluorescencia. A continuación, se sondan los microarreglos capaces de hibridarse con el ADNc de la enzima con las sondas de ADNc marcadas, se escanean los portaobjetos y se mide la intensidad de la fluorescencia. Esta intensidad se correlaciona con la intensidad de hibridación y los niveles de expresión.

Los métodos de amplificación "cuantitativa" son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la PCR cuantitativa implica coamplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control utilizando los mismos cebadores. Esto proporciona un estándar interno que se puede utilizar para calibrar la reacción de PCR. Se proporcionan protocolos detallados para la PCR cuantitativa, por ejemplo, en Innis et al., (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.

Determinación del nivel de expresión midiendo la proteína

Los niveles de proteínas Psap y Tsp-1 se pueden medir poniendo en contacto la muestra de tejido con una fracción de unión basado en anticuerpo que se une específicamente a Psap o Tsp-1, o a un fragmento de Psap o Tsp-1. Luego se detecta la formación del complejo anticuerpo-proteína mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica.

El término "fracción de unión basada en anticuerpo" o "anticuerpo" cuando se usa en el presente documento en referencia a un miembro del par de unión específica anticuerpo-antígeno, incluye moléculas de inmunoglobulina y determinantes inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona con) a las proteínas Psap. La expresión "fracción de unión basada en anticuerpo" pretende incluir anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con las proteínas Psap. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales. Por lo tanto, el término incluye segmentos de porciones proteolíticamente escindidas o preparadas recombinantemente de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una determinada proteína. Los ejemplos no limitantes de dichos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, dAbs y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio VL y VH unidos mediante un enlazador peptídico. Los scFv pueden enlazarse covalentemente o no covalentemente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión. Por lo tanto, "fracción de unión basada en anticuerpo" incluye preparaciones policlonales, monoclonales u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. La expresión "fracción de unión basada en anticuerpo" pretende incluir además anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos y moléculas quiméricas que tienen al menos un determinante de unión a antígeno derivado de una molécula de anticuerpo. En una realización preferida, la fracción de unión basada en anticuerpo está marcado de forma detectable.

"Anticuerpo marcado", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que están marcados mediante un medio detectable e incluye, entre otros, anticuerpos que están marcados enzimática, radiactivamente, fluorescente y quimioluminiscente. Los anticuerpos también se pueden marcar con una etiqueta detectable, tal como c-Myc, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5 o HIS. La detección y cuantificación de Psap o Tsp-1 presentes en las muestras de tejido se correlacionan con la intensidad de la señal emitida por el anticuerpo marcado de forma detectable.

En una realización preferida, la fracción de unión basada en anticuerpo se marca de forma detectable enlazando el anticuerpo a una enzima. La enzima, a su vez, cuando se expone a su sustrato, reaccionará con el sustrato de tal manera que produzca una fracción química que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de forma detectable los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, entre otras, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

La detección también se puede lograr usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, al marcar radiactivamente un anticuerpo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de ensayos radioinmunes. El isótopo radiactivo puede detectarse mediante medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante audiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el propósito de la presente divulgación son ^3H , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C , y preferiblemente ^{125}I .

También es posible marcar un anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado con fluorescencia se expone a luz de la longitud de onda adecuada, se puede detectar su presencia gracias a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcado fluorescente más utilizados se encuentran los colorantes CYE, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeriterina, la ficocianina, la aloficocianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina.

Un anticuerpo también puede marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales tales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Un anticuerpo también puede marcarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo quimioluminiscente se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, luciferina, isoluminol, éster de acridinio termomático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Como se mencionó anteriormente, los niveles de proteína enzimática pueden detectarse mediante inmunoensayos, tales como ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA), transferencia Western, inmunocitoquímica o inmunohistoquímica, cada uno de los cuales se describe con más detalle abajo. Generalmente se prefieren los inmunoensayos tales como ELISA o RIA, que pueden ser extremadamente rápidos. También se pueden emplear arreglos de anticuerpos o chips de proteínas, ver por ejemplo Solicitudes de Patente de EE. UU. Nos: 20030013208A1; 20020155493A1; 20030017515 y Patente de EE. UU. Nos: 6,329,209 y 6,365,418.

Inmunoensayos

El inmunoensayo enzimático más común es el "ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA)". ELISA es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno utilizando una forma marcada (por ejemplo, enlazada a enzima) del anticuerpo. Existen diferentes formas de ELISA, que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas estándar conocidas en la técnica para ELISA se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2ª edición, Rose y Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell et al., "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; y Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22:895-904.

En un "intercalado de ELISA", un anticuerpo (por ejemplo, antienzima) se enlaza a una fase sólida (es decir, una placa de microtitulación) y se expone a una muestra biológica que contiene antígeno (por ejemplo, enzima). Luego se lava la fase sólida para eliminar el antígeno no unido. Luego se une un anticuerpo marcado (por ejemplo, enlazado a una enzima) al antígeno unido (si está presente) formando un intercalado de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Ejemplos de enzimas que pueden enlazarse al anticuerpo son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la luciferasa, la ureasa y la B-galactosidasa. El anticuerpo enlazado a enzima reacciona con un sustrato para generar un producto de reacción coloreado que puede medirse.

En un "ELISA competitivo", el anticuerpo se incuba con una muestra que contiene antígeno (es decir, enzima). Luego, la mezcla antígeno-anticuerpo se pone en contacto con una fase sólida (por ejemplo, una placa de microtitulación) que está recubierta con antígeno (es decir, enzima). Cuanto más antígeno esté presente en la muestra, menos anticuerpos libres estarán disponibles para unirse a la fase sólida. Luego se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, enlazado a enzima) a la fase sólida para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido a la fase sólida.

En un "ensayo de inmunohistoquímica", se analiza una sección de tejido en busca de proteínas específicas exponiendo el tejido a anticuerpos que son específicos de la proteína que se está analizando. Luego, los anticuerpos se visualizan mediante cualquiera de varios métodos para determinar la presencia y la cantidad de la proteína presente. Ejemplos de métodos utilizados para visualizar anticuerpos son, por ejemplo, a través de enzimas enlazadas a los anticuerpos

(por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante o beta-galactosidasa) o métodos químicos (por ejemplo, cromágeno de sustrato/DAB). Luego, la muestra se analiza microscópicamente, más preferiblemente mediante microscopía óptica de una muestra teñida con un tinte que se detecta en el espectro visible, utilizando cualquiera de una variedad de tales métodos de tinción y reactivos conocidos por los expertos en la técnica.

Alternativamente, se pueden emplear "Radioinmunoensayos". Un radioinmunoensayo es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno utilizando una forma marcada (por ejemplo, marcada radiactiva o fluorescente) del antígeno. Ejemplos de marcadores radiactivos para antígenos incluyen ³H, ¹⁴C y ¹²⁵I. La concentración de enzima antigénica en una muestra biológica se mide haciendo que el antígeno en la muestra biológica compita con el antígeno marcado (por ejemplo, radiactivamente) para unirse a un anticuerpo contra el antígeno. Para asegurar la unión competitiva entre el antígeno marcado y el antígeno no marcado, el antígeno marcado está presente en una concentración suficiente para saturar los sitios de unión del anticuerpo. Cuanto mayor sea la concentración de antígeno en la muestra, menor será la concentración de antígeno marcado que se unirá al anticuerpo.

En un radioinmunoensayo, para determinar la concentración de antígeno marcado unido a un anticuerpo, el complejo antígeno-anticuerpo debe separarse del antígeno libre. Un método para separar el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre es precipitando el complejo antígeno-anticuerpo con un antisuero antiisotipo. Otro método para separar el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre es precipitar el complejo antígeno-anticuerpo con *S. aureus* muerto con formalina. Otro método más para separar el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre es realizar un "radioinmunoensayo en fase sólida" en donde el anticuerpo se enlaza (por ejemplo, covalentemente) a perlas de Sefarosa, pocillos de poliestireno, pocillos de cloruro de polivinilo o pocillos de microtitulación. Comparando la concentración de antígeno marcado unido al anticuerpo con una curva estándar basada en muestras que tienen una concentración conocida de antígeno, se puede determinar la concentración de antígeno en la muestra biológica.

Un "ensayo inmunoradiométrico" (IRMA) es un inmunoensayo en donde el reactivo de anticuerpo está marcado radiactivamente. Un IRMA requiere la producción de un conjugado de antígeno multivalente; mediante técnicas tales como la conjugación con una proteína, por ejemplo, albúmina sérica de conejo (RSA). El conjugado de antígeno multivalente debe tener al menos 2 residuos de antígeno por molécula y los residuos de antígeno deben estar a una distancia suficiente entre sí para permitir la unión de al menos dos anticuerpos al antígeno. Por ejemplo, en un IRMA el conjugado de antígeno multivalente se puede unir a una superficie sólida como una esfera de plástico. Se añaden un antígeno de "muestra" sin marcar y un anticuerpo contra el antígeno que está marcado radiactivamente a un tubo de ensayo que contiene la esfera recubierta del conjugado de antígeno multivalente. El antígeno de la muestra compete con el conjugado de antígeno multivalente por los sitios de unión del antígeno a anticuerpo. Después de un período de incubación apropiado, los reactivos no unidos se eliminan mediante lavado y se determina la cantidad de radiactividad en la fase sólida. La cantidad de anticuerpo radiactivo unido es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.

Se pueden usar otras técnicas para detectar Psap y Tsp-1 en las muestras de tejido obtenidas en una biopsia, de acuerdo con la preferencia del médico y basándose en la presente divulgación. Una de esas técnicas es la transferencia Western (Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979)), en donde una muestra adecuadamente tratada se procesa en un gel SDS-PAGE antes de transferirse a un soporte sólido, tal como un filtro de nitrocelulosa. Los anticuerpos antienzimáticos detectablemente marcados pueden usarse luego para evaluar los niveles de enzima, donde la intensidad de la señal del marcador detectable corresponde a la cantidad de enzima presente. Los niveles se pueden cuantificar, por ejemplo mediante densitometría.

En algunas realizaciones, Psap y Tsp-1, y/o sus niveles de ARNm en la muestra de tejido se pueden determinar mediante espectrometría de masas tal como MALDI/TOF (tiempo de vuelo), SELDI/TOF, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear o espectrometría de masas en tándem (por ejemplo, MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS, etc.). Ver por ejemplo, Solicitudes de Patente de EE. UU. Nos. 20030199001, 20030134304, y 20030077616.

Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica y se han usado para cuantificar y/o identificar biomoléculas, tales como proteínas (ver, por ejemplo, Li et al., (2000) Tibtech 18:151-160; Rowley et al., (2000) Methods 20: 383-397; y Kuster y Mann (1998) Curr. Opin. Structural Biol. 8: 393-400). Además, se han desarrollado técnicas de espectrometría de masas que permiten al menos una secuenciación parcial de novo de proteínas aisladas. Chait et al., Science 262:89-92 (1993); Keough et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96:7131-6 (1999); revisado en Bergman, EXS 88:133-44 (2000).

En determinadas realizaciones, se utiliza un espectrofotómetro de iones en fase gaseosa. En otras realizaciones, se utiliza espectrometría de masas por desorción/ionización por láser para analizar la muestra. La espectrometría de masas de desorción/ionización por láser moderna ("LDI-MS") se puede practicar en dos variaciones principales: espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz ("MALDI") y desorción/ionización por láser mejorada en superficie ("SELDI"). En MALDI, el analito se mezcla con una solución que contiene una matriz y se coloca una gota del líquido sobre la superficie de un sustrato. La solución de matriz luego cocrystaliza con las moléculas biológicas. El sustrato se inserta en el espectrómetro de masas. La energía láser se dirige a la superficie del sustrato

donde desorbe e ioniza las moléculas biológicas sin fragmentarlas significativamente. Ver, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 5,118,937 y 5,045,694.

En SELDI, la superficie del sustrato se modifica para que sea un participante activo en el proceso de desorción. En una variante, la superficie se derivatiza con adsorbente y/o reactivos de captura que se unen selectivamente a la proteína de interés. En otra variante, la superficie se derivatiza con moléculas absorbentes de energía que no se desorben cuando se golpean con el láser. En otra variante, la superficie se derivatiza con moléculas que se unen a la proteína de interés y que contienen un enlace fotolítico que se rompe al aplicar el láser. En cada uno de estos métodos, el agente derivatizante generalmente se localiza en una ubicación específica en la superficie del sustrato donde se aplica la muestra. Ver, por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 5,719,060 y documento WO 98/59361. Los dos métodos se pueden combinar, por ejemplo, usando una superficie de afinidad SELDI para capturar un analito y añadiendo líquido que contiene una matriz al analito capturado para proporcionar el material absorbente de energía.

Para obtener información adicional sobre espectrómetros de masas, véase, por ejemplo, *Principles of Instrumental Analysis*, 3rd edition., Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; and *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4.sup.th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, Nueva York 1995), pp. 1071-1094.

La detección de la presencia de ARNm o proteína de Psap o Tsp-1 dependerá típicamente de la detección de la intensidad de la señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y el carácter de un polipéptido unido al sustrato. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la intensidad de la señal de los valores máximos de los espectros de una primera muestra y una segunda muestra se puede comparar (por ejemplo, visualmente, mediante análisis por computadora, etc.), para determinar las cantidades relativas de biomoléculas particulares. Se pueden utilizar programas de software tales como el programa Biomarker Wizard (CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, California) para ayudar en el análisis de espectros de masas. Los espectrómetros de masas y sus técnicas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Anticuerpos o antisueros contra las proteínas Psap y Tsp-1

Se pueden usar anticuerpos o antisueros para determinar los niveles de expresión de Psap y Tsp-1. Los anticuerpos para uso en la presente divulgación se pueden obtener de una fuente comercial tal como Novus Biologicals (anti-prosaposina, clon 1D1-C12, catálogo #H00005660-M01), Santa Cruz Biotechnology (anti-saposina B (E-15), catálogo #sc-27014; anti-Tsp-1, clon CSI 002-65, catálogo # sc-59888) y Labvision (anti-Tsp-1, clon Ab-2, catálogo #MS-419-B). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Alternativamente, se pueden generar anticuerpos contra la proteína Psap (acceso a Genbank No. NM_002778) o Tsp-1 (acceso a Genbank No. NM_003246). Los métodos para la producción de anticuerpos enzimáticos se describen en Publicación PCT WO 97/40072 o Solicitud de EE. UU. No. 2002/0182702.

Los anticuerpos para uso en la presente divulgación se pueden producir usando métodos estándar para producir anticuerpos, por ejemplo, mediante producción de anticuerpos monoclonales (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry y Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands (1984); St. Groth et al., *J. Immunology*, (1990) 35: 1-21; y Kozbor et al., *Immunology Today* (1983) 4:72). Los anticuerpos también se pueden obtener fácilmente usando porciones antigénicas de la proteína para seleccionar una biblioteca de anticuerpos, tal como una biblioteca de presentación en fagos, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Patente de EE. UU. No.: 5,702,892 y el documento WO 01/18058 describen bibliotecas de presentación de bacteriófagos y métodos de selección para producir fragmentos del dominio de unión de anticuerpos.

La detección de anticuerpos Psap y Tsp-1 se puede lograr marcando directamente los propios anticuerpos, con marcadores que incluyen un marcador radiactivo tal como ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I o, o ^{131}I , un marcador fluorescente, un marcador de hapteno tal como biotina, o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, el anticuerpo primario no marcado se usa junto con el anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. En algunas realizaciones, el anticuerpo o antisuero primario no está marcado, el antisuero o anticuerpo secundario se conjuga con biotina y se usa estreptavidina enlazada a enzima para producir tinción visible para el análisis histoquímico.

A menos que se indique lo contrario, la presente divulgación se realizó usando procedimientos estándar que son bien conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, en Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU. (1982); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU. (1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York, EE.UU. (1986); *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques* Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, EE.UU. (1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (CPMB) (Fred M. Ausubel, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.); *Current Protocols in Protein Science* (CPPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.); *Current Protocols in Cell Biology* (CPCB) (Juan S. Bonifacio et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005); *YAnimal Cell Culture Methods* (Methods in Cell Biology, Vol 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1ra edición, 1998).

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

5 Las definiciones de términos comunes en biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Genes IX, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew et al., (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

10 Aparte de los ejemplos operativos, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en el presente documento deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se utiliza en relación con porcentajes, puede significar $\pm 1\%$.

15 Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los pesos moleculares o valores de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para descripción. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de esta divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura "por ejemplo" se deriva del latín *exempli gratia*, y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por tanto, la abreviatura "por ejemplo" es sinónimo del término "por ejemplo".

Ejemplos

25 La invención es tal como se define en las reivindicaciones. Cualquiera de los siguientes Ejemplos que no entren dentro del alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente con fines comparativos.

Ejemplo 1: Identificación de polipéptidos derivados de Saposina A con actividad de Saposina A

30 Procedimientos experimentales

Creación de mutantes de truncamiento de prosaposina.

35 Todos los fragmentos codificantes de prosaposina se crearon mediante amplificación por PCR utilizando el cebador 5' común: 5'-ggcggcgctgcacATGTACGCCCTCTTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 30). La región saposinaA se creó utilizando el cebador 3':

ggcgctcttagaAGAGACTCGCAGAGGTTGAG (SEQ ID NO: 31). La región AB de saposina se creó usando el cebador 3': ggcgcctcttagaACCTCATCACAGAACCC (SEQ ID NO: 32). La región ABC de saposina se creó utilizando el cebador 3':

40 ggcgcctcttagaGCCAGAGCAGAGGTGCAGC (SEQ ID NO: 33). Los productos de la PCR se digirieron con Sal1 y Xba1 y se clonaron en pDNR-Dual (Clontech). Luego se clonaron las regiones de saposina en pLP-CMVNeo utilizando el sistema de clonación Creator (Clontech). Se utilizaron constructos de truncamiento de prosaposina para transfectar transitoriamente células PC3M-LN4.

Exploración del péptido Saposina A

45 Se sintetizaron siete péptidos de 20 (21) aminoácidos superpuestos que abarcan la longitud de la saposinaA (Anaspec, Fremont, CA). Las secuencias fueron: 1-20-SLPCDICKDVVTAAGDMLKD (SEQ ID NO: 34), 11-30-VTAAGDMLKD NATEEEILVY (SEQ ID NO: 35), 21-40-NATEEEILVYLEKTCDWLPK (SEQ ID NO: 36), 31-50-LEKTCDWLPKPNMSASCKEI (SEQ ID NO: 37), 41-60-PNMSASCKEIVDSYLPVILD (SEQ ID NO: 38), 51-70-VDSYLPVILDIK GEMSRPG (SEQ ID NO: 39), 61-81-IK GEMSRPGVCSALNLCES (SEQ ID NO: 40). Cinco péptidos analizados posteriormente consistían en los residuos 35-47: CDWLPKPNMSASC (SEQ ID NO: 41), 35-40: CDWLPK (SEQ ID NO: 3), 38-43: LPKPNM (SEQ ID NO: 42), 42-47: NMSASC (SEQ ID NO: 43), 35-39: CDWLP (SEQ ID NO: 29), 35-38: CDWL (SEQ ID NO: 44), 35-37: CDW, 36-39: DWLPK (SEQ ID NO: 4), 37-39: DWLP (SEQ ID NO: 5), 37-40: WLPK (SEQ ID NO: 45), 38-40: LPK. También se ensayaron péptidos pegilados de 35-40 aminoácidos al igual que péptidos con un d-aminoácido sustituido en las posiciones 36 y 38 en un péptido correspondiente a los residuos 36-39 y en las posiciones 37 y 39 en el mismo péptido.

Estos péptidos se usaron para tratar fibroblastos de próstata y pulmón in vitro a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 16 horas en medios especificados por la ATCC suplementados con FBS al 0.1 %. La expresión de Tsp-1 y p53 se

analizó mediante transferencia Western como se describió anteriormente (Kang, Y., et al., (2003) Cancer Cell 3:537-549.)

Análisis de péptidos *in vivo*

- 5 Para el análisis libre de tumores, se trataron ratones C57B16 con 200 μ l de medio PC3M-LN4 solo o en combinación con los péptidos descritos anteriormente a una dosis de 30 mg/kg/día durante 5 días. Después del tratamiento, los animales se sacrificaron y los pulmones se recolectaron, lisaron y analizaron para determinar los niveles de proteína Tsp-1 y p53 como se describió anteriormente (Kang et al).

Tratamiento de tumores

- 10 Tumores de próstata

- 15 A ratones SCID C57B16 se les inyectó 1×10^6 células de cáncer de próstata PC3M-LN4 en la glándula prostática como se describió anteriormente (Kang et al). Después de 26 días, los animales se trataron con PBS o péptidos correspondientes a los residuos 36-40 o 36-39 de saposina A a una dosis de 30 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Después de 16 días de tratamiento, se sacrificaron todos los animales, se pesaron y recogieron los tumores de próstata, junto con los pulmones de los animales. Los tejidos se fijaron en NBF o se lisaron y analizaron para determinar la expresión de Tsp-1 y p53 mediante análisis de transferencia Western.

Melanomas

- 20 A los ratones C57B16 se les inyectó 0.5×10^6 células de melanoma B16-B6 por vía subcutánea. Después de 10 días, los animales se trataron con PBS o con un péptido correspondiente a los residuos 36-39 de saposina A a una dosis de 30 mg/kg/día por vía inyección i.p.. Después de 16 días de tratamiento, se sacrificaron todos los animales, se pesaron y recogieron los tumores de próstata, junto con los pulmones de los animales. Los tejidos se fijaron en NBF o se lisaron y analizaron para determinar la expresión de Tsp-1 y p53 mediante análisis de transferencia Western.

- 25 Metástasis pulmonar

- 30 A los ratones C57B16 se les inyectó 1×10^6 células del carcinoma de pulmón de Lewis a través de la vena de la cola. Después de 10 días, los animales se trataron con PBS o con un péptido correspondiente a los residuos 36-40 de saposina A a una dosis de 30 mg/kg/día por vía inyección i.p.. Después de 16 días de tratamiento, se sacrificaron todos los animales, se pesaron los pulmones y se recogieron. Los tejidos se fijaron en NBF o se lisaron y analizaron para determinar la expresión de Tsp-1 y p53 mediante análisis de transferencia Western.

Resultados

- 35 Se buscó determinar si había un dominio más pequeño dentro de la saposina A que contuviera la actividad estimulante de p53/Tsp-1. Así, se probó la actividad de un péptido ciclado de 13 aminoácidos que abarca los residuos 35-47 y se observó que también era capaz de estimular la expresión de p53 y Tsp-1 en fibroblastos de próstata. A ratones C57B16 (5-6 semanas de edad) se les inyectaron diariamente 300 μ L de DMEM libre de suero, medio condicionado (CM) de células PC3 no metastásicas, CM de células PC3M-LN4 metastásicas y PC3M-LN4 CM más 30 mg/kg del polipéptido pegilado de 6 aminoácidos (PEG2000-CDWLPPK (SEQ ID NO: 46)) o 30 mg/kg del polipéptido pegilado de 18 aminoácidos (PEG2000-EKTCDWLPKPNMSASCKE (SEQ ID NO: 47)). Después de 9 días, los ratones fueron sacrificados y los pulmones e hígados se recogieron y se fijaron en formalina o se lisaron para análisis de transferencia Western. El análisis de transferencia Western, que se muestra en la Figura 1, reveló que los polipéptidos pegilados de 6 y 18 aminoácidos eran tan efectivos o más que los medios condicionados con PC3 para estimular la expresión de Tsp-1 en el pulmón y el hígado de los ratones.

- 45 Luego se probaron tres péptidos de 6 aminoácidos superpuestos de la región de 13 aminoácidos. Finalmente, se probaron péptidos de diversas longitudes dentro de la región 35-40. Se observó que la eliminación de la cisteína en el residuo 35 en realidad aumentaba la capacidad del péptido de 5 aminoácidos resultante para estimular Tsp-1 en los fibroblastos de próstata (Figura 2). También se observó que la eliminación de la lisina en la última posición no afectó la actividad del péptido para estimular Tsp-1 (Figura 2). Finalmente, se determinó la actividad del péptido de 4 aminoácidos (DWLP (SEQ ID NO: 5)) y el péptido de 5 aminoácidos (DWLPK (SEQ ID NO: 4)) para estimular Tsp-1 y p53 en los pulmones de ratones tratados con CM de PC3M-LN4 se probó para simular un entorno tumoral sistémico.

- 50 Habiendo determinado que los péptidos de 4 y 5 aminoácidos retienen la actividad de la proteína prosaposina de longitud completa, se buscó determinar si también tenían actividad *in vivo*. Como tal, los ratones con CM de células PC3M-LN4 se trataron solos o en combinación con los péptidos de 4 y 5 aminoácidos. El análisis de transferencia Western reveló que el tratamiento de ratones con ambos péptidos no solo anuló la capacidad de los medios PC3M-LN4 para reprimir Tsp-1 sino que estimuló la expresión de Tsp-1 y p53 en los pulmones de estos ratones 6 veces por encima de los niveles basales (Figura 3). Luego, cada uno de los 4 aminoácidos se sustituyó con alanina y se observó que todas las sustituciones, excepto la leucina en el residuo 3, inactivaron el péptido para estimular la Tsp-1 en los fibroblastos de pulmón *in vitro* (Figura 4). Luego se realizaron sustituciones conservadoras de aminoácidos y se observó que la sustitución del triptófano en el residuo 2 por tirosina, o la leucina en la posición 3 por valina, aumentaba

ligeramente la actividad del péptido para estimular la expresión de Tsp-1 en fibroblastos de pulmón *in vitro* (Figura 5). Estos resultados indican que la sustitución de tirosina por triptófano o valina por leucina mejora ligeramente la actividad.

Luego se probó la capacidad de los péptidos para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis en tres modelos: el modelo de cáncer de próstata PC3M-LN4, el modelo de melanoma B16-B6 y el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC). Se inyectaron 1×10^6 células PC3M-LN4 por primera vez en la glándula prostática de ratones SCID. Después de 26 días, estos ratones fueron tratados con PBS solo o con el péptido de 4 o 5 aminoácidos a una dosis de 30 mg/kg/día por vía inyección i.p. Los ratones se trataron durante 16 días, después de lo cual se examinó el tamaño de los tumores y la expresión de Tsp-1 y p53 en los tumores primarios y los pulmones de los animales. Los tumores en animales tratados con los péptidos de 4 y 5 aminoácidos eran, en promedio, 45% y 40% del tamaño de los animales de control, respectivamente (Figura 6).

A ratones C57B16 se les inyectó 0.5×10^6 células de la línea celular de melanoma singénico B16-B6. Después de 10 días, los ratones se trataron con PBS o con el péptido de 4 aminoácidos en una dosis de 45 mg/kg/día. Los ratones se trataron durante 14 días, después de lo cual los animales se sacrificaron y los tumores primarios y los pulmones se analizaron para determinar la expresión de Tsp-1 y p53. Los tumores en el grupo tratado tenían un tamaño del 2.4 % del tamaño de los tumores en los animales de control, tratados con PBS (Figura 7).

Luego se inyectaron 1×10^6 células LLC que expresan luciferasa a través de la vena de la cola en ratones C57B16. Después de 5 días, los ratones fueron tratados con el péptido de 5 aminoácidos a una dosis de 30 mg/kg/día por vía inyección i.p.. Después de 29 días, los animales se sacrificaron, momento en donde la actividad de luciferasa promedio en los ratones tratados con péptido, medida por un sistema Xeongoen IVIS, fue del 2% de la actividad de luciferasa en ratones tratados con un péptido mezclado (Figura 8).

Finalmente, se analizó el efecto de sustituir D-aminoácidos en diferentes residuos del péptido de 4 aminoácidos. Mediante análisis de transferencia Western se observó que la sustitución del primer y tercer residuo o del segundo y cuarto, en combinación, no tuvo ningún efecto sobre la actividad estimulante de Tsp-1 *in vitro*. Luego, estos péptidos se probaron en el modelo animal libre de tumores descrito anteriormente. El péptido normal de 4 aminoácidos y los péptidos sustituidos con D-aminoácido se inyectaron en combinación con medios condicionados de células PC3M-LN4 en ratones C57B16 adultos durante 4 días a una dosis de 10 o 30 mg/kg/día por vía inyección i.p.. Los ratones se sacrificaron 24 horas después del tratamiento el día 4. Se recolectaron los pulmones de estos ratones y se analizó la expresión de Tsp-1 mediante análisis de transferencia Western. El péptido D-aminoácido administrado a una dosis de 10 mg/kg/día fue equivalente al péptido de tipo silvestre administrado a una dosis de 30 mg/kg/día para estimular la Tsp-1. El péptido sustituido con D-aminoácido estimuló la Tsp-1 aproximadamente ~3 veces más a la dosis equivalente de 30 mg/kg/día en comparación con el péptido de tipo silvestre (Figura 9).

Ejemplo 2: Más datos sobre péptidos

Métodos

Plasma humano y de ratón y sangre de ratón

Se obtuvo plasma humano masculino (Lot # BCE012312PM1, K3 EDTA) de BioChemmed Services (Winchester, VA) y se almacenó a -80°C . Se obtuvieron ratones Swiss-Webster machos adultos jóvenes de Taconic Fanns, se anestesiaron con dióxido de carbono y se desangraron mediante punción cardíaca. La sangre se recogió en tubos que contenían K2 EDTA y se enfrió en hielo. El plasma se preparó mediante centrifugación durante 10 minutos a 3000 g y 4°C . Se utilizó plasma y sangre de ratón el día de la recolección.

Preparación de curvas estándar

Se prepararon muestras de matriz apagada (plasma humano y de ratón) a partir de un volumen de plasma precipitado con tres volúmenes de acetonitrilo: agua 9:1 a 4°C y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 g y 4°C , y el sobrenadante se usó para preparar muestras de curvas estándar. Una solución madre de 20 mg/ml de Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133, Ac = grupo acetilo, amida = grupo amida) y 20 mg/ml de Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132, DWLP con D-aminoácidos D y L indicados en minúsculas) se preparó en agua destilada. Cada solución madre de péptido (20 mg/ml) se usó para preparar una dilución en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 1 mg/ml y esas muestras se diluyeron adicionalmente en PBS para preparar soluciones de 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$. Las soluciones de 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$ se agregaron al sobrenadante de la matriz apagada en concentraciones equivalentes a concentraciones de plasma previas al apagado de 0, 300, 1000, 3000 y 10000 ng/ml para preparar muestras de curva estándar. Se diluyeron alícuotas por triplicado (100 μl) de cada muestra de curva estándar en 100 μl de agua antes del análisis por LC/MS.

Incubación con plasma y sangre

Plasma

Los dos péptidos se formularon en PBS (40 µg/ml) y se incubaron con plasma humano y de ratón a 37 °C en tubos de polipropileno a una concentración de 800 ng/ml por duplicado. Se retiraron alícuotas de incubación (100 µl) a los 0, 15, 30 y 60 min y se apagaron inmediatamente mediante la adición de 300 µl de acetonitrilo: agua 9:1, se agitaron y se centrifugaron durante 10 min a 3000 g y 4 °C. Luego se diluyeron 100 µl de cada sobrenadante con 100 µl de PBS antes del análisis por LC/MS.

Sangre

Los dos péptidos se formularon como para plasma y se introdujeron en sangre de ratón enfriada en un baño de hielo a una concentración de 800 ng/ml por duplicado. Cinco minutos después de añadirlo a la sangre, se preparó plasma y se extrajeron alícuotas duplicadas (como anteriormente) y se analizaron mediante LC/MS.

Análisis por LC/MS

La curva estándar procesada y las muestras de incubación se analizaron utilizando el método descrito en la Tabla 1. La concentración de péptido en plasma se determinó mediante extrapolación de la curva estándar.

Tabla 1. Condiciones LC/MS/MS

Instrumento	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 4000 con fuente de pulverización de turboiones (MS-900)		
	Detector de arreglos de diodos Agilent 1100		
	Automuestreador Agilent 1100		
	Bombas binarias Agilent 1100		
	Compartimento de columna Agilent 1100		
	Válvula de conmutación Valco VICI EHMA con bomba isocrática Agilent 1100		
Condiciones de cromatografía	Columna	Phenomenex Luna C18 (50 X 2 mm, 5 µm) con cartucho protector C18	
	Volumen de inyección:	10 µL	
	Fase móvil:	A: 0.1 % Ácido fórmico en agua + Formiato de amonio 10 mM	
		B: 0.1 % Ácido fórmico en metanol + Formiato de amonio 10 mM	
	Flujo:	0.5 mL/min	
	Gradiente:	Tiempo	%A
		0	95
		1	95
		6	5
		8	5
		8.1	95
		10	95
	Válvula	0-1 min – a residuo	
1-10 min – a MS			
Disolvente de compensación: MEOH:H ₂ O (50:50) en 100 µL/min			
Detección de péptidos	571.3→ 457.3 (DP=101; CE=17; CXP=28)		

CAD:	10
CUR:	10
GS1:	50
GS2:	50
IS:	4000
TEM:	550
EP:	10
Permanencia:	75 mseg

15 Resultados

Los parámetros de la curva estándar para cada péptido se presentan en la Tabla 2. Se empleó un modelo de regresión lineal simple con ponderación $1/x$ para el ajuste de curvas. Las curvas estándar cumplieron con los requisitos del método. Nótese que las muestras de la curva estándar se prepararon inadvertidamente 10 veces más que lo especificado en el protocolo. Las curvas fueron lineales en este intervalo y las concentraciones de todas las muestras analizadas estuvieron dentro de la curva estándar.

Tabla 2. Parámetros de curva estándar

Péptido/Especie	Pendiente	Intercepto	R ²
Ac-dWIP-amida - Ratón (SEQ ID NO: 132)	1.78	-183	1.00
Ac-dWIP-amida - Humana (SEQ ID NO: 132)	1.93	-344	0.98
Ac-DWLP-amida - Ratón (SEQ ID NO: 133)	1.76	-174	0.99
Ac-DWLP-amida - Humana (SEQ ID NO: 133)	2.03	-105	0.99

Las concentraciones de Ac-dW1P-amida (SEQ ID NO: 132) medidas en plasma humano y de ratón durante 1 h de incubación a una concentración de 800 ng/ml se muestran en la Tabla 3 y la Figura 10. Los datos indican que el péptido es estable en plasma humano durante 1 h a 37 °C. El péptido es menos estable en plasma de ratón durante este período de tiempo, con concentraciones a 1 h de aproximadamente 56-59 % de las nominales. La mayor parte de la caída en concentración de Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) se produjo en los primeros 15 minutos de incubación, sin una disminución significativa durante los siguientes 45 minutos.

Tabla 3. Concentración y porcentaje de concentración nominal de Ac-dW1P-amida (SEQ ID NO: 132) en plasma Humano y Ratón

Especies	Replicado	Punto de tiempo (min)	Concentración (ng/mL)	Porcentaje del nominal
Humano	1	0	779	97.4
Humano	1	15	875	109.4
Humano	1	30	818	102.3
Humano	1	60	1100	137.5
Humano	2	0	1050	131.3
Humano	2	15	941	117.6
Humano	2	30	863	107.9
Humano	2	60	901	112.6
Ratón	1	0	858	107.3
Ratón	1	15	520	65.0
Ratón	1	30	541	67.6
Ratón	1	60	446	55.8
Ratón	2	0	859	107.4
Ratón	2	15	462	57.8

Especies	Replicado	Punto de tiempo (min)	Concentración (ng/mL)	Porcentaje del nominal
Ratón	2	30	496	62.0
Ratón	2	60	469	58.6

5 Las concentraciones de Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133) medidas en plasma humano y de ratón durante 1 h de incubación a una concentración de 800 ng/ml se muestran en la Tabla 4 y la Figura 10. Los datos indican que el péptido tiene buena estabilidad (77-79% del nominal) durante 1 h de incubación en plasma humano y que la estabilidad es menor en plasma de ratón, quedando solo 50-58% después de 1 h de incubación. La mayor parte de la caída en concentración de Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133) se produjo en los primeros 30 minutos de incubación, sin una disminución significativa durante los siguientes 30 minutos.

Tabla 4. Concentración y porcentaje de concentración nominal de Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133) en plasma Humano y Ratón

Especies	Replicado	Punto de tiempo (min)	Concentración (ng/mL)	Porcentaje del nominal
Humano	1	0	784	98.0
Humano	1	15	817	102.1
Humano	1	30	607	75.9
Humano	1	60	634	79.3
Humano	2	0	649	81.1
Humano	2	15	760	95.0
Humano	2	30	538	67.3
Humano	2	60	616	77.0
Ratón	1	0	869	108.6
Ratón	1	15	669	83.6
Ratón	1	30	428	53.5
Ratón	1	60	398	49.8
Ratón	2	0	955	119.4
Ratón	2	15	605	75.6
Ratón	2	30	400	50.0
Ratón	2	60	463	57.9

10 Las concentraciones de Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) y Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133) encontrados en plasma de ratón preparado a partir de sangre de ratón que se incubó con 800 ng/ml de péptido se muestran en la Tabla 5. El hematocrito típico de un ratón es de 0.4-0.5, lo que corresponde a una contribución de plasma del 50-60 % del volumen sanguíneo. Si los péptidos permanecen en la fracción plasmática, se esperaría que las concentraciones

medidas oscilen de 1333 a 1600 ng/ml. Las concentraciones medidas oscilan de 1.010 a 1.610 ng/ml, lo que indica que ambos péptidos permanecen principalmente en la fracción plasmática y no se dividen en glóbulos rojos.

Tabla 5. Concentración de Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) y Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133) en Plasma de Ratón Preparado a partir de Sangre de Ratón Incubada con cada Péptido.

Péptido	Replicado	Concentración (ng/mL)
Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132)	1	1060
Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132)	1	1010
Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132)	2	1420
Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132)	2	1380
Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133)	1	1580
Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133)	1	1510
Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133)	2	1530
Ac-DWLP-amida (SEQ ID NO: 133)	2	1610

5

Ejemplo 3: Más datos sobre péptidos

Métodos: A 18 ratones C57B16 se les inyectó Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) a una dosis de 30 mg/kg en un volumen de 100 μ l mediante inyecciones intraperitoneales (i.p) en medios condicionados carentes de suero de células de cáncer de próstata PC3M-LN4. Los ratones se separaron en 6 grupos de 3 ratones, que se sacrificaron 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas después de la inyección del péptido. Después de la eutanasia, se extrajeron los pulmones de los ratones, se trituraron en un homogeneizador Dounce y se lisaron usando tampón RIPA en hielo durante 30 minutos. Los lisados de tejido luego se centrifugaron a 13,000 rpm en una minicentrífuga de mesa durante 20 minutos a 4°C. Luego se retiraron los sobrenadantes y se mezclaron con tampón de carga 4X y se cargaron y sometieron a electroforesis 100 μ g de proteína total (basado en el ensayo Bio-Rad) sobre un gel de bis-tris con un gradiente del 4-12%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon-P (Millipore) durante 2 horas a 200 V. Luego, las membranas se bloquearon en leche desnatada al 5 % en PBS-T durante 40 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo Tsp-1 ab-11 (Labvision) y el anticuerpo β -actina de AbCam durante la noche a 4 °C con balanceo. Luego, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS-T a temperatura ambiente con balanceo y luego se incubaron con anticuerpo secundario de anticuerpo anti-ratón de cabra durante una hora a temperatura ambiente con balanceo. Después de la incubación secundaria del anticuerpo, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos en PBS-T a temperatura ambiente con balanceo y luego se añadió el revelador Pierce Super Signal durante 1 minuto. Luego, las membranas se expusieron a una película para visualizar las bandas de Tsp-1 y β -actina. La intensidad relativa de las bandas de Tsp-1 (normalizadas a β -actina) se determinó utilizando un sistema Bio-Rad Chemi-Doc XRS.

25 Resultados:

Para determinar la cinética de inducción de Tsp-1 por Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132, DWLP con D-aminoácidos D y L indicados en minúsculas) se trataron ratones C57B16 *in vivo* con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) a una dosis de 30 mg/kg en combinación con PC3M-LN4 CM mediante inyección i.p.. Los ratones se sacrificaron a las 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas después de la inyección y se midió la inducción de Tsp-1 en los pulmones de los ratones mediante análisis de transferencia Western. La inducción de Tsp-1 alcanzó un máximo de 5 veces a las 16 horas y permaneció en ese nivel hasta 48 horas después de la inyección (Figura 11). A las 72 horas después de la inducción, los niveles de Tsp-1 se habían reducido a 2 veces más que el valor inicial.

Ejemplo 4: Más datos sobre péptidos

Métodos:

35 Se cultivaron células PC3 o PC3M-LN4 en RPMI con FBS al 10%. Luego se subcultivaron 5×10^6 células en medio sin suero durante 24 horas para generar medio condicionado. Los medios recolectados se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de tamaño de poro de 0.22 μ m para eliminar cualquier célula o restos celulares. Se pretrataron

ratones BMT y Tsp-1/- BMT C57BL/6J de tipo silvestre con 200 µl de medio acondicionado sin suero de células PC3 o LN4 o medio RPMI sin suero diariamente durante 6 días mediante inyección intraperitoneal (i.p.).

Los animales se sacrificaron al final de los experimentos y los pulmones se perfundieron rápidamente inyectando 5 ml de PBS frío a través del ventrículo derecho del corazón. Una parte del pulmón de cada animal se fijó en formalina al 3.7% y la otra parte se clasificó mediante citometría de flujo para extracción de proteínas o ARN.

Para la microscopía, después de la fijación con formalina, los tejidos se crioincrustaron en el compuesto de inclusión Tissue-Tek OCT (Electron Microscopy Sciences). Las secciones (30 µm) se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron en tampón de bloqueo/permeabilización (PBS + EDTA 2 mM, BSA al 1 %, suero de cabra al 1 %, Triton X-100 al 0.05 %). Luego, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios marcados contra GR1 (Clon RB6-8C5, BD Pharmingen), CD11b (Clon M1/70, BD Pharmingen), Tsp-1 (Ab-4 Neomarkers), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de bloqueo/permeabilización a una dilución de 1:100. Después de la incubación del anticuerpo primario, las secciones se enjuagaron 5 veces con PBS, se contratiñeron con DAPI y se montaron en reactivo Prolong Gold-antifade para análisis de microscopía de epifluorescencia.

Resultados:

Se realizó un análisis de inmunotinción para determinar la fuente de Tsp-1 en el estroma pulmonar, y se observó que la expresión de Tsp-1 se limitaba en gran medida a las células hematopoyéticas CD11b+ derivadas de BM reclutadas en los pulmones de ratones tratados con PC3 CM. Sorprendentemente, este patrón de expresión no se observó en los pulmones de ratones tratados con LN4 CM (Fig. 12). El análisis de células clasificadas por flujo mostró que Tsp-1 fue expresada por células progenitoras mieloides Gr1+ y no por células estromales Gr1 (Fig. 12), lo que coincide con el análisis de inmunotinción que muestra que la expresión de Tsp-1 se limitó a un subconjunto de células Gr1+ (Fig. 12).

Ejemplo 5: Psap y cáncer de próstata

Métodos:

Se recuperaron muestras de archivo (muestras de prostatectomía radical o biopsias de metástasis) de los archivos del Departamento de Patología del Instituto Gade del Hospital Universitario de Haukeland. Las muestras de prostatectomía fijadas con formalina se incluyeron en parafina y se estudiaron mediante secciones escalonadas de montaje completo a intervalos de 5 mm. Se construyeron microarreglos de tejido (TMA) seleccionando tres núcleos de tejido (0.6 mm de diámetro) del área de mayor grado tumoral en cada caso.

Se desparafinaron secciones delgadas de parafina (5 µm) del bloque de parafina TMA con xileno/etanol antes de la recuperación del epitopo por microondas inducida por calor en tampón citrato (pH 6.0) durante 20 minutos, y se incubaron con un anticuerpo policlonal de prosaposina (H-81) (sc- 32875, Santa Cruz Biotechnology, CA), diluido 1:2000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. La inmunotinción se realizó en el DAKO Autostainer con el método de polímero de cadena EnVision (Dako Cytomation, Copenhagen, Dinamarca) como sistema de detección. La localización del antígeno se logró mediante la reacción de diaminobencidina peroxidasa DAB, contrateñida con hematoxilina.

La inmunotinción se estimó semicuantitativamente, y se obtuvo un índice de tinción (SI) como producto de la intensidad de la tinción (0-3) y se calculó la proporción de células tumorales inmunopositivas (<10%=1, 10-50%=2, >50%=3). El índice de tinción (intervalo 0-9) es una escala categórica, donde se espera cierta variación dentro de cada categoría. Los casos con un índice de tinción <3 se definieron como expresadores bajos.

Las correlaciones entre las variables se evaluaron mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson, la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba U de Mann-Whitney (paquete estadístico SPSS; SPSS, Inc., Chicago, IL).

La población de estudio estuvo compuesta por 219 pacientes con carcinomas primarios localizados (n=104, meobjetivo de edad 62.0 años), carcinomas primarios resistentes a la castración (n=33), metástasis de cánceres de próstata (n=41) o hiperplasia benigna de próstata (n=41), todos tratados en el Haukeland University Hospital, Bergen, Noruega (1988-1994), con seguimiento completo incluido. La enfermedad en estadio clínico T1/T2, una gammagrafía ósea negativa y una buena salud general con una esperanza de vida de 10 a 15 años eran los requisitos previos para la cirugía de los carcinomas primarios localizados. Durante el seguimiento, los pacientes recibieron tratamiento antiandrogénico después del fracaso bioquímico y radioterapia externa después de la recurrencia local. La información sobre el curso de la enfermedad se recopiló a partir de exámenes institucionales y registros hospitalarios o correspondencia con médicos generales. Se registró el tiempo desde la cirugía hasta el fallo bioquímico, definido como elevación de s-PSA > 0.5 ng/ml en dos muestras de sangre consecutivas, así como el tiempo hasta las recurrencias clínicas locoregionales, las metástasis o la muerte por cáncer de próstata. Se registró como recurrencia clínica un tumor palpable en la fosa prostática o evidencia de metástasis a distancia en la gammagrafía ósea, radiografía o resonancia magnética. El estudio fue aprobado por The Regional Ethical Committee for Medical Research.

Resultados:

Para determinar la expresión de psap en pacientes con cáncer, se evaluaron los niveles de prosaposina en muestras de tejido de 219 pacientes con cáncer de próstata con estadios de la enfermedad que van desde hiperplasia de próstata hasta metástasis mediante IHC en portaobjetos de microarreglos de tejido (TMA). Se observó que los pacientes con cáncer de próstata localizado tenían un nivel de expresión de psap, estimado por el índice de tinción categórica (intervalo 0-9), que era significativamente menor que el de los pacientes con hiperplasia de próstata. Estos resultados fueron altamente significativos estadísticamente con un valor de $p < 0.0005$ según el análisis de Kruskal-Wallis (Fig. 13). Además, se incluyó en este estudio una serie consecutiva de 104 hombres tratados mediante prostatectomía radical por cáncer de próstata (Haukeland University Hospital, Bergen, Bergen, Noruega) y con un seguimiento largo y completo (Supl. info.). El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína prosaposina en un microarreglo de tejido reveló una asociación entre la baja expresión de prosaposina y características adversas como PSA sérico preoperatorio alto ($P = 0.025$), extensión del tumor extraprostático (tendencia; $P = 0.077$) y tiempo hasta el fallo bioquímico ($P = 0.027$) y supervivencia específica del cáncer ($P = 0.036$) (Fig. 13).

Ejemplo 6: Más datos sobre péptidos

Métodos:

Ver métodos del ejemplo 5.

Resultados:

A continuación, se determinó si la expresión de psap en los carcinomas de próstata primarios se correlacionaba con otras características clínico-patológicas del cáncer de próstata. Específicamente, basándose en el análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína prosaposina en células tumorales, se encontró que había una asociación entre la expresión baja de prosaposina y características tumorales más agresivas, tales como niveles elevados de PSA sérico preoperatorio, una tendencia a una puntuación de Gleason más alta y mayor extensión extraprostática. En cuanto al análisis de supervivencia multivariado, la PSAP tuvo una influencia independiente en el tiempo hasta la recurrencia clínica ($p=0.074$) además de la puntuación de Gleason, mientras que el pT y la PSA abandonaron este modelo (Fig. 14). Además, y de manera significativa, con respecto a la supervivencia global de los pacientes, la PSAP fue de hecho independientemente significativa ($p=0.020$), como único factor en este modelo, siendo por lo tanto más fuerte que la puntuación de Gleason, pT y PSA (Fig. 14). Estos hallazgos sugieren que el análisis de la expresión de psap podría ser útil para predecir la recurrencia o el resultado de la enfermedad.

Ejemplo 7: Psap asociada con el tiempo hasta la falla bioquímica y la supervivencia específica del cáncer

Métodos:

Consulte los métodos del Ejemplo 5.

Resultados:

La prosaposina (psap) es una proteína secretada por tumores que inhibe la metástasis a órganos distantes en modelos singénicos y de xenoinjerto. En este estudio, se examinó la correlación entre la expresión de prosaposina y la supervivencia del paciente. Así, se analizó la expresión de psap en una serie consecutiva de 104 hombres tratados mediante prostatectomía radical por cáncer de próstata (Haukeland University Hospital, Bergen, Noruega) de los que hubo un seguimiento largo y completo. El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína psap reveló que la tinción débil de psap se asoció con una reducción del tiempo hasta el fallo bioquímico ($P = 0.027$), así como con la supervivencia específica del cáncer ($P = 0.036$) (Figura 15). Además, las pacientes con cáncer de endometrio también tuvieron una asociación entre la supervivencia específica del cáncer y los niveles de Psap (Figura 15). Así, parece que los pacientes con niveles elevados de Psap establecen una barrera a la progresión tumoral. Además, parece que los niveles de expresión de Psap identifican a los pacientes que probablemente respondan o respondan al tratamiento.

Ejemplo 8: Más datos sobre péptidos

Métodos:

A los ratones C57B16 se les inyectó 5×10^5 células de melanoma B16-B16 por vía subcutánea. Después de 8 días, los ratones se trataron con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132, DWLP con D-aminoácidos D y L indicados como letras minúsculas) a una dosis de 40 mg/kg QD, DTIC (dacarbazina) a una dosis de 80 mg/kg QOD, Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) + DTIC a las mismas dosis, o PBS QD. El diámetro del tumor se midió cada dos días usando calibradores. Después de 24 días, se sacrificaron todos los ratones y se recogieron los tumores para análisis de inmunohistoquímica o transferencia Western.

Resultados:

Los inventores intentaron determinar si Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) podría inhibir el crecimiento de tumores primarios agresivos y por ello eligió la línea celular de melanoma murino B16-B16. Se inyectaron 5×10^5 células por vía subcutánea en ratones C57B16 singénicos. El tratamiento se inició con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132), DTIC, Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) + DTIC o PBS (control) 8 días después de la inyección y se midió el diámetro del

tumor cada dos días durante 24 días. Tratamiento con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) solo fue capaz de bloquear prácticamente todo el crecimiento tumoral con una t/c del 98% en comparación con los ratones de control tratados con PBS (Figura 16). La Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) también fue significativamente más eficaz que DTIC solo o en combinación con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132).

5 Ejemplo 9: Más datos sobre péptidos

Métodos:

Consulte los métodos de Ejemplo 6 y 8.

Resultados:

Se tiñeron secciones congeladas de tumores B16-B16 con anticuerpos contra Gr1 y Tsp-1 para determinar si estos tumores reclutaban monocitos derivados de médula ósea y si Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) podría inducir Tsp-1 en estas células. Se observó que los tumores tratados de control reclutaban células Gr1 pero estas células no expresaban Tsp-1 (Figura 17). Se observó que los tumores tratados con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) no sólo reclutaban células Gr1 sino que estas células eran inducidas a expresar Tsp-1. Estos resultados demuestran que el mecanismo de actividad de Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) no se limita a las metástasis sino que también se aplica a los tumores primarios.

Ejemplo 10: Más datos sobre péptidos

Métodos:

Para inyecciones ortotópicas de células de cáncer de mama, se inyectaron 5×10^6 células MDA-MB-231 viables o su variante metastásica MDA-MB-LM2 en almohadillas de grasa de ratones SCID CB-17 en un volumen de 0.1 ml. El crecimiento del tumor y las metástasis pulmonares (después de la resección del tumor primario) se controlaron mediante imágenes de bioluminiscencia de animales vivos (Xenogen) una vez por semana. Para inyecciones ortotópicas de células de cáncer de próstata, se inyectaron 2×10^6 células LN4 o LN4-psap viables en la glándula prostática de ratones. Para la determinación in vivo de la carga metastásica, se anestesiaron los ratones y se les inyectó por vía intraperitoneal 75 mg/kg de D-luciferina (100 μ l de 30 mg/mL en PBS). El crecimiento metastásico se controló a lo largo del tiempo mediante imágenes de bioluminiscencia realizadas con ratones en posición supina 5 minutos después de la inyección de D-luciferina con un sistema Xenogen IVIS acoplado al software de adquisición y análisis Living Image (Xenogen). Para los gráficos BLI, se calculó el flujo de fotones para cada ratón utilizando la misma región circular de interés que abarca el tórax del ratón.

Resultados:

La capacidad del péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4) se probó para inhibir la metástasis en un modelo ortotópico, clínicamente relevante, de cáncer de mama metastásico al pulmón. Se inyectaron ortotópicamente células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231-LM2 que expresan el indicador luc en las glándulas mamarias de ratones SCID. Después de tres semanas de crecimiento (Fig. 19), los tumores primarios se resecaron quirúrgicamente y una cohorte de ratones se trató diariamente con péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4) y otra cohorte con un péptido mezclado. Las metástasis pulmonares se evaluaron 3 semanas después de la extirpación del tumor primario (semana 6 después de la inyección del tumor primario). En ratones tratados con DWLPK (SEQ ID NO: 4), la carga metastásica en los pulmones se redujo significativamente en un 50% (Fig. 19). De acuerdo con observaciones anteriores, los pulmones tratados con DWLPK (SEQ ID NO: 4) mostraron una regulación positiva persistente de Tsp-1 en el compartimento mieloide Gr 1 + en comparación con el tratamiento con péptido mezclado (Fig. 18). En conjunto, estos resultados indican que el péptido DWLPK de 5 aminoácidos (SEQ ID NO: 4), mediante la inducción de Tsp-1 en células derivadas de BM Gr1+ en el microambiente pulmonar, podría tener una eficacia significativa en el tratamiento del cáncer metastásico.

Ejemplo 11: Más correlaciones entre Psap y el cáncer

Métodos:

Se recuperaron especímenes de archivo de biopsias de pacientes con cáncer de ovario del Department of Pathology, Dana Farber Cancer Institute (Boston, MA). Las muestras fijadas con formalina se incluyeron en parafina y se estudiaron mediante secciones escalonadas de montaje completo a intervalos de 5 mm. Se construyeron microarreglos de tejido (TMA) seleccionando tres núcleos de tejido (0.6 mm de diámetro) del área de mayor grado tumoral en cada caso. Se desparafinaron secciones delgadas de parafina (5 μ m) del bloque de parafina TMA con xileno/etanol antes de la recuperación del epitopo por microondas inducida por calor en tampón citrato (pH 6.0) durante 20 minutos, y se incubaron con un anticuerpo policlonal de prosaposina (H-81) (sc-32875, Santa Cruz Biotechnology, CA), diluido 1:2000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. La inmunotinción se realizó en el DAKO Autostainer con el método de polímero de cadena EnVision (Dako Cytomation, Copenhagen, Dinamarca) como sistema de detección. La localización del antígeno se logró mediante la reacción de diaminobencidina peroxidasa DAB, contrateñida con hematoxilina.

La inmunotinción se estimó semicuantitativamente, y se obtuvo un índice de tinción (SI) como producto de la intensidad de la tinción (0-3) y se calculó la proporción de células tumorales inmunopositivas (<10%=1, 10-50%=2, >50%=3). El índice de tinción (intervalo 0-9) es una escala categórica, donde se espera cierta variación dentro de cada categoría. Los casos con un índice de tinción <3 se definieron como expresadores bajos.

- 5 Las correlaciones entre las variables se evaluaron mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson, la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba U de Mann-Whitney (paquete estadístico SPSS; SPSS, Inc., Chicago, IL).

Resultados:

- 10 Los inventores intentaron determinar si existía alguna correlación entre la expresión de prosaposina y la metástasis del cáncer de ovario. Como tal, se tiñó un microarreglo de tejido (TMA) compilada de 165 pacientes con cáncer de ovario y 37 pacientes normales. Se determinó que los tumores de ovario metastásicos expresaban niveles de prosaposina -20 % más bajos, lo que fue estadísticamente significativo con un valor de $p < 0.0001$ según lo evaluado mediante la prueba U de Mann-Whitney (Figura 19). También se determinó que el 68.1% de todos los tumores primarios de ovario tenían una intensidad de tinción de prosaposina alta (>6), mientras que sólo el 37.4% de las metástasis tenían una tinción de prosaposina alta (>6).

- 15 Ejemplo 12: Más datos sobre péptidos

Métodos:

- 20 Para inyecciones de células de cáncer de ovario metastásico, se inyectaron 5×10^6 células de cáncer de ovario primario viables en ratones SCID CB-17 por vía intraperitoneal en un volumen de 0.1 ml. El crecimiento del tumor se controló mediante imágenes de bioluminiscencia de animales vivos (Xenogen) una vez por semana. Para la determinación in vivo de la carga metastásica, se anestesiaron los ratones y se les inyectó por vía intraperitoneal 75 mg/kg de D-luciferina (100 μ l de 30 mg/mL en PBS). El crecimiento metastásico se controló a lo largo del tiempo mediante imágenes de bioluminiscencia realizadas con ratones en posición supina 5 minutos después de la inyección de D-luciferina con un sistema Xenogen IVIS acoplado al software de adquisición y análisis Living Image (Xenogen). Para los gráficos BLI, se calculó el flujo de fotones para cada ratón utilizando la misma región circular de interés que abarca el abdomen del ratón.

Resultados:

- 30 Para determinar si DWLPK (SEQ ID NO: 4) podría inhibir o hacer retroceder las metástasis ováricas existentes, se inyectaron por vía intraperitoneal 5×10^6 células primarias de cáncer de ovario en ratones SCID. Después de 17 días se inició el tratamiento con DWLPK (SEQ ID NO: 4) a una dosis de 40 mg/kg una vez al día, cisplatino a una dosis de 2 mg/kg una vez al día, una combinación de DWLPK (SEQ ID NO: 4) y cisplatino en las mismas dosis, o PBS (control). Se observó que el tratamiento con DWLPK (SEQ ID NO: 4) hizo retroceder completamente las metástasis en 11/12 después de 30 días y las metástasis en los ratones restantes retrocedieron en un 99% (Figura 20). Sorprendentemente, los tumores desarrollaron resistencia al tratamiento con cisplatino después de 20 días y comenzaron a crecer nuevamente.

- 35 Ejemplo 13: Más datos sobre péptidos

Métodos:

Se recogió líquido ascítico de ratones después de la eutanasia inyectando en la cavidad peritoneal 5 ml de PBS y luego drenando la cavidad y recogiendo el líquido.

- 40 Las células se lavaron, se filtraron y se resuspendieron en tampón de tinción FACS (PBS + EDTA 2 mM, BSA al 1%). Para el análisis de sangre periférica, se recogió sangre de las colas de ratones en tampón anticoagulante 22 (PBS con EDTA 5 mM). Los glóbulos rojos se eliminaron mediante incubación en tampón de lisis (BD Bioscience) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las suspensiones celulares se prebloquearon con FBS al 2 % más bloque Fc (CD16/CD32, 1:30, BD Biosciences Pharmingen) y luego se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: se añadió control de isotipo IgG2 α e IgG2 α de rata (BD Pharmingen), Gr1 (clon RB6-8C5, Biolegend), CD11b (clon M1/70, BD Pharmingen), azul SYTOX (Invitrogen) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en cada tubo de tinción celular para facilitar la eliminación de células muertas en citometría de flujo. Las poblaciones de células marcadas se midieron mediante un citómetro de flujo LSRII acoplado con el software FACSDiva (BD Bioscience). El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando una variedad de controles que incluyen anticuerpos de isotipo, muestras de fluorescencia menos uno (FMO) (31) y muestras sin teñir para determinar las puertas, voltajes y compensaciones apropiados requeridos en la citometría de flujo multivariante. Para la clasificación, las poblaciones de células específicas se controlaron dentro del software FACSDiva y se clasificaron mediante el clasificador Aria II (BD Bioscience).

Resultados:

Los inventores intentaron determinar si las metástasis intraperitoneales y la ascitis del cáncer de ovario reclutaban monocitos GR1+/Cd11b+ derivados de la médula ósea. Como tal, se recogió líquido ascítico del control (PBS) y Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) trataron ratones y evaluaron el contenido de GR1+/Cd11b+ mediante FACS. Se observó que >70 % de las células en el líquido ascítico de los ratones tratados de control eran GR1+/Cd11b+, en comparación con menos del 30 % en ratones que habían sido "curados" con Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132) (Figura 21).

Ejemplo 14: Más datos sobre péptidos

Métodos:

Para la metástasis experimental, se inyectaron a ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad a través de la vena de la cola 1×10^5 células LLC marcadas con luciferasa. El crecimiento metastásico se controló a lo largo del tiempo mediante imágenes de bioluminiscencia realizadas con ratones en posición supina 5 minutos después de la inyección de D-luciferina con un sistema Xenogen IVIS acoplado al software de adquisición y análisis Living Image (Xenogen). Para los gráficos BLI, se calculó el flujo de fotones para cada ratón utilizando la misma región circular de interés que abarca el tórax del ratón.

Resultados:

Para determinar si la estimulación de DWLPK (SEQ ID NO: 4) de Tsp-1 por células BM Gr1 + en el parénquima pulmonar conferir un nicho resistente a metástasis, se administraron células LLC-luc a través de la vena de la cola en ratones de tipo silvestre tratados con péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4) o control mezclado. Sorprendentemente, la administración del péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4) redujo drásticamente las metástasis pulmonares en comparación con el péptido mezclado, según lo medido mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI) (Figura 22).

Ejemplo 15: Más datos sobre péptidos

Métodos:

Se recogió CM de células PC3M-LN4 cultivadas en medio sin suero durante 24 horas, se centrifugó y se filtró a través de filtros de tamaño de poro de 0.22 μ m para eliminar cualquier célula o restos celulares. Se trataron ratones C57BL/6J de tipo silvestre con 200 μ l de medio acondicionado sin suero de células PC3M-LN4 diariamente durante 6 días mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en combinación con péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4) o péptido mezclado.

Los animales se sacrificaron al final de los experimentos y los pulmones se perfundieron rápidamente inyectando 5 ml de PBS frío a través del ventrículo derecho del corazón. Una parte del pulmón de cada animal se fijó en formalina al 3.7% y la otra parte se clasificó mediante citometría de flujo para extracción de proteínas o ARN.

Para la microscopía, después de la fijación con formalina, los tejidos se crioincrustaron en el compuesto de inclusión Tissue-Tek OCT (Electron Microscopy Sciences). Las secciones (30 μ m) se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron en tampón de bloqueo/permeabilización (PBS + EDTA 2 mM, BSA al 1 %, suero de cabra al 1 %, Triton X-100 al 0.05 %). Luego, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios marcados contra GR1 (Clon RB6-8C5, BD Pharmingen) y Tsp-1 (Ab-4 Neomarkers/Labvision), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de bloqueo/permeabilización a una dilución de 1:100. Después de la incubación del anticuerpo primario, las secciones se enjuagaron 5 veces con PBS, se contratiñeron con DAPI y se montaron en reactivo Prolong Gold-antifade para análisis de microscopía de epifluorescencia.

El ARN total de las células clasificadas por citometría de flujo se extrajo utilizando el kit de extracción de ARN PicoPure (Arcturus) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se convirtió en ADNc usando supermezcla de ADNc qScript™ (Quanta biosciences). La Q-PCR se realizó con cebadores y la mezcla maestra iQTM SYBER Green (Biorad, Hercules, CA). Cada muestra se duplicó para minimizar el error de pipeteo. Un protocolo estándar de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min y el análisis de la curva de fusión se aplicó en un sistema en tiempo real BioRad CFX96 (BioRad) acoplado con el software Bio-Rad-CFX Manager. La abundancia relativa de cada transcripción en comparación con el control se calculó utilizando el método delta-Ct.

Las secuencias de cebadores utilizadas para RT-PCR fueron:

Mus-GAPDH-para: CATGGCCTTCCGTGTTCTTA (SEQ ID NO: 134)

Mus-GAPDH-rev: GCGGCACGTCAGATCCA (SEQ ID NO: 135)

Mus-Tsp1-para: CTTGAGGCAGATGAAGAAGACC (SEQ ID NO: 136)

Mus-Tsp1-rev: ACTGACACCACTTGTTGCTTCC (SEQ ID NO: 137)

Resultados:

Habiendo determinado que el péptido DWLPK de 5 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) derivado de psap retiene la actividad estimulante de Tsp-1 de la psap de longitud completa tanto *in vitro* como *in vivo*, los Inventores intentaron determinar si también se dirigían a células derivadas de MO. Como tal, los ratones se trataron con CM de células LN4 solas, para simular un reclutamiento sistémico inducido por tumores de células estromales derivadas de BM en los pulmones, o CM en combinación con el péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4, péptido psap, Figura 23). Como era de esperar, el reclutamiento de células Gr1+ fue idéntico independientemente del tratamiento. Sin embargo, la administración del péptido DWLPK (SEQ ID NO: 4) estimuló la expresión de Tsp-1 en las células Gr1+ en más de dos plegamientos, mientras que un péptido compuesto por los mismos aminoácidos en una secuencia mezclada no logró estimular Tsp-1. Luego se aislaron células del pulmón y se clasificaron mediante FACS en tres poblaciones: CD45-, F4/80+, y Gr1+. Se realizó un análisis de RT-PCR en estas poblaciones para determinar el nivel de expresión de Tsp-1 y se encontró que Tsp-1 se expresaba casi exclusivamente en la población de células Gr1+.

Ejemplo 16: El medio condicionado de células débilmente metastásicas puede regular positivamente Tsp-1 *in vivo*

Métodos:

Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-LM2 se cultivaron en RPMI con FBS al 10%. Luego se subcultivaron 5x10⁶ células en medio sin suero durante 24 horas para generar medio condicionado. Los medios recolectados se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de tamaño de poro de 0.22 µm para eliminar cualquier célula o restos celulares.

Los animales se sacrificaron al final de los experimentos y los pulmones se perfundieron rápidamente inyectando 5 ml de PBS frío a través del ventrículo derecho del corazón. Una parte del pulmón de cada animal se fijó en formalina al 3.7% y la otra parte se clasificó mediante citometría de flujo para extracción de proteínas o ARN.

Para la microscopía, después de la fijación con formalina, los tejidos se crioincrustaron en el compuesto de inclusión Tissue-Tek OCT (Electron Microscopy Sciences). Las secciones (30 µm) se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron en tampón de bloqueo/permeabilización (PBS + EDTA 2 mM, BSA al 1 %, suero de cabra al 1 %, Triton X-100 al 0.05 %). Luego, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios marcados contra GR1 (Clon RB6-8C5, BD Pharmingen), CD11b (Clon M1/70, BD Pharmingen), Tsp-1 (Ab-4 Neomarkers), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de bloqueo/permeabilización a una dilución de 1:100. Después de la incubación del anticuerpo primario, las secciones se enjuagaron 5 veces con PBS, se contratiñeron con DAPI y se montaron en reactivo Prolong Gold-antifade para análisis de microscopía de epifluorescencia.

Resultados:

La CM de células de cáncer de mama MDA débilmente metastásicas provocó una regulación positiva de la expresión de Tsp-1 en BM reclutó células Gr1+ en comparación con CM de células de cáncer de mama LM2 altamente metastásicas (Figura 24).

Ejemplo 17: Más datos sobre péptidos

Métodos:

A los ratones se les inyectó DWLPK (SEQ ID NO: 4) o un péptido mezclado usando inyecciones I.P. con 30 mg/kg de péptido. Se aislaron glóbulos blancos, se extrajeron proteínas y se realizó una transferencia Western midiendo la proteína Tsp-1.

Resultados:

Se descubrió que Tsp-1 estaba regulada positivamente en glóbulos blancos aislados de ratones inyectados con DWLPK (SEQ ID NO: 4) pero no el péptido mezclado (Figura 25).

Ejemplo 18: Tratamiento de otras enfermedades o trastornos dependientes de la angiogénesis.

AMD: Las lesiones se crean en la retina de un ratón con un láser. Luego, los ratones se tratan con un polipéptido como se describe en el presente documento, por ejemplo, DWLPK (SEQ ID NO: 4) o Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132), o un control de péptidos mezclados. El tratamiento es sistémico (por ejemplo, mediante inyección intravenosa o intraperitoneal) o mediante inyección intravítrea. La tasa de curación de la lesión se mide a lo largo del tiempo. Se espera que la lesión sane más rápidamente en ratones tratados con el polipéptido que con el control.

Obesidad: Se obtienen ratones Ob/Ob (laboratorio Jackson, Maine, #000632) y los compañeros de camada heterocigotos se utilizan como ratones de control. Luego, los ratones se tratan con un polipéptido como se describe en el presente documento, por ejemplo, DWLPK (SEQ ID NO: 4) o Ac-dWIP-amida (SEQ ID NO: 132), o un control de péptidos mezclados. El tratamiento es mediante inyección intravenosa o intraperitoneal. Tanto los ratones polipeptídicos como los de control se alimentan con la misma dieta. El peso de los animales se mide en el tiempo. Se espera que los ratones Ob/Ob tratados con el polipéptido pierdan peso o no ganen peso tan rápido como los ratones Ob/Ob tratados con el péptido de control.

Enfermedad de Crohn: Se genera un modelo experimental de enfermedad de Crohn (CD) en ratones administrando 0.1 ml de TNBS al 2.5 % (p/v) en etanol al 50 % en el colon bajo una ligera anestesia. Los ratones de control reciben 0.1 ml de etanol al 50%. Comenzando un día después de la administración de TNBS, los ratones se tratan con Ac-dWIP-Amida (SEQ ID NO: 132) o péptido mezclado de control mediante inyección intraperitoneal (i.p.). También se genera un modelo experimental de CD inducido por DSS añadiendo sulfato sódico de dextrano (DSS) al 3% al agua potable de ratones. 7-8 días después de la adición al agua de bebida, los ratones se tratan con Ac-dWIP-Amida (SEQ ID NO: 132) o péptido mezclado de control mediante inyección i.p. (Laroui, H., et al., Dextran sodium sulfate (DSS) induce colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. PLoS One, 2012. 7(3): pág. e32084). La inflamación en un grupo de ratones DSS y TNBS al inicio del tratamiento se controlará macroscópicamente, histológicamente como se conoce en la técnica (ver, por ejemplo, Laroui, H., et al., Dextran sodium sulfate (DSS) induce colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. PLoS One, 2012. 7(3): p. e32084 y Hollenbach, E., et al., Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn's disease. The Journal of biological chemistry, 2005. 280(15): p. 14981-8). Se espera que los ratones con enfermedad de Crohn tratados con Ac-dWIP-Amida (SEQ ID NO: 132) tendrán una inflamación reducida en comparación con los ratones con enfermedad de Crohn tratados con una mezcla de control.

Para todos los estudios de ARMD, obesidad y enfermedad de Crohn, se realiza un estudio de búsqueda de dosis que comienza con 100 µg/kg/día y aumenta a 100 mg/kg/día en incrementos de 10 veces. La experiencia previa indica que 10 mg/kg/día son suficientes para inducir Tsp-1 en los pulmones de ratones. Los ratones reciben tratamiento durante 5 a 7 días o más, según la enfermedad. La expresión de Tsp-1 se utiliza como lectura, así como para condiciones específicas de la enfermedad (por ejemplo, pérdida de peso o inflamación). También se controlan los niveles de Tsp-1 en orina y suero como lectura de la actividad polipeptídica.

Para todos los estudios de ARMD, obesidad y enfermedad de Crohn, se utilizan 20 animales/grupo, según lo determinado mediante un análisis de poder estadístico utilizando una f_2 de 0.35 y un valor p deseado de 0.05. Todos los análisis bivariados, tal como la respuesta a la inflamación, se realizan mediante la prueba exacta de Fisher. Para el análisis de otros conjuntos de datos, se utiliza ANOVA para determinar la significancia.

Las referencias citadas en el presente documento y en toda la especificación se incorporan en el presente documento como referencia.

Referencias

1. Bendre, M.S., et al., (2002) Cancer Res 62, 5571-5579.
2. Brown, L.F., et al., (1999) Clinical Cancer Research 5:1041-1056.
3. Brummelkamp, T.R., et al., (2002) Science 296:550-553.
4. Bykov VJ, y Wiman KG. (2003) Ann Med. 35(7):458-65.
5. Campana WM, et al., (1996) Biochem Biophys Res Commun; 229(3): 706-712.
6. Campana WM, et al., (1998) FASEB J; 12(3): 307-314.
7. Campana WM, et al., (1999) Biochim Biophys Acta; 1427(3): 392-400.
8. Dameron, K.M., et al., (1994) Science 265:1582-1584.
9. Dong, J., et al., (2004) EMBO J; 23:2800-2810.
10. Ebba Bråkenhielm, et al., (2004) Circulation Research; 94:1579
11. Elenbaas, B., et al., (2001) Genes Dev 15, 50-65.
12. Escot, C., et al., (1986) Proc Natl Acad Sci U S A; 83:4834-4838.
13. Espinoza-Fonseca LM. (2005) Theor Biol Med Model. Sep 20; 2:38.
14. Gurova, K. V., et al., (2004) Cancer Res. 64:1951-1958.
15. Fidler, I.J. (2003). Nat Rev Cancer 3:453-458.
16. Folkman, J. (1971). N Engl J Med 285:1182-1186.
17. Fukumura, D., et al., (1998) Cell 94:715-725.
18. Grammas P, et al., (1999) Am. J. Path., 154(2):337-42

19. Gopalakrishnan, M. M., et al., (2004) *Biochem J.* November 1; 383(Pt 3): 507-515.
20. Hawighorst, T., et al., (2002). *Oncogene* 21, 7945-7956.
21. Healy DL, et al., (1998) *Human Reproduction Update*, 4:736-740.
22. Hiraiwa M, et al., (1997) *Biochem Biophys Res Commun*; 240(2): 415-418.
- 5 23. Hiraiwa M, et al., (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*; 94(9): 4778-4781.
24. Ho CK y Li G. (2005) *Br J Dermatol.* Nov;153(5):900-10.
25. Issaeva N, et al., (2004) *Nat Med.* 10(12):1321-8.
26. Janz, A., et al., (2000) *Nucleic Acids Res* 28:2268-2275.
27. Kalas, W., et al., (2005) *Cancer Res* 65:8878-8886.
- 10 28. Kang, Y., et al., (2003) *Cancer Cell* 3:537-549.
29. Kishimoto Y, et al., (1992) *J Lipid Res*; 33(9): 1255-1267.
30. Koch, A. E., (2000) *Ann. Rheum. Dis.*;59(Suppl 1): i65-i71
31. Koochekpour S. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* Marzo 2006.
32. Koochekpour S. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* Septiembre 2006
- 15 33. Kotani Y, et al., (1996) *J Neurochem*; 66(5): 2197-2200.
34. Littlewood, T.D., et al., (1995) *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.
35. MacDougall, J.R., y Matrisian, L.M. (1995). *Cancer Metastasis Rev* 14:351-362.
36. Martins, C.P., et al., (2006). *Cell* 127:1323-1334.
37. Minn, A.J., et al., (2005) *Nature* 436:518-524.
- 20 38. Misasi R, et al., (2001) *FASEB J*; 15(2): 467-474.
39. Morales, CR. (1998), 51:156-166.
40. Morales, CR, (2003) *Asian J Androl*; 5(1): 57-63.
41. Muller, A., et al., (2001). *Nature* 410:50-56.
42. Nag, A., y Smith, R.G. (1989) *Prostate* 15:115-122.
- 25 43. Naumov, G.N., et al., (2002) *Cancer Res* 62:2162-2168.
44. Ngo, C.V., et al., (2000) *Cell Growth Differ* 11.
45. O'Brien JS, et al., (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 91(20): 9593-9596.
46. O'Brien JS, et al., (1995) *FASEB J*; 9(8): 681-685.
47. Paget, S. (1889) *Lancet* 1:571-573.
- 30 48. Paleolog, E. M., (2002) *Arthritis Res*, 4(Suppl 3): S81-S90)
49. Pettaway, C.A., et al., (1996) *Clinical Cancer Research* 2:1627-1636.
50. Rehman Abdur, et al., *Breast Cancer Research* 2005, 7: R765-R774.
51. Roth, J., et al., (2003) *Can. Res.* 63: 3904-3908.
52. Schultheiss C, et al., (2006) *Angiogenesis*. 9(2):59-65.
- 35 53. Shing, Y. (1988). *J Biol Chem* 263:9059-9062.
54. Tanner S, Barberis A. (2004). *J Negat Results Biomed.* 3:5.
55. Tikhonenko, et al., (1996) *J Biol. Chem.* 271:30741-30747.

56. Vassilev, et al., (2004) Science 303:844-848.
57. Ventura, A., et al., (2007) Nature 445:661-665.
58. Vagnucci AH, Li WW, (2003) Lancet, 361(9357):605-8.
59. Watnick, R., et al., (2003) Cancer Cell 3.
- 5 60. Wiman, K. G., (2006) Cell Death and Differentiation 13:921-926.
61. Xue, W., et al., (2007) Nature 445:656-660.
62. Savagner, P., et al., (2004) Cell 117:927-939.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en DWLPKPNMS (SEQ ID NO: 12), CDWLPKPNM (SEQ ID NO: 13), TCDWLPKPN (SEQ ID NO: 14), KTCDWLPKP (SEQ ID NO: 15), EKTCDWLPK (SEQ ID NO: 16), LEKTCDWLP (SEQ ID NO: 17), o variantes de los mismos que tienen una sustitución de aminoácido conservadora por un aminoácido que flanquea la secuencia DWLP.
2. Un péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácidos es:
 - a) una sustitución de aminoácido conservadora por Leucina (L);
 - b) Arginina (R) por Lisina (K);
 - c) un isómero D de Ácido Aspártico (D) para un isómero L de Ácido Áspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) para un isómero L de Leucina (L);
 - d) un isómero D de Triptófano (W) para un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para un isómero L de Prolina (P);
 - e) Alanina (A) o Glicina (G) para Leucina (L); o combinaciones de los mismos;preferiblemente en donde la sustitución de aminoácidos es
- a) un isómero D de Ácido Aspártico (D) para un isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) para un isómero L de Leucina (L); o
- b) un isómero D de Triptófano (W) para un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) para un isómero L de Prolina (P).
3. El péptido aislado de la reivindicación 2, en donde la sustitución de aminoácido conservadora por Leucina es Valina (V), o en donde la sustitución de aminoácido por Leucina es Glicina (G).
4. Un conjugado peptídico que comprende un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 conjugado con al menos una molécula terapéutica.
5. Un péptido quimérico que comprende al menos una primera porción y al menos una segunda porción, en donde la primera porción es un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y en donde la segunda porción es un péptido sin Psap.
6. Un ácido nucleico aislado que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un vector de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 6.
8. Un peptoide que consiste en la secuencia de aminoácidos del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 5, en donde la cadena lateral de cada aminoácido está conectada al nitrógeno de la cadena principal del péptido y no al carbono alfa.
9. Una composición que comprende un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o un péptido quimérico de la reivindicación 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un péptido quimérico de la reivindicación 5, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la reivindicación 9 para uso en:
 - (a) tratar una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis en un sujeto que lo necesita;
 - (b) inhibir la recurrencia de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis en un sujeto que lo necesita;
 - (c) inhibir la angiogénesis o estimular la expresión de Tsp-1 en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis;
 - (d) inhibir la angiogénesis o estimular la expresión de Tsp-1 en un sujeto que tiene cáncer; o
 - (e) inhibir el crecimiento y/o metástasis del cáncer en un sujeto que lo necesita.
11. Un péptido para uso en
 - (a) tratar una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis en un sujeto que lo necesita;
 - (b) inhibir la recurrencia de una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis en un sujeto que lo necesita;

(c) inhibir la angiogénesis o estimular la expresión de Tsp-1 en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis;

(d) inhibir la angiogénesis o estimular la expresión de Tsp-1 en un sujeto que tiene cáncer;

(e) inhibir el crecimiento y/o metástasis del cáncer en un sujeto que lo necesita;

5 en donde el péptido consiste en una variante de sustitución de aminoácidos conservadora de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DWLPKPNMS (SEQ ID NO: 12), CDWLPKPNM (SEQ ID NO: 13), TCDWLPKPN (SEQ ID NO: 14), KTCDWLPKP (SEQ ID NO: 15), EKTCDWLPK (SEQ ID NO: 16), LEKTCDWLP (SEQ ID NO: 17), en donde la sustitución de aminoácidos es: Tirosina (Y) por Triptófano (W).

10 12. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de un individuo diagnosticado con cáncer, en donde un nivel de Psap en una muestra obtenida de dicho individuo es inferior al 95% de un nivel de Psap de referencia.

13. Un método para determinar la probabilidad de que un individuo diagnosticado con cáncer responda al tratamiento mediante la administración de la composición de la reivindicación 9, comprendiendo el método:

a. determinar un nivel de Psap en una muestra obtenida del individuo; y

15 b. comparar el nivel de Psap determinado en (a) con un nivel de Psap de referencia,

en donde dicho nivel de Psap determinado en (a) es inferior al 95% de dicho nivel de Psap de referencia, indica que es probable que el individuo responda a la administración de una composición de la reivindicación 9.

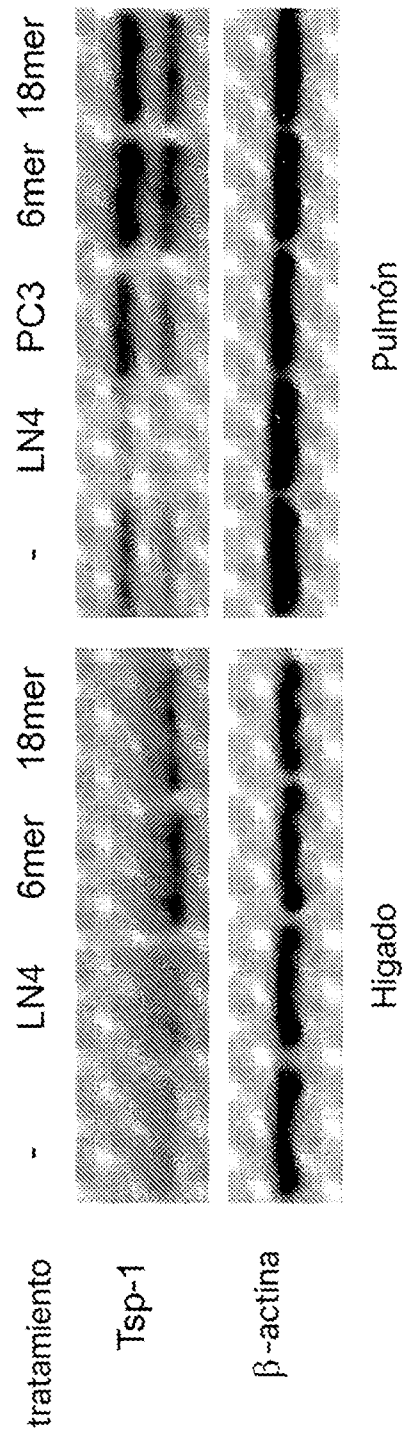
14. El péptido, péptido quimérico o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde:

20 (a) la enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis se selecciona de un grupo que consiste en cáncer, psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia tiroidea, preeclampsia, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Alzheimer, obesidad, derrame pleural, aterosclerosis, endometriosis, retinopatías diabéticas/otras, glaucoma neovascular, hemangiomas y neovascularización corneal; o

25 (b) el péptido, péptido quimérico o composición es para administración junto con quimioterapia, radioterapia, un agente citostático, un agente anti-VEGF, un factor antiangiogénesis y/o un agente de reactivación de p53.

15. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un péptido quimérico de la reivindicación 5, o una composición de la reivindicación 9, en donde el péptido, el péptido quimérico, o la composición tiene una o más de las actividades de estimular la expresión de Tsp-1, activar p53, inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la invasividad del tumor, o inhibir la metástasis del tumor.

30



"-"=sin tratar

"LN4"=Medios condicionados PCM3-LN4 (células metastásicas)

"PC3"=Medios condicionados PCE3 (células no metastásicas)

Fig.1

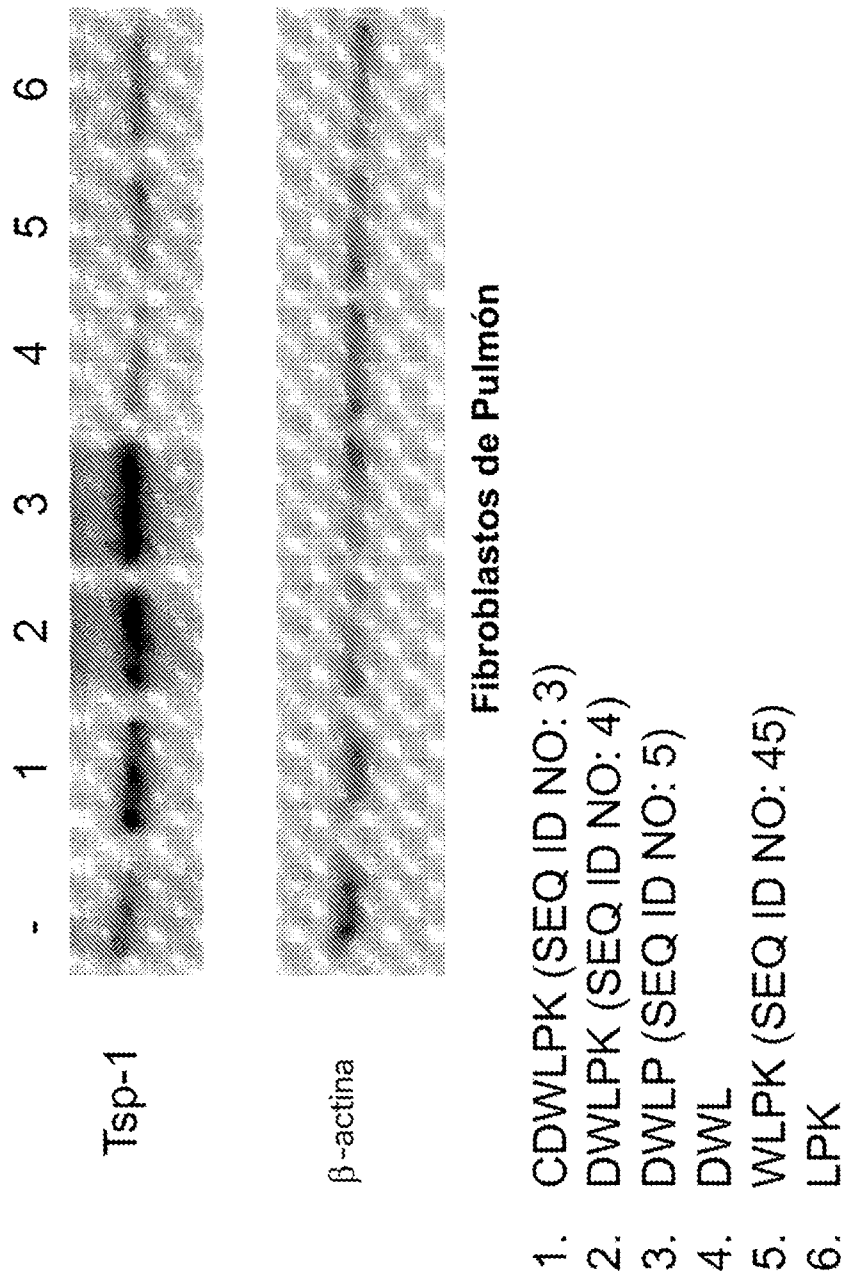
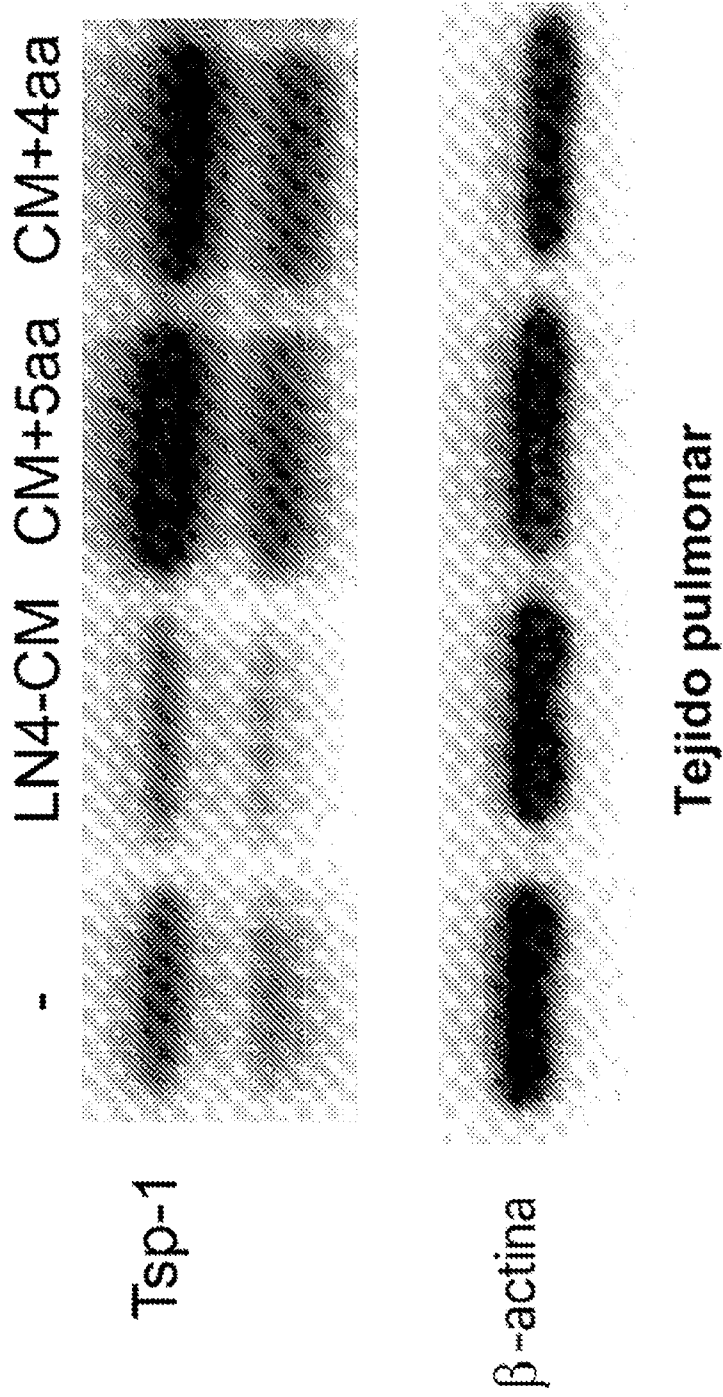


Fig. 2



Tratamiento de 4 días 20 mg/kg diarios i.p.

Fig. 3

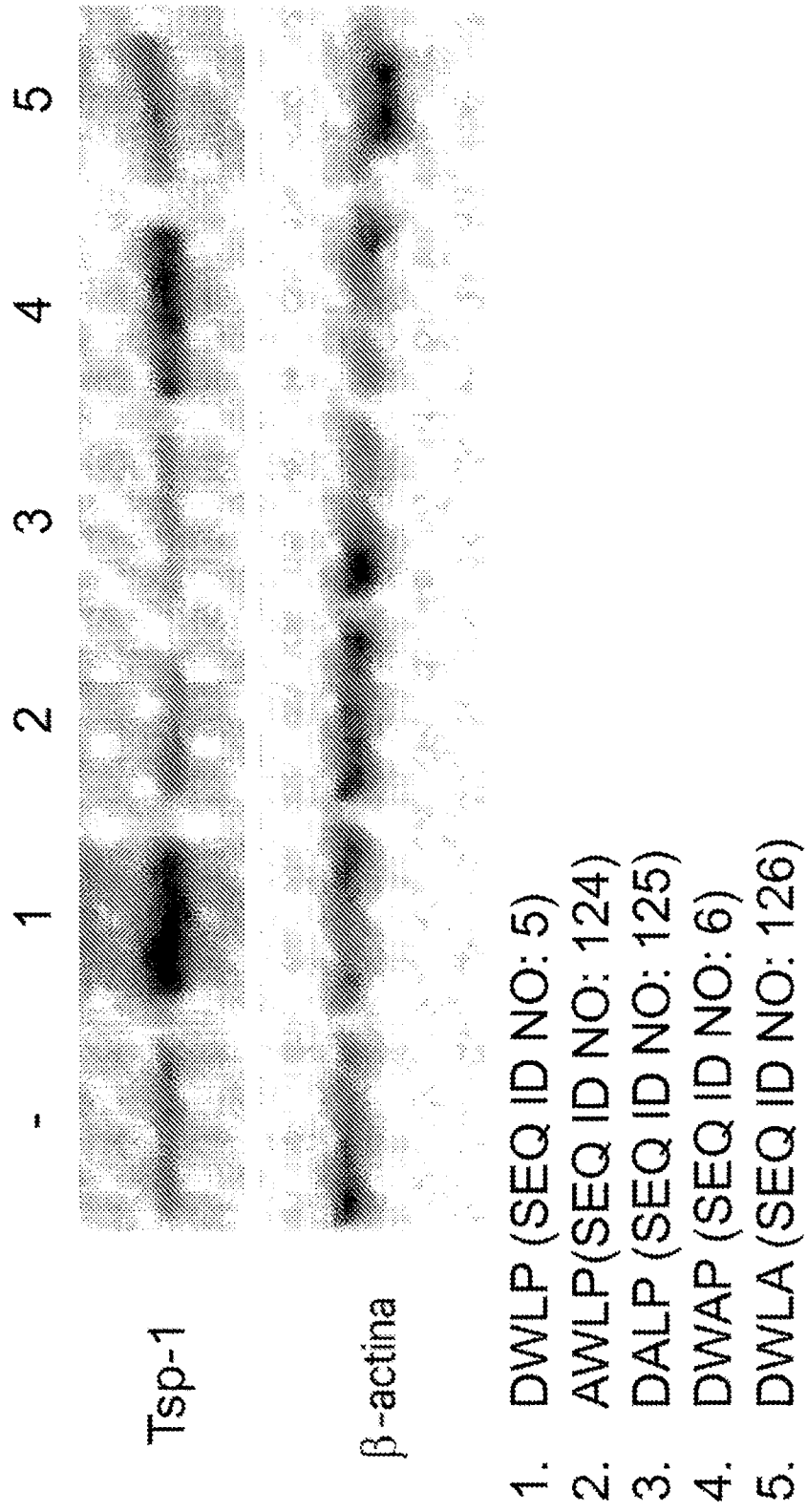


Fig. 4

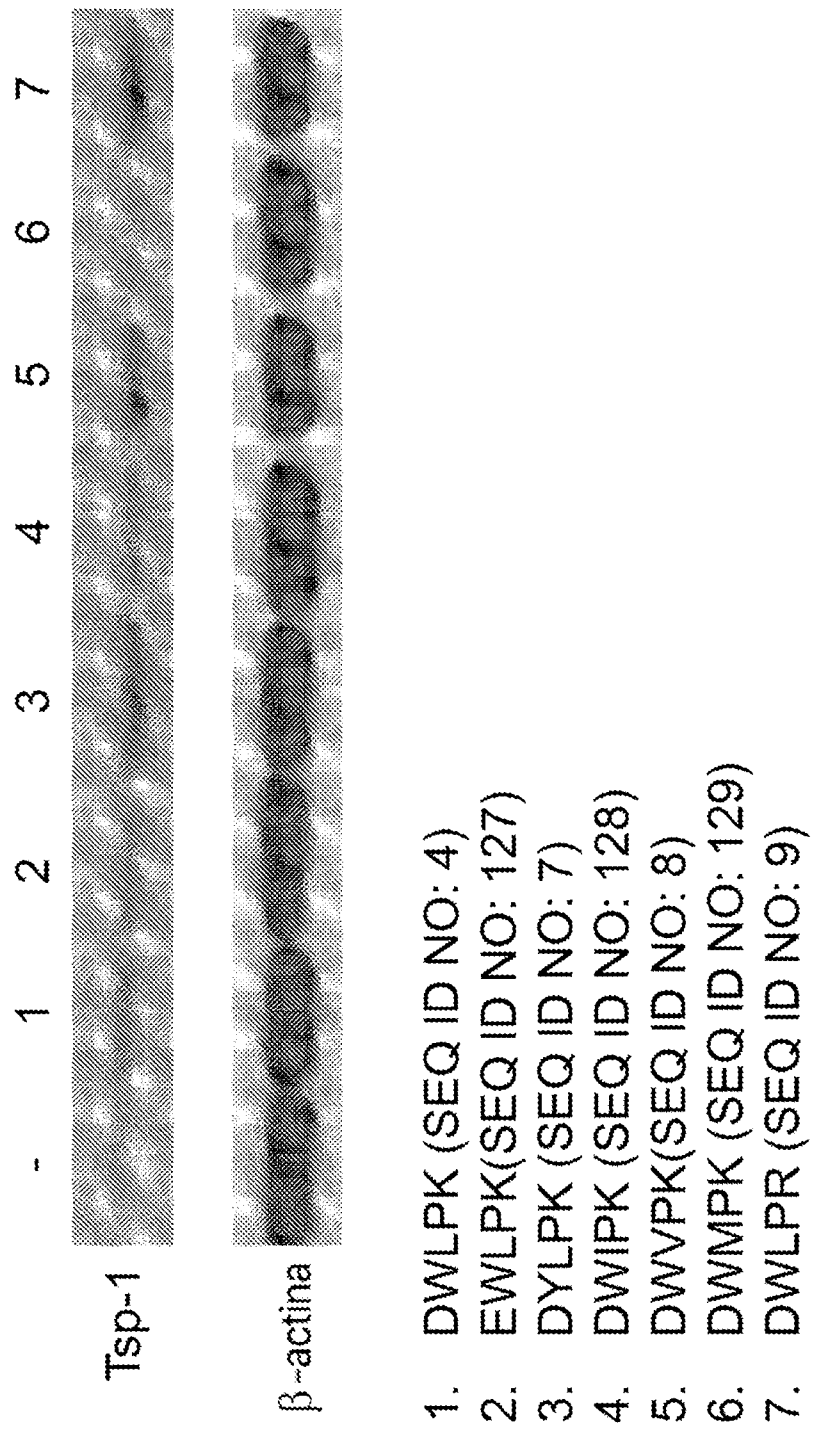


Fig. 5

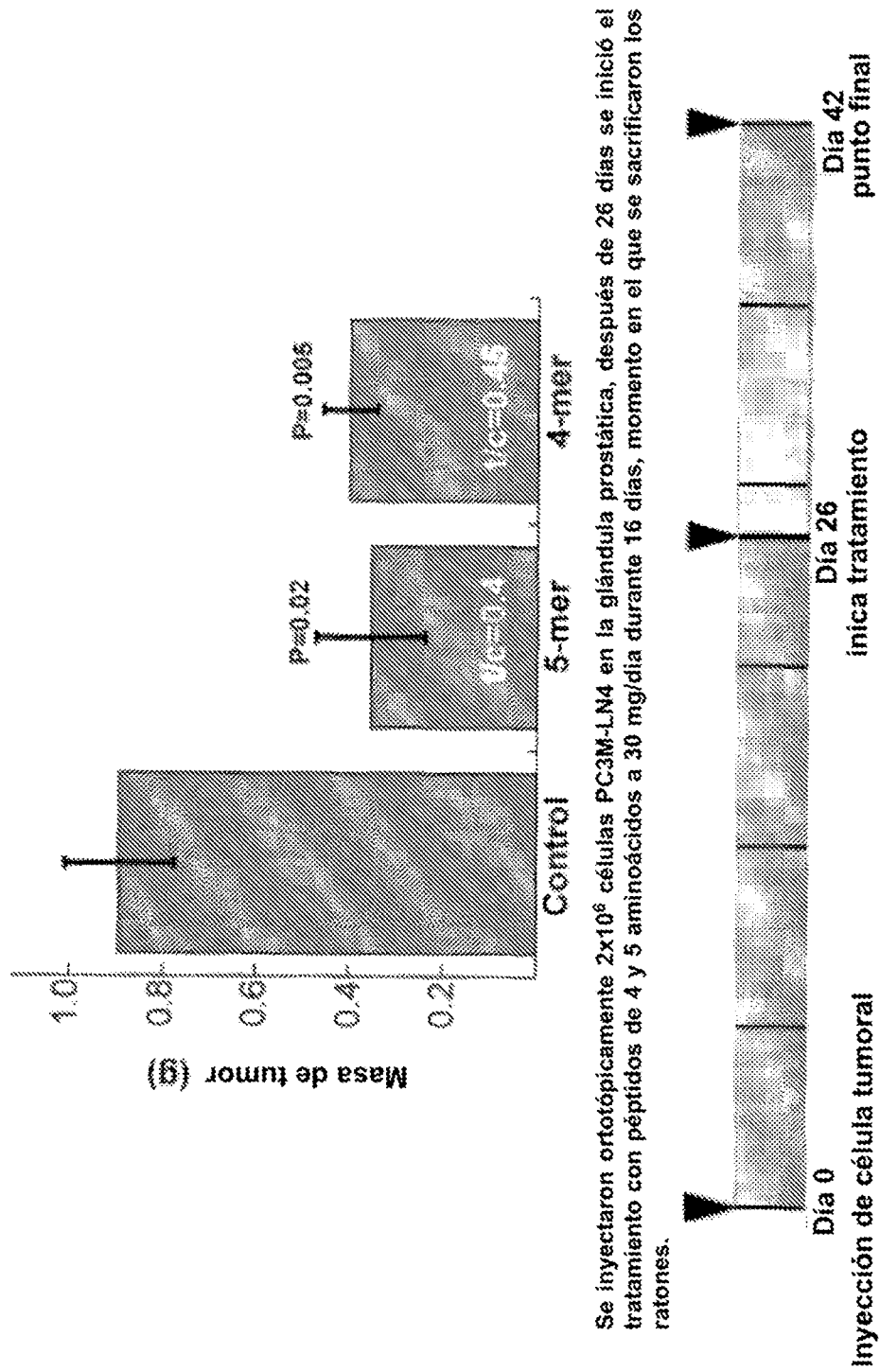


Fig. 6

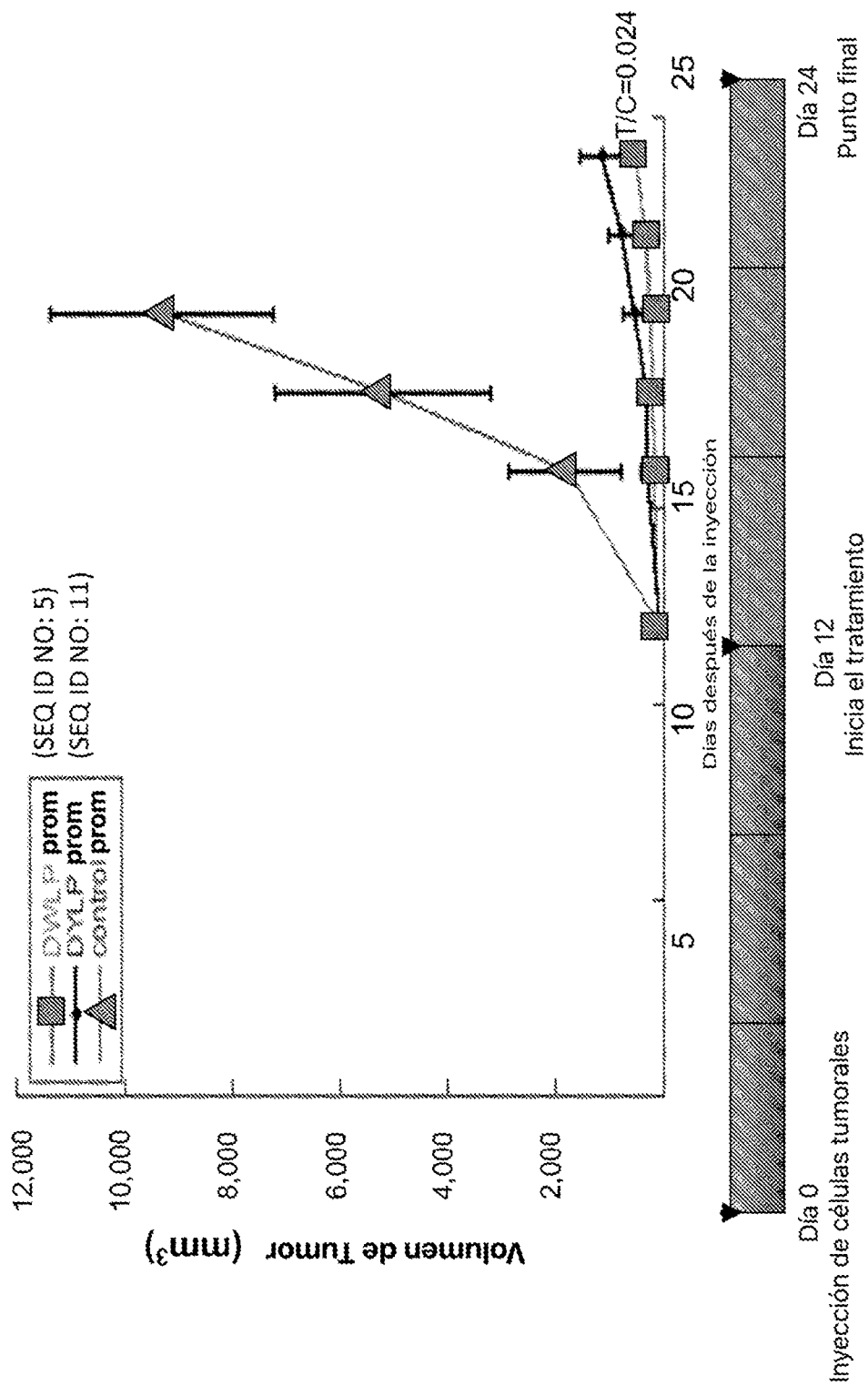


Fig. 7

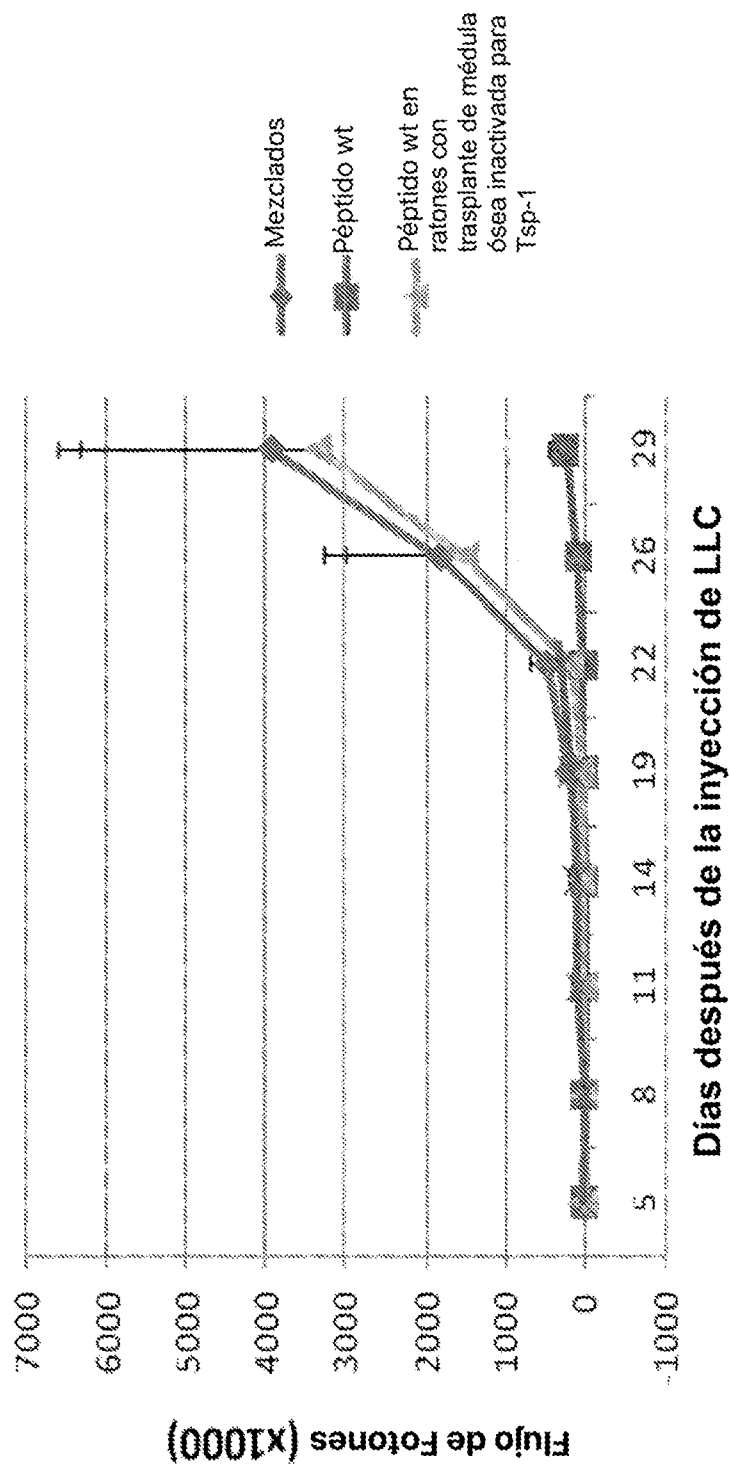


Fig. 8

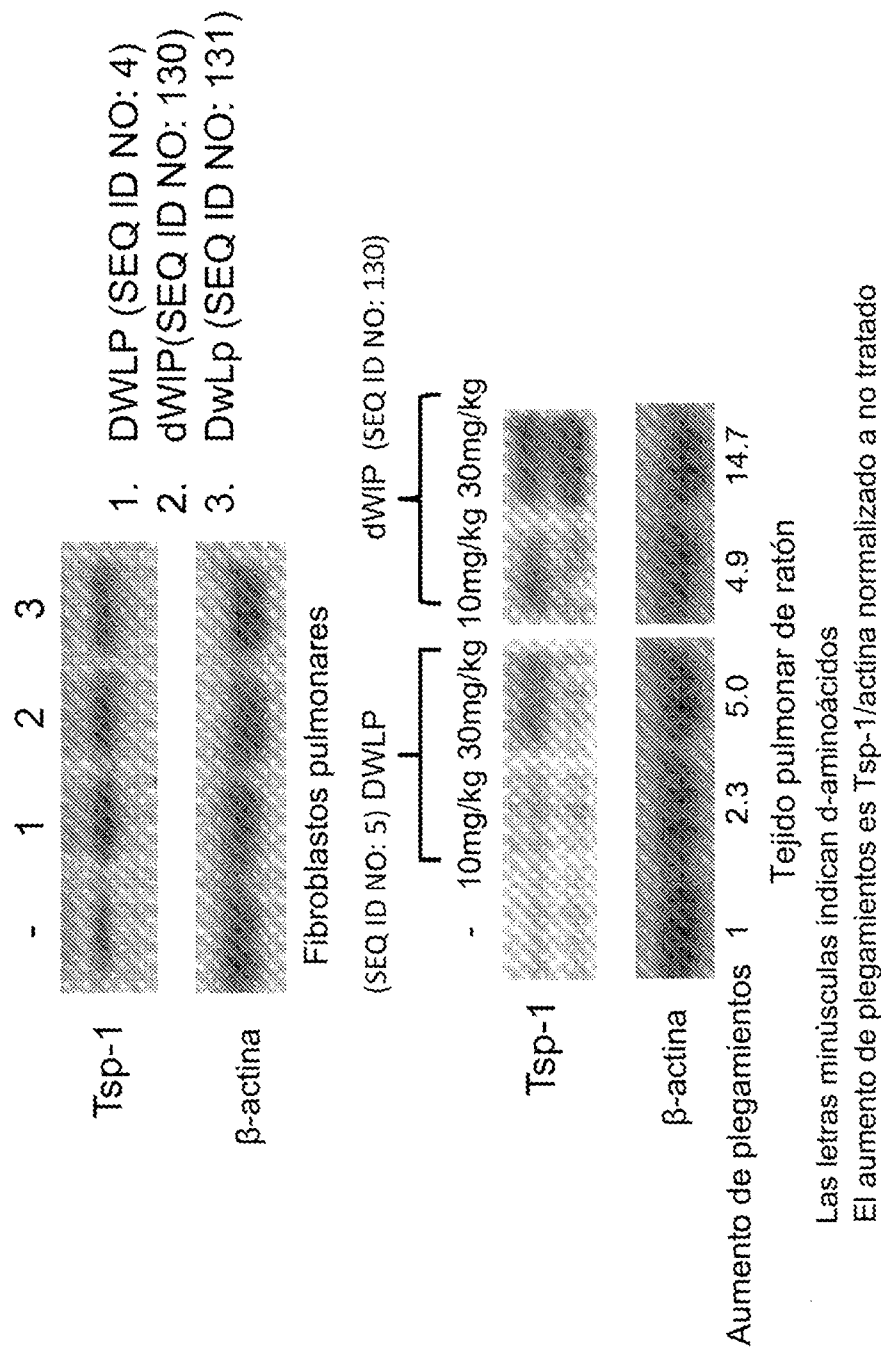


Fig. 9

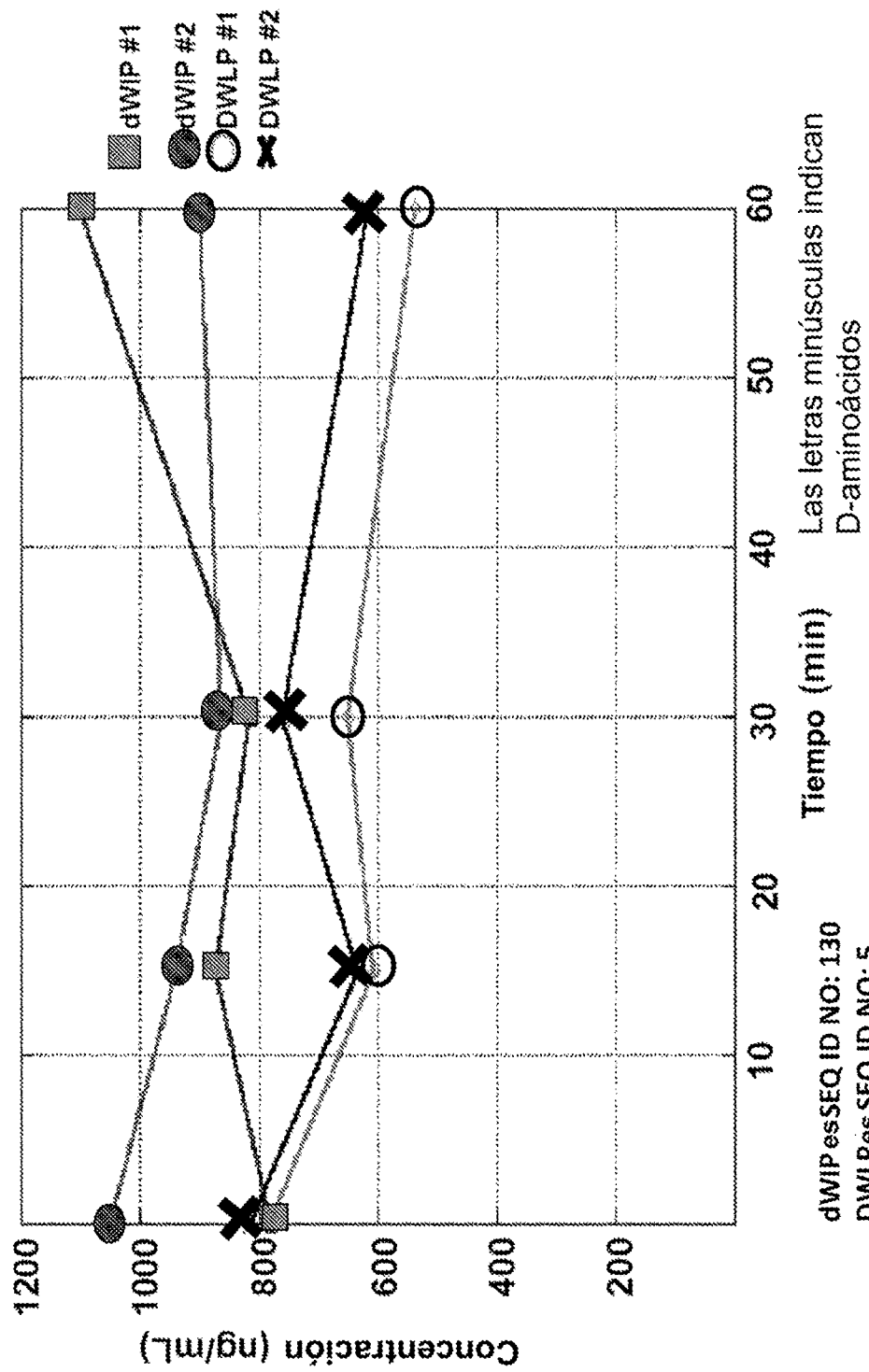


Fig. 10

dWIPesSEQ ID NO: 130

DWLPesSEQ ID NO: 5

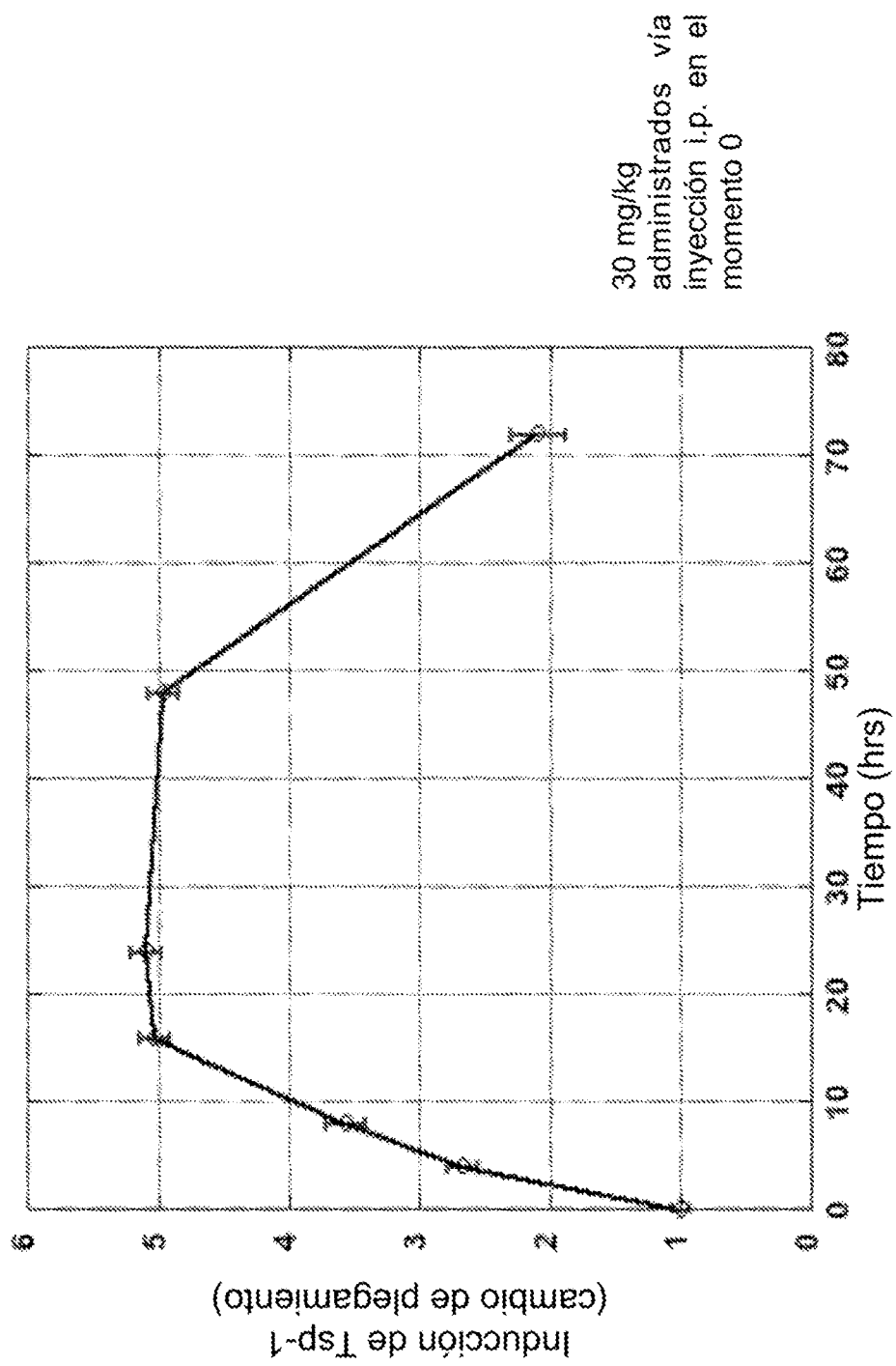


Fig. 11

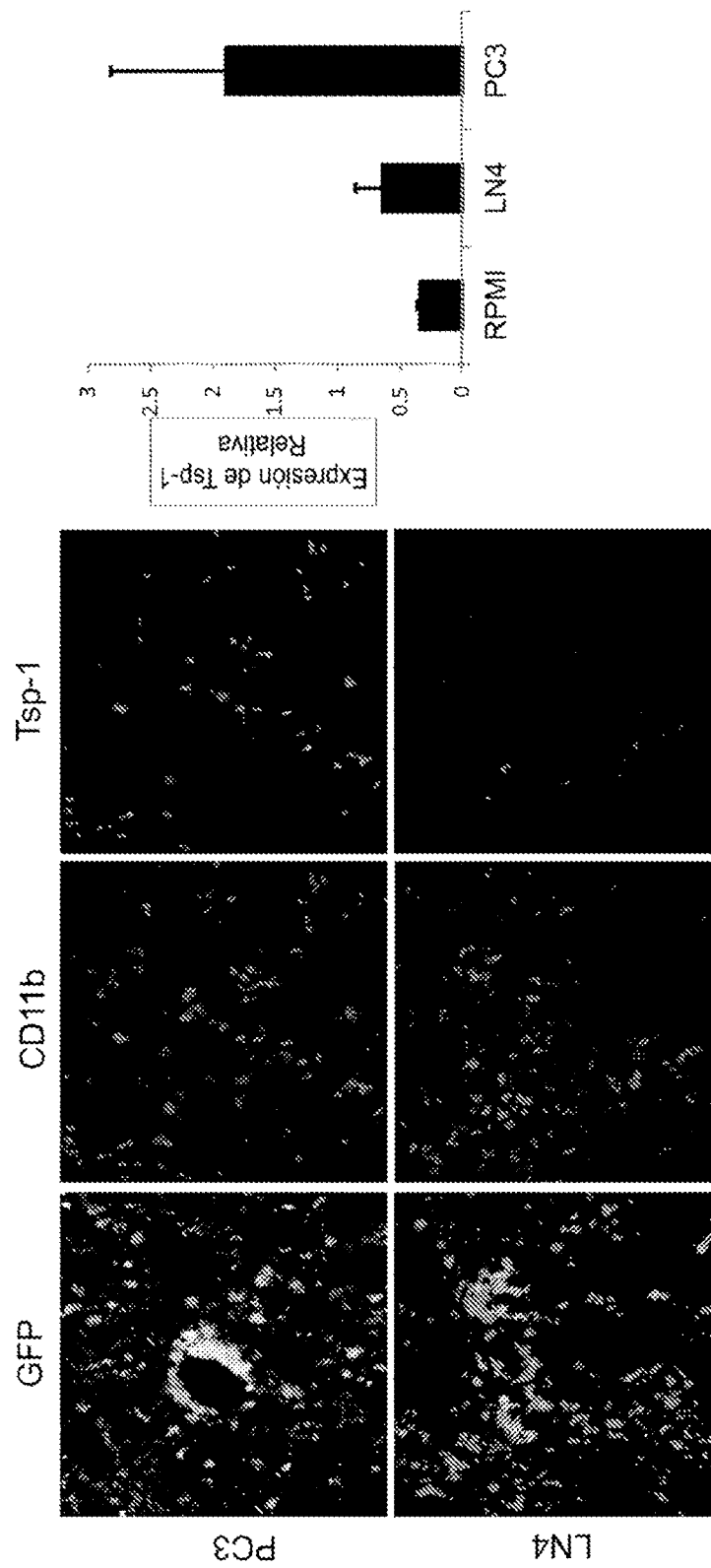
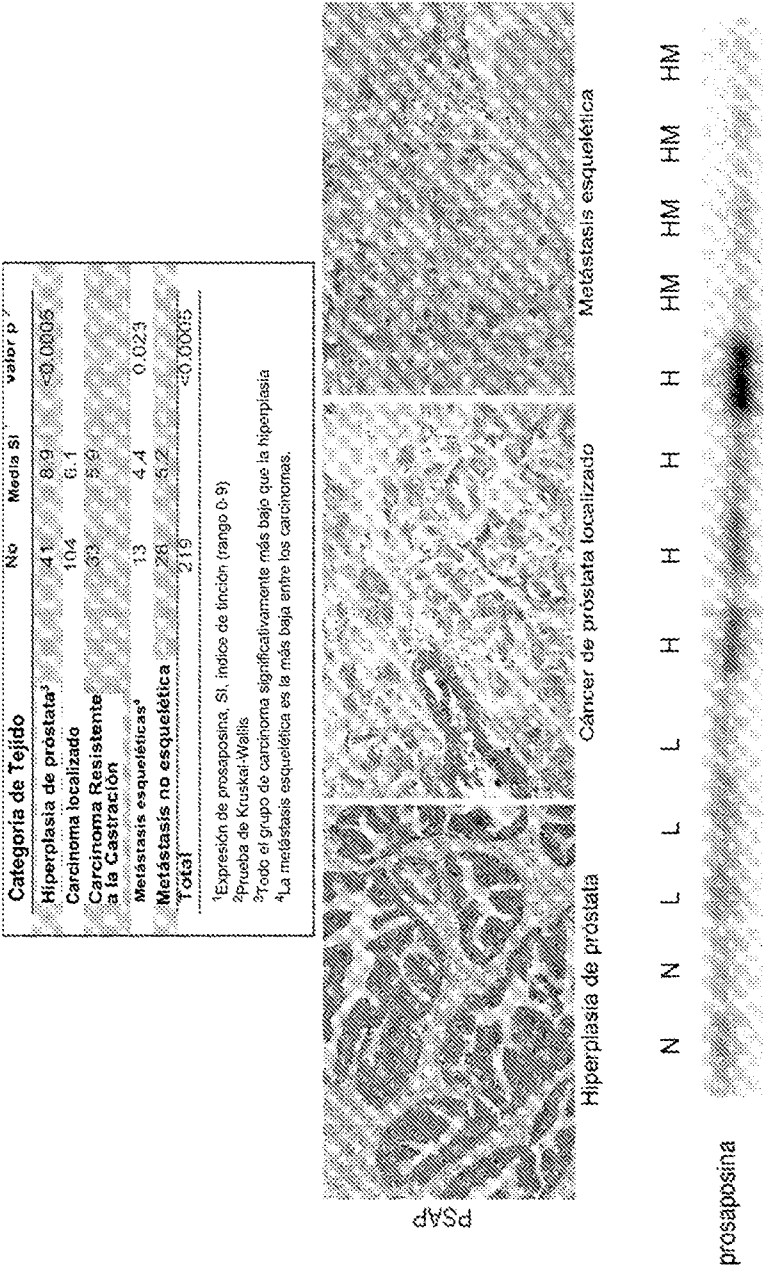


Fig. 12



Suero Para Pacientes con Cáncer Colorrectal

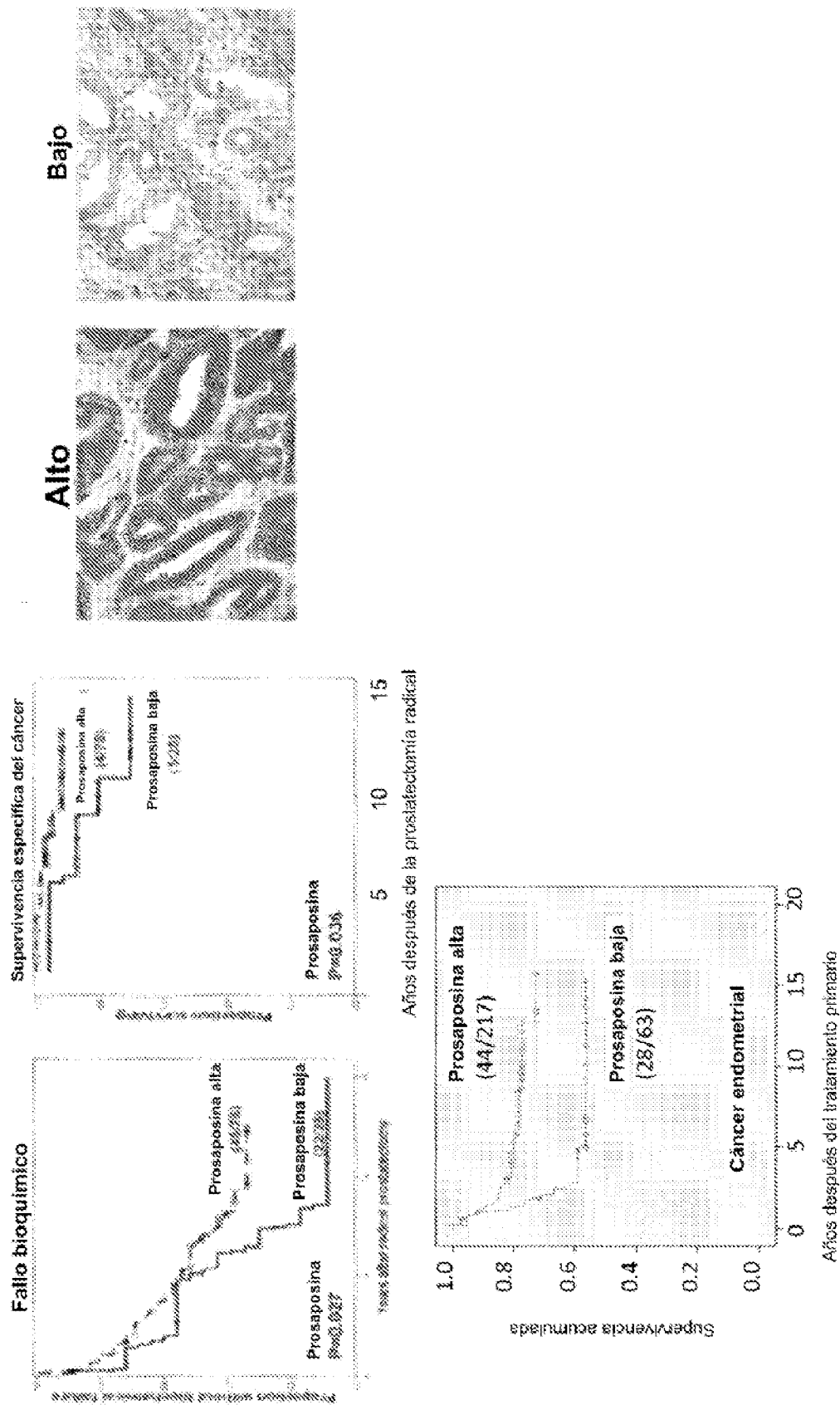
N= pacientes normales (sin cancer)
L= bajo grado CRC (T_{1/2}M₀)
H= alto grado CRC (T₃M₀)
HM= alto grado CRC con metástasis(T_{3/4}M₀)

Fig. 13

Variables	No	Cociente de riesgo	95% CI	p
Recurrencia clínica				
Puntuación de Gleason				
≤ 7	42	1.0		0.011
≥ 8	83	4.6	1.6-13.2	
Escala patológica §				
pT2	29	1.0		ns
≥ pT3	88	1.0	0.0-5.0	
s PSA preoperatorio †				
≤ 20 ng/ml	12	1.0		ns
> 20 ng/ml	86	1.0	0.5-2.9	
Prostata				
expresión	76	1.0		0.074
Fuerte	22	2.1	1.0-4.4	
Debil				
Supervivencia del paciente				
Puntuación de Gleason				
≤ 7	42	1.0		ns
≥ 8	83	1.8	0.6-2.8	
Escala patológica §				
pT2	29	1.0		ns
≥ pT3	88	1.9	0.0-5.0	
s PSA preoperatorio †				
≤ 20 ng/ml	12	1.0		ns
> 20 ng/ml	86	0.5	0.2-1.2	
Prostata				
expresión	76	1.0		0.026
Fuerte	22	2.7	1.2-6.0	
Debil				

† Puntuación de Gleason examinada en: especímenes de prostatectomía
 § Estadío patológico (UICC/TNM 1992)
 § Solo casos sin información sobre s PSA preoperatorio

Fig. 14



159

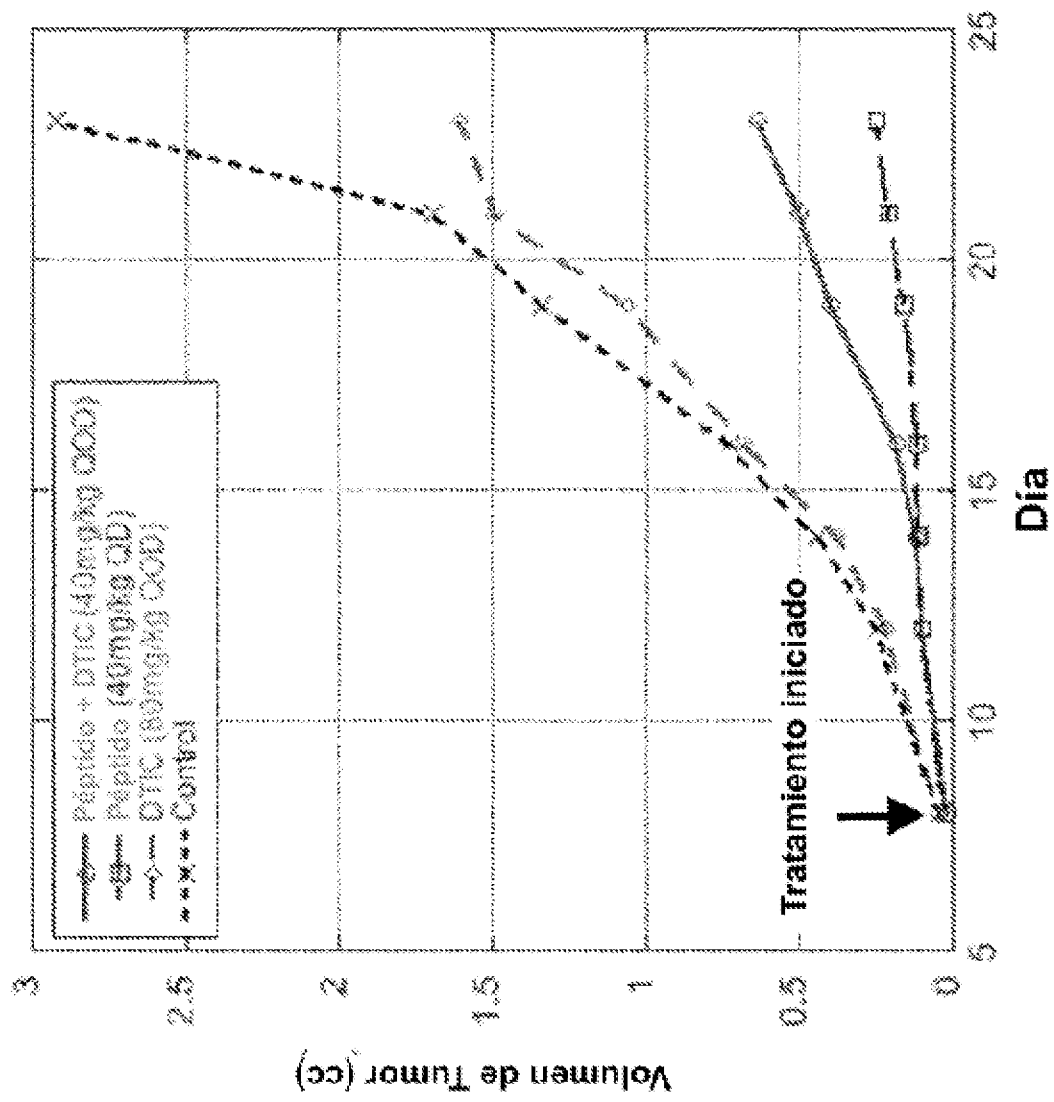


Fig. 16

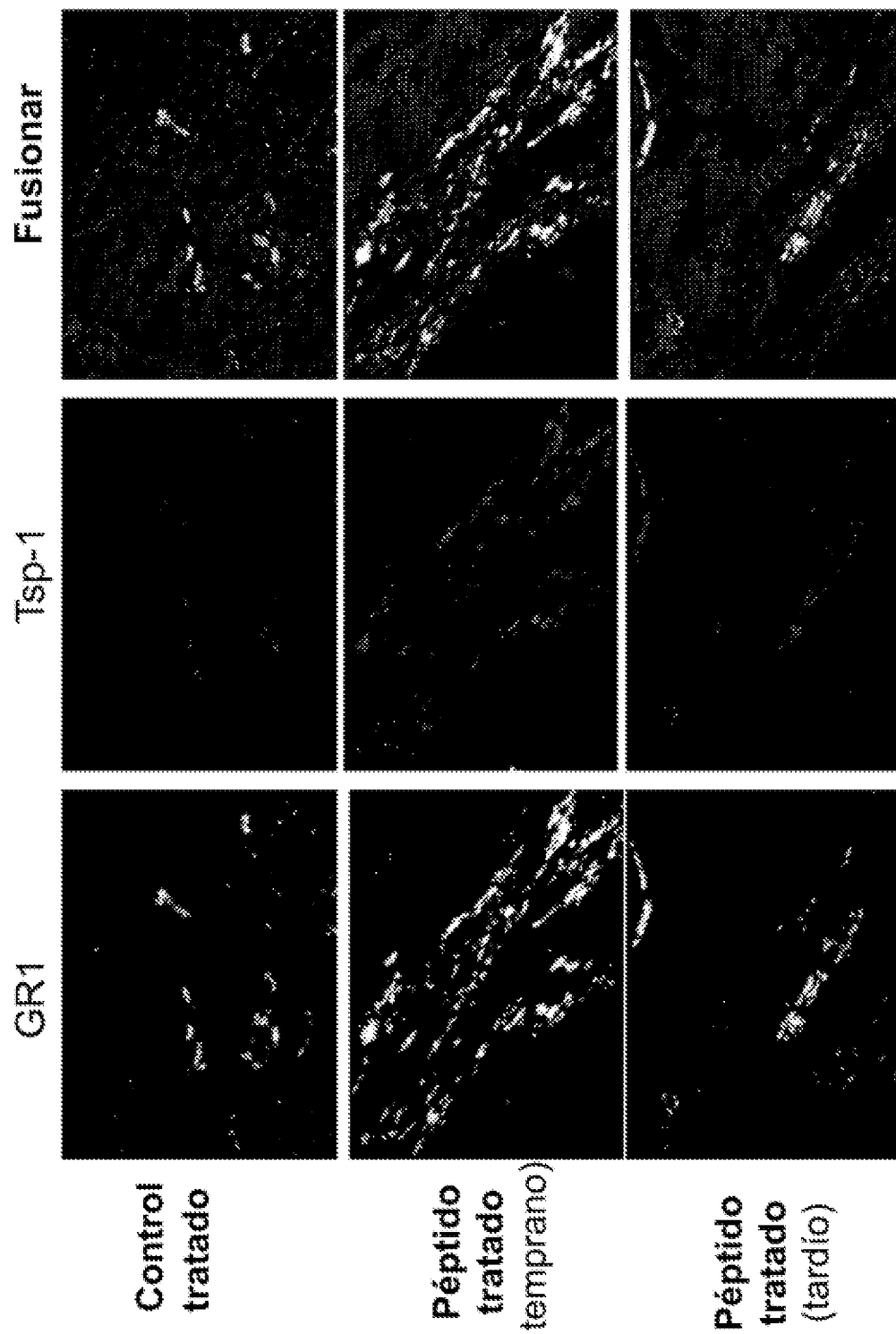
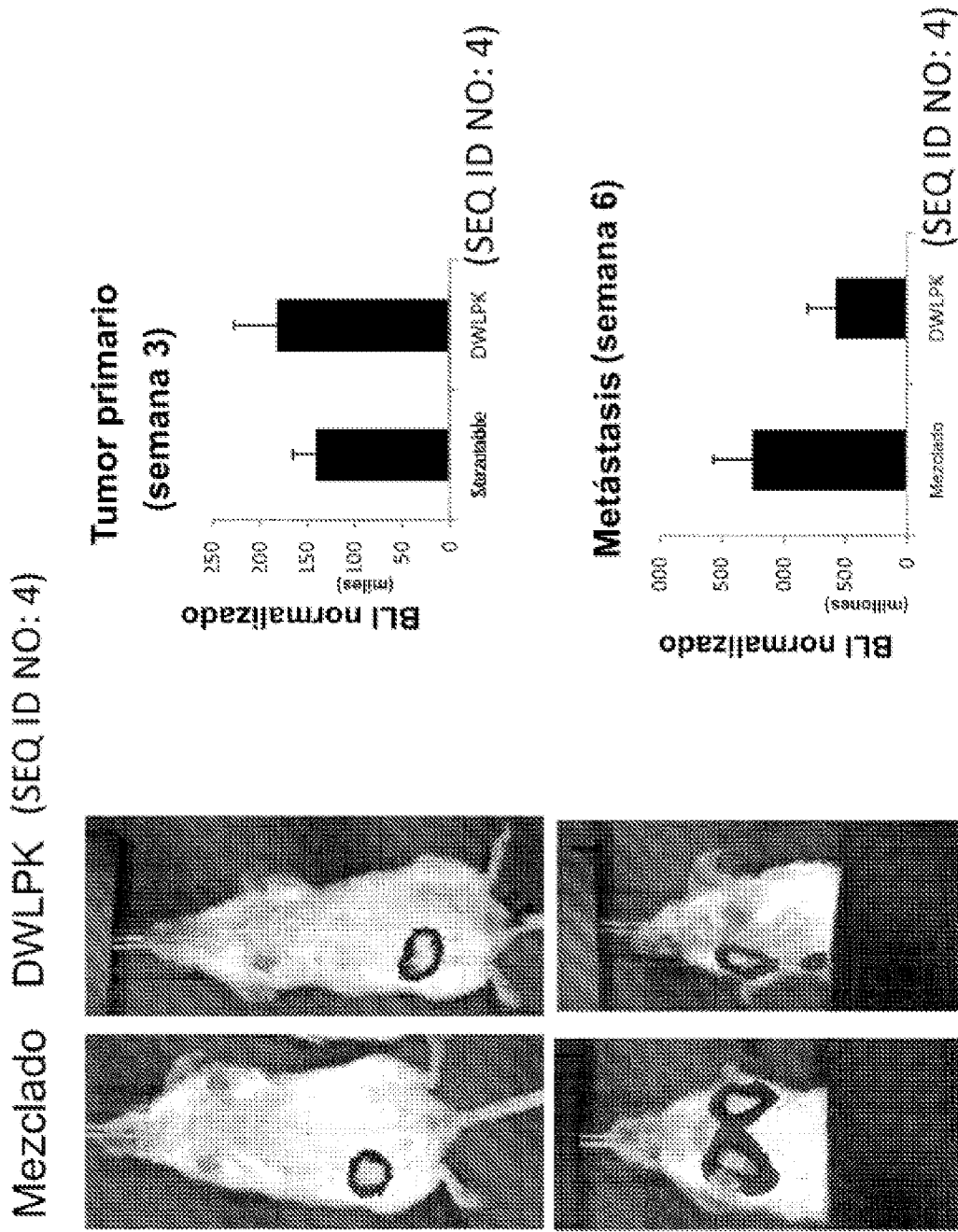


Fig. 17



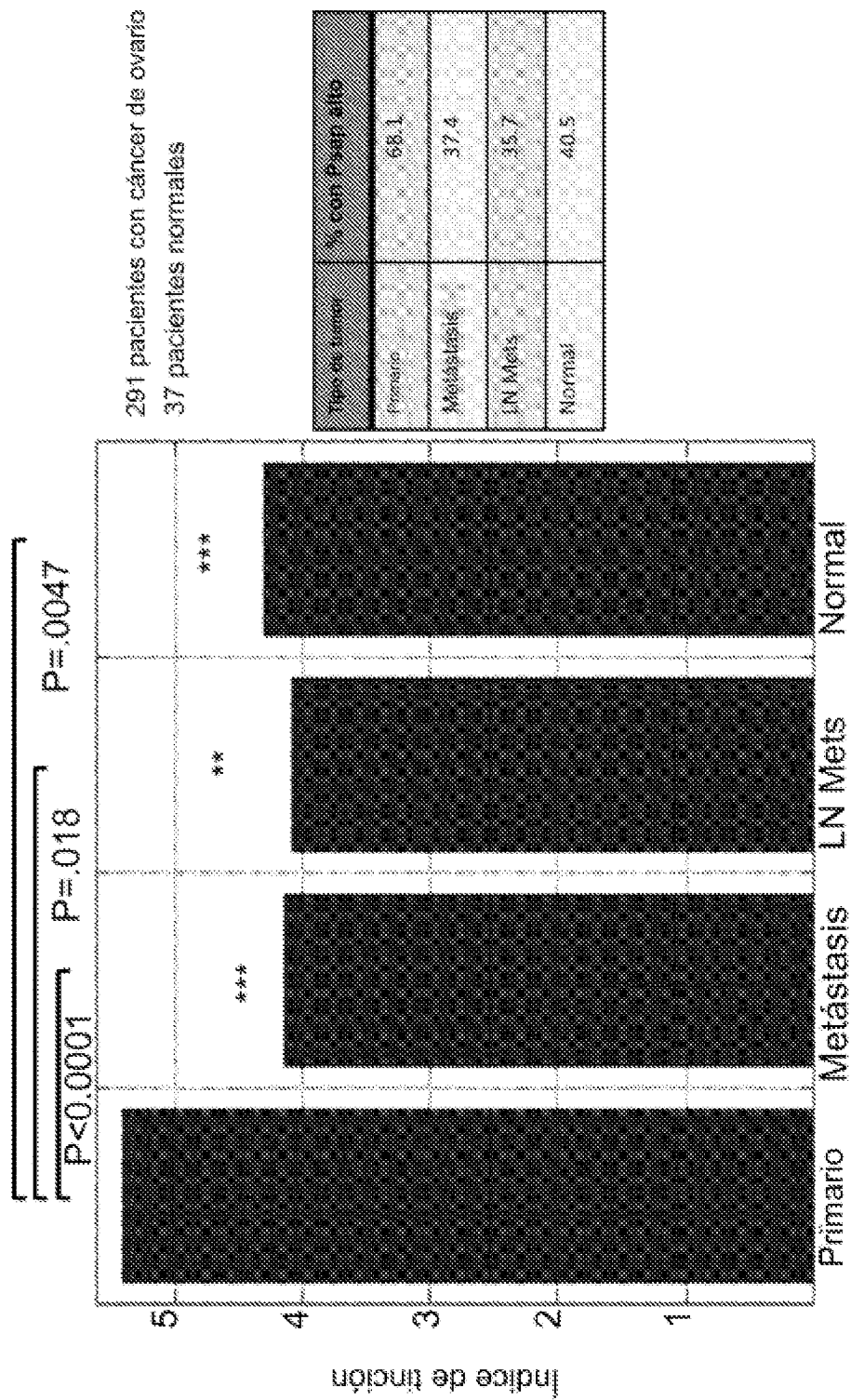
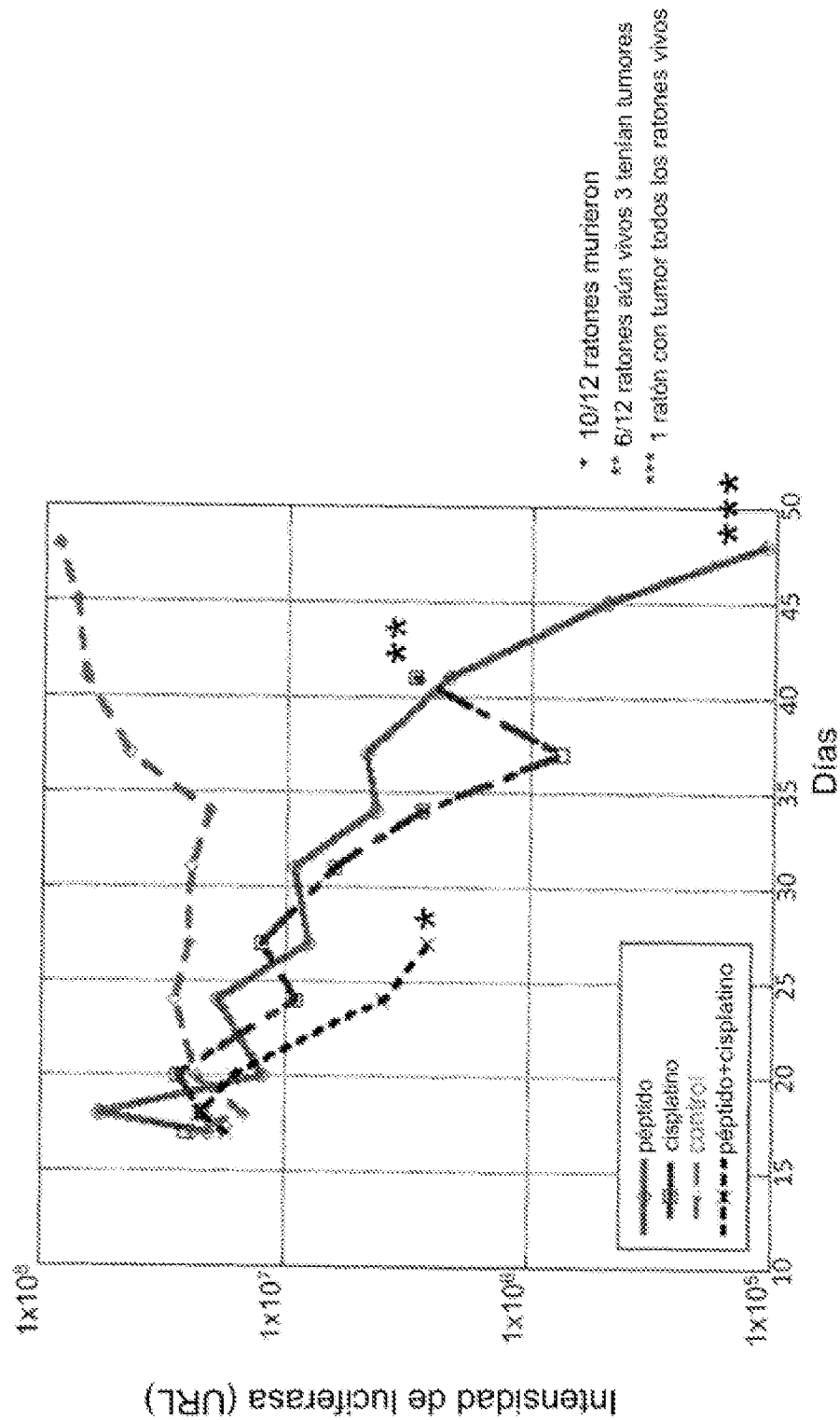


Fig. 19



Se inyectó 1 millón de células de cáncer de ovario por vía intraperitoneal y comenzó el tratamiento 17 días después con cisplatino (4 mg/kg QOD), una combinación de cisplatino y psaptida o PBS QD. Los ratones tratados con cisplatino perdieron entre ~35%-40% de peso corporal, los ratones tratados con psaptida no perdieron peso.

Fig. 20

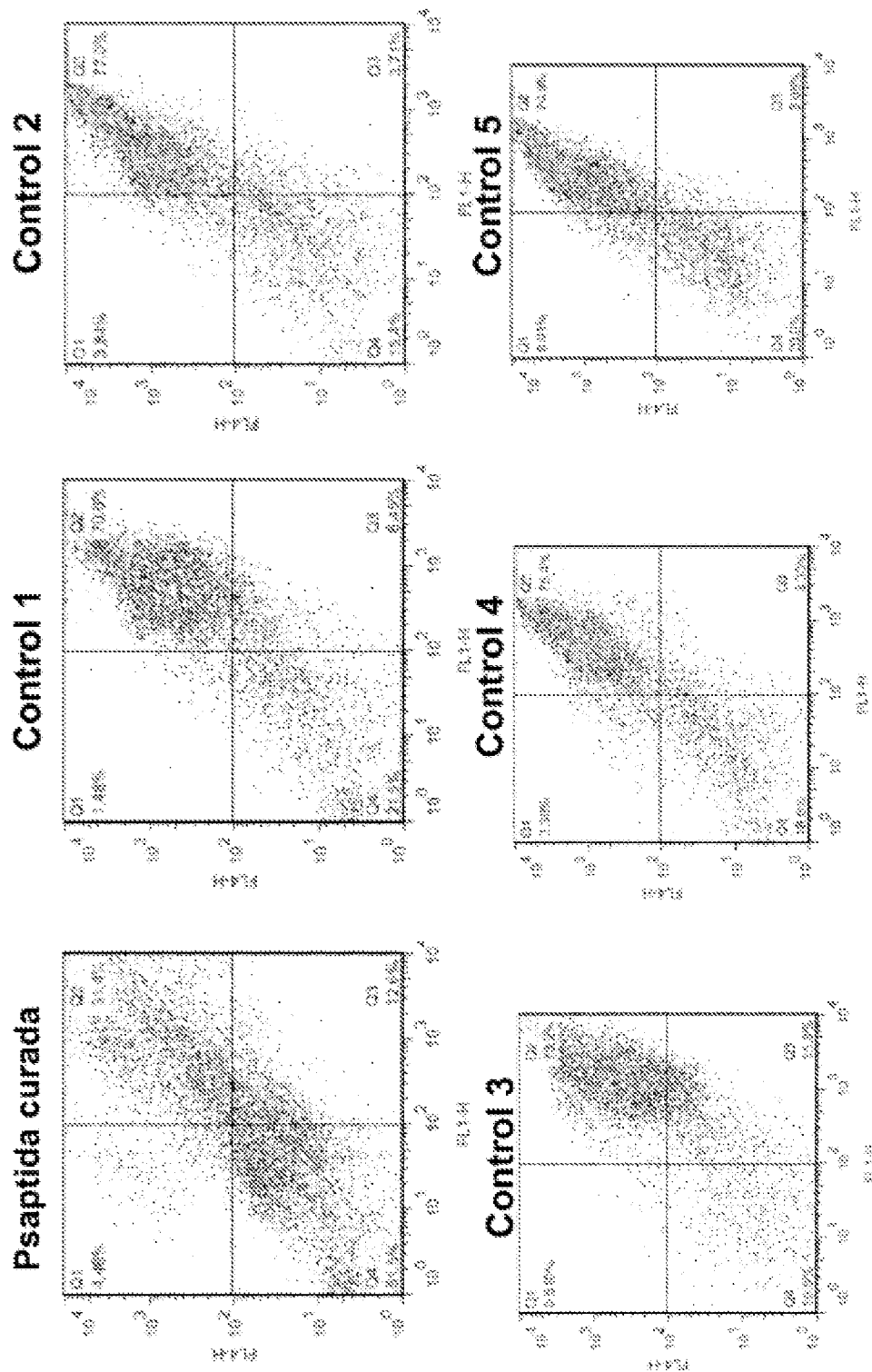


Fig. 21

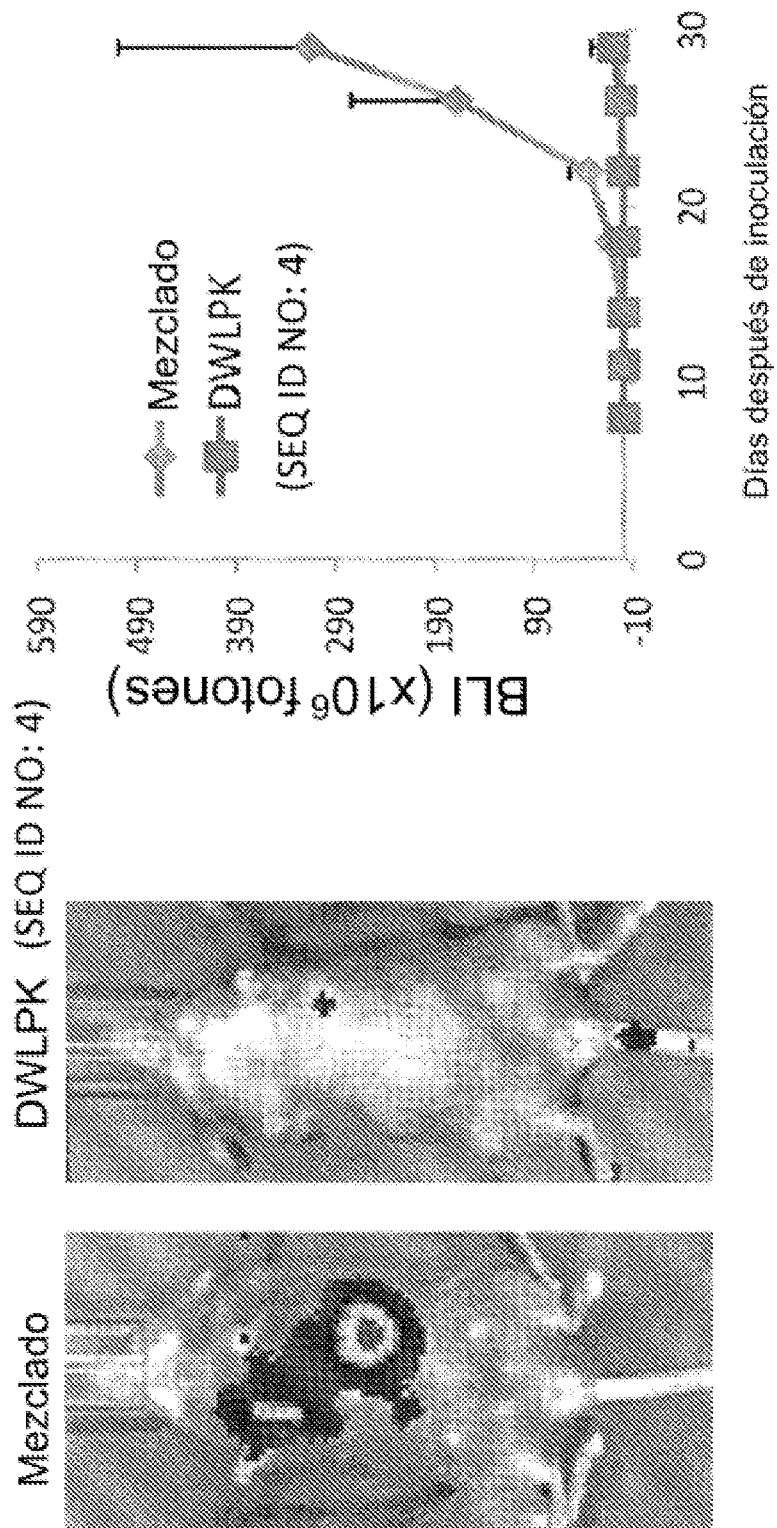
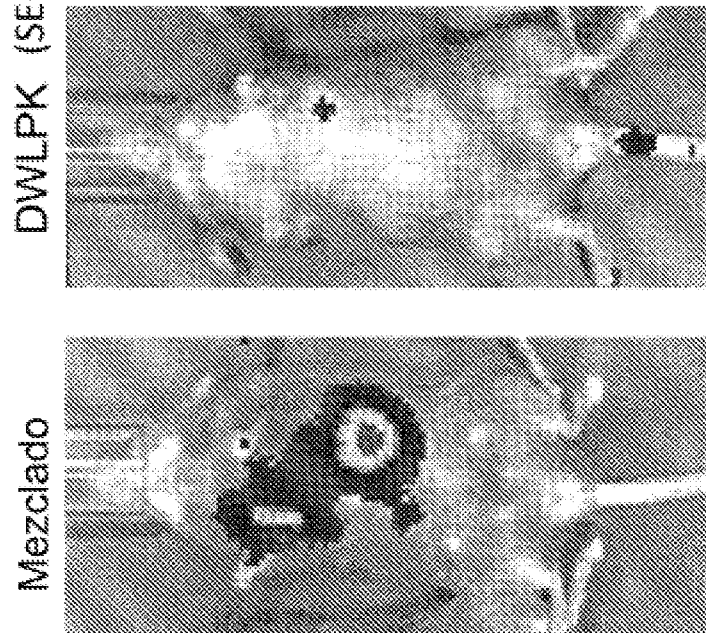


Fig. 22



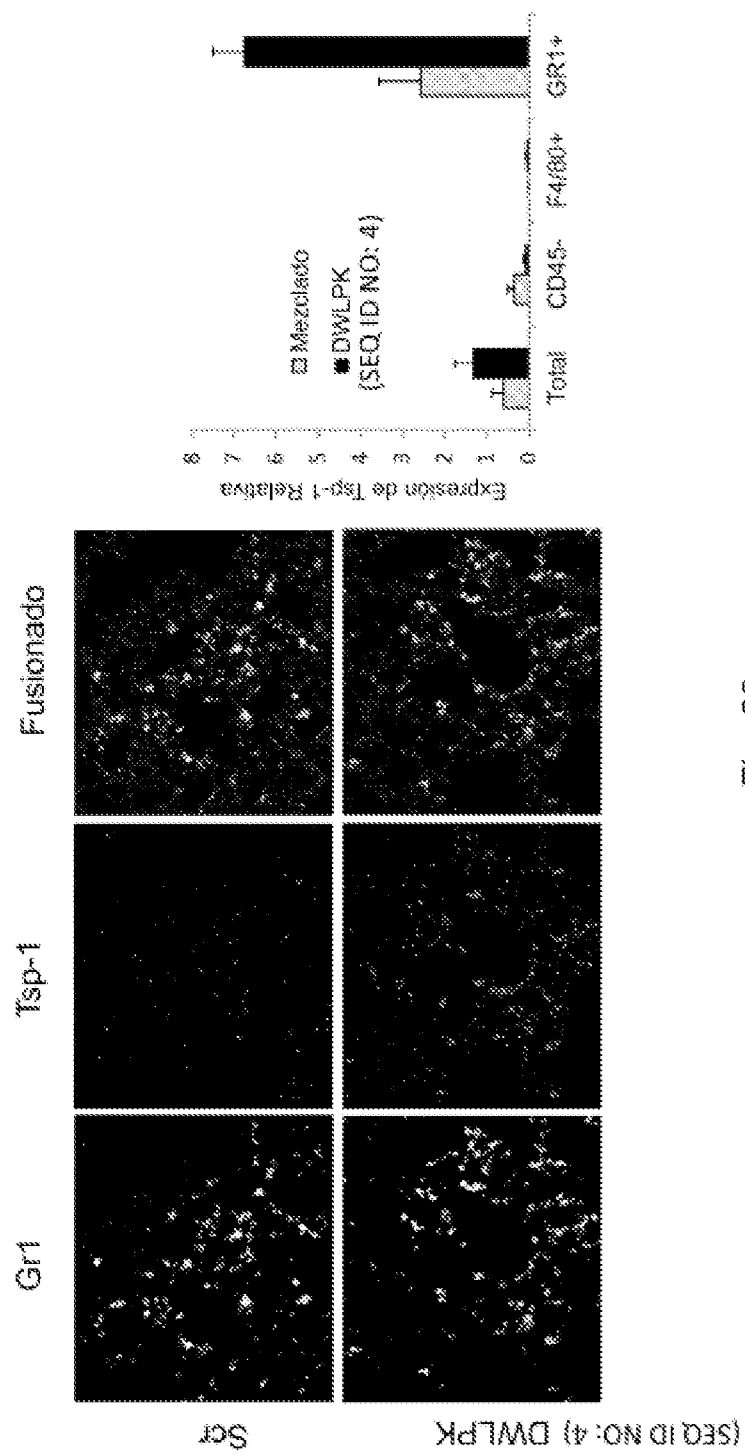


Fig. 23

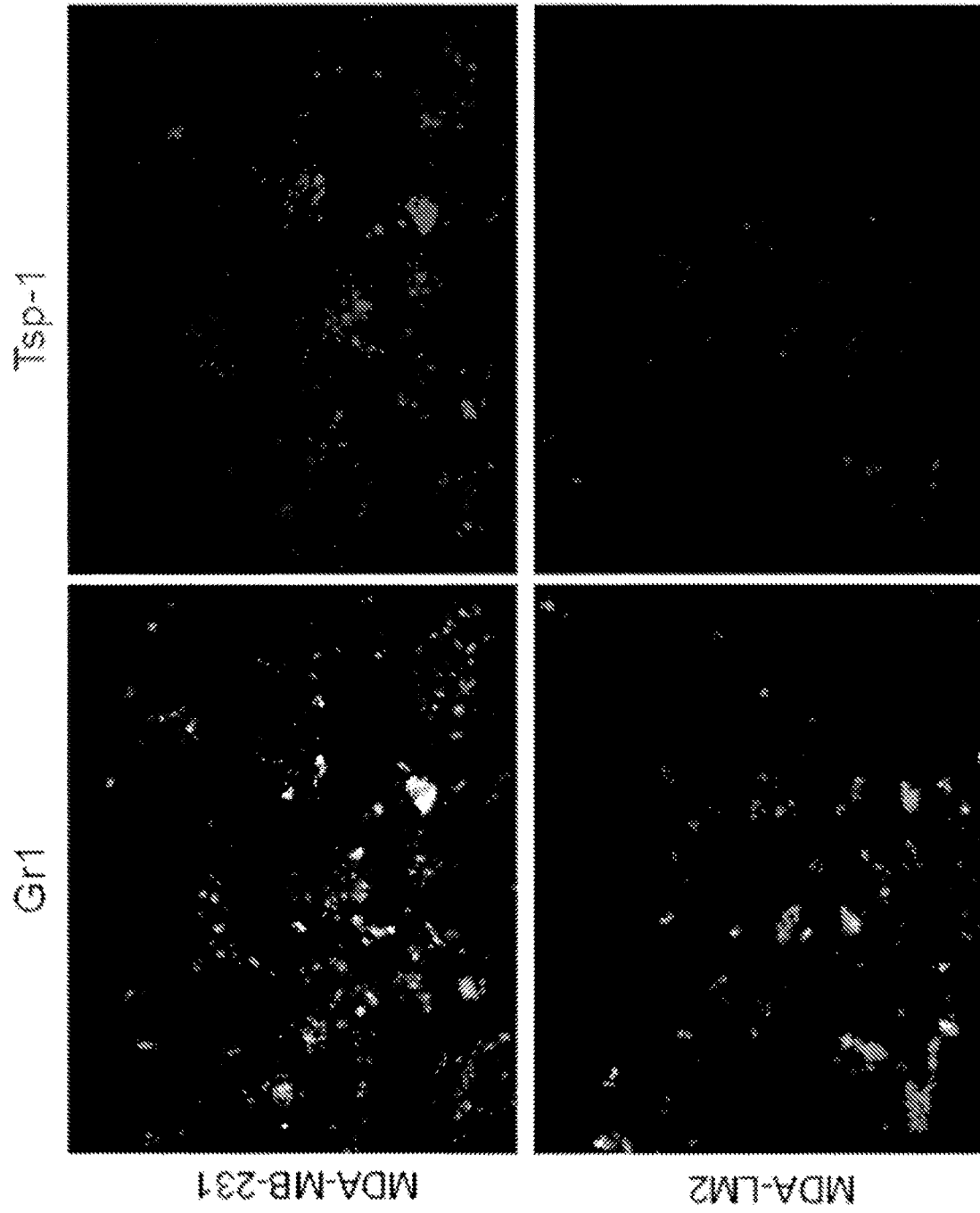
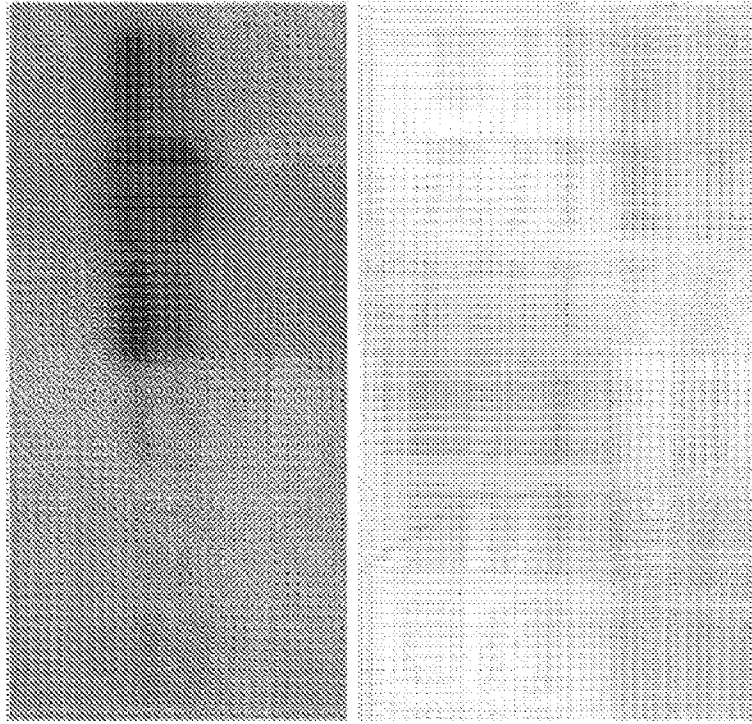


Fig. 24

Mezclado DWL PK (SEQ ID NO: 4)



Tsp-1

Ponceau S

Glóbulos Blancos

Fig. 25