(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 360 004**

(51) Int. Cl.:
C07K 7/64 (2006.01)
C07K 5/12 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07731176 .9**
(96) Fecha de presentación : **22.03.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1996608**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

(54) Título: **Ciclopéptido con actividad anticancerígena derivado del colágeno de tipo IV.**

(30) Prioridad: **23.03.2006 FR 06 02530**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2011

(73) Titular/es:
Université de Reims Champagne-Ardenne
Villa Douce, 9, boulevard de la Paix
51097 Reims Cédex, FR

(72) Inventor/es: **Monboisse, Jean-Claude, Paul, Louis;**
Floquet, Nicolas, Joseph, Gilbert;
Thevenard, Jessica, Andree, Mireille;
Ramont, Laurent, Gabriel, Emile y
Brassart, Sylvie, Anne, Yvonne

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un ciclopéptido homodético. Es decir, que el ciclo se realiza mediante la ciclización de los grupos amina y carboxilo de los aminoácidos N- y C-terminales, formando así un péptido cíclico unido por un enlace amida, caracterizado porque comprende la secuencia YSNS; o un ciclopéptido, cuyo ciclo comprende la secuencia YSNS y tiene un número de residuos de aminoácidos comprendido entre 4 y 6. De manera particular, el ciclopéptido es un pentapéptido, que forma una estructura en codo β a nivel de los aminoácidos YSNS, y susceptible de ser obtenido mediante la formación de una unión peptídica entre los dos aminoácidos de los extremos del pentapéptido representado linealmente. En un modo de realización preferido, el ciclopéptido de la invención es capaz de fijarse a la integrina αVβ3.

La utilización de un ciclopéptido tal como se ha definido anteriormente en el tratamiento del cáncer, y más particularmente en el tratamiento de las diferentes formas (o estados) del melanoma, así como en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, forma parte asimismo de la invención. El ciclopéptido está particularmente adaptado a la administración de una composición que lo contiene, por vía oral.

El melanoma es el segundo cáncer en el ser humano en términos de número de años de vidas perdidos. Durante los diez últimos años, su incidencia ha aumentado de manera más importante (3 a 5% por año) que los demás tipos de cáncer, con la excepción del cáncer bronquial en la mujer. En el año 2000, se estimaba que uno de cada 100 individuos desarrollaría un melanoma a lo largo de su vida, y que uno de cada 2 pacientes tendría menos de 50 años. Este tipo de cáncer se vuelve ineludiblemente un problema principal de salud pública. El melanoma es un tumor maligno de muy mal pronóstico con un riesgo elevado de metástasis ganglionares y viscerales.

Durante los últimos años, se ha estudiado el mecanismo tumoral y se han explicado poco a poco los mecanismos subtendentes a la progresión tumoral. Así, durante la progresión tumoral, las células cancerígenas dejan el tumor primario, atraviesan las membranas vasculares y migran en el seno de la matriz extracelular cercana.

El conjunto de estos fenómenos implica la secreción y después la activación de enzimas proteolíticas, tal como las metaloproteinasas matriciales (MMP) o el sistema de activación del plasminógeno (Hornebeck W. *et al.*). El perfil de expresión de estas enzimas proteolíticas, estudiado en diversas líneas de células de melanoma humano o de ratón, revela un aumento muy elevado de la expresión de diversas MMP, de manera correlacionada con el fenotipo invasivo de estas células (Egeblad M *et al.*). La expresión en la superficie celular de MMP-2, funcionalmente activa, influye directamente en la adhesión y en la extensión de las células sobre los componentes de la matriz extracelular y de las membranas basales, y favorece la migración y la invasión de estas células.

La activación de la MMP-2 requiere la formación de complejos con su inhibidor, el TIMP-2, y otra MMP transmembranaria, la MT1-MMP o MMP-14 (Egeblad M *et al.*). Requiere asimismo la presencia de la integrina αVβ3 cuya expresión aumenta con el grado de invasión de las células de melanoma. Esta integrina sirve de receptor membranario de la MMP-2, favorece su activación y focaliza la forma activa de la MMP-2 a los lamelipodios, que inducen la progresión de la célula cancerígena en el seno de la matriz extracelular (Settor REB *et al.*; Deryugina EI *et al.*). Además, durante la progresión tumoral, intervienen numerosos fenómenos inflamatorios que implican la activación de células inflamatorias (polinucleares, neutrófilos, monocitos, macrófagos, etc.) que desembocan en la liberación de diversas citocinas y factores de crecimiento, pero también de MMP, tal como la MMP-9.

El aumento del volumen tumoral provoca una hipoxia y una falta de aportación de los nutrientes para las células tumorales. Los efectos se superan mediante la angiogénesis tumoral, mecanismo de neovascularización que nace en el seno de los tumores a partir de una red capilar preexistente. Es indispensable para el crecimiento de los tumores y el desarrollo de las metástasis, debido a que restablece la aportación de oxígeno y de nutrientes. La activación de las células endoteliales, inducida por la hipoxia y los protooncogenes en el seno de los tumores, conduce a la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular cercana poniendo en juego las cascadas proteolíticas implicadas en la progresión tumoral. La migración orientada de las células endoteliales está seguida de una fase proliferativa. Las células se organizan en una estructura de tipo capilar para formar la red vascular intratumoral. La angiogénesis es un factor pronóstico en diversos canceres, incluyendo el melanoma.

La única función de soporte mecánico se debió durante mucho tiempo a las macromoléculas de la matriz extracelular. Se ha demostrado, desde hace varios años, que ciertos dominios proteicos constitutivos de estas macromoléculas podían asimismo controlar diversos eventos fisiopatológicos tales como la diferenciación celular, la apoptosis o la expresión de los genes. Las matrikinas son unos péptidos procedentes de la proteolisis parcial de las macromoléculas de la matriz extracelular capaces de regular la actividad biológica de numerosos tipos celulares (Maquart FX *et al.*). Las moléculas de la matriz extracelular, y más particularmente los diversos constituyentes de las membranas basales (colágeno de tipo IV, XV y XVIII, lamininas, proteoglicanos, etc.) pueden regular la adhesión y la migración de las células cancerígenas, por medio de ciertas matrikinas (Pasco S *et al.* (2004); Ortega N *et al.*). Asimismo, estas últimas pueden asegurar un control de la expresión y/o de la activación de las proteasas puestas en juego durante la progresión tumoral.

Entre las macromoléculas de las membranas basales, el colágeno de tipo IV que es el principal constituyente de éstos, desempeña una función preponderante en este control por medio del dominio no colagénico (NC1) de sus diferentes cadenas. Está constituido por la asociación en triple hélice de tres cadenas polipeptídicas α(IV), entre 6 posibles,

α1(IV) a α6(IV), cada una codificada por un gen diferente (Kalluri R.). La asociación más frecuente corresponde a [α1(IV)2; α2(IV)]; se encuentra en el conjunto de las membranas basales. Otras asociaciones, menos determinadas, contienen las cadenas α3(IV) a α6(IV), denominadas menores debido a su baja expresión. La cadena α3(IV) presenta una distribución tisular muy especializada (alvéolo pulmonar, glomérulo renal, cápsula del cristalino, etc.) (Kalluri R). Unas matrikinas derivadas de los dominios NC1 de las cadenas α(IV) del colágeno de tipo IV, o de su dominio helicoidal, introducen la adhesión de las células cancerígenas y controlan sus propiedades invasivas (Pasco S *et al.* (2004); Ortega N *et al*.; Kalluri R).

Los estudios anteriores se han concentrado en el dominio C-terminal de la cadena α3(IV) (aminoácidos 1438 a 1670 de la secuencia NP_000082; Número de registro NCBI) denominado dominio NC1 (noncollagenous domain) que resultó extremadamente interesante a la vista de los resultados siguientes:

- el dominio NC1 de la cadena α3(IV) posee una actividad inhibidora sobre la proliferación y las propiedades invasivas de diversas líneas de células cancerígenas. Más particularmente, un péptido constituido por los aminoácidos 185 a 203 del dominio NC 1α3(IV) (CNYYSNSYSFWLASLNPER) puede inhibir la proliferación de estas diversas líneas celulares. Por el contrario, los péptidos constituidos por las secuencias homólogas de las demás cadenas α(IV) no tienen ningún efecto sobre estas mismas líneas (Han J *et al.*; Shanan S *et al.*).

- por otra parte, unos péptidos de secuencia [NC1 α3(IV) 185-203] inhiben la migración de células de melanomas o de fibrosarcoma *in vitro*. Esta inhibición de la migración de las células tumorales parece ser explicada por el efecto inhibidor de la secuencia [NC1 α3(IV) 185-203] sobre la fijación de la MMP-2 a la membrana plásmica pero también por el efecto inhibidor sobre la activación de la MMP-2 (Pasco S *et al.* (2000a)). Se han obtenido unos resultados comparables con unas células cancerígenas bronquiales (Martinella-Catusse *et al.*, 2001).

- la secuencia [NC1 α3(IV) 185-203] se fija al complejo integrina αVβ3-proteína CD47 presente en la superficie de las células de melanoma (Shahan TA *et al.*). Más precisamente, la secuencia [NC1 α3(IV) 185-203] se fija sobre la sub-unidad β3 de la integrina, independientemente de CD47 y de la sub-unidad α asociada (Pasco S *et al.* (2000b)). Asimismo, el dominio de interacción entre esta secuencia y la sub-unidad β3 es independiente del sitio de reconocimiento de la secuencia RGD, que sirve de sitio de reconocimiento para numerosas proteínas de la matriz extracelular sobre diversas integrinas.

- el péptido sintético [NC1 α3(IV) 185-203] inhibe el crecimiento tumoral de las células B16F1 de melanoma murino, preincubadas con el péptido sintético [NC1 α3(IV) 185-203], y después inyectadas en unos ratones singénicos C57BL6; esta inhibición se ejerce mediante una disminución de la proliferación de las células de melanoma y de sus propiedades invasivas y mediante la disminución de la expresión de MMP-2 y de los activadores del plasminógeno, uPA y tPA. Este efecto inhibidor depende de la conformación estructural de la secuencia [NC1 α3(IV) 185-203] que forma un codo β a nivel de los aminoácidos YSNS (188-191) indispensable para su actividad biológica. La ausencia de este codo en unos análogos estructurales anula la actividad biológica (Floquet *et al.*).

- un péptido de secuencia α3(IV) 185-203 es capaz de inhibir la angiogénesis *in vitro* así como *in vivo*, tal como se ha mostrado en unas secciones histológicas realizadas en los tumores tratados por este péptido y en el seno de las cuales el número de vasos sanguíneos ha disminuido claramente (Pasco S *et al.* 2005).

- la actividad inhibidora de la secuencia α3(IV) 185-203 sobre el crecimiento tumoral de células de melanomas puede ser reproducida mediante la utilización de un heptapéptido lineal, que contiene 7 aminoácidos N-terminales CNYYSNS del dominio, incluyendo la secuencia YSNS. Unos estudios estructurales han mostrado la formación de una estructura en codo β a nivel del tetrapéptido YSNS, indispensable para la actividad biológica. Unos péptidos homólogos que no presentan esta conformación particular están desprovistos de actividad biológica (Floquet *et al.*).

A pesar de la comprensión de estos diferentes mecanismos utilizados en la iniciación y la evolución de los melanomas, los tratamientos propuestos son poco numerosos, y sobre todo están limitados en su eficacia. Así, la exéresis quirúrgica es actualmente el único tratamiento curativo del melanoma de estado 1. Debe ser precoz y amplia. En estados más avanzados, y en particular después de la diseminación metastática, los tratamientos paliativos actuales son decepcionantes y poco eficaces. Están representados sobre todo por la poliquimioterapia y han progresado muy poco.

La presente invención propone unas moléculas, y más particularmente unas moléculas elaboradas a partir de péptidos derivados del colágeno de tipo IV, que tienen unas propiedades antitumorales, y que responden a la exigencias impuestas para su utilización en terapia, a saber, una buena solubilidad y biodisponibilidad y una actividad biológica eficaz.

La invención se refiere a un ciclopéptido homodético. Es decir, que el ciclo se realiza mediante la ciclización de los grupos amina y carboxilo de los aminoácidos N- y C-terminales, formando así un péptido cíclico unido mediante un enlace amida, caracterizado porque comprende la secuencia YSNS; o un ciclopéptido, cuyo ciclo comprende la secuencia YSNS, y tiene un número de residuos de aminoácidos comprendido entre 4 y 6. Según un modo de realización particular de la invención, este ciclopéptido es capaz de fijarse a la integrina αVβ3.

Por el término “ciclopéptido” se entiende una molécula formada por una secuencia de residuos de aminoácidos (péptido) para la cual existe por lo menos un enlace estable entre dos de estos residuos, permitiendo la formación de un ciclo constituido por el conjunto de los residuos de aminoácidos o por una parte de la secuencia de los aminoácidos de dicha parte que comprende los residuos YSNS consecutivos, o bien unidos entre sí mediante unos enlaces peptídicos, o bien para por lo menos dos de ellos mediante dicho enlace estable. Dicho enlace estable cierra por lo tanto el ciclo, a nivel de dos residuos de la secuencia de aminoácidos. Alternativamente, se utilizará asimismo la expresión “péptido cíclico” por oposición a los términos “péptido lineal” o “péptido acíclico”.

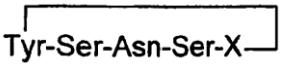
Mediante la expresión “ciclopéptido homodético” se entiende un ciclopéptido que consiste únicamente en unos residuos de aminoácidos unidos entre sí por unos enlaces peptídicos o enlaces eupéptidos (enlace peptídico entre la función alfa-carboxilo de un aminoácido y la función alfa-amina de otro aminoácido). Por el contrario, los ciclopéptidos heterodéticos consisten en unos residuos de aminoácidos unidos entre sí por unos enlaces peptídicos y por lo menos por un enlace de otra naturaleza tal como los enlaces éster, puente disulfuro, enlace carbono-carbono, enlace carbono-nitrógeno, enlace nitrógeno-hidrógeno o enlace carbono-azufre. En este caso, el enlace puede producirse entre las funciones de los aminoácidos N- y C-terminales, entre la función de un aminoácido terminal y la función de una cadena lateral (aminoácido interno) o entre dos cadenas laterales.

En un modo de realización particular, la invención se refiere a un ciclopéptido homodético que comprende la secuencia YSNS.

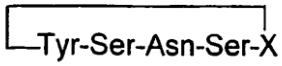
Los ciclopéptidos de la invención, o en un modo de realización particular, el ciclo de estos ciclopéptidos tienen un tamaño de por lo menos 4 aminoácidos, y por ejemplo un tamaño inferior a 10 aminoácidos, y particularmente un número de residuos de aminoácidos comprendido entre 4 y 6, y de forma más particular, exactamente 4 (ciclotetrapéptido), exactamente 5 (ciclopentapéptido) o exactamente 6 (ciclohexapéptido).

En un modo de realización particular, el ciclopéptido según la invención no consiste en un ciclopéptido de secuencia ACPYSNSSLC.

A título de ejemplo, un ciclopentapéptido heterodético según la invención se representará mediante la fórmula



o

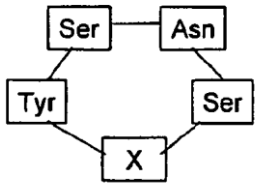


en la que un trazo horizontal al lado del aminoácido indica un enlace con la función amina o carboxilo (normalmente introducida en el enlace peptídico), y un trazo vertical por encima del aminoácido indica un enlace con otro grupo diferente de los indicados anteriormente.

A título de ejemplo, un ciclopentapéptido homodético está representado por cualquiera de las fórmulas siguientes:

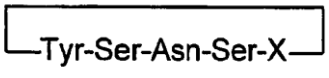
(I) ciclo(Y-S-N-S-X) o ciclo(Tyr-Ser-AsN-Ser-X),

(II)



o

(III)



Entre las propiedades funcionales de los ciclopéptidos de la invención que ilustran su utilidad en la elaboración de composiciones antitumorales, en un modo de realización particular, éstos se fijan a la integrina $\alpha V\beta 3$. En un modo de realización particular, los ciclopéptidos tienen una fijación a la integrina $\alpha V\beta 3$ por lo menos tan eficaz como la del péptido lineal de secuencia [NC1 $\alpha 3$(IV) 185-203] y/o del heptapéptido lineal CNYYSNS. De manera todavía más

particular, la fijación del ciclopéptido a la integrina αVβ3 es más eficaz que la de los péptidos lineales descritos anteriormente.

Los estudios de fijación del heptapéptido lineal CNYYSNS o del ciclopéptido YSNSG de la invención se realizan mediante competición con el péptido nativo lineal [NC1 α3(IV) 185-206] marcado con biotina (Pasco *et al.*, 2000b). Brevemente, unas células de melanoma, por ejemplo unas células UACC903, HT-144 o A-375 (10^6 células) son preincubadas *in vitro* durante 15 minutos en presencia del heptapéptido lineal CNYYSNS (0 a 200 μM) o del ciclopéptido YSNSG (0 a 200 μM). Las células se lavan 3 veces, y después se incuban durante 30 minutos con el péptido [NC1 α3(IV) 185-206] marcado con biotina. Las células se lavan después 3 veces y se incuban con un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con FITC (fluoresceína isotiocianato) dilución 1:75. Las células se fijan después y se analizan en inmunofluorescencia.

Asimismo, las regiones potenciales de interacción del péptido o de los péptidos cíclicos de la invención y/o sus versiones lineales, se caracterizan por unos métodos de acoplamiento molecular (docking). Estos métodos consisten en predecir el modo de unión y la afinidad de ligandos flexibles, conociendo la estructura de la diana, considerada como rígida. Se ha publicado la estructura de la integrina αVβ3. Con el programa Autodock, el protocolo de estudio de "docking" consiste en leer la estructura de la diana (disponible en Protein Data Bank), y después en ensayar sucesivamente todas las posiciones y orientaciones posibles del ligando en su superficie. Las posiciones se clasifican según una función de resultados que describen la energía libre de fijación del ligando a la proteína diana. Las mejores posiciones se analizan en términos de regiones de fuertes afinidades a la superficie del receptor (clusters). Las regiones en cuestión son experimentalmente verificadas a continuación estudiando las interacciones entre los péptidos de la invención y unos dominios recombinantes, mutados para los aminoácidos implicados, de la integrina β3, mediante la técnica que utiliza un aparato Biacore.

Los ciclopéptidos de la invención, ya sean en particular homodéticos o heterodéticos, pueden ser caracterizados asimismo por la presencia a nivel de los aminoácidos YSNS de una estructura en codo β, tal como la representada en la figura 1. De manera particular, los ángulos diedros φ y ψ de los dos residuos centrales del codo Y(SN)S son respectivamente de aproximadamente -90 y aproximadamente -66 grados. El codo β correspondiente es próximo a un codo β de tipo I. Así, el codo β formado por los aminoácidos YSNS es del tipo I, del tipo VIII (clasificación según Hutchinson EG *et al*.) o similar a estos tipos de codo β debido a los ángulos diedros mencionados anteriormente. De manera particular, el ciclopéptido de la invención presenta un codo β que tiene un valor ψ+1 de aproximadamente -60º y un valor φ+2 de aproximadamente -90º. La presencia de un codo β en uno de los ciclopéptidos de la invención requiere que los enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos Y_1 y S_2, S_2 y N_3 y N_3 y S_4 estén en una orientación trans.

Los ciclopéptidos de la invención tienen unas capacidades anti-tumorales ilustradas por el hecho de que se verifica por lo menos una de las propiedades siguientes: su capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales, su capacidad para inhibir la migración de células tumorales o una actividad anti-angiogénica. Se considera que un ciclopéptido tiene por lo menos una de estas propiedades si la inhibición citada anteriormente de la proliferación o de la migración celular, o la actividad anti-angiogénica es por lo menos tan eficaz como la registrada con el heptapéptido lineal CNYYSNS.

La inhibición de la proliferación o de la migración de las células tumorales se puede ensayar como se indica en la parte titulada "métodos", en los puntos A.9 y A.10 respectivamente. Los experimentos descritos en estos párrafos se pueden llevar a cabo con cualquier tipo de células tumorales, y particularmente unas células tumorales de melanoma tales como las células UACC-903, las células HT-144 (ATCC HTB-63), las células A375 (ATCC CRL-1619) o las células G-361 (ATCC CRL-1424) (LGC Promochem-ATCC). En cuanto a la actividad anti-angiogénica, ésta se puede ensayar según el método descrito en el punto A.15 sobre unas células endoteliales tales como unas células HMEC-1 (Ades, Atlanta) o unas células HUVEC (Promocell, Heidelberg, Alemania).

Así, se considera eficaz un ciclopéptido según la invención a nivel de la inhibición de la proliferación de células tumorales (y más particularmente de células procedentes de melanoma) cuando, en presencia de dicho ciclopéptido, el porcentaje de proliferación de las células observado *in vitro* y preferentemente *in vivo* se reduce por lo menos 20%, por lo menos 30% o por lo menos 40%, con unas concentraciones en ciclopéptido tan bajas como 5 a 20 μM. De manera preferida, una reducción de 50% de la proliferación de las células tumorales se alcanza con una concentración de 20 μM para un número inicial de 20.000 células por pocillo.

Por otra parte, se considera eficaz un ciclopéptido según la invención a nivel de la inhibición de la migración de células tumorales (y más particularmente de células procedentes de melanoma) cuando el número de células observadas se reduce en un factor de por lo menos 1,5 después de la observación *in vitro* y preferentemente *in vivo*. Preferentemente, una reducción de un factor 2 se considera como particularmente eficaz a una concentración de 20 μM para un número de células inicial de 5.10^4.

Por último, la actividad anti-angiogénica se evalúa mediante la capacidad de las células endoteliales (células HMEC-1 o células HUVEC) para formar unos pseudotubos capilares cuando se cultivan sobre un gel de Matrigel. Se considera que un ciclopéptido según la invención tiene una actividad anti-angiogénica cuando el porcentaje del número o del tamaño de los pseudotubos capilares se reduce por lo menos 40%, preferentemente por lo menos 50%, para una

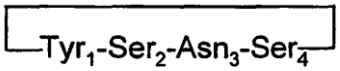
concentración de por lo menos 10 μM de ciclopéptido.

Además de las características funcionales anteriores, el ciclopéptido de la invención es suficientemente biodisponible y/o estable para ser utilizado en unas composiciones farmacéuticas. En particular, el ciclopéptido es asimismo tan biodisponible y/o estable como el heptapéptido lineal CNYYSNS.

Mediante la expresión "péptido biodisponible" se entiende un péptido capaz de atravesar las diferentes barreras biológicas para alcanzar las células diana después de su administración, y particularmente atravesar la barrera intestinal después de la administración oral. La biodisponibilidad se evalúa para un tipo celular seleccionado según la aplicación prevista.

Mediante la expresión "péptido estable" se entiende un péptido que tiene una duración de vida, una vez administrado *in vivo*, suficiente para alcanzar las células diana y ejercer su acción biológica. Dicho péptido tiene en particular una conformación que le permite estar protegido frente a la degradación por las proteasas celulares, y conservar al mismo tiempo su actividad biológica. Una indicación de la estabilidad del péptido se puede obtener mediante unos ensayos realizados *in vitro*. La degradación *in vitro* del ciclopéptido se mide por contacto con diversas proteasas purificadas, disponibles comercialmente, durante unos periodos de incubación de duración creciente (1 hora a 72 horas por ejemplo). La degradación del péptido se demuestra a continuación mediante HPLC en fase inversa, comparando los perfiles obtenidos antes y después de la digestión. La actividad biológica de los péptidos sometidos a la degradación proteolítica se verifica mediante la medición de la inhibición de la migración de las células tumorales según la técnica descrita.

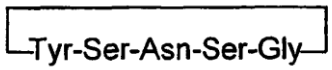
En un modo de realización particular, el ciclopéptido es un tetrapéptido de secuencia YSNS, que se puede representar mediante la fórmula:



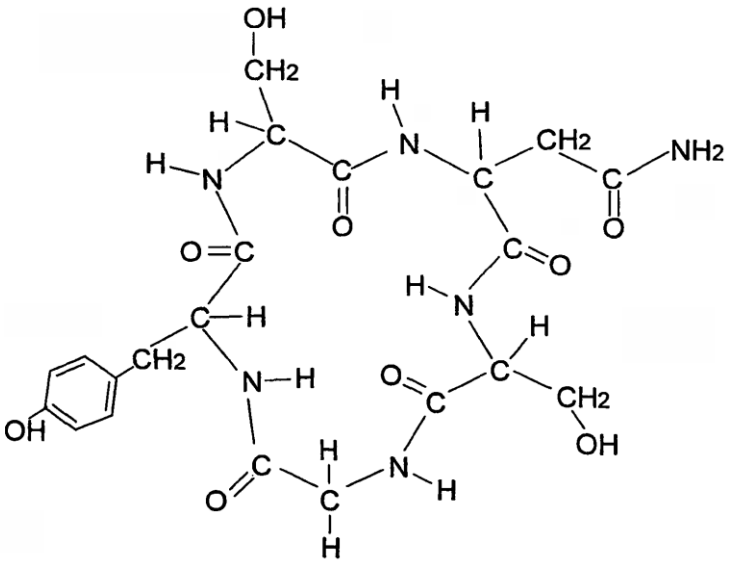
La ciclización del péptido lineal YSNS está facilitada por la proximidad que existe entre los grupos Cα (véase la figura 1) de Y_1 y S_4, distantes menos de 7 Å.

En otro modo de realización, el ciclopéptido es un ciclopentapéptido de secuencia YSNSX de fórmula tal como se ha definido anteriormente, en la que X es cualquier aminoácido que permite la ciclización del péptido lineal de la misma secuencia. La naturaleza del residuo de aminoácido X está limitada por un lado por la formación de un ciclopéptido, eventualmente homodético y, por otro lado por la concentración del codo β a nivel de los residuos YSNS. Preferentemente, se utilizará un aminoácido de muy bajo volumen (tal como la alanina, la glicina o la serina) o de bajo volumen (tal como la cisteína, la asparagina o la treonina) para el cual las cadenas laterales no impedirán la formación de enlaces peptídicos entre Y_1 y X_5 y entre S_4 y X_5. Alternativamente o en combinación con la limitación mencionada anteriormente, se utilizará preferentemente un aminoácido poco cargado o neutro (tal como la alanina, la asparagina, la cisteína, la glicina, la serina y la treonina) para evitar cualquier interacción indeseable que alterara la conformación en codo β. Entre estos aminoácidos, se elegirá muy particularmente la alanina o la glicina.

Así, un ciclopéptido de la invención es un ciclopéptido, homodético o heterodético, que consiste en la secuencia YSNSG. De manera preferida, el ciclopéptido es un pentaciclopéptido homodético, para el cual los 5 aminoácidos están unidos mediante unos enlaces peptídicos, de fórmula



o de fórmula



En un modo de realización de la invención, el ciclopéptido homodético (sea cual sea su tamaño) posee unos enlaces peptídicos en trans. Así, en un ejemplo preferido, los 5 enlaces peptídicos del pentaciclopéptido homodético de secuencia YSNSG están en trans. Se ha demostrado que dicho polipéptido estaba limitado en su conformación β a nivel de los aminoácidos YSNS debido a los enlaces peptídicos en trans. Un ciclopéptido particular de la invención es el que posee la confirmación tridimensional representada en la figura 4, tal como se obtiene mediante la búsqueda de conformación aleatoria (véase el método, punto A.5).

La selección del aminoácido o de los aminoácidos que componen el ciclopéptido, además de la secuencia YSNS, debe responder a las limitaciones estructurales y funcionales indicadas anteriormente. Entre las limitaciones estructurales, el aminoácido (o los aminoácidos) está preferentemente poco cargado o es neutro y/o de bajo volumen. Además, la elección de este aminoácido o de estos aminoácidos debe permitir la formación de un codo β a nivel de los aminoácidos YSNS que poseen un valor de ángulo diedro ψ+1 entre -90 y -30º y un valor de ángulo diedro φ+2 entre -120 y -60º (figura 1). Entre las limitaciones funcionales, el ciclopéptido resultante debe ser capaz de unirse a la integrina $\alpha V\beta 3$ y/o inhibir la proliferación de células de melanomas y/o inhibir la migración de células de melanomas y/o inhibir la angiogénesis. Así, el residuo de aminoácido glicina (G) puede constituir una elección interesante debido a la corta longitud de su cadena lateral que podría por consiguiente aumentar las posibilidades de ciclización y disminuir los riesgos de obtener un péptido que comprende unos enlaces peptídicos en posición cis.

En un modo de realización particular, el ciclopéptido según la invención es susceptible de ser obtenido mediante ciclización de un péptido lineal que comprende la secuencia YSNS, particularmente un péptido lineal que consiste en 4, 5, 6 ó 7 aminoácidos, consistiendo la secuencia cíclica en o comprendiendo la secuencia peptídica Y-S-N-S. La obtención del ciclopéptido a partir del péptido lineal de misma secuencia es posible mediante unos métodos clásicos de ciclización. Brevemente, el péptido lineal se desprotege en su extremo C-terminal, y después N-terminal. La etapa de ciclización se desarrolla en fase líquida. Después de la activación específica, la función COOH hecha reactiva puede sufrir el ataque nucleófilo del nitrógeno básico (extremo N-terminal) para conducir a la formación del enlace peptídico buscado. La reacción de ciclización se lleva a cabo en alta dilución con el fin de eliminar cualquier riesgo de dimerización. El análisis en HPLC o en espectroscopía de masas confirma el aspecto monomérico del péptido obtenido (Thern B *et al.*).

Preferentemente, el ciclopéptido se obtiene mediante la formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos N- y C-terminales del péptido lineal.

Muy particularmente, un ciclopentapéptido de la invención es susceptible de ser obtenido mediante la formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos Y y X del péptido lineal YSNSX.

Alternativamente, el ciclopéptido se puede obtener mediante la formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos terminales de los péptidos lineales SNSXY, NSXYS, SXYSN y XYSNS (en los que X es tal como se ha definido anteriormente).

En un modo de realización particular, el enlace peptídico formado que permite la ciclización se realiza en trans, es decir, que los carbonos Cα (de los dos aminoácidos unidos mediante este enlace peptídico) están dispuestos a ambos lados del puente C-N.

En un modo de realización de la invención, el conjunto de los enlaces peptídicos está en trans, es decir, los enlaces peptídicos entre los aminoácidos del péptido lineal, pero también el enlace peptídico que permite la ciclización.

En el caso particular de un ciclopentapéptido de secuencia YSNSG, la ciclización se obtiene a partir del péptido lineal YSNSG, mediante la formación de un enlace peptídico entre la función carboxílica COOH de la glicina (G) y la función amina NH_2 libre de residuo N-terminal de tirosina (Y).

Con el fin de modificar (aumentar o reducir) su estabilidad o su biodisponibilidad, el ciclopéptido según la invención puede ser modificado antes o después de la etapa de ciclización. Así, cualquiera de los aminoácidos del ciclopéptido puede sufrir una modificación química tal como acetilación, alquilación, amidación, carboxilación, hidroxilación o metilación, o puede ser objeto de adición de lípidos (isoprenilación, palmitoilación, miristoilación o glipiación) o de glúcidos (glicosilación).

Independientemente o en combinación con las modificaciones químicas, el ciclopéptido según la invención puede ser objeto asimismo de un enlace covalente o no covalente con otra molécula. Así, en un modo de realización particular, el ciclopéptido de la invención se acopla a un grupo lipídico o se une (eventualmente de manera covalente) a un vehículo o a un ligando. Un ciclopéptido unido a otra molécula se definirá en el marco de la presente solicitud como un compuesto híbrido.

Sin embargo, por razones relacionadas en particular con la biodisponibilidad, el ciclopéptido de la invención se utiliza en forma de monómero.

Una composición que comprende por lo menos un ciclopéptido (o compuesto híbrido) descrito anteriormente forma parte asimismo de la invención. Así, una composición según la invención comprende un solo y único ciclopéptido, es decir, que la composición únicamente comprende una sola clase de ciclopéptidos de tamaño y secuencia idénticos y para los cuales los enlaces peptídicos son todos del mismo tipo, por ejemplo los enlaces peptídicos están todos en trans.

Una composición particular según la invención comprende un ciclopentapéptido de secuencia YSNSG para el cual el conjunto de los enlaces peptídicos está en trans.

Alternativamente, una composición según la invención comprende unos ciclopéptidos para los cuales el tamaño y/o la secuencia y/o la naturaleza de los enlaces peptídicos es diferente, con la condición de que todos los ciclopéptidos comprendan la secuencia YSNS. A título de ejemplo, una composición de la invención puede comprender unos ciclopéptidos de igual secuencia pero para los cuales la naturaleza de los enlaces peptídicos es diferente de un ciclopéptido a otro, es decir, o bien cis, o bien trans. Entra asimismo en el ámbito de la invención una composición que comprende unos ciclopéptidos según la invención de tamaño diferente, por ejemplo, una mezcla de tetra, penta y/o hexaciclopéptidos, o de secuencia diferente, por ejemplo una mezcla de ciclopentapéptidos para los cuales la naturaleza del aminoácido X es diferente de un ciclopéptido a otro (por ejemplo una mezcla de ciclopentapéptidos YSNSG y YSNSA).

La composición puede comprender además cualquier molécula susceptible de mejorar la actividad biológica del ciclopéptido según la invención. Por el término “mejorar” se entiende tanto un aumento de la actividad biológica del ciclopéptido tal como se ha definido anteriormente en los ensayos *in vitro* o *in vivo*, como una mejor actividad biológica a nivel de las células diana comparada con una composición que comprende únicamente el ciclopéptido o también una biodisponibilidad o una estabilidad aumentada. Así, una molécula capaz de favorecer el transporte del ciclopéptido hacia sus células diana o capaz de disminuir o retrasar (en el tiempo) la degradación del ciclopéptido puede estar comprendida en una composición de la invención. Asimismo, una molécula capaz de prolongar la actividad biológica del ciclopéptido puede estar incluida en una composición según la invención; alternativamente, el ciclopéptido según la invención se inserta en unas nanocápsulas, eventualmente biodegradables, permitiendo así mejorar la biodisponibilidad, la protección y/o el suministro del ciclopéptido.

Forma parte asimismo de la invención una composición tal como se ha descrito en los párrafos anteriores que comprende además por lo menos una molécula de otro tipo, biológicamente activa en el tratamiento del cáncer. Mediante la expresión “molécula biológicamente activa en el tratamiento del cáncer” se entiende cualquier molécula susceptible de intervenir en el tratamiento del cáncer, según la definición proporcionada a continuación. A título de ejemplo de moléculas biológicamente activas en el tratamiento del cáncer, se pueden citar los agentes quimioterapéuticos y los agentes inmunoterapéuticos utilizados habitualmente en el tratamiento del melanoma. Se citará en particular la dacarbazina, cisplatina, vindesina, fotemustina o las nitrosoureas. Pueden asimismo entrar en la composición según la invención, unos epítopos tumorales conocidos por estar específicamente asociados a las células tumorales y particularmente los asociados a las células de melanomas tales como los antígenos Mage 1, 2 y 3, Bage, Gage 1 y 2, o los antígenos de diferenciación melanocitaria tales como la tirosinasa y Melan-A/MART-1. Por último, la composición podrá comprender asimismo la interleuquina 2 o el interferón α.

Por último, cuando una de las composiciones descritas en la presente solicitud se administra por vía sistémica o local, particularmente por inyección, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable, o un transportador y/o un vehículo.

La presente solicitud se refiere asimismo a un método que comprende la administración *in vivo* de un ciclopéptido tal como se ha definido anteriormente o de una composición que lo contiene para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, más particularmente de células tumorales que expresan la molécula integrina $\alpha V\beta 3$. Así, un ciclopéptido o una

composición que lo contiene se puede utilizar en el tratamiento del melanoma o del cáncer bronquial, del cáncer de mama o del cáncer de próstata. Así, forma parte asimismo de la invención, un ciclopéptido según la invención o una composición que lo contiene para su utilización como medicamento, y más particularmente para su utilización en el tratamiento del cáncer, tal como el tratamiento de melanomas.

Mediante la expresión "tratamiento del cáncer" se entiende tanto el tratamiento directo de los tumores, por ejemplo reduciendo o estabilizando su número o su tamaño (efecto curativo) pero también evitando la progresión *in situ* de las células tumorales o su difusión, o el establecimiento de los tumores; se entiende asimismo el tratamiento de los efectos nefastos relacionados con la presencia de estos tumores, en particular la atenuación de los síntomas observados en un paciente o la mejora de las condiciones de vida.

Cuando diferentes tipos de moléculas biológicamente activas entran en la composición con los ciclopéptidos de la invención, se puede obtener un efecto sinérgico contra el tumor, y en particular la progresión tumoral, es decir, la combinación de una o varias molécula(s) biológicamente activa(s) con uno o varios ciclopéptido(s) según la invención tiene un efecto sobre la progresión tumoral más importante que la suma de los efectos de las moléculas y de los ciclopéptidos utilizados separadamente. Las moléculas biológicamente activas y los ciclopéptidos de la invención pueden ser administrados junto o separadamente en el tiempo.

La presente solicitud se refiere asimismo a la utilización *in vitro* o *in vivo* de un ciclopéptido o de una composición según la invención, en la disminución de la cascada proteolítica asociada a proMMP-2 o del sistema de activación del plasminógeno (uPA). La invención se refiere asimismo a un ciclopéptido o a una composición según la invención para ser utilizada en la disminución de la cascada proteolítica asociada a proMMP-2 o del sistema de activación del plasminógeno (uPA).

Por último, en otro aspecto de la invención, el ciclopéptido o la composición según la invención se puede utilizar asimismo como sustancia anti-angiogénica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Mediante la expresión "sustancia anti-angiogénica" se entiende una sustancia que tiene un efecto de inhibición o de reducción de la formación de vasos sanguíneos, preferentemente en el seno de tumores.

Las propiedades anti-angiogénicas de un ciclopéptido según la invención se pueden ensayar por ejemplo tal como se describe en los ejemplos, sobre unas células HUVEC. Se puede buscar en particular el efecto del ciclopéptido sobre la migración celular, por ejemplo detectando la secreción de activadores del plasminógeno en presencia de un ciclopéptido de la invención, o dosificando ciertos receptores de estos activadores, o también observando el efecto del ciclopéptido sobre la matriz celular.

La presente solicitud se refiere asimismo a la utilización de un ciclopéptido o de una composición según la invención en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer, y más particularmente para tratar los diferentes estados de melanomas. Así, el ciclopéptido según la invención se puede utilizar para tratar unos tumores primarios, eventualmente antes de una exéresis quirúrgica, o para tratar las regiones cercanas para limitar el primer estado de invasión por unas metástasis cutáneas locales.

El ciclopéptido según la invención o una composición que lo contiene se administra a un paciente por vía sub-cutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o por inyección intravenosa (i.v.) o por administración oral. Debido a su estructura en codo β, el ciclopéptido está protegido frente a unas proteasas, lo cual le asegura una importante estabilidad y biodisponibilidad *in vivo*. Por consiguiente, el ciclopéptido de la invención está particularmente adaptado a la administración por vía oral de una composición que lo contiene.

La invención prevé asimismo un kit que comprende una composición tal como se ha descrito en la presente solicitud, en particular una composición formulada para una administración parenteral, oral, sub-cutánea o intravenosa.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación de un codo β formado por los aminoácidos YSNS y de los diferentes ángulos diedros característicos de un codo β, a saber, φ+1, ψ+1, φ+2, ψ+2.

Figura 2: Representación de los 10 grupos extraídos de la simulación dinámica molecular del péptido lineal YSNSG. Se distinguen 4 clases de estructura: una estructura en codo β sobre los aminoácidos YSNS (grupos 1, 3 y 5), una estructura en codo β sobre los aminoácidos SNSG (grupo 2), unas estructuras intermedias (grupos 4 y 6) y unas estructuras extendidas (grupos 7, 8, 9 y 10). Los aminoácidos son numerados de la tirosina (Y_1) a la glicina (G_5).

Figura 3: Resonancia magnética nuclear del ciclopéptido YSNSG. Partes del espectro ROESY del ciclopéptido YSNSG. Los esquemas **A** y **B** describen las regiones NH-NH y NH-Hα, respectivamente. En abscisas y en ordenadas, aparecen los valores de desplazamientos químicos (en ppm: partes por millón). La posición de las manchas traduce las correlaciones entre protones; así, los protones que son de 4 Å como máximo proporcionan una correlación sobre el espectro RMN 2D.

Figura 4: Conformación de energía mínima *in vacuo* del ciclopéptido YSNSG. Esta conformación se ha obtenido a partir de la búsqueda conformacional aleatoria *in vacuo* utilizando una constante dieléctrica dependiente de la

distancia, y se realiza de acuerdo con los datos RMN; los nOes (efecto Overhauser nuclear) observados experimentalmente que han sido incluidos como limitación en la realización de esta conformación se representan en línea de puntos. Esta conformación comparte el potencial de energía mínimo.

Figura 5: Estructura estable del ciclopéptido YSNSG tal como se ha observado durante una trayectoria de dinámica molecular de 20 ns. La simulación ha sido realizada en una caja de agua explícita y muestra una estructura en codo β estable. El panel **A** muestra que la flexibilidad se reduce a la sola cadena lateral de la tirosina (Y_1). El panel **B** muestra que la estructura peptídica posee la particularidad de presentar una clara separación de los grupos NH de los grupos C=O. Por último, el panel **C** muestra que la particularidad de la estructura impide la formación de enlaces hidrógeno internos.

Figura 6: Distancias medias protón-protón, extraídas de la simulación dinámica molecular del ciclopéptido YSNSG. En blanco se representan los nOes observados experimentalmente; en negro los demás nOes. Esta figura muestra una buena correlación entre los valores teóricos y los observados experimentalmente.

Figura 7: Potencial electroestático del ciclopéptido YSNSG. Las isosuperficies a +7,5 kT/e (superficie superior) y a -7,5 kT/e (superficie inferior) del ciclopéptido YSNSG (siendo T=300 k) han sido calculadas y representadas con la ayuda de VMD. Esta figura muestra el aspecto altamente polarizado del ciclopéptido.

Figura 8: Espectro de dicroísmo circular del ciclopéptido YSNSG. Los diferentes espectros han sido registrados a unas temperaturas de 0ºC, 20ºC, 37ºC y 50ºC, y son el resultado de 3 acumulaciones de una señal en un intervalo de 190-250 nm.

Figura 9: Ensayo de proliferación *in vitro* de las células de melanoma humano UACC-903 en presencia del ciclopéptido YSNSG. Las células UACC-903 han sido incubadas durante 48 horas, en unas placas de 24 pocillos, con un medio de control (control negativo, barra blanca), un heptapéptido lineal CNYYSNS (control positivo, barra negra) o unas concentraciones de ciclopéptido YSNSG comprendidas entre 5 μM y 20 μM (barras grises). La proliferación de las células se ha medido con el agente reactivo Wst-1. *: significativamente diferente del control ($p<0,05$); **: significativamente diferente del control ($p<0,01$).

Figura 10: Ensayo de migración *in vitro* de las células de melanoma humano UACC-903 en presencia del ciclopéptido YSNSG. Las células UACC-903 han sido incubadas con un medio de control (control negativo, barra blanca), un heptapéptido lineal CNYYSNS (control positivo, barra negra) o con el ciclopéptido YSNSG a 20 μM (barra gris). Después de un periodo de incubación de 48 horas, las células que han migrado han sido coloreadas con violeta cristal y contadas en microscopía inversa. Los resultados han sido expresados como la media de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. **: significativamente diferente del control ($p<0,01$).

Figura 11: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la secreción de MMP-2 y MMP-9. La secreción de MMP-2 y MMP-9 ha sido analizada mediante zimografía en presencia de gelatina (**A**), sobre medio acondicionado por unas células UACC903 en ausencia de péptido (control negativo, barra blanca), sobre unas células tratadas por el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (control positivo, barra negra) o unas células tratadas por unas concentraciones de 5 μM a 20 μM de ciclopéptido YSNSG (barras grises). El medio acondicionado ha sido recogido y analizado tal como se ha descrito en los métodos. La cuantificación ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1D. B: Cuantificación de ProMMP-2; C: Cuantificación de ProMMP-9 (A.U.: unidad arbitraria).

Figura 12: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la expresión y la activación de MMP-14. La expresión de ProMMP-14 (barra blanca) y MMP14 (barra negra) ha sido estudiada mediante transferencia Western (**A**) en un medio acondicionado por unas células UACC903 cultivadas en ausencia de péptido (control), sobre unas células tratadas por el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (CNYYSNS) o tratadas por el ciclopéptido YSNSG a una concentración de 20 μM (ciclopéptido YSNSG). El medio acondicionado ha sido recogido y analizado tal como se ha descrito en los métodos. La cuantificación ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1 D (**B**).

Figura 13: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la secreción de TIMP. La secreción de 3 inhibidores tisulares de metaloproteinasas o TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase) ha sido analizada mediante zimografía inversa (**A**) en un medio acondicionado por unas células UACC903, control en ausencia de péptido (control negativo, barra blanca), sobre unas células tratadas por el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (control positivo, barra negra) o tratadas por el ciclopéptido YSNSG a una concentración comprendida entre 5 μM y 20 μM (barras grises). El medio acondicionado ha sido recogido y analizado tal como se ha descrito en los métodos. La cuantificación de TIMP-2 ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1 D (**B**). **: significativamente diferente del control ($p<0,01$).

Figura 14: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la secreción de activadores de plasminógeno. La secreción de u-PA (activador del plasminógeno de tipo urocinasa) y t-PA (activador tisular del plasminógeno) ha sido analizada mediante zimografía en presencia de gelatina y de plasminógeno (**A**) en un medio acondicionado por unas células UACC903 control en ausencia de péptido (control negativo, barra blanca), sobre unas células tratadas por el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (control positivo, barra negra) o tratadas por el ciclopéptido YSNSG a una concentración comprendida entre 5 μM y 20 μM (barras grises). El medio acondicionado ha sido recogido y analizado tal como se ha descrito en los métodos. La cuantificación de t-PA (**B**) y de u-PA (**C**) ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1

D. **: significativamente diferente del control (p<0,01).

Figura 15: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la secreción de PAI-1 (inhibidor de los activadores del plasminógeno 1). La secreción de PAI-1 ha sido analizada mediante transferencia Western (**A**) en un medio acondicionado por unas células UACC903 control en ausencia de péptido (control negativo, barra blanca), sobre unas células tratadas por el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (control positivo, barra negra) o tratadas por el ciclopéptido YSNSG a una concentración comprendida entre 5 μM y 20 μM (barras grises). El medio acondicionado ha sido recogido, concentrado y analizado tal como se ha descrito en los métodos. La cuantificación de PAI-1 (**B**) ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1 D. **: significativamente diferente del control (p<0,01).

Figura 16: Ensayo de crecimiento tumoral *in vivo* en presencia del ciclopéptido YSNSG. Unas células B16F1 han sido incubadas durante 15 minutos con un medio de control (control negativo, rombos blancos), con el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (control positivo, rombos negros) o con el ciclopéptido YSNSG a una concentración de 20 μM (rombos grises), y después han sido inyectadas de forma sub-cutánea a unos ratones singénicos C57BL6 ($2{,}5.10^5$ células por ratón). El volumen tumoral ha sido medido al vigésimo día.

Figura 17: Actividad anti-angiogénica *in vitro* del ciclopéptido YSNSG. **A**: fotografía al microscopio de la red de pseudotubos capilares de células endoteliales HMEC-1 después de 24 horas de incubación en ausencia de péptido (control; 1), con el ciclopéptido YSNSG a una concentración de 10 ó 20 μM (2 y 3 respectivamente) o con el heptapéptido lineal CNYYSNS (20 μM) (control positivo; 4). **B**: Cuantificación del número de pseudotubos de las fotografías en A.

Figura 18: Inhibición *in vitro* de la migración de células HUVEC en presencia del ciclopéptido YSNSG. Fotografías al microscopio de heridas artificiales realizadas sobre monocapa de células endoteliales a T0 y a T48h en ausencia de péptido (control) o en presencia de 20 μM de ciclopéptido YSNSG.

Figura 19: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la expresión y la activación de MMP-14 por las células HUVEC. La expresión de ProMMP-14 y MMP-14 ha sido estudiada mediante transferencia Western (**A**). Las células HUVEC han sido cultivadas en ausencia (control) o en presencia de 20 μM de ciclopéptido YSNSG, y se han analizado los extractos membranarios correspondientes. La cuantificación ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1D (**B**).

Figura 20: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la secreción de activadores del plasminógeno. La secreción de u-PA y de t-PA ha sido analizada mediante zimografía en presencia de gelatina y de plasminógeno (**A**) en un medio acondicionado por unas células HUVEC en ausencia (control) o en presencia de 20 μM de ciclopéptido YSNSG. La cuantificación ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1 D (**B**).

Figura 21: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la expresión del receptor del u-PA: u-PAR por las células HUVEC. La secreción del u-PAR ha sido analizada mediante transferencia Western (**A**) en un medio acondicionado por unas células HUVEC en ausencia (control) o en presencia de 20 μM de ciclopéptido YSNSG. La cuantificación ha sido efectuada con la ayuda del programa Bio 1 D (**B**).

Figura 22: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la organización del citoesqueleto de las células HUVEC. Las células se cultivan sobre láminas de vidrio en ausencia (control) o en presencia de 20 μM de ciclopéptido YSNSG. Después de 48h de incubación, las células se fijan, se permeabilizan, se incuban con la faloidina (A) o con un anticuerpo anti-fosfo-FAK (B) y después con Hoechst-33342. Las láminas se observan con la ayuda de un microscopio confocal.

Figura 23: Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la repartición de las sub-unidades β1 de integrina en la superficie de las células HUVEC. Las células se cultivan sobre láminas de vidrio en ausencia (control) o en presencia de 20 μM de ciclopéptido YSNSG. Después de 48h de incubación, las células se fijan y se incuban en presencia de anticuerpos dirigidos contra la sub-unidad β1 de integrina. Las láminas se observan con la ayuda de un microscopio confocal.

EJEMPLOS

A. Métodos

A.1. Agentes reactivos

El conjunto de los agentes reactivos de cultivo celular y de biología molecular procede de Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia); el suero de albúmina bovina (SAB), la gelatina y el Matrigel (ECM gel) proceden de Sigma (Saint Quentin Fallavier, Francia). El plasminógeno humano procede de Calbiochem (VWR Int. Estrasburgo, Francia). El anticuerpo anti-MMP-14 humano procede de Santa-Cruz Biotech (Tébubio, Le Perray en Yvelines, Francia). El anticuerpo anti-PAI-1 humano procede de American Diagnostica (Neuville sur Oise, Francia). El conjunto de los agentes reactivos utilizados en los experimentos descritos en la presente solicitud se recoge en la tabla 1.

A.2. Péptidos

El péptido lineal NC1 [α3(IV)185-191] de secuencia CNYYSNS ha sido obtenido mediante síntesis en fase sólida,

utilizando un procedimiento derivado de la síntesis FMOC; después, se ha purificado mediante HPLC en fase inversa con una columna C18 por elución sobre un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético, y después se ha liofilizado (Floquet *et al.*). El ciclopéptido YSNSG ha sido solicitado a Ansynth Service B.V. (Roosendaal, Holanda). El ciclopéptido CYSNG está en forma de acetato y su pureza es superior a 95%, determinada mediante HPLC en fase inversa.

A.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN han sido registrados sobre un espectrómetro Bruker DRX 500. Las muestras han sido disueltas en una mezcla de D_2O:H_2O en una relación 9:1. El TSP-d_4 (Trimethylsilyl propanoic acid, sodium salt) ha sido utilizado como referencia interna de desplazamiento químico. La señal del agua ha sido suprimida por la secuencia WATERGATE (Piotto M. *et al.*). La dependencia del desplazamiento químico de los protones amidas ha sido estudiada a 294 K. La identificación de los sistemas de espines ha sido realizada mediante análisis del espectro TOCSY (tiempo de mezcla de 200 ms; secuencia de impulso mlevdpst19). La clasificación de las distancias entre protones ha sido realizada a partir del espectro NOESY (tiempo de mezcla de 350 ms, secuencia de impulso noesyqpst19). La matriz de adquisición de este último contiene 512 x2K puntos, extendidos a 1Kx 4K mediante adición de ceros. La función de apodización cos^2 se aplica en las dos dimensiones antes de la transformación de Fourier 2D.

Tabla 1: Proveedores y referencias de los agentes activos utilizados

Productos de cultivo celular	**Proveedor**	**Referencia**
Medio RPMI 1640	Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia	61870-010
Medio DMEM 4,5 g/l glucosa		31966-021
Tripsina / EDTA		15400-054
Phosphate Buffered Saline		10010015
Suero de ternera fetal		10270106
Medio de cultivos para células endoteliales ECGM MV	Promocell, Heidelberg, Alemania	C-22020
Agente reactivo Wst-1	Roche Diagnostics, Meylan, Francia	11644807001
Productos químicos	**Proveedor**	**Referencia**
Suero de albúmina bovina	Sigma, St Quentin Fallavier, Francia	A 9543
Gelatina		G8150
Matrigel (ECM gel)		E1270
Membrana de transferencia Immobilon -PVDF		P2938
Violeta cristal	Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia	86,099-9
Plasminógeno EACA	Calbiochem, VWR, Estrasburgo, Francia	528178.50
Pro-MMP-2	Oncogene, VWR, Strasbourg, Francia	PF037
TSP-d4	Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia	18,033-5
Anticuerpos	**Proveedor**	**Referencia**
Anti-MM P-14	Chemicon, Euromedex, Souffelweyersheim, Francia	AB815
Anti-PAI-1	American Diagnostica, Neuvile sur Oise, Francia	395G
Material de cultivo celular	**Proveedor**	**Referencia**
Placas de 24 pocillos	Nunc, Dutscher, Brumath, Francia	055429
Frascos de 25 cm^2	Nunc, Dutscher, Brumath, Francia	055401
Thincert 8 µm	Greiner, Dutscher, Brumath, Francia	662638
Animales de laboratorio	**Proveedor**	**Referencia**
Ratón C57BL6	Harlan, Gannat, Francia	
Péptidos sintéticos	**Proveedor**	**Referencia**
Ciclopéptido YSNSG	Ansynth Service, Roosendaal, Paises bajos	
Cajas de detección	**Proveedor**	**Referencia**
ECL Chemiluminescence	Amersham, Saclay, Francia	RPN 2132
Biotrak ELISA TIMP-2		RPN 2618
Hyperfilm MP		RPN 3103K

A.4. Dicroísmo circular (CD)

Los espectros de dicroísmo circular del ciclopéptido YSNSG han sido registrados sobre un espectropolarímetro JASCO J-810 CD equipado con un sistema de control de temperatura Peltier PTC-623S, utilizando una célula de longitud de trayecto óptico de 0,2 mm. El péptido se disuelve a una concentración de 0,2 mg/ml o bien en agua (pH ~3) o en un tampón fosfato de potasio a 20 mM de manera que la disolución alcance un pH ~7,3. Los barridos se adquieren en el intervalo de espectro 190-250 nm a una temperatura de 0, 20, 37 y 50ºC, midiendo los puntos cada 0,1 nm.

A.5. Búsqueda conformacional aleatoria

Partiendo de una conformación aleatoria del ciclopéptido YSNSG, se ha realizado una búsqueda conformacional de su estructura *in vacuo* (aisladamente) con una constante dieléctrica dependiente de la distancia utilizando el programa CHARMM y un campo de fuerza (PARAM set 22) (Brooks *et al.*; MacKerell *et al.*) de acuerdo con los datos de RMN; las distancias interprotónicas que corresponden a los efectos Overhauser nucleares (nOes) observados experimentalmente han sido limitadas a un intervalo de 2,0 a 4,0 Å. Además, los protones amidas del esqueleto peptídico que no estaban enfrentados han sido limitados a un intervalo de 4,0 a 8,0 Å. Puesto que no se había observado ninguna correlación $H\alpha$-$H\alpha$ sobre el espectro de ROESY (datos no mostrados), todos los enlaces peptídicos han sido asimismo limitados en su configuración trans ($\omega \sim 180^o$). Por último y de acuerdo con la relación de Karplus modificada por Pardi *et al.*, los ángulos φ de los dos residuos serina (S_2 y S_4) han sido limitados a aproximadamente $120^o \pm 30^o$, según los valores de acoplamiento constantes $^3J_{(NH\text{-}H\alpha)}$ de 8,2 y 8,8 Hz, respectivamente (compartiendo los demás residuos unos valores comprendidos entre 5,0 y 7,0 Hz).

En cada etapa del protocolo de búsqueda conformacional aleatoria, todos los ángulos diedros del esqueleto peptídico han sido repartidos al azar; además, las estructuras correspondientes según las limitaciones del análisis de RMN anterior han sido minimizadas. Cada modelo generado ha sido minimizado utilizando al mismo tiempo el algoritmo SD (Steepest Descent) y el algoritmo ABNR (Adopter Based Newton Raphson), hasta que se ha alcanzado un gradiente de energía de 10^{-5} Kcal.mol^{-1}. Tres series independientes de 1000 etapas han sido realizadas modificando la semilla aleatoria inicial del generador de número aleatorio. Las 3000 estructuras minimizadas generadas han sido agrupadas para análisis.

A. 6. Simulación dinámica molecular

El péptido YSNSG (en forma lineal y cíclica) ha sido estudiado asimismo por simulación dinámica molecular. Para el péptido lineal, el punto de partida de los cálculos fue una conformación totalmente extendida. Para el ciclopéptido, la simulación empezó a partir de la conformación que requiere el mínimo de energía, que ha sido obtenida anteriormente mediante la búsqueda conformacional aleatoria. Los péptidos han sido en un primer tiempo incorporados en una caja de agua que asegura una capa de agua de 8 Å (TIP3P) sobre cada uno de sus lados, y el conjunto de los sistemas ha sido minimizado mediante 2000 etapas de algoritmo de gradiente conjugado y llevado a temperatura ambiente (300 K) utilizando el programa NAMD (Phillips *et al*.; Kale *et al.*). Las dos simulaciones (sobre el péptido lineal o cíclico) han sido realizadas en un conjunto NPT (1 atm, 300 K) utilizando el algoritmo de Verlet y una etapa de integración de $1{,}0^{-15}$ s. Las interacciones electroestáticas han sido tratadas aplicando una función de lisado al potencial clásico entre 10 y 12 Å (valor umbral). Un análisis conformacional ha sido realizado sobre la totalidad de la simulación que alcanza 20 ns, extrayendo la estructura de los péptidos cada 10 ps. Estos modelos han sido agrupados en un número reducido de grupos utilizando el programa NMRCLUST (Kelley *et al*.) y un umbral de 2,5 Å para el valor umbral del grupo.

A. 7. Animales

Se han comprado unos ratones hembra C57BL6 (peso corporal medio de 18 a 20 g) en Harlan France (Gannat, Francia). Los animales han sido dispuestos en jaulas individuales, a temperatura y humedad mantenidas constantes; la alimentación y el agua han sido suministrados *ad libitum*. Todos los ratones han sufrido un periodo de aclimatación de 1 semana antes del inicio de los experimentos. Los experimentos *in vivo* han sido realizados según las recomendaciones del Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

A. 8. Cultivo celular y condiciones de cultivo

Unas células B16F1, una sub-línea metastática de células pulmonares de melanoma murino B16 (Dr. M. Grégoire, INSERM U419, Nantes, Francia) han sido cultivadas en medio RPMI 1640, adicionado con suero de ternera fetal (SVF) al 5% en unos frascos de 25 cm^2 (Nunclon, VWR int., Estrasburgo, Francia) bajo atmósfera humidificada que contiene 5% de CO_2. Unas células UACC-903, una línea celular de melanoma (Dr. J. Trent, Phoenix, Arizona) han sido cultivadas en un medio DMEM, que contiene glucosa 4,5 g/l, adicionado con SVF al 5% en unos frascos de 25 cm^2 (Nunclon) bajo atmósfera humidificada que contiene 5% de CO_2. Unas células HMEC-1 (células endoteliales microvasculares humanas; E. W. Ades, Center for disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia) y unas células HUVEC (células endoteliales de venas umbilicales humanas; Promocell, Heidelberg, Alemania) han sido cultivadas en un medio de crecimiento de células endoteliales (ECGM) adicionado con ECGS/H al 0,4% (en peso), de suero de ternera fetal al 2% (en volumen), de factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 10 ng/ml, de hidrocortisona a 1 μg/ml, de amfotericina B a 50 ng/ml y de gentamicina a 50 μg/ml.

A. 9. Ensayo de proliferación *in vitro*

La proliferación celular ha sido determinada utilizando el agente reactivo Wst-1 según las instrucciones del fabricante. Este agente reactivo contiene una sal de tetrazolio que es reducida por las oxido-reductasas mitocondriales y permite evaluar la proliferación y la viabilidad de las células. Su reducción da lugar a un derivado formazán soluble, de coloración amarilla. Antes de alcanzar la confluencia, las células han sido lavadas dos veces con una disolución salina tamponada con fosfato (Phosphate buffered saline; PBS) para retirar los residuos de SVF e incubadas durante 48 horas en medio DMEM, en presencia o en ausencia de péptidos sintéticos a unas concentraciones de 0 a 20 μM. El medio ha sido recuperado y después centrifugado a 500 g durante 10 minutos a 4ºC para retirar los residuos celulares.

El contenido proteico del medio así obtenido se determina mediante el método de Bradford, utilizando SAB como patrón.

A. 10. Ensayo de invasión *in vitro*

La invasión celular ha sido ensayada en unas cámaras de Boyden modificadas (ThinCert®, inserto de cultivo celular para una placa de 24 pocillos, de diámetro interior de 8,36 cm, poro de 8 μm, Greiner Bio-one, Courtaboeuf Francia). Brevemente, 5.10^4 células han sido suspendidas en medio DMEM sin SVF y que contenía SAB al 0,2% e inoculadas sobre unas membranas tapizadas de matrigel (30 $\mu g/cm^2$). Se ha utilizado medio DMEM adicionado con SVF al 10% y con SAB al 2% como quimioatrayente. Después de un periodo de incubación de 48 horas, las células han sido fijadas con metanol y coloreadas con violeta cristal durante 15 minutos. Las células que permanecen en la superficie superior de las membranas han sido eliminadas mediante raspado y las de la superficie inferior han sido contadas utilizando un microscopio inverso (Pasco *et al*. 2000(a)). Las células contadas corresponden a las células que han atravesado el tapiz de Matrigel, y después la membrana porosa de la cámara de Boyden; por lo tanto, son el reflejo de las capacidades de migración y de invasión de las células tumorales a través de una matriz extracelular o de una membrana basal, reproducida en este caso por el Matrigel.

A. 11. Análisis de zimografía

Zimografía en presencia de gelatina.

La expresión de MMP-2 y MMP-9 en medio acondicionado de células UACC-903, tratadas o no con unos péptidos sintéticos ha sido analizada mediante zimografía en presencia de gelatina tal como se ha descrito anteriormente (Pasco *et al*. 2000(a)). La secreción de TIMP-2 ha sido analizada en un medio acondicionado de células UACC-903 mediante zimografía inversa en presencia de gelatina tal como se ha descrito anteriormente (Pasco *et al*. 2000(a)).

Zimografía en presencia de gelatina y de plasminógeno.

Para la determinación de los activadores del plasminógeno, unos medios acondicionados de células UACC-903 han sido analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y que contiene gelatina a 1 mg/ml y plasminógeno a 10 μg/ml. Después de la electroforesis, los geles han sido incubados durante una noche a temperatura ambiente en un tampón de glicina a 100 mM, EDTA a 5 mM pH 8,0. La actividad gelatinolítica resultante de la activación del plasminógeno ha sido demostrada mediante unas zonas de lisis blancas después de la coloración del gel con azul de Coomassie (Pasco *et al*. 2004).

A. 12 Transferencia Western

Las muestras han sufrido una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS al 0,1% y después se han transferido sobre unas membranas Immobilon-P (Millipore, St Quentin en Yvelines, Francia). Las membranas han sido saturadas con leche desnatada liofilizada al 5%, Tween 20 al 0,1% en un tampón Tris-HCl a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,5 (TBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas han sido incubadas a continuación durante una noche a 4ºC con unos anticuerpos anti-MMP-14, anti-PAI y anti-uPAR, y después incubadas durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-IgG) conjugado con la peroxidasa. Los complejos inmunes han sido visualizados con un kit de detección de quimioluminiscencia ECL.

A. 13. Medición del crecimiento tumoral *in vivo*

Una suspensión de células B16F1 ($2,5\ 10^5$ células en medio RPMI 1640) pretratadas o no con el ciclopéptido YSNSG (20 μM) ha sido inyectada de manera sub-cutánea en el lado izquierdo de ratones singénicos de diferentes series. Los ratones han sido sacrificados al día 20 y se ha medido el tamaño de los tumores. El volumen de los tumores ha sido determinado por la relación $V = 1/2\ A \times B^2$ en la que A y B representan respectivamente la dimensión más grande y la dimensión más pequeña del tumor (Wald *et al.*).

A 14. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos han sido realizados mediante el ensayo t de Student. Los resultados se expresan como la media ± 1 desviación estándar. Para los experimentos *in vivo*, los volúmenes de los tumores primarios han sido analizados de manera estadística utilizando el ensayo -u no paramétrico de Mann y Withney, y el ensayo paramétrico t de Student, comparado con unos ratones seleccionados para un peso correspondiente.

A. 15. Medición del efecto anti-angiogénico

La actividad anti-angiogénica *in vitro* del ciclopéptido YSNSG se mide sobre la formación de pseudotubos capilares mediante las células endoteliales HMEC-1 o HUVEC, depositadas sobre el tapiz de Matrigel.

Una disolución de Matrigel (ECM gel: 10 mg/ml) se deposita estérilmente en unas placas de 24 pocillos (Nunclon), a razón de 250 μl por pocillo, sobre hielo machacado. La formación del gel se obtiene mediante la incubación de la placa a 37ºC durante 30 minutos. Unas células HMEC-1 o unas células HUVEC con sub-confluencia se sueltan de sus soportes plásticos de cultivo mediante adición de tripsina/EDTA, y después se suspenden en el medio de cultivo para

células endoteliales y se diluyen a la concentración de 2.10^5 células por ml. Unos volúmenes de 100 µl de esta suspensión celular se depositan en la superficie del gel. Después de una incubación durante 1 hora a 37ºC para permitir la adhesión de las células, los diferentes péptidos se añaden en disolución en 400 µl de medio del cultivo (concentración final de 10 ó 20 µM). La formación de pseudotubos se observa con microscopio y se fotografía, después de 24 horas de incubación. La cuantificación se realiza con un programa de análisis de imágenes.

A. 16. Técnica de herida cicatricial

Se inoculan 1.10^5 células endoteliales en placas de 24 pocillos y se incuban durante 24 horas a 37ºC. Se realiza entonces una herida en la monocapa celular, en el centro del pocillo, con la ayuda de una punta de cono de 200 µl. Las células se lavan con PBS para eliminar los restos celulares, y después se incuban en presencia o en ausencia de péptido cíclico YSNSG. El cierre de la herida, que atestigua unas propiedades migratorias de las células, se observa en microscopía y se fotografía después de 48 horas de incubación.

A. 17. Coloración citoquímica con Hoechst-33342

Las células se cultivan en placas de 24 pocillos, en presencia o no de ciclopéptido YSNSG. Después de 24 horas de incubación, las células se aclaran dos veces con una disolución de PBS. En esta etapa, se añaden sobre las células fluorocromo Hoechst-33342 (50 µg/ml) diluido en PBS. Después de 15 minutos de incubación a 37ºC, 5% de CO_2, los núcleos de las células se observan con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (λ excitación = 346 nm; λ emisión = 460 nm) y después se fotografían.

A. 18. Marcado de la actina F

Las células se inoculan sobre láminas de vidrio estériles dispuestas en placas de 24 pocillos (2.10^4 células/pocillo), en el medio adecuado que contiene 5% de suero, en presencia o no del ciclopéptido YSNSG. Después de 24 y 48 horas de incubación, las células se fijan con formaldehído 3,7% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizan durante 3 minutos con una disolución de acetona a -20ºC. Se efectúan tres lavados de 5 minutos en PBS, y después las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en una disolución de saturación (PBS que contiene 1% de suero de albúmina bovina). Las células se incuban entonces durante 1 hora con la faloidina acoplada a Alexa Fluor® 568 (diluida al 1/40 en PBS que contiene 1% de SAB) y después se lavan 3 veces durante 5 minutos con PBS. Las láminas se observan con microscopio confocal y se fotografían.

A. 19. Inmunomarcación fosfo-FAK e integrina β1

Las células se inoculan sobre láminas de vidrio estériles dispuestas en placas de 24 pocillos (2.10^4 células/pocillo), en el medio adecuado que contiene 5% de suero, en presencia o no de ciclopéptido YSNSG. Después de 24 y 48 horas de incubación, las células se fijan durante 15 minutos en metanol. Se realizan tres lavados de 5 minutos en TBS-T, y después las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en una disolución de saturación (TBS-T que contiene 3% de SAB). Las células se incuban entonces durante 2 horas, a temperatura ambiente, en presencia del anticuerpo primario diluido al 1/100 en TBS-T que contiene 3% de SAB. Después de 5 lavados de 5 minutos en TBS-T, las células se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a Alexa Fluor® 488, diluido al 1/100 en TBS-T que contiene 3% de suero de albúmina bovina. Las células se lavan entonces 3 veces durante 5 minutos con TBS-T. Las láminas se observan con un microscopio confocal y se fotografían.

B. Resultados

B. 1. Estructura del péptido lineal YSNSG

Como punto de partida del estudio del péptido lineal, se ha realizado una simulación dinámica molecular a 300 K sobre el péptido YSNSG lineal con una representación explícita del disolvente y partiendo de una conformación completamente extendida (ϕ = 180º; ψ = 180º). La simulación duró 20 ns. Este experimento ha permitido demostrar diez grupos sobre el conjunto de la trayectoria, representativos de diferentes estructuras representadas en la figura 2. Entre estos grupos, se puede observar la presencia de codos β YSNS (grupos 1, 3 y 5), de codos β SNSG (grupo 2), de estructuras intermedias (grupos 4 y 6) y de estructuras extendidas o casi-extendidas (grupos 7, 8, 9 y 10). Debido a sus parámetros ϕ y ψ, los codos β YSNS y SNSG son muy próximos a los codos β de tipo I (residuos centrales de los codos localizados a nivel de la región de la hélice α del diagrama de Ramachandran). A la vista de estos resultados y del mantenimiento de la estructura en codo β a pesar de la adición de un residuo de glicina, se ha previsto por lo tanto producir un ciclopéptido YSNSG.

B. 2. Estructura del ciclopéptido YSNSG

La estructura del ciclopéptido YSNSG ha sido estudiada en primer lugar mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Después de la atribución de todas las señales protónicas sobre el espectro TOCSY, una de las informaciones más interesante procedía del espectro ROESY que indicaba claramente una correlación entre los protones amidas del esqueleto de residuos secuenciales. Sin embargo, no se observaba ninguna correlación con unos residuos no secuenciales (figura 3A). Algunos otros nOes han sido asimismo revelados por los diferentes espectros en las regiones Nh-Hα (figura 3B).

Un estudio conformacional aleatorio de la estructura del péptido ha sido realizado de acuerdo con los datos RMN (véase material y métodos). De manera interesante, los tres ensayos independientes han convergido hacia una conformación idéntica de muy baja energía con un RMSD de todos los átomos inferior a 0,2 Å.

Esta estructura (figura 4) comparte un codo β sobre los residuos YSNS, con una distancia $C\alpha(Y_1)$-$C\alpha(S_4)$ inferior a 7,0 Å. La estructura *in vacuo* ha sido estabilizada mediante unos enlaces hidrógeno entre los protones amidas de Y_1 y la estructura C=O de S_4 que forma un codo γ sobre unos residuos S_4GY_1 y mediante unos enlaces hidrógeno entre el grupo hidroxilo de Y_1 y la función amida de la cadena lateral de N_3.

Esta conformación ha sido utilizada a continuación como punto de partida de una simulación dinámica molecular no limitada que ha sido realizada en las mismas condiciones que la efectuada para el péptido lineal (agua explícita, 300 K). Tal como se esperaba, el ciclopéptido ha sido observado en forma de una estructura altamente limitada tal como se indica mediante el valor RMSD inferior a 0,5 Å sobre los átomos del esqueleto, a lo largo de la trayectoria dada (no mostrada). El codo γ descrito anteriormente desaparece rápidamente (durante la fase de calentamiento) para alcanzar una conformación estable en los primeros momentos de la simulación. La flexibilidad del péptido ha sido después reducida para explorar los diferentes rotámeros de la tirosina. La conformación correspondiente ha sido caracterizada por el codo β YSNS durante toda la trayectoria (figura 5). El diagrama de los diferentes ángulos del esqueleto ϕ/ψ del péptido a lo largo de la trayectoria ha mostrado asimismo que estos cinco residuos estaban frecuentemente localizados en una región hélice α del diagrama de Ramachandran, haciendo del tetrapéptido YSNS una estructura próxima al codo β de tipo I. Sin embargo, este codo no pertenece a ningún codo β de tipo canónico con una media ϕ/ψ de (-90ºC; -66ºC) para al mismo tiempo los residuos S_2 y N_3.

Esta conformación es muy próxima al grupo 5 descrito para el péptido lineal con un RMSD medio de aproximadamente 1,5 Å calculado para los átomos del esqueleto.

B. 3. Comparación con los datos experimentales

Para comparar con mayor detalle los resultados experimentales y teóricos, se ha realizado un diagrama de las distancias medias protón/protón (representado en la figura 6). Las distancias medias son extraídas de las simulaciones dinámicas moleculares. A través de esta figura, se debe apreciar que los nOes observados experimentalmente, en particular entre los protones amidas de los residuos secuenciales, corresponden a unas distancias medias inferiores a 4 Å. Por el contrario, los protones amidas del esqueleto que no están enfrentados corresponden a unas distancias superiores a 4 Å. Además, el valor medio observado de los ángulos diedros de los dos residuos serina eran de aproximadamente -90ºC de acuerdo con el experimento RMN.

Un aspecto particular de la conformación del péptido, observado durante la trayectoria dinámica molecular, es que todas las funciones NH del esqueleto están agrupadas en la misma cara del péptido mientras que todas las funciones carbonilo están agrupadas sobre la otra cara (figura 7).

Esta conformación particular impide la formación de enlaces de hidrógeno internos al esqueleto. Este resultado estaba de acuerdo con los datos experimentales de la RMN. En efecto, los coeficientes de temperatura de los protones amidas del péptido, que han sido registrados entre 295 y 320 K, no han predicho ningún enlace hidrógeno interno, con unos valores de -10,0, -4,6, -7,0, -4,6 y -6,1 ppb/K para Y_1, S_2, N_3, S_4 y G_5 respectivamente (siendo unos valores inferiores a -4,5 ppb/K asociados frecuentemente a la ausencia de enlace hidrógeno). Debido a esta característica, el péptido aparece altamente polarizado tal como se representa en la figura 6 que muestra el potencial electroestático del péptido (isovalores de 7,5 y -7,5 kT/e en posición superior e inferior respectivamente). La distribución de las cargas ha sido calculada utilizando los parámetros por defecto del método “Particle Mesh Ewald” (Essmann *et al*.) tal como se ha utilizado por VMD (Humphrey *et al*.). De manera interesante, las cargas positivas que engloban las cadenas laterales de los residuos SNS son conocidas por desempeñar una función crucial en la actividad biológica del péptido y de sus derivados, característica que puede asimismo ser importante para la fijación del péptido a la integrina $\alpha V\beta 3$ (Pasco *et al.*; 2000 (b)).

B. 4. Caracterización de la estructura secundaria del ciclopéptido YSNSG mediante espectroscopía dicroísmo circular

La figura 8 muestra el espectro de dicroísmo circular (CD) del ciclopéptido YSNSG registrado a pH 7 y a unas temperaturas de 0, 20, 37 y 50ºC. La señal obtenida no muestra claramente la presencia de una conformación bien estructurada que no es ni totalmente aleatoria, ni α ni β. Los mismos resultados se observan sin añadir tampón a un pH de aproximadamente 3; esto demuestra que el péptido es poco sensible a la temperatura y al pH, debido probablemente a su aspecto altamente limitado.

La forma CD observada no es característica de ninguna conformación en codo β clásico (tipo I, tipo II o tipo VIII); esto se debe probablemente a los parámetros distorsionados ϕ/ψ del péptido comparado a un codo β de tipo I.

Puesto que la RMN, el modelo molecular y los resultados CD han demostrado que el ciclopéptido YSNSG adoptaba la conformación esperada en codo β, su actividad biológica ha sido comparada con la del péptido lineal CNYYSNS.

B. 5. Inhibición de la proliferación *in vitro* de células de melanoma humano UACC-903 por el ciclopéptido YSNSG

La proliferación *in vitro* de las células de melanoma humano UACC-903 se inhibe de manera significativa por el heptapéptido lineal CNYYSNS (-4,5%). El ciclopéptido YSNSG a unas concentraciones de 5, 10 y 20 μM inhibe asimismo la proliferación de las células de melanoma UACC-903 en 27, 29 y 40% respectivamente (figura 9). El ciclopéptido es aproximadamente tan activo como el péptido natural a las mismas concentraciones.

B. 6. Inhibición de la migración *in vitro* de células de melanoma UACC-903 por el ciclopéptido YSNSG

El efecto del ciclopéptido YSNSG sobre la migración de las células UACC-903 sobre una membrana basal reconstituida *in vitro* ha sido analizado utilizando unas membranas tapizadas de Matrigel y SVF al 10% como quimioatrayente. La migración ha sido medida después de 48 horas. El ciclopéptido YSNSG induce una importante disminución de la migración de las células UACC-903 (-47%), de manera similar al heptapéptido lineal CNYYSNS a una misma concentración (figura 10).

B.7. Efecto del ciclopéptido YSNSG sobre las metaloproteinasas matriciales y sus inhibidores

No se ha detectado ningún cambio significativo de la secreción de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía en presencia de gelatina después del tratamiento de las células UACC-903 por el ciclopéptido YSNSG o el péptido lineal CNYYSNS (figura 11). Sin embargo, el ciclopéptido YSNSG inhibe fuertemente la expresión de proMMP-14 tal como se ha demostrado mediante el análisis de transferencia Western (figura 12). La activación de proMMP-14 está asimismo totalmente abolida. Los efectos inhibidores del ciclopéptido tienen la misma intensidad que la observada con el péptido natural.

La secreción de los TIMP en un medio de cultivo acondicionado ha sido analizada mediante zimografía inversa (figura 13A). Un aumento dependiente de la dosis de la secreción de TIMP-2 ha sido observado en unos cultivos incubados con el ciclopéptido YSNSG y asimismo con el péptido lineal CNYYSNS (figura 13B). Este resultado ha sido confirmado utilizando el sistema ELISA Biotrak (Amersham Biosciences, Orsay, Francia) (datos no mostrados). La secreción de TIMP-1 y de TIMP-3 no está modificada.

B. 8. Efectos del ciclopéptido YSNSG sobre el sistema de activación del plasminógeno

La secreción de u-PA y de t-PA, los dos principales activadores del plasminógeno, ha sido analizada mediante zimografía en presencia de gelatina y de plasminógeno (figura 14). El tratamiento de las células UACC-903 con el ciclopéptido YSNSG induce una disminución dependiente de la dosis de la secreción de u-PA y de t-PA, más fuerte que la disminución observada con el heptapéptido lineal CNYYSNS.

La secreción de PAI-1, un inhibidor de u-PA y de t-PA, ha sido analizada mediante transferencia Western (figura 15). El tratamiento de las células UACC-903 con el ciclopéptido YSNSG induce un importante aumento de la secreción de PAI-1, superior a la observada con el heptapéptido CNYSNS.

B. 9. Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por el ciclopéptido YSNSG

El conjunto de los resultados *in vitro* indica que el ciclopéptido YSNSG inhibe la degradación de la matriz extracelular y, al mismo tiempo, la invasión de las células tumorales de manera tan eficaz como el péptido natural lineal CNYYSNS. Por consiguiente, se ha realizado un estudio de sus efectos *in vivo*.

Los efectos del ciclopéptido YSNSG sobre el crecimiento tumoral *in vivo* han sido estudiados en un modelo murino de melanoma. Unas células de melanoma murino B16F1, pre-incubadas con el ciclopéptido YSNSG o no, han sido inyectadas de manera sub-cutánea en el costado izquierdo de ratones singénicos C57BL6 y el volumen tumoral medido al día 20. Las células B16F1 no tratadas han inducido el desarrollo de tumores sub-cutáneos. La pre-incubación de células tumorales con el ciclopéptido YSNSG inhibió el crecimiento tumoral de manera tan eficaz como el heptapéptido lineal CNYYSNS (figura 16).

De manera complementaria, una semana después de la inyección sub-cutánea de células de melanoma B16F1 en el costado izquierdo de ratones C57BL6, a razón de 250.000 células en 0,1 ml de medio RPMI 1640, los ciclopéptidos según la invención se administran, en diversas series de animales, según:

a. inyección peritoneal de ciclopéptidos (a una concentración de 5 mg/kg de peso de ratón) diariamente, solos o fijados sobre unas nanopartículas biodegradables;

b. inyección intravenosa de ciclopéptidos en las mismas condiciones que la opción a);

c. administración *per os*: los ciclopéptidos se mezclan con comida (a razón de 10 mg/kg de peso de ratón) y el conjunto se administra mediante cebado gástrico;

d. inyección sub-cutánea de disolución de ciclopéptidos, controlateral con respecto a la inyección de las células cancerígenas;

En todos los casos, el efecto de los péptidos se evalúa mediante la medición en cinética del volumen tumoral

(porcentaje del volumen tumoral con tratamiento con respecto al volumen tumoral sin tratamiento).

B. 10. Efecto anti-angiogénico del ciclopéptido YSNSG

La actividad anti-angiogénica se evalúa mediante la capacidad de las células endoteliales (células HMEC-1) para formar unos pseudotubos capilares cuando se cultivan sobre un gel de Matrigel. Tal como se muestra en las fotografías de la figura 17A, la adición de ciclopéptidos (a 10 ó 20 μM) inhibe fuertemente la formación de pseudotubos de manera comparable a la adición del péptido lineal CNYYSNS. Así, la adición del ciclopéptido YSNSG a 10 μM reduce la formación de pseudotubos de 40%, mientras que la adición del ciclopéptido YSNSG a 20 μM reduce la formación hasta 70%, de manera similar al péptido lineal (figura 17B).

Unos resultados similares han sido obtenidos con unas células HUVEC, sobre las cuales el ciclopéptido YSNSG (20 μM) ejerce una inhibición de 45%. Esta inhibición se puede ejercer teóricamente sobre la proliferación celular o la migración celular. El ciclopéptido YSNSG inhibe 83% la migración de las células HUVEC (figura 18) después de 48h de incubación en un modelo de herida artificial. Por el contrario, el ciclopéptido YSNSG no ejerce ninguna modificación de la proliferación celular.

Esta inhibición de la migración se explica en particular por un lado por una disminución de 56% de la activación de MT1-MMP, una metaloproteinasa matricial capaz de degradar la matriz extracelular y ampliamente implicada en la angiogénesis (figura 19) y, por otro lado, por una disminución de la producción de u-PA (-27%), un activador del plasminógeno y de su receptor, u-PAR (-49%), ambos implicados asimismo en la degradación de la matriz extracelular y la migración celular (figuras 20 y 21).

La inhibición de la migración se manifiesta por una modificación de la organización del citoesqueleto de actina y por una disminución de expresión de la forma fosforilada de la cinasa de adhesión focal (fosfo-FAK) (figura 22), que demuestra una disminución del fenotipo migratorio.

La expresión de la sub-unidad β_1 de integrina en periferia celular aumenta en presencia del ciclopéptido (figura 23), lo cual refleja un aumento de los puntos de anclaje celular y una disminución de las propiedades migratorias de las células.

Debate

La actividad biológica del ciclopentapéptido YSNSG ha sido comparada a la del péptido natural CNYYSNS. El ciclopéptido inhibe la proliferación *in vitro* de las células de melanoma humano UACC 903, así como sus propiedades invasivas evaluadas por su capacidad de migración a través de membranas recubiertas de una matriz extracelular reconstituida, el Matrigel (figuras 9 y 10). La intensidad de la inhibición obtenida es por lo menos igual a la del péptido natural, a las concentraciones ensayadas. Esta inhibición de las propiedades invasivas *in vitro* se ejerce mediante una disminución muy importante de la expresión, pero sobre todo de la activación de MMP-14 (figura 12), asociada a un aumento de la secreción de inhibidor TIMP-2 (figura 13). Esta inhibición se ejerce asimismo sobre la cascada de activación del plasminógeno, mediante la disminución de la secreción de uPA y de tPA, tan intensa como la inducida por el péptido natural CNYYSNS (figura 14).

Asimismo, la actividad anti-cancerígena del ciclopentapéptido YSNSG ha sido medida en el modelo experimental de melanoma *in vivo* en el ratón. Para ello, unas células B16F1 de melanoma de ratón han sido tratadas con el ciclopentapéptido y después inyectadas en el costado izquierdo de ratones singénicos C57BL6. El ciclopentapéptido YSNSG induce una disminución de 46% del volumen tumoral (figura 16). En el presente caso, se ha utilizado sólo el tratamiento previo de las células, sin ninguna re-inyección del péptido en la región peri-tumoral en los días 7 y 14.

bibliografía

Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983) J. Comp. Chem. 4,187-217.

Deryugina El, Ratnikov B, Monosov E, Postnova Tl, DiScipio R, Smith JW, *et al*. (2001) Exp. Cell Res., 263,209-233.

Egeblad M, Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer, 2,161-173.

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995) J. Chem. Phys. 103, 8577.

Floquet N., Pasco S., Ramont L., Derreumaux P., Laronze J.Y., Nuzillard J.M., Maquart F.X. Alix A.J., Monboisse J.C. (2004) J. Biol Chem. 279(3): 2091-2100.

Han J, Ohno N, Pasco S, Monboisse JC, Borel JP, Kefalides NA. (1997) J. Biol. Chem., 272, 20395-20401.

Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G. (2002) Sem. Cancer Biol., 439, 1-11.

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996) J. Mol. Graph. 14, 33-38, 27-38.

Hutchinson EG, Thornton JM (1994) Protein Sci. Dec;3(12):2207-16

Kalé, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajan, K. & Schulten, K. (1999) Journal of Computational Physics. 151, 283-312.

Kalluri R. (2003) Nat. Rev. Cancer, 3,422-433.

Kelley, L.A., Gardner, S.P. & Sutcliffe, M.J. (1996) Protein Eng. 9, 1063-1065.

MacKerell, J., A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Jr., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., et al. (1998) Journal of Physical Chemistry B 102, 3586-3616.

Maeshima V; Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, Kahn CR, Sonenberg N, Hynes RO, Kalluri R. (2002) 295, 140-143.

Maquart FX; Pasco S, Ramont L, Hornebeck W; Monboisse JC. (2004) Crit. Rev. Oncol. Haematol. 49, 199-202.

Martinella-Catusse C, Polelfe M, Noel A, Gilles C, Dehan P, Munaut C, *et al.* (2001) Lab. Invest. 81, 167-175.

Ortega N, Werb Z. (2002) J. Cell Sci. 11, 4201-4214.

Pasco S (2000a), Han J, Gillery P, Bellon G, Maquart FX, Borel JP, *et al.* Cancer Res. 60, 467-473.

Pasco S (2000b), Monboisse JC, Kieffer N. J. Biol. Chem. 275, 32999-33007.

Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. (2004) Grit. Rev. Oncol. Haematol. 49, 221-233.

Pasco S, Brassart B, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. (2005) Cancer Detect Prey. 29, 260-266.

Pardi, A., Billeter, M., Jr., 8(Wuthrich, K. (1984) J. Mol. Biol. 180, 741-751.

Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L. & Schulten, K. (2005) J. Comp. Chem. 26, 1781-1802.

Piotto M., Saudek V and Sklenar V. (1992) J. Biomol. NMR, 1992, 2, 661.

Settor REB. (1998) Am. J. Pathol. 153, 1347-1351.

Shahan S, Ohno N, Pasco S, Borel JP, Monboisse JC, Kefalides NA (1999)Connect. Tissue Res. 40, 221-232.

Shahan TA, Ziaie Z, Pasco S, Fawzi A, Bellon G, Monboisse JC, *et al.* (1999) Cancer Res. 59, 4584-4590.

Them n B, Rudolph J, Jung G. (2002) Angew Chem Int Ed Engl. Jul. 2;41 (13):2307-9

Wald, M., Olejar, T., Sebkova, V., Zadinova, M., Boubelik, M., & Pouckova, P. (2001) Cancer. Chemother. Pharmacol. 47, S16-S22.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université de Reims Champagne-Ardenne

<120> CICLOPÉPTIDO A ACTIVIDAD ANTI-CANCERÍGENA DERIVADO DEL COLÁGENO DE TIPO IV

<130> B6598A-AD/LV/KN

<140> New International Patent Application

<141> 2007-03-22

<150> FR 06/02530

<151> 2006-03-23

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ciclopéptido

<400> 1

Tyr Ser Asn Ser
1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<220>

<221> MIS FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> xaa: cualquier aminoácido, preferentemente A, G, S, C, N o T

<400> 2

Tyr Ser Asn Ser Xaa
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<400> 3

Tyr Ser Asn Ser Gly
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<400> 4

Tyr Ser Asn Ser Ala
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heptapéptido lineal

<400> 5

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser
1 5

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> NC1 alfa3 (IV) 185-203

<400> 6

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn
1 5 10 15

Pro Glu Arg

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<220>

<221> MIS_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa: cualquier aminoácido, preferentemente A, G, S, C, N o T

<400> 7

Ser Asn Ser Xaa Tyr
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<220>

<221> MIS_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> xaa: cualquier aminoácido, preferentemente A G, S, C, N o T

<400> 8

Asn Ser Xaa Tyr Ser
1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa: cualquier aminoácido, preferentemente A, G, S, C, N o T

<400> 9

Ser Xaa Tyr Ser Asn
1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ciclopéptido

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa: cualquier aminoácido, preferentemente A, G, S, C, N o T

<400>10

Xaa Tyr Ser Asn Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Ciclopéptido seleccionado de entre:

a) un ciclopéptido homodético, caracterizado porque comprende la secuencia YSNS; y

b) un ciclopéptido, cuyo ciclo comprende la secuencia YSNS y tiene un número de residuos de aminoácidos comprendido entre 4 y 6.

2. Ciclopéptido según la reivindicación 1, caracterizado porque el ciclo está constituido por la secuencia YSNS.

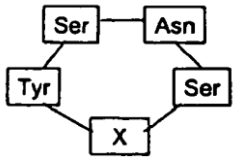
3. Ciclopéptido según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque su tamaño es superior o igual a 4 aminoácidos e inferior a 10 aminoácidos, y preferentemente porque su tamaño es de 4 a 6 aminoácidos.

4. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque es capaz de fijarse a la integrina $\alpha V\beta 3$.

5. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque forma un codo β a nivel de los aminoácidos YSNS.

6. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque su secuencia de aminoácidos consiste en YSNS.

7. Ciclopentapéptido homodético que consiste en la secuencia YSNSX y representado por la fórmula siguiente:

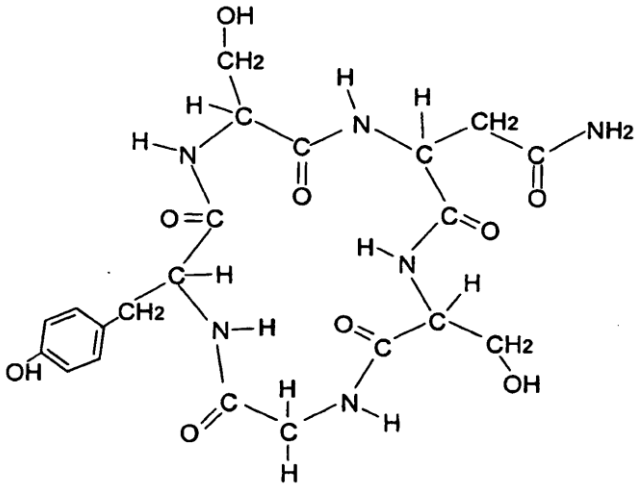


en la que X es cualquier aminoácido que permite la ciclización del péptido lineal de misma secuencia.

8. Ciclopéptido según la reivindicación 7, en el que X es un aminoácido de bajo volumen y/o es un aminoácido poco cargado o neutro.

9. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, caracterizado porque es capaz de fijarse a la integrina $\alpha V\beta 3$.

10. Ciclopentapéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en YSNSG, representada por la fórmula siguiente:



11. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque todos los enlaces peptídicos están en trans, y opcionalmente porque tiene la estructura tridimensional representada en la figura 4.

12. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque posee unas propiedades anti-tumorales.

13. Composición caracterizada porque comprende un ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y opcionalmente una molécula biológicamente activa en el tratamiento del cáncer.

14. Composición según la reivindicación 13, caracterizada porque la molécula biológicamente activa se selecciona de entre por lo menos una de las moléculas siguientes:

a. un agente quimioterapéutico;

b. un epítopo tumoral específicamente asociado a las células tumorales;

c. un antígeno de diferenciación celular; y

d. la interleuquina 2 y/o el interferón α.

15. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, para su utilización como medicamento.

16. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, para su utilización en el tratamiento del cáncer, en particular en el tratamiento del melanoma o en el tratamiento del cáncer bronquial, del cáncer de mama o del cáncer de próstata, o en particular en el tratamiento de un cáncer cuyas células tumorales expresan la molécula integrina $\alpha V\beta 3$.

17. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, para su utilización en la inhibición o en la reducción de la angiogénesis, preferentemente en el seno de tumores.

18. Ciclopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, para su utilización en la disminución de la cascada proteolítica asociada a proMMP-2 o del sistema de activación del plasminógeno (uPA).

19. Kit que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en particular formulada para una administración parenteral, oral, sub-cutánea o intravenosa.

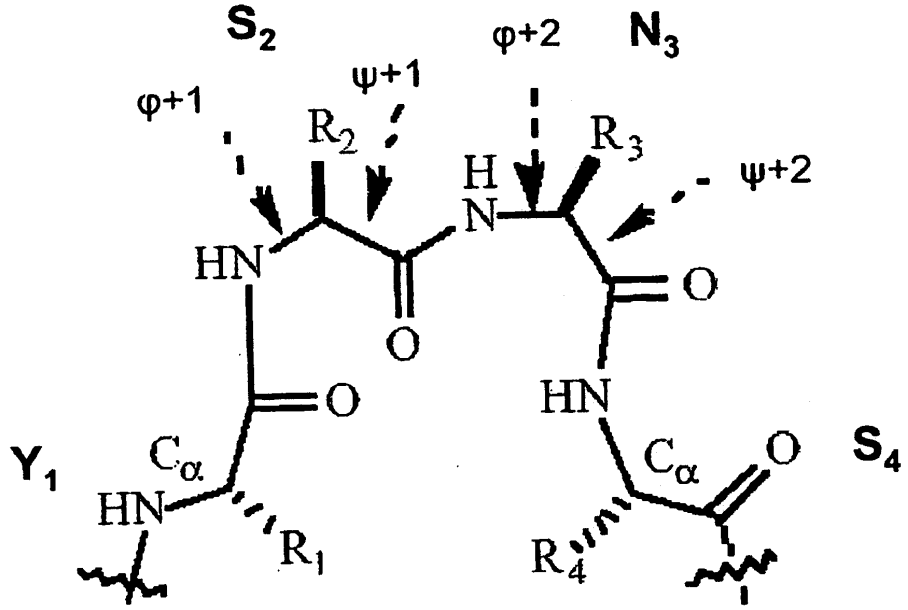


Figura 1

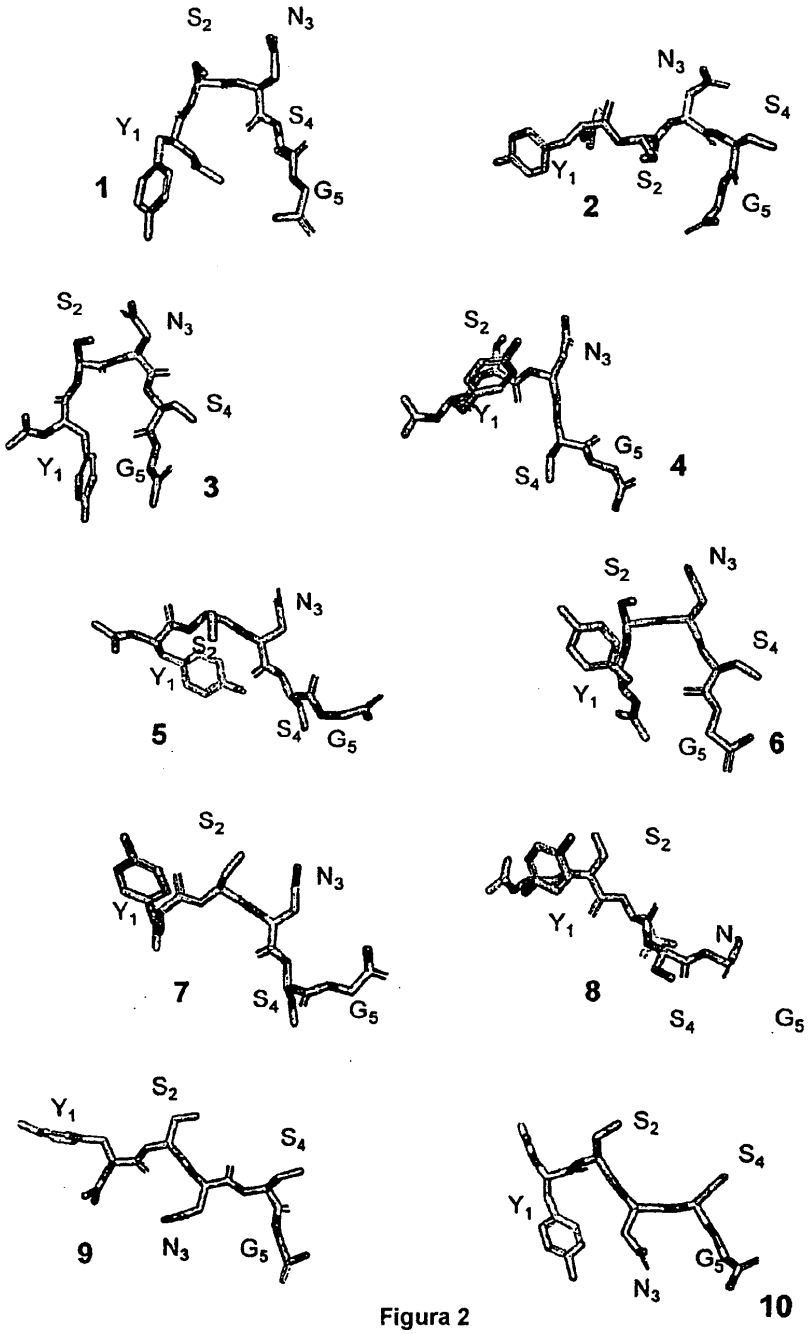

S2
N3
Y1
S4
G5
1
N3
S4
Y1
S2
G5
2
S2
N3
S4
Y1
G5
3
S2
N3
Y1
G5
S4
4
N3
S2
Y1
S4
G5
5
S2
N3
S4
Y1
G5
6
S2
Y1
N3
7
S4
G5
S2
Y1
N
8
S4
G5
Y1
S2
S4
9
N3
G5
S2
S4
Y1
G5
N3
10

Figura 2

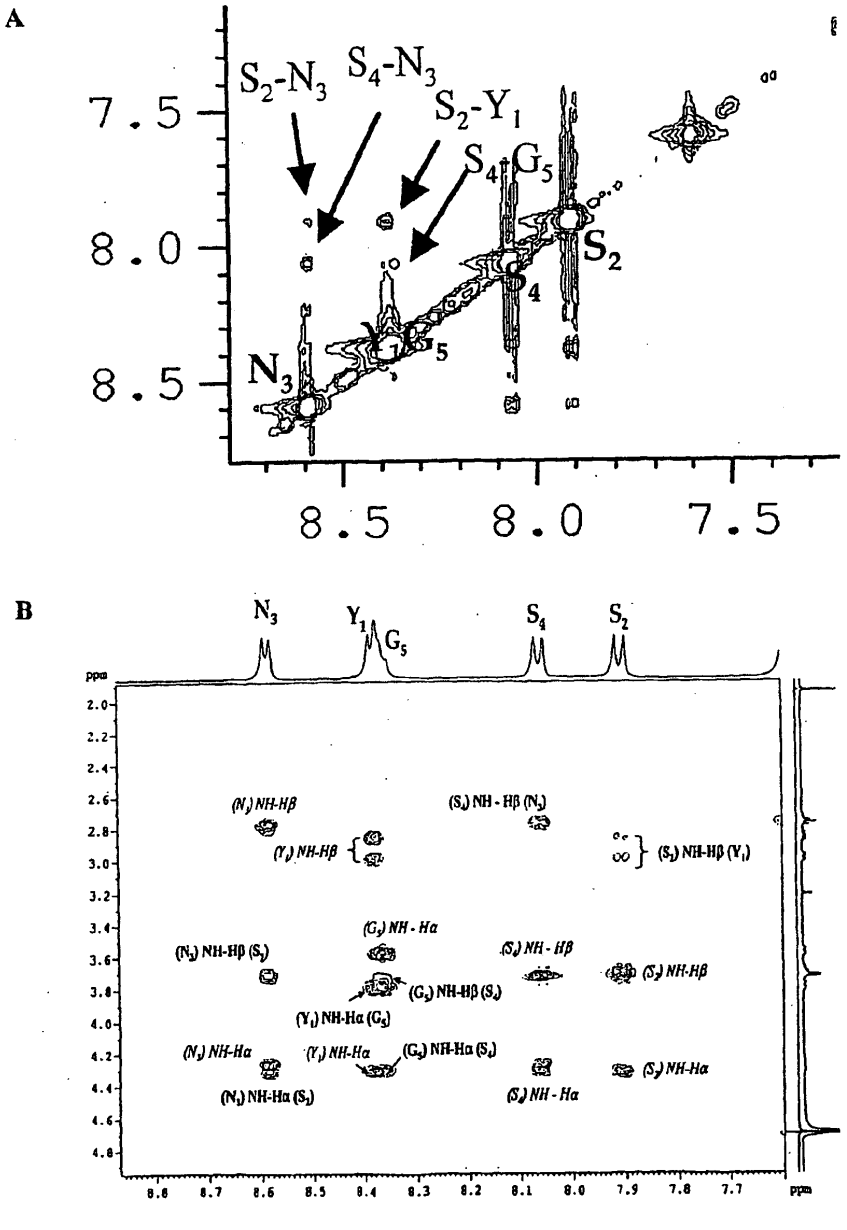

A
S2-N3
S4-N3
S2-Y1
S4 G5
S2
G4
Y1 G5
N3
7.5
8.0
8.5
8.5
8.0
7.5
B
N3
Y1
G5
S4
S2
ppm
(N3) NH-Hβ
(Y1) NH-Hβ
(S4) NH - Hβ (N3)
(S2) NH-Hβ (Y1)
(G5) NH - Hα
(N3) NH-Hβ (S4)
(S4) NH - Hβ
(G5) NH-Hβ (S4)
(S2) NH-Hβ
(Y1) NH-Hα (G5)
(N3) NH-Hα
(Y1) NH-Hα
(G5) NH-Hα (S4)
(S2) NH-Hα
(N3) NH-Hα (S4)
(S4) NH - Hα

Figura 3

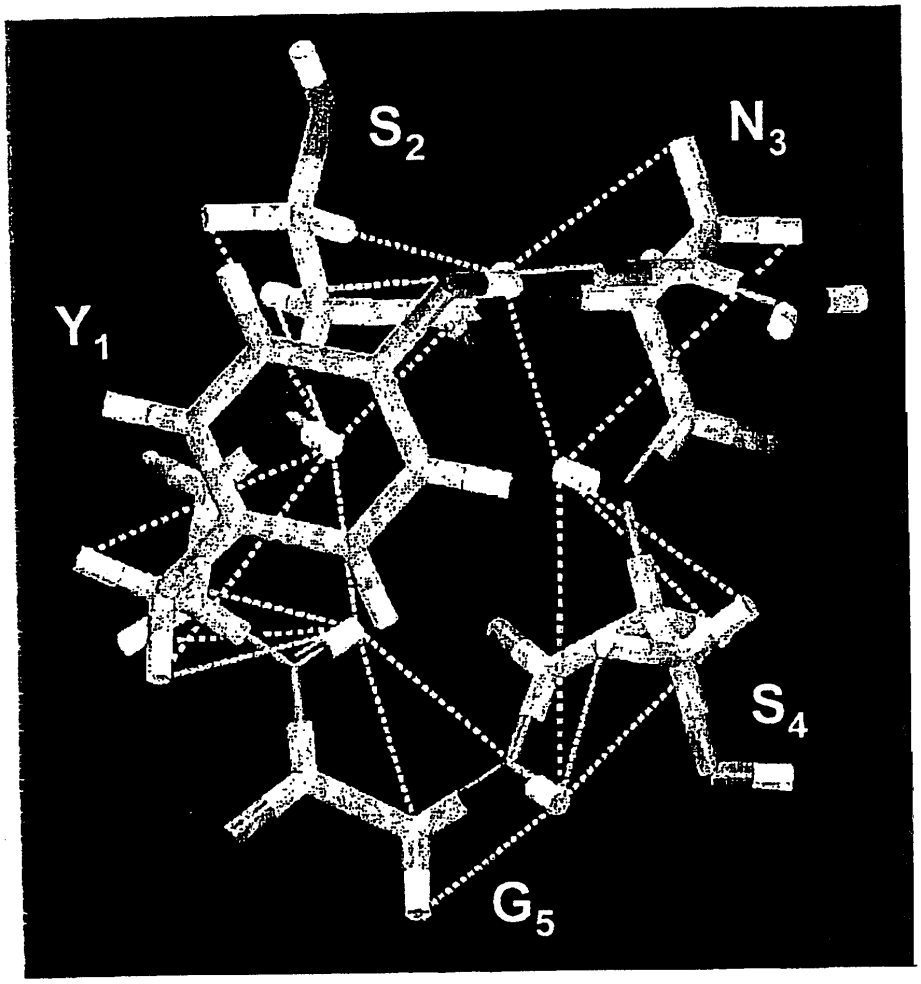


Figura 4

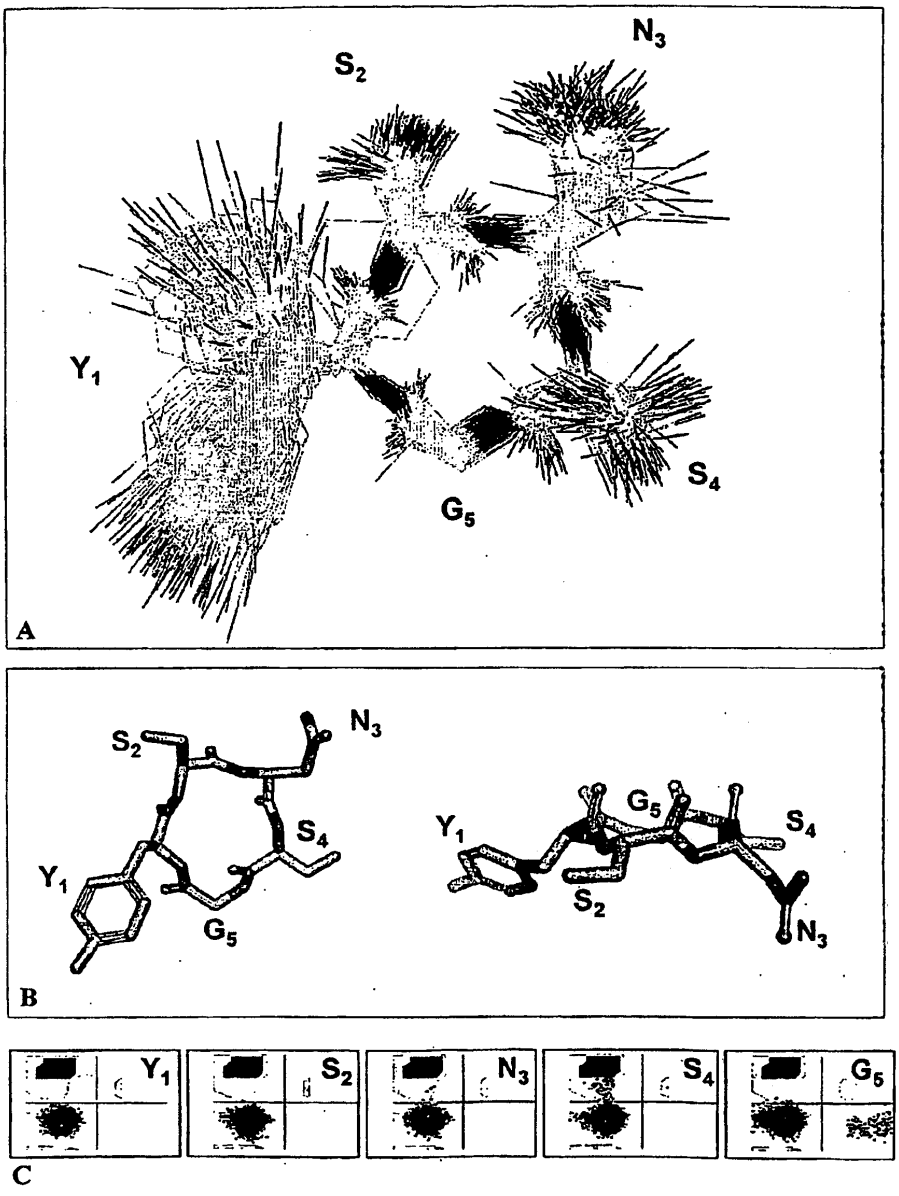


Figura 5

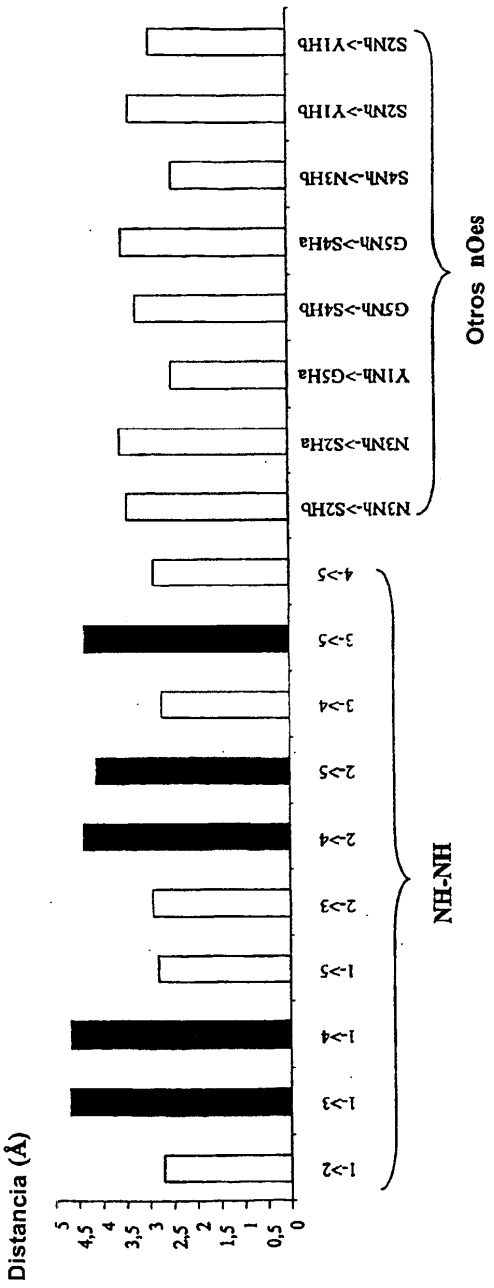

Distancia (Å)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
4,5
5
1->2
1->3
1->4
1->5
2->3
2->4
2->5
3->4
3->5
4->5
N3Nh->S2Hb
N3Nh->S2Ha
Y1Nh->G5Ha
G5Nh->S4Hb
G5Nh->S4Ha
S4Nh->N3Hb
S2Nh->Y1Hb
S2Nh->Y1Hb
S2Nh->Y1Hb
NH-NH
Otros nOes

Figura 6

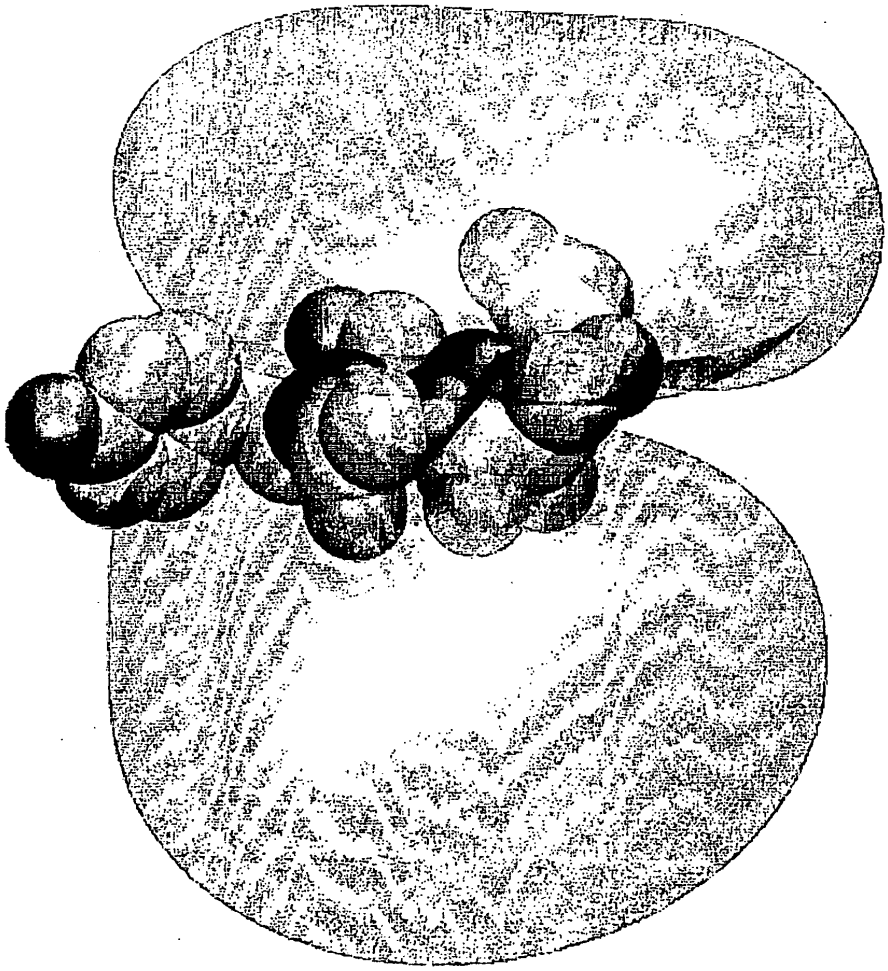


Figura 7

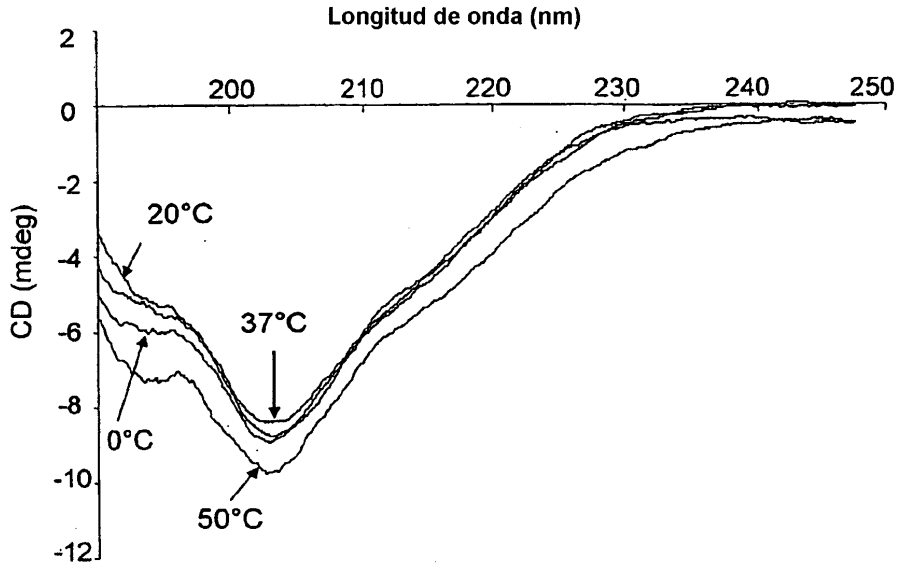

Longitud de onda (nm)
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
200
210
220
230
240
250
CD (mdeg)
20°C
37°C
0°C
50°C

Figura 8

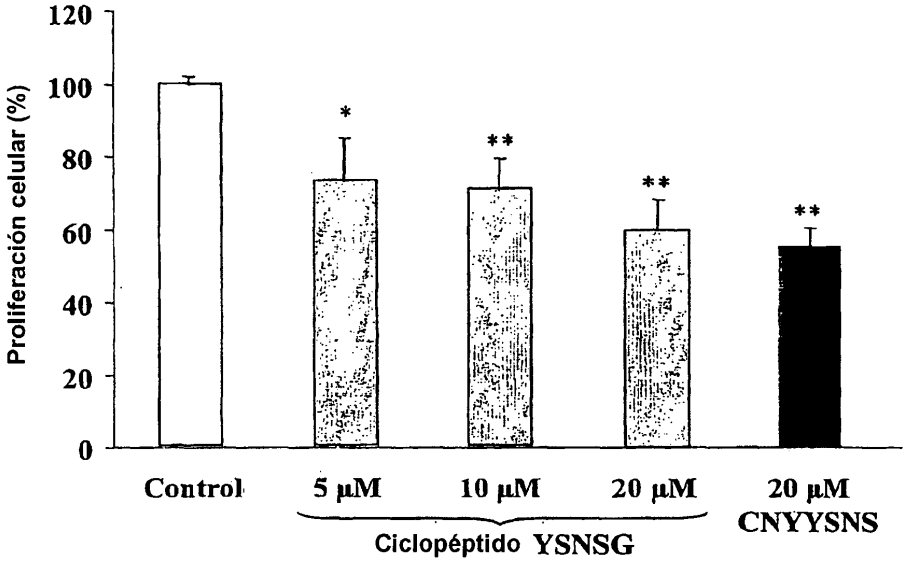

Proliferación celular (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
**
**
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM
CNYYSNS
Ciclopéptido YSNSG

Figura 9

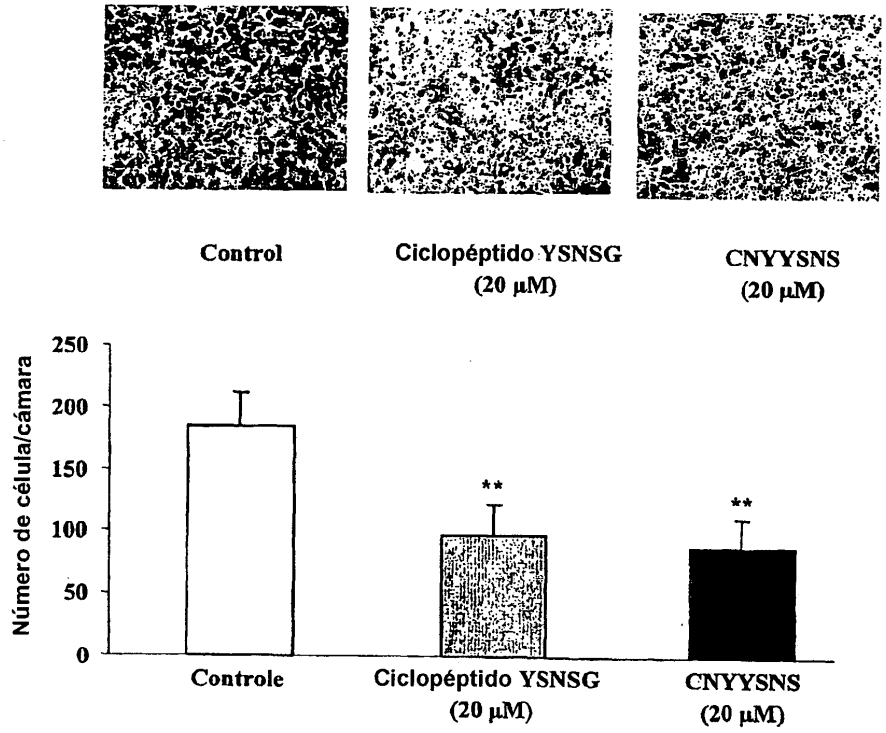

Control
Ciclopéptido YSNSG
(20 µM)
CNYYSNS
(20 µM)
Número de célula/cámara
250
200
150
100
50
0
**
**
Controle
Ciclopéptido YSNSG
(20 µM)
CNYYSNS
(20 µM)

Figura 10

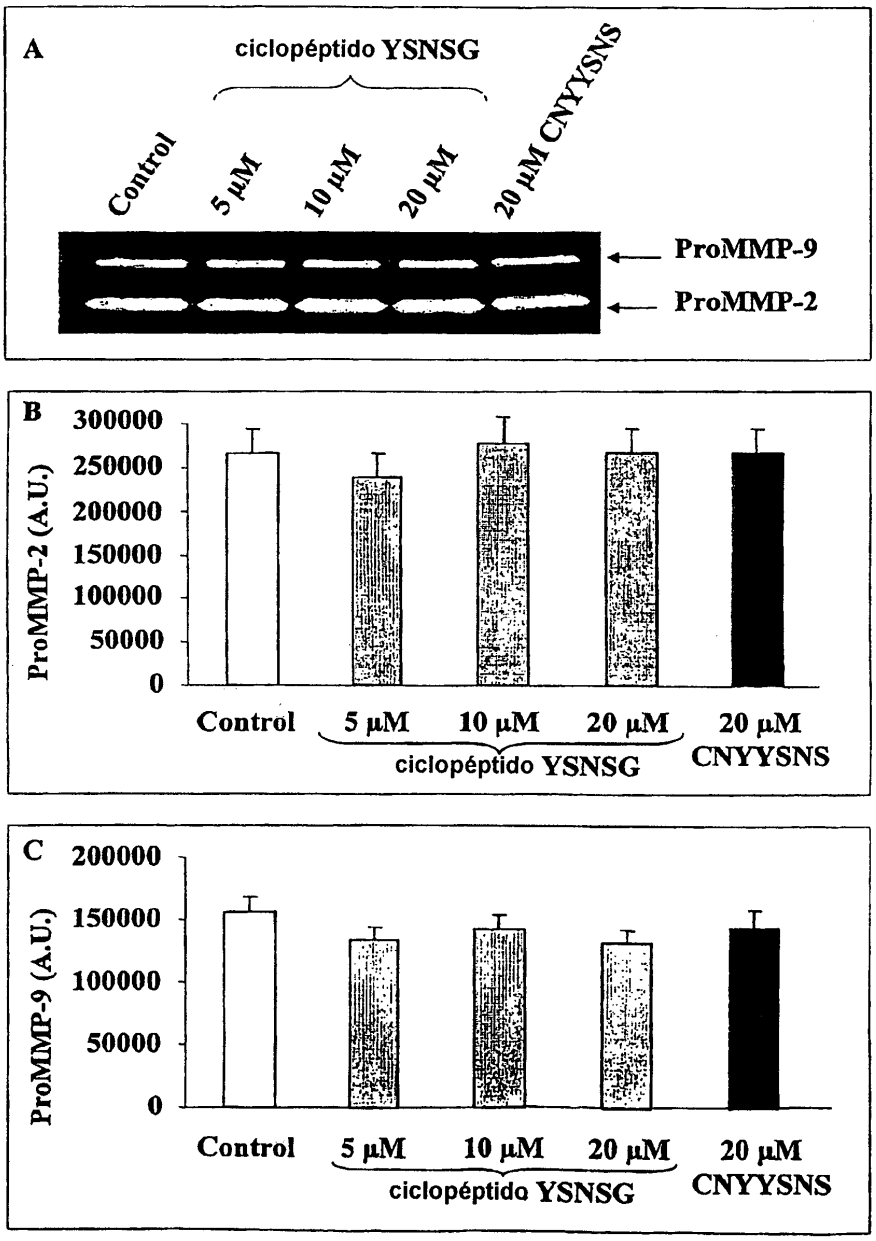

A
ciclopéptido YSNSG
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
ProMMP-9
ProMMP-2
B
ProMMP-2 (A.U.)
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Control
5 µM
10 µM
20 µM
ciclopéptido YSNSG
20 µM CNYYSNS
C
ProMMP-9 (A.U.)
200000
150000
100000
50000
0
Control
5 µM
10 µM
20 µM
ciclopéptido YSNSG
20 µM CNYYSNS

Figura 11

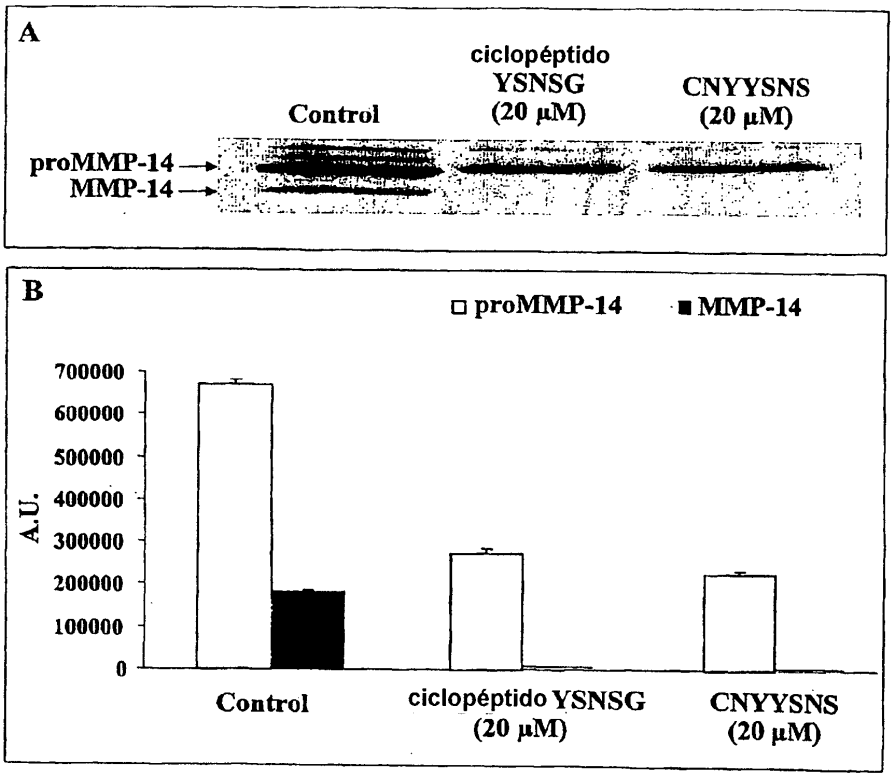

A
Control
ciclopéptido YSNSG (20 µM)
CNYYSNS (20 µM)
proMMP-14
MMP-14
B
□ proMMP-14
■ MMP-14
A.U.
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Control
ciclopéptido YSNSG (20 µM)
CNYYSNS (20 µM)

Figura 12

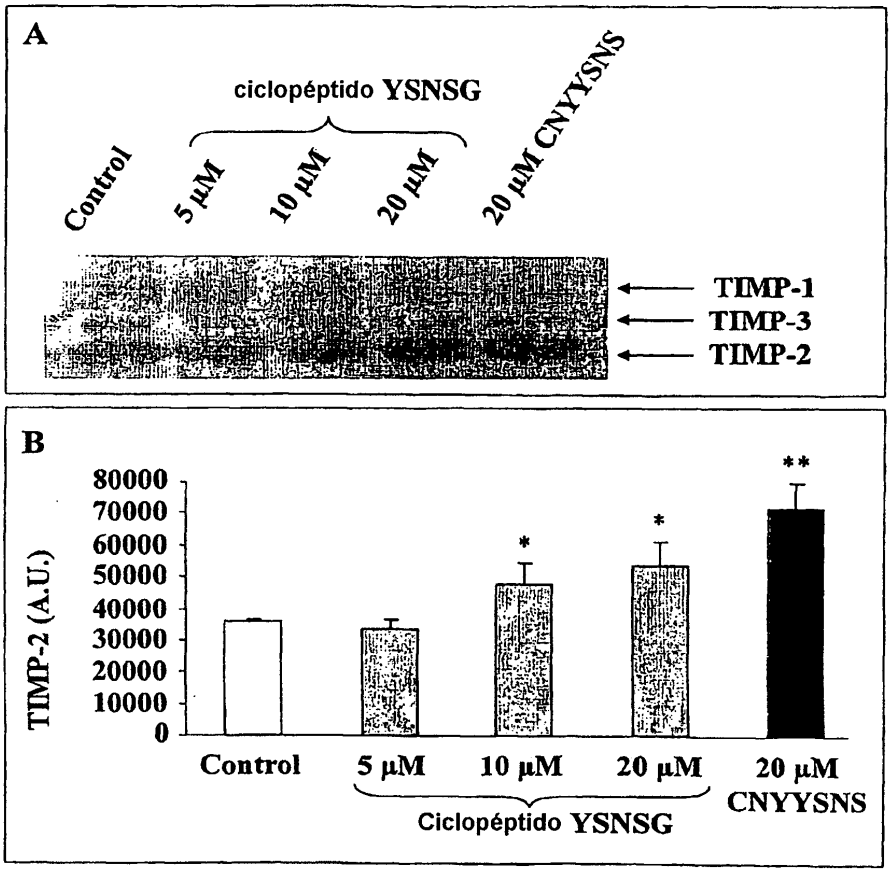

A
ciclopéptido YSNSG
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
TIMP-1
TIMP-3
TIMP-2
B
TIMP-2 (A.U.)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
*
*
**
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
Ciclopéptido YSNSG

Figura 13

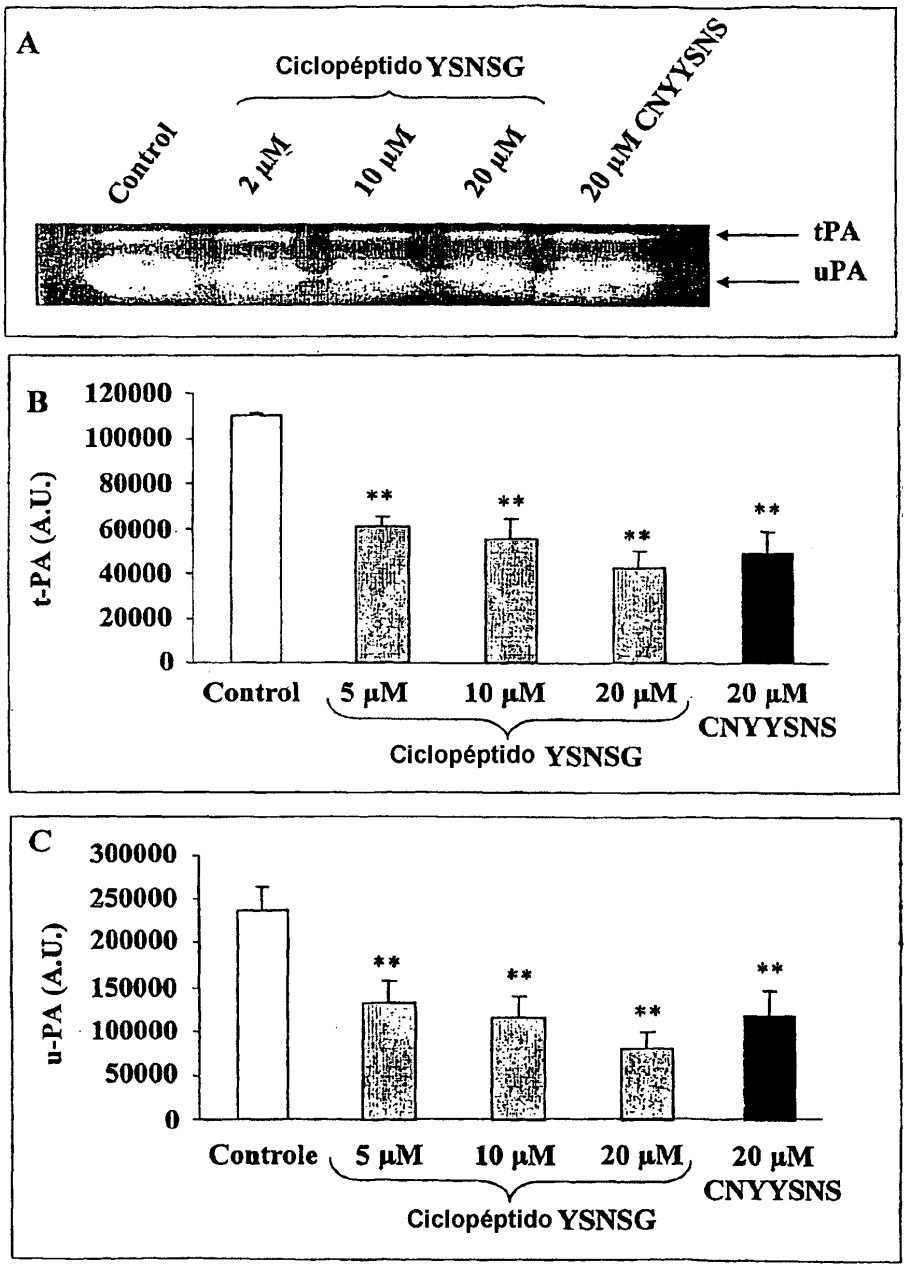

A
Ciclopéptido YSNSG
Control
2 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
tPA
uPA
B
t-PA (A.U.)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
**
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
Ciclopéptido YSNSG
C
u-PA (A.U.)
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Controle
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
Ciclopéptido YSNSG

Figura 14

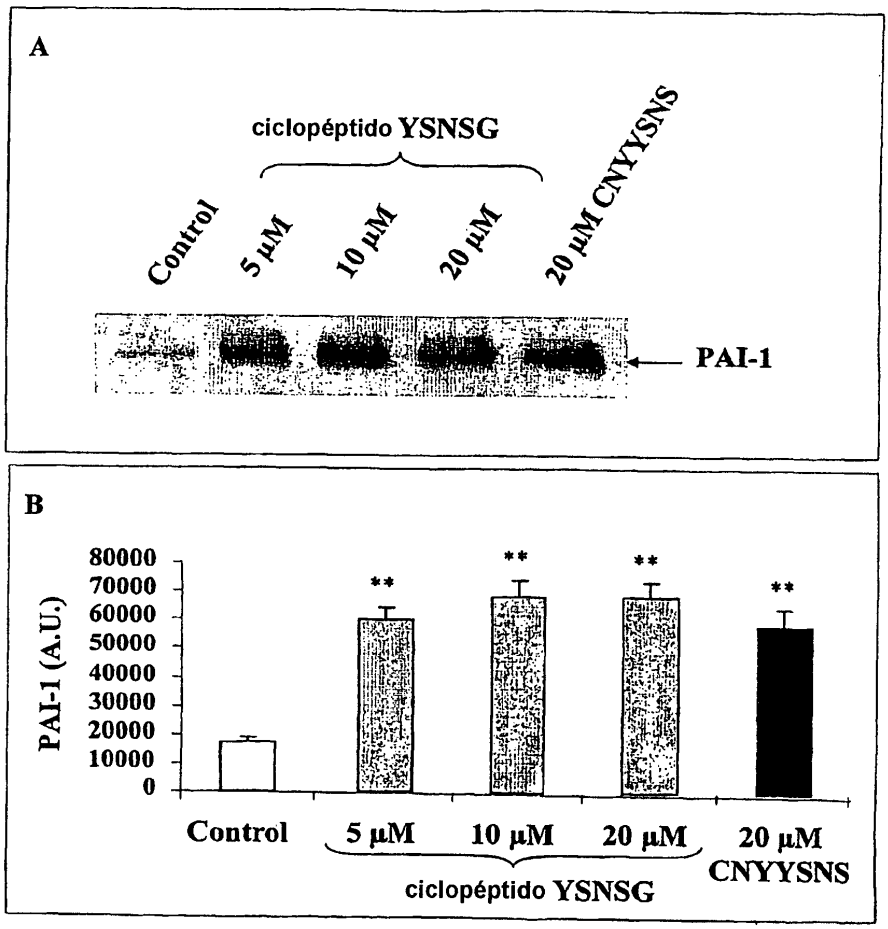

A
ciclopéptido YSNSG
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
PAI-1
B
PAI-1 (A.U.)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
**
**
**
**
Control
5 µM
10 µM
20 µM
20 µM CNYYSNS
ciclopéptido YSNSG

Figura 15

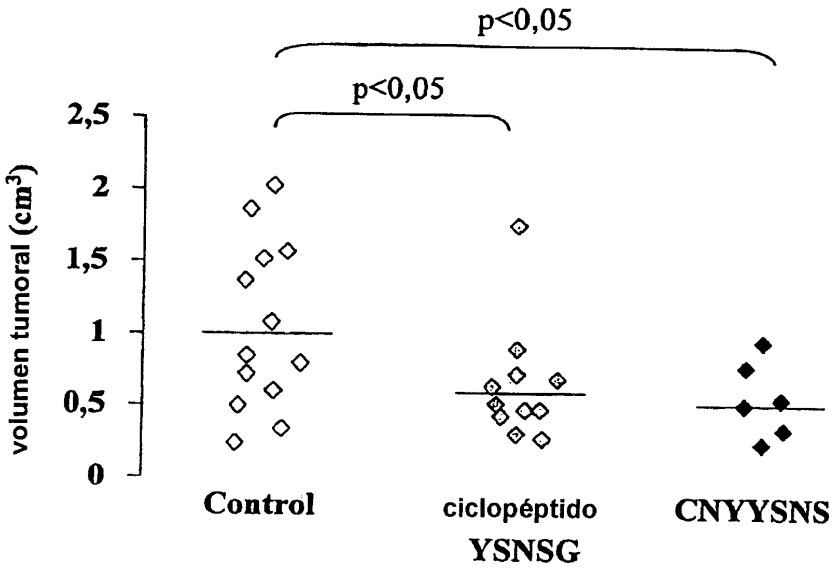

p<0,05
p<0,05
2,5
2
1,5
1
0,5
0
volumen tumoral (cm3)
Control
ciclopéptido YSNSG
CNYYSNS

Figura 16

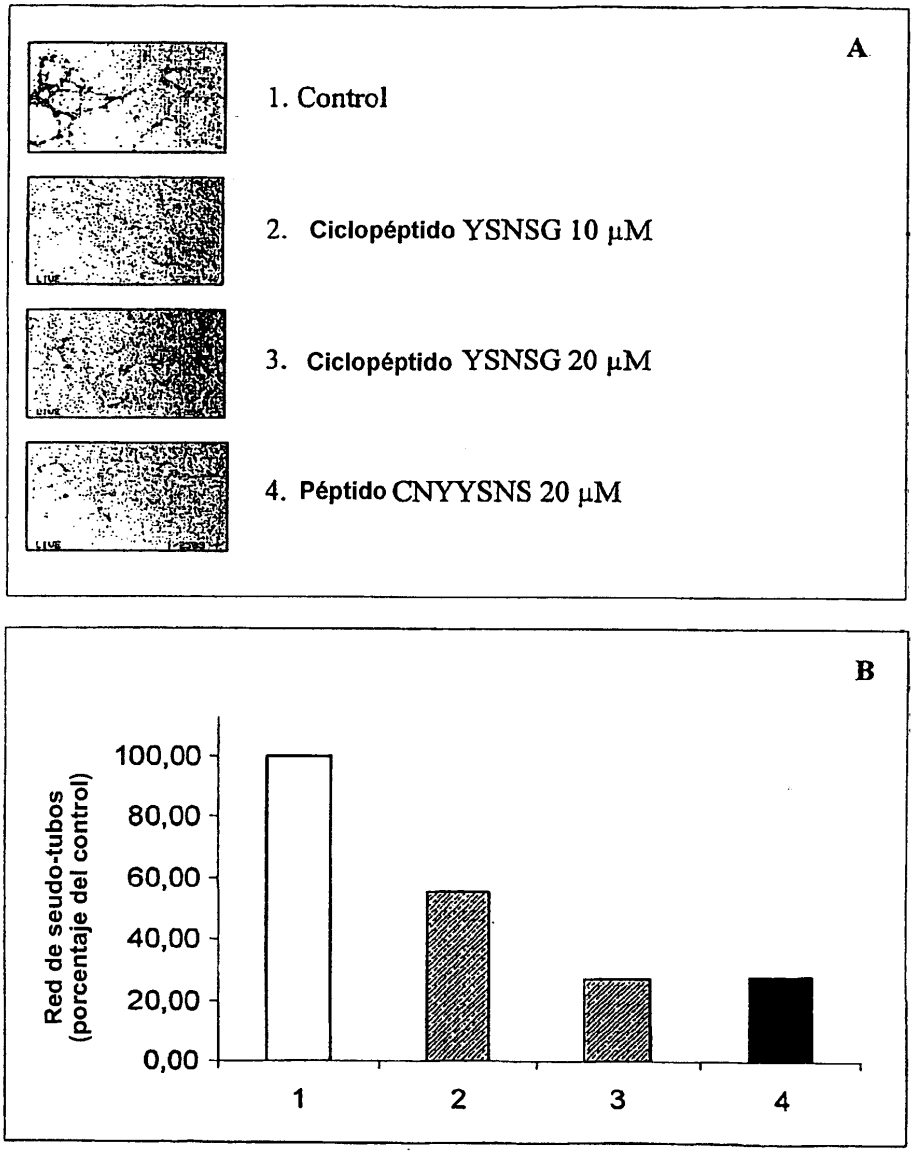

A
1. Control
2. Ciclopéptido YSNSG 10 µM
3. Ciclopéptido YSNSG 20 µM
4. Péptido CNYYSNS 20 µM
B
Red de seudo-tubos (porcentaje del control)
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
1
2
3
4

Figura 17

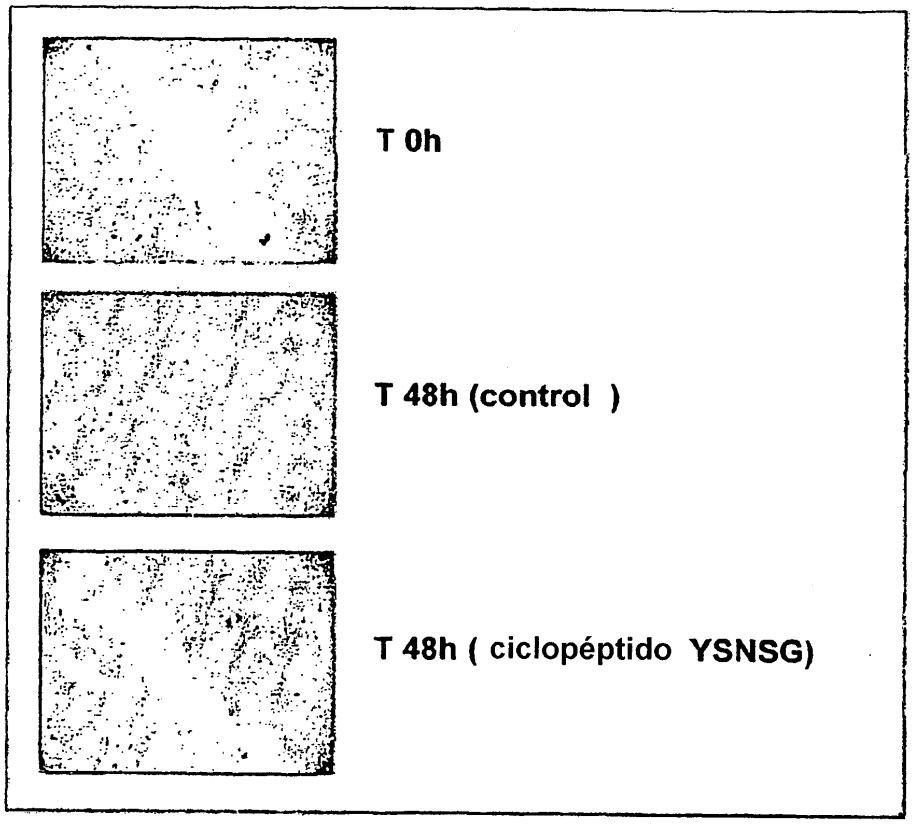


Figura 18

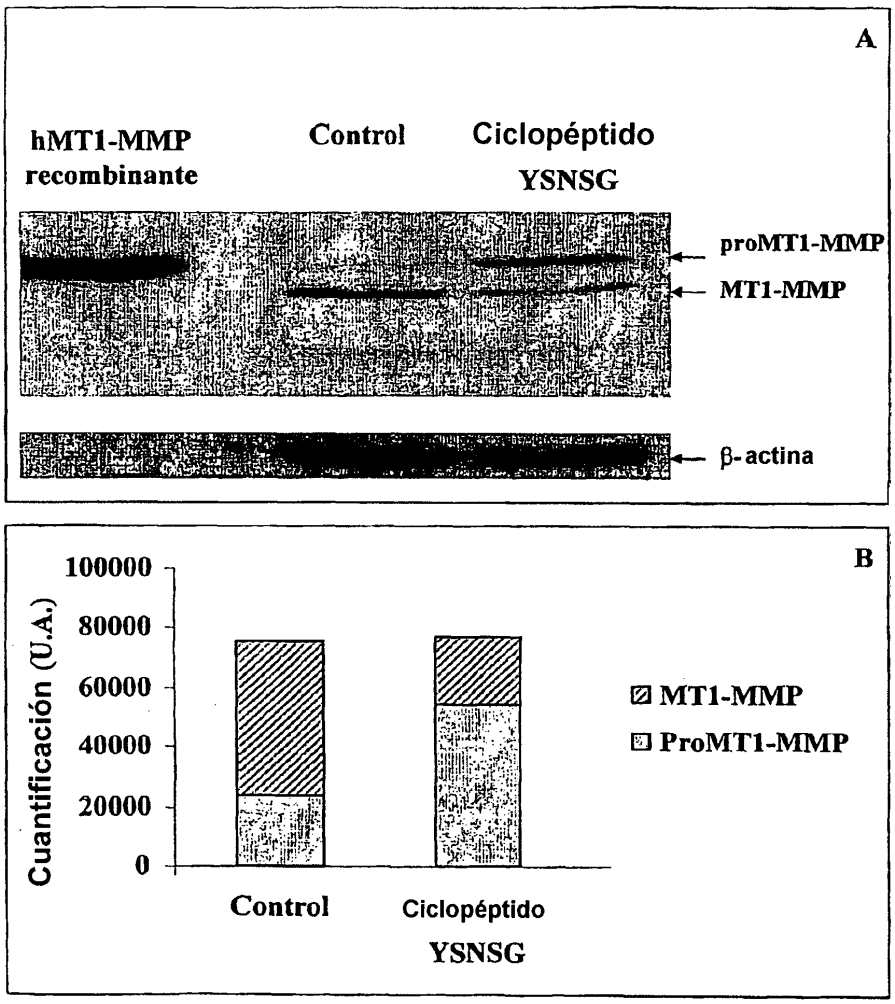

A
hMT1-MMP recombinante
Control
Ciclopéptido YSNSG
proMT1-MMP
MT1-MMP
β-actina
B
Cuantificación (U.A.)
100000
80000
60000
40000
20000
0
Control
Ciclopéptido YSNSG
MT1-MMP
ProMT1-MMP

Figura 19

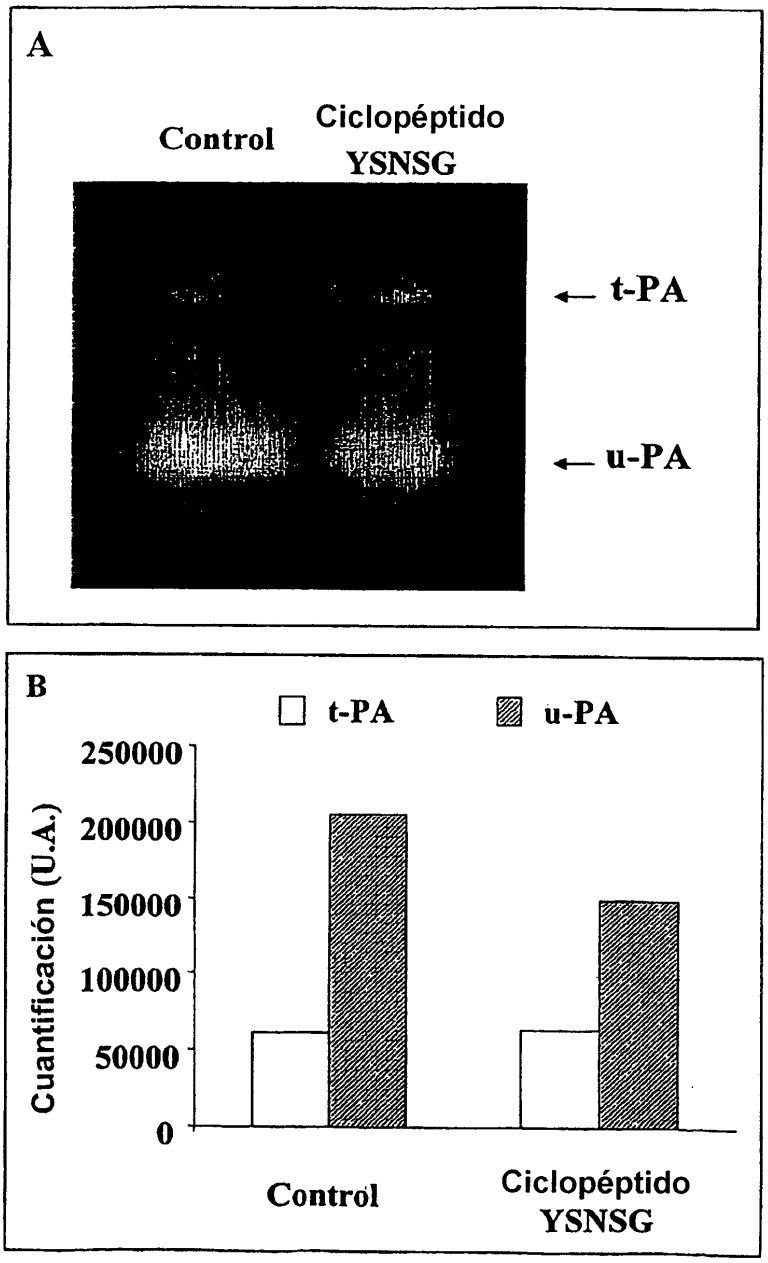

A
Control
Ciclopéptido YSNSG
t-PA
u-PA
B
t-PA
u-PA
Cuantificación (U.A.)
250000
200000
150000
100000
50000
0
Control
Ciclopéptido YSNSG

Figura 20

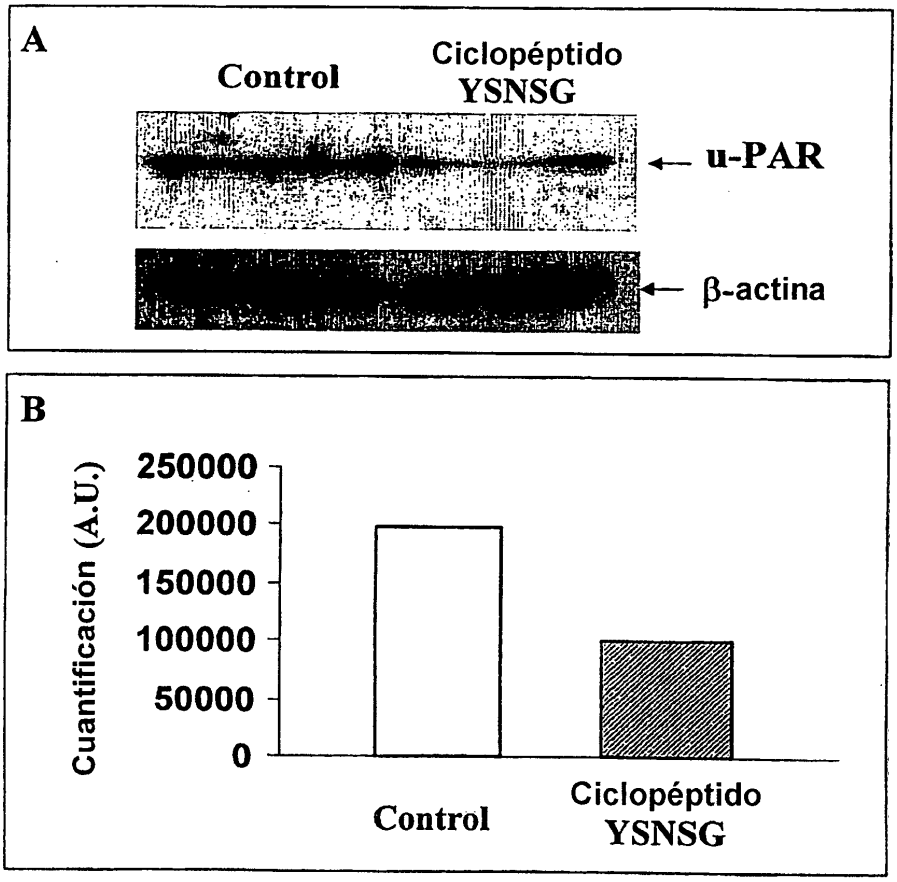

A
Control
Ciclopéptido YSNSG
u-PAR
β-actina
B
Cuantificación (A.U.)
250000
200000
150000
100000
50000
0
Control
Ciclopéptido YSNSG

Figura 21

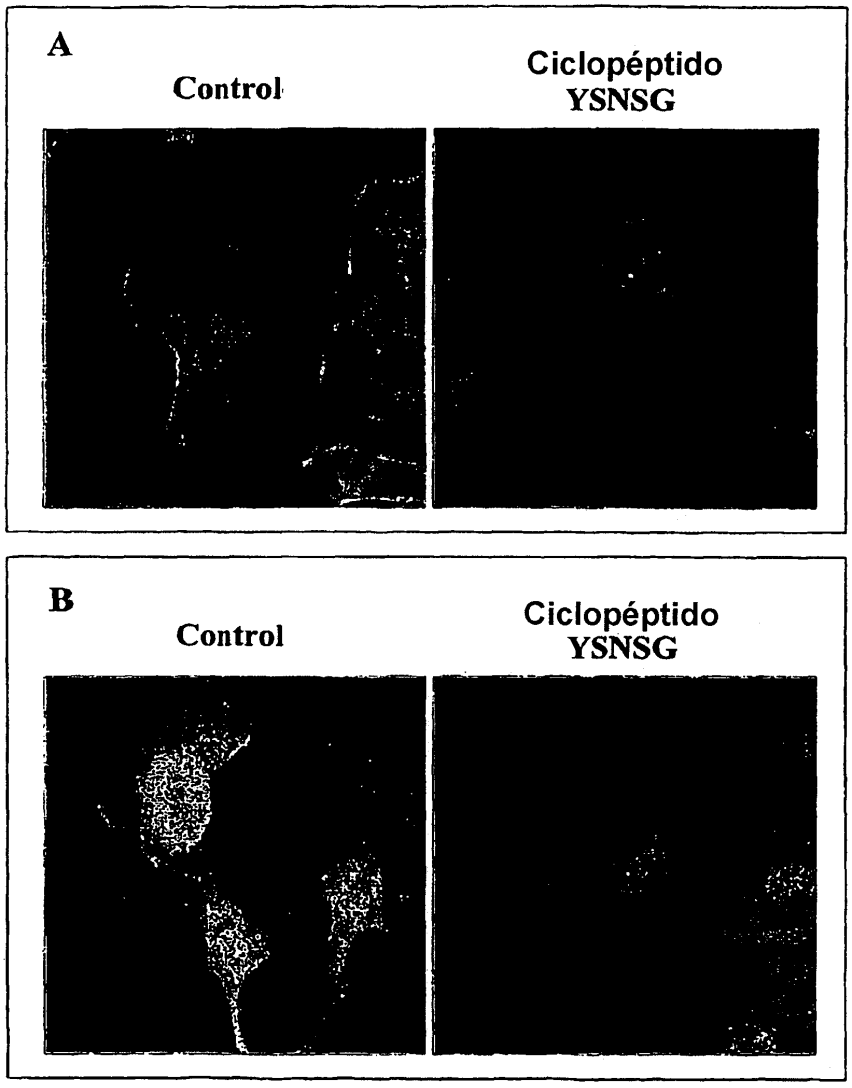

A
Control
Ciclopéptido
YSNSG
B
Control
Ciclopéptido
YSNSG

Figura 22

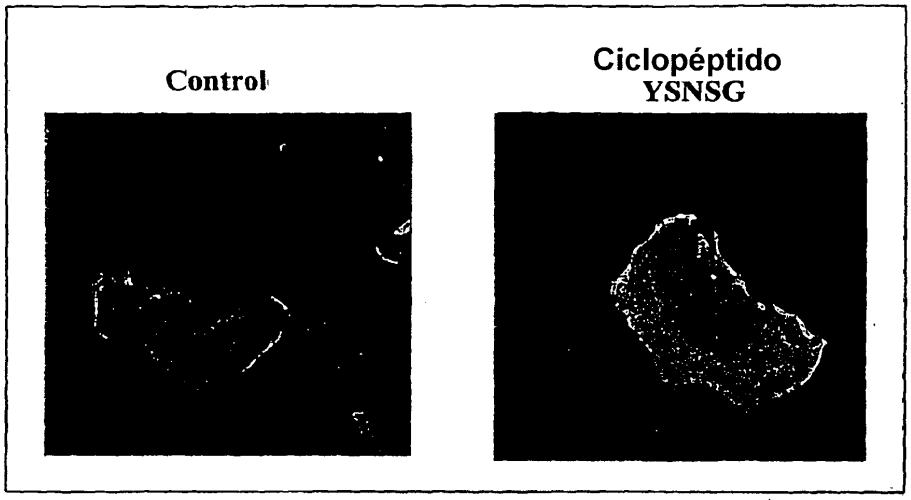


Figura 23