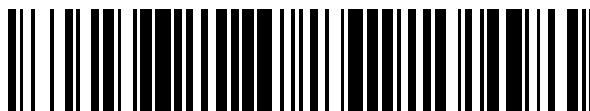


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 068**

51 Int. Cl.:
C07K 14/78 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05825649 .6**
96 Fecha de presentación: **21.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1831254**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Producto de conjugación**

30 Prioridad:
23.12.2004 US 638158 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2012

73 Titular/es:
Molmed SpA
Via Olgettina 58
20132 Milan, IT y
Ospedale San Raffaele S.r.l.

72 Inventor/es:
CORTI, Angelo y
CURNIS, Flavio

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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

ES 2 388 068 T3

DESCRIPCIÓN

Producto de conjugación.

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos que pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis y cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a péptidos de la matriz extracelular y derivados de los mismos, y, en particular, a péptidos que comprenden un resto DGR e isómeros de los mismos. La presente invención se refiere también a citoquinas modificadas, en particular a derivados de citoquinas capaces de "alojar" los vasos angiogénicos.

Antecedentes de la Invención

- 10 La matriz extracelular es un regulador importante del comportamiento de células y tejidos. Las proteínas de la matriz extracelular, tales como fibronectina, vitronectina, colágenos y laminina se fijan a cierto número de receptores celulares que controlan muchos fenómenos biológicos médicamente importantes, tales como angiogénesis, migración celular, reparación tisular, diferenciación de las células del cáncer, agregación plaquetaria y regreso de células del sistema inmunitario y procesos neuronales a sus sitios diana. Una familia importante de receptores que se fijan a la
- 15 la matriz extracelular son las integrinas.

- Las fibronectinas son grandes glicoproteínas de la matriz extracelular (~ 450 KDa) que han sido implicadas en la fijación de integrinas. Las mismas se componen de dos subunidades prácticamente idénticas unidas por disulfuro, estando constituida cada subunidad por tres tipos de módulos homólogos que se repiten denominados repeticiones FN-I, FN-II y FN-III. Adicionalmente, pueden estar presentes también módulos empalmados alternativamente, denominados EDA, EDB y IIICS (Mohri, 1997; Pankov y Yamada, 2002). Módulos individuales o grupos de módulos pueden contener sitios de fijación para moléculas diferentes, que incluyen glucosaminoglucanos sulfatados, DNA, gelatina, heparina y fibrina (Mohri, 1997; Pankov y Yamada, 2002; Yamada, 1989). Adicionalmente, las fibronectinas contienen sitios de fijación para aproximadamente la mitad de los receptores de integrinas conocidos de la superficie celular (Johansson et al., 1997; Plow et al., 2000). En particular, la repetición FN-III₁₀ contiene un sitio RGD que
- 20 puede fijar las integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_8\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$, mientras que la repetición FN-III₉ contiene el denominado "sitio de sinergia" PHSRN que coopera con RGD en la fijación de $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Busk et al., 1992; Dedhar y Gray, 1990; Gardner y Hynes, 1985; Johansson et al., 1997; Pankov y Yamada, 2002; Plow et al., 1985; Pytela et al., 1985; Smith et al., 1990; Takada et al., 1987; Vogel et al., 1990; Weinacker et al., 1994). La región FN-III₁₄-IIICS contiene tres sitios (denominados CS₁, CS₅ y H₁) caracterizados por la presencia de un resto LDV y sitios accesorios REDV e IDA implicados en el reconocimiento de $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ (Johansson et al., 1997; Pankov y Yamada, 2002). Además, la repetición FN-III₅ contiene la secuencia KLDAPT que fija $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ (Moyano et al., 1997), mientras que FN-I₁₋₉ y FN-II₁₋₂ contienen sitios, no identificados todavía, que pueden interaccionar con $\alpha_5\beta_1$ (Hocking et al., 1998).
- 30

- El análisis de la estructura primaria y terciaria de la fibronectina humana demostró que esta proteína contiene dos bucles GNGRG, localizados en módulos FN-I₅ y FN-I₇, que están conservados en bovinos, murinos, ratas, anfibios y peces (Di Matteo et al.). Dos sitios NGR adicionales, menos conservados, están presentes también en FN-II₁ y FN-III₉ humanos. Un trabajo experimental reciente ha demostrado que los péptidos que contienen el resto NGR pueden inhibir la adhesión celular mediada por $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_1$ a la fibronectina (Koivunen et al., 1993).
- 35

- La interacción entre las integrinas ancladas a la superficie celular y los componentes de la matriz extracelular ha sido implicada en la angiogénesis, un proceso importante en el crecimiento neonatal y en la patogénesis de una gran diversidad de enfermedades clínicas que incluyen inflamación tisular, artritis, crecimiento de tumores, retinopatía diabética, degeneración macular por neovascularización de la retina y condiciones análogas. Es sabido que la integrina $\alpha_v\beta_3$, el receptor de vitronectina, juega un papel crítico en la angiogénesis (Hynes, 2002). Es sabido que los compuestos capaces de inhibir la interacción de esta integrina con las proteínas de la matriz extracelular inhiben la
- 40 la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Brooks et al., 1994; Brooks et al., 1995; Friedlander et al., 1995; Friedlander et al., 1996; Harnmes et al., 1996). Sin embargo, un problema asociado con estos inhibidores es su reactividad cruzada con muchas especies de integrinas.
- 45

- En vista del conocimiento creciente del papel de la matriz extracelular en los procesos biológicos y el desarrollo de enfermedades, persiste una necesidad de nuevas terapéuticas que estén enfocadas a esta área. La presente invención aborda esta necesidad.
- 50

- La actividad antitumoral de algunas citoquinas está perfectamente conocida y descrita. Algunas citoquinas han sido utilizadas ya terapéuticamente también en humanos (Fiers et al., 1995). Por ejemplo, citoquinas tales como interleucina-2 (IL-2) e interferón α (IFN α) han demostrado actividad antitumoral positiva en pacientes con diferentes tipos de tumores, tales como el carcinoma metastásico de riñón, la leucemia de células vellosas, el sarcoma de Kaposi, el melanoma, el mieloma múltiple, y análogos. Otras citoquinas como IFN β , el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) α , TNF β , IL-1, 4, 6, 12, 15 y los Factores Estimulantes de colonias (CFs) han demostrado cierta actividad antitumoral sobre algunos tipos de tumores y por esta razón son objeto de estudios adicionales.
- 55

En general, el uso terapéutico de citoquinas se ve muy limitado por su toxicidad sistémica. TNF, por ejemplo, se descubrió originalmente por su capacidad para inducir la necrosis hemorrágica de algunos tumores (Carswell et al., 1975), y por su efecto citotóxico in vitro sobre diferentes líneas tumorales (Helson et al., 1975), pero se demostró posteriormente que tiene actividad pro-inflamatoria fuerte, que puede, en caso de condiciones de superproducción, afectar peligrosamente al cuerpo humano (Tracey et al., 1993).

Dado que la toxicidad sistémica es un problema fundamental con el uso de cantidades farmacológicamente activas de citoquinas en humanos, nuevos derivados y estrategias terapéuticas se encuentran actualmente bajo evaluación, orientados a reducir los efectos tóxicos de esta clase de efectores biológicos al tiempo que mantienen su eficacia terapéutica. Por ejemplo, WO 01/61017 describe un producto de conjugación entre TNF o IFN γ y un ligando del receptor CD13; WO 03/093478 describe una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una citoquina y un resto direccionado a tumores en la cual la citoquina está presente en una cantidad que no induce un mecanismo de realimentación negativo; y WO 03/092737 describe conjugados de diversas citoquinas y restos direccionados a tumores. La presente invención proporciona nuevos conjugados de citoquinas que tienen potencial terapéutico.

Sumario de la Invención

La desamidación de la asparagina (N), una modificación no enzimática posterior a la traducción de las proteínas, está considerada generalmente como un evento deletéreo asociado con el envejecimiento de las proteínas. En la presente solicitud se demuestra que una secuencia Asparagina-Glicina-Arginina (NGR) de la matriz extracelular puede promover la adhesión de las células endoteliales por un mecanismo inusual basado en la desamidación no enzimática de asparagina a ácido aspártico y ácido isoaspártico, generando un nuevo resto de adhesión celular. En particular, se demuestra que esta desamidación está asociada con una "ganancia de función"; siendo los fragmentos desamidados capaces de inhibir la adhesión de las células endoteliales a la vitronectina, inhibir la integrina $\alpha_v\beta_3$ e inhibir el crecimiento tumoral.

En particular, se ha demostrado que los isómeros LisoDGR y DGR exhiben fijación de la adhesión celular y propiedades anti-cáncer mejoradas sobre otras formas isómeras. Esto es sorprendente, dado que la gran mayoría de los péptidos comprenderán el enantiómero L de ácido aspártico. Los péptidos producidos por expresión génica comprenderán todos ellos el enantiómero L.

Se ha encontrado también que las citoquinas conjugadas a péptidos NGR desamidados tienen actividad sorprendente. Se ha encontrado previamente que el índice terapéutico de ciertas citoquinas puede mejorarse notablemente y sus propiedades inmunoterapéuticas pueden aumentarse por acoplamiento con un ligando que comprende el resto NGR, tal como un ligando modificado del receptor N de aminopeptidasa (CD13). CD13 es una glicoproteína transmembranal de 150 kDa altamente conservada en diversas especies. La misma se expresa en las células normales así como en líneas tumorales mieloides, en el endotelio angiogénico y en algunos epitelios. El receptor CD13 se identifica usualmente como receptor "NGR", en el sentido de que sus ligandos peptídicos comparten el resto aminoácido "NGR". Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que pueden conseguirse resultados similares o de hecho mejorados utilizando un ligando modificado en el cual el residuo asparaginilo (Asn o N) en el resto NGR está modificado a aspartilo (Asp o D), es decir un resto "DGR", por desamidación. El TNF acoplado con un ligando modificado de este tipo del receptor CD13 e IFN γ puede actuar también sinérgicamente de tal modo que puede observarse una actividad anti-tumoral eficaz después de co-administración a dosis que son inferiores a las dosis eficaces individualmente. Además, se ha encontrado que la actividad anti-tumoral de una combinación del TNF modificado y otro agente anti-tumoral, tal como melfalán, o doxorrubicina o cis-platino o gemcitabina o taxol, se incrementa por administración de IFN γ .

Declaraciones de la Invención

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que comprende un resto isoDGR.

La presente invención proporciona un péptido que comprende una secuencia seleccionada de CisoDGRCSVSGCAGRC, GisoDGRG, CisoDGRG, CisoDGRG, LQCICTGisoDGRGEWKCE, LQCISTGisoDGRGEWKCE, CICTGisoDGRGEWK, CISTGisoDGRGEWK, MRCTCVGisoDGRGEWTCY, MRCTSVGisoDGRGEWTCY, CTCVGisoDGRGEWTC o CTSVGisoDGRGEWTC, más preferiblemente una secuencia seleccionada de lineal CisoDGRG lineal, CisoDGRG cíclico, CisoDGRG lineal y C-isoDGRG cíclico.

En una realización, el péptido está constituido por una secuencia seleccionada de CisoDGRCSVSGCAGRC, GisoDGRG, CisoDGRG, CisoDGRG, LQCICTGisoDGRGEWKCE, LQCISTGisoDGRGEWKCE, CICTGisoDGRGEWK, CISTGisoDGRGEWK, MRCTCVGisoDGRGEWTCY, MRCTSVGisoDGRGEWTCY, CTCVGisoDGRGEWTC y CTSVGisoDGRGEWTC, más preferiblemente una secuencia seleccionada de CisoDGRG lineal, CisoDGRG cíclico, CisoDGRG lineal y CisoDGRG cíclico.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que comprende un resto LisoDGR .

Preferiblemente, el péptido comprende una secuencia seleccionada de $\text{C}_{\text{LisoDGR}}\text{CSVSGCAGRC}$, $\text{G}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{C}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{C}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{LQCICTG}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{LQCISTG}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{CICTG}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{CISTG}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{MRCTCVG}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{MRCTSVG}_{\text{LisoDGRG}}$, $\text{CTCVG}_{\text{LisoDGRG}}$ o $\text{CTSVG}_{\text{LisoDGRG}}$, más preferiblemente una secuencia seleccionada de $\text{C}_{\text{LisoDGRG}}$ lineal, $\text{C}_{\text{LisoDGRG}}$ cíclico, $\text{C}_{\text{LisoDGRG}}$ lineal y $\text{C}_{\text{LisoDGRG}}$ cíclico.

CICTG_LisoDGRGEWK, CISTG_LisoDGRGEWK, MRCTCVG_LisoDORGEWTCY, MRCTSVG_LisoDGRGEWTCY, CTCVG_LisoDGRGEWTC y CTSVG_LisoDGRGEWTC, más preferiblemente una secuencia seleccionada de C_LisoDGRG lineal, C_LisoDGRG cíclico, C_LisoDGRCG lineal y C_LisoDGRCG cíclico.

5 En una realización, el péptido está constituido por una secuencia seleccionada de C_LisoDGRG, C_LisoDGRG, C_LisoDGRG, LQCISTG_LisoDGRGEWKCE, LQCISTG_LisoDGRGEWKCE, CICTG_LisoDGRGEWK, CICTG_LisoDGRGEWK, MRCTCVG_LisoDGRGEWTCY, MRCTSVG_LisoDGRGEWTCY, CTCVG_LisoDGRGEWTC y CTSVG_LisoDGRGEWTC, más preferiblemente una secuencia seleccionada de C_LisoDGRG lineal, C_LisoDGRG cíclico, C_LisoDGRCG lineal y C_LisoDGRCG cíclico.

10 Se describe en esta memoria un péptido que comprende el resto isoDGR o el resto _LisoDGR que comprende un producto de desamidación de una proteína de la matriz extracelular, tal como, pero sin carácter limitante, fibronectina, vitronectina, colágeno o laminina, más preferiblemente un producto de desamidación de fibronectina, más preferiblemente un producto de desamidación del módulo FN-I₅, FN-I₇, FN-II₁ o FN-III₉ de fibronectina, o un fragmento o derivado de los mismos.

15 Preferiblemente, el fragmento comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ó 100 aminoácidos consecutivos de la proteína o módulo de la matriz extracelular.

Preferiblemente, el péptido de la presente invención inhibe de modo selectivo la integrina $\alpha_v\beta_3$ y/o inhibe la adhesión de las células endoteliales a la vitronectina. Preferiblemente, el péptido inhibe $\alpha_v\beta_3$, pero no inhibe $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$.

20 Preferiblemente, la CI₅₀ del péptido con respecto a la inhibición de $\alpha_v\beta_3$ es < 0,5 μ M, preferiblemente < 0,2 μ M. Preferiblemente, el ensayo utilizado para determinar la CI₅₀ se determina utilizando complejos de conjugados estreptavidina-peroxidasa como se describe en Materiales y Métodos. Preferiblemente, la CI₅₀ del péptido con respecto a $\alpha_v\beta_5$ y/o $\alpha_5\beta_1$ y/o $\alpha_1\beta_1$ es > 1,0 μ M, más preferiblemente > 2,0 μ M, > 3,0 μ M, y > 4,0 μ M.

Preferiblemente, el péptido de la presente invención inhibe el crecimiento tumoral.

Preferiblemente, el péptido de la presente invención inhibe la angiogénesis.

25 En una realización, el péptido de la presente invención no comprende un agente terapéutico adicional, con inclusión de un agente anticáncer o citoquina.

Preferiblemente, el péptido de la presente invención comprende una vuelta que implica los residuos G y R del resto DGR.

En una realización, el péptido de la presente invención comprende hasta 350, 100, 50, 25, 15, 10 ó 5 aminoácidos.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un producto de conjugación que comprende un péptido de la presente invención. Preferiblemente, el producto de conjugación es entre un péptido de la presente invención y un fármaco, citoquina, toxina de fragmento de citoquina, péptido apoptótico, radionucleido modificador de la respuesta biológica, partícula viral, gen o un compuesto de producción de imágenes. En una realización, el fármaco es un agente anticáncer tal como doxorubicina, melfalán, cis-platino, gemcitabina o taxol.

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un péptido o producto de conjugación de la presente invención, comprendiendo preferiblemente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Preferiblemente, la composición no comprende esencialmente péptido o conjugado alguno que tenga un resto NGR. En particular, cuando la composición comprende un péptido desamidado, preferiblemente la misma no comprende en esencia ningún péptido precursor es decir, esencialmente no comprende material de partida alguno. Preferiblemente, el péptido o conjugado de la composición comprende menos de 40, 30, 20, 15, 10, 5, 3 ó 1% de material de partida.

45 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención que comprenden péptidos y conjugados que contienen restos DGR están sustancialmente exentas de los péptidos y conjugados correspondientes que contienen el resto NGR correspondiente. Preferiblemente, la proporción de péptido que contiene DGR con relación al péptido total (es decir, péptido que contiene DGR y NGR) es mayor que 60%, más preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que 80%, más preferiblemente mayor que 85%, más preferiblemente mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 97%, y más preferiblemente mayor que 99% p/p.

La composición de la presente invención puede encontrarse en la forma de una solución o suspensión inyectable o un líquido para infusiones.

50 La composición de la presente invención puede encontrarse en la forma de liposomas.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un péptido, producto de conjugación o composición farmacéutica de la presente invención para tratar o diagnosticar un paciente que sufre trastornos que implican

α_3 tales como, pero sin carácter limitante, osteoporosis, artritis, retinopatía diabética, degeneración macular, restenosis o hemangioma.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un péptido, producto de conjugación o composición farmacéutica de la presente invención para tratar o diagnosticar un paciente que sufre osteoporosis, artritis, retinopatía diabética, degeneración macular, restenosis o hemangioma.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un péptido, producto de conjugación o composición farmacéutica de la presente invención para tratar o diagnosticar un paciente que sufre un cáncer tal como, pero sin carácter limitante, cáncer de pulmón, páncreas, mama, colon, laringe u ovario.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un producto de conjugación entre un péptido de la presente invención y una citoquina.

Una lista no limitante de citoquinas utilizadas en el conjugado de la presente invención es TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-1, 2, 4, 6, 7, 12, 15, EMAP II, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), PDGF, PD-ECGF o una quimioquina. Preferiblemente, la citoquina del conjugado se selecciona de TNF, IFN γ , IL-12, IP-10, IL-7 o EMAP II. Más preferiblemente, la citoquina se selecciona de TNF, IFN γ o IL-12.

Preferiblemente, el TNF es TNF α o TNF β .

En una realización, la citoquina está derivatizada con polietilenglicol o un residuo acilo.

En otra realización, la citoquina está conjugada ulteriormente con un compuesto seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y biotina, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo está dirigido a un compuesto seleccionado del grupo constituido por un antígeno tumoral, un marcador tumoral angiogénico o un componente de la matriz extracelular.

En otra realización, la citoquina es TNF y está conjugada a la vez con el resto diana y con un compuesto seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y biotina.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un producto de conjugación de TNF de la presente invención, y una cantidad eficaz de IFN γ o un polinucleótido que codifica el mismo.

Preferiblemente, el péptido o conjugado de la presente invención es distinto del que se forma in vivo por metabolismo de un péptido o conjugado que comprende un resto NGR.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido o conjugado de la presente invención que puede obtenerse por tratamiento térmico.

La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente otro agente antitumoral, tal como, pero sin carácter limitante, doxorubicina o melfalán, o cisplatino, o gemcitabina, o taxol, o un compuesto de producción de imágenes tumorales de diagnóstico.

Descripción Detallada

Diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención se describirán a continuación por medio de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, DNA recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Methods in Enzymology, Academic Press. Cada uno de estos textos generales se incorpora en esta memoria por referencia.

Motivo DGR

Es bien sabido que el ácido aspártico puede existir en una forma isómera estructural diferente, a saber ácido isoaspártico (véase Figura 14).

El ácido aspártico y el ácido isoaspártico son ambas moléculas quirales, y puede hacerse referencia a los diferentes isómeros como L-AsP (LD), LisoAsp (LisoD), DAsP (DD) y DisoAsp (DisoD), donde LisoD y DisoD representan los enantiómeros de ácido isoaspártico, y LD y DD representan los enantiómeros de ácido aspártico.

Cuando la técnica anterior hace referencia a DGR, la misma se refiere esencialmente a LisoDGR . Como se utiliza en esta memoria, el término DGR se refiere a un resto DGR que comprende D y/o LisoD o mixturas de los mismos y que puede comprender adicionalmente L y DisoD . Preferiblemente, el DGR se genera por desamidación del resto NGR correspondiente. En una realización, el resto DGR comprende al menos 10% p/p de LisoDGR . En otra realización, el resto DGR comprende al menos 10% p/p de DGR .

Por un péptido o resto de direccionamiento que comprende un resto isoDGR se entiende un péptido o resto de direccionamiento en el cual el resto DGR se encuentra sustancialmente en la forma de isoDGR . Por sustancialmente, se entiende que el % p/p de péptido o resto de direccionamiento que comprende el resto isoDGR con relación al péptido o resto de direccionamiento que contiene DGR total es mayor que 55%, más preferiblemente mayor que 60%, más preferiblemente mayor que 65%, más preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que 75%, más preferiblemente mayor que 80%, más preferiblemente mayor que 85%, más preferiblemente mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 97%, y más preferiblemente mayor que 99%. El isoDGR puede comprender ambos enantiómeros de LisoD , pero comprende preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 30, más preferiblemente al menos 40, y más preferiblemente al menos 50% p/p de LisoD .

Por un péptido o resto de direccionamiento que comprende un resto LisoDGR se entiende un péptido o resto de direccionamiento en el cual el resto DGR se encuentra sustancialmente en la forma de LisoDGR . Por sustancialmente, se entiende que el % p/p de péptido o resto de direccionamiento que comprende el resto LisoDGR con relación al péptido o resto de direccionamiento que contiene DGR total es mayor que 55%, más preferiblemente mayor que 60%, más preferiblemente mayor que 65%, más preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que 75%, más preferiblemente mayor que 80%, más preferiblemente mayor que 85%, más preferiblemente mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 97%, y más preferiblemente mayor que 99%.

Por un péptido o resto de direccionamiento que comprende un resto DGR se entiende un péptido o resto de direccionamiento en donde el resto DGR se encuentra sustancialmente en la forma de DGR . Por sustancialmente se entiende que el % p/p de péptido o resto de direccionamiento que comprende el resto DGR con relación al péptido o resto de direccionamiento que contiene DGR total es mayor que 55%, más preferiblemente mayor que 60%, más preferiblemente mayor que 65%, más preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que 75%, más preferiblemente mayor que 80%, más preferiblemente mayor que 85%, más preferiblemente mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 97%, y más preferiblemente mayor que 99%.

El resto DGR de la presente invención comprende preferiblemente una vuelta que implica los residuos G y R. Cuando se llega al resto DGR por desamidación del resto NGR correspondiente, es preferible que el resto NGR comprenda una vuelta que implique los residuos G y R. La relación estructura-actividad de los péptidos lineales y cíclicos que contienen el resto NGR y su capacidad para direccionarse a tumores se exponen en Colombo et al., J. Biol. Chem., 2002, 49, 47891-47897. Los experimentos realizados en modelos animales han demostrado que tanto GNGRG como CNGRC pueden direccionar el TNF a tumores. La simulación molecular dinámica de CNGRC cíclico demostró la presencia de una geometría de flexión que implica residuos $\text{Gly}^3\text{-Arg}^4$, estabilizados por la formación de un puente disulfuro. La simulación molecular dinámica del mismo péptido sin restricciones disulfuro demostró que la configuración más abundante y favorecida termodinámicamente se caracteriza por la presencia de una vuelta β que implica residuos $\text{Gly}^3\text{-Arg}^4$. Estos resultados sugieren que el resto NGR tiene una fuerte propensión a formar vuelta β en péptidos lineales y pueden explicar el descubrimiento de que este péptido GNGRG puede direccionar TNF a tumores, aunque en menor grado que CNGRC.

El análisis de la estructura tridimensional del dominio de fibronectina FN-I₅ demostró que el resto GNGRG forma un bucle expuesto, fácilmente accesible al agua y a los receptores (véase Fig. 1B). La simulación molecular dinámica de un péptido NGR con cisteínas flanqueantes (CNGRC), utilizado en la presente solicitud como un sustitutivo molecular del resto NGR de fibronectina, demostró que su estructura es superponible a la del bucle FN (Di Matteo et al., 2002).

Desamidación

La desamidación de los residuos asparagina da como resultado la conversión en isoaspartato y aspartato. El proceso se muestra en la Figura 14.

La desamidación a que se hace referencia en esta memoria puede llevarse a cabo en cualesquiera condiciones adecuadas identificadas fácilmente por una persona con experiencia en la técnica. La desamidación de la presente invención se lleva a cabo in vitro.

En una realización, la desamidación se lleva a cabo por calentamiento del péptido NGR que comprende NGR. La temperatura requerida puede variar dependiendo de la naturaleza exacta del péptido y es fácilmente determinable por un experto en la técnica. Preferiblemente, la temperatura es suficiente para inducir desamidación del residuo asparagina, pero no es tan alta como para desnaturar o deteriorar el péptido. Una temperatura adecuada puede ser, por ejemplo, entre 25-50, 30-40 ó 35-40°C.

La desamidación puede realizarse también por incubación del péptido en condiciones básicas, por regla general aproximadamente a pH 8, v.g., por incubación en una solución de bicarbonato de amonio. La naturaleza exacta de las condiciones básicas puede variar dependiendo de la naturaleza exacta del péptido, pero éstas son fácilmente determinables por un experto en la técnica. Preferiblemente, las condiciones básicas son suficientes para inducir desamidación del residuo asparagina, pero no son tales que el péptido remanente se desnaturalice o deteriore. Condiciones básicas adecuadas pueden ser, por ejemplo, entre pH 7,5 y 9,0, 8,0-9,0 ó 8,0-8,5.

En una realización preferida, la desamidación se lleva a cabo bajo calentamiento en un disolvente básico.

Péptidos

El término "péptido", como se utiliza en esta memoria, incluye polipéptidos y proteínas. El término "polipéptido" incluye moléculas polipeptídicas monocatenarias así como complejos de polipéptidos múltiples donde los polipéptidos individuales constituyentes están enlazados por medios covalentes o no covalentes. El término "polipéptido" incluye péptidos de dos o más aminoácidos de longitud, que tienen típicamente más de 5, 10, 20, 30, 40, 50, ó 100 aminoácidos.

Los péptidos de la presente invención pueden administrarse terapéuticamente a pacientes. Se prefiere utilizar péptidos que no estén constituidos exclusivamente por aminoácidos existentes naturalmente, sino que hayan sido modificados, por ejemplo para reducir la inmunogenicidad, aumentar la semivida circulatoria en el cuerpo del paciente, mejorar la biodisponibilidad y/o mejorar la eficacia y/o especificidad.

Se han utilizado cierto número de enfoques para modificar péptidos para aplicación terapéutica. Un enfoque consiste en enlazar los péptidos o proteínas a una diversidad de polímeros, tales como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG) - véanse, por ejemplo las Patentes U.S. Núms. 5.091.176, 5.214.131 y US 5.264.209.

El reemplazamiento de aminoácidos existentes naturalmente con una diversidad de aminoácidos no codificados o modificados tales como D-aminoácidos y N-metil-aminoácidos puede utilizarse también para modificar los péptidos.

Otro enfoque consiste en utilizar reticuladores bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato, succinimidil-6-[3-(2-piridilditio)-propionamido]-hexanoato, y sulfosuccinimidil-6-[3-(2-piridilditio)-propionamido]hexanoato (véase la Patente US 5.580.853).

Puede ser deseable utilizar derivados de los péptidos de la invención que están restringidos por conformación. La restricción por conformación se refiere a la estabilidad y conformación preferida de la forma tridimensional asumida por un péptido. Las restricciones por conformación incluyen restricciones locales, que implica restringir la movilidad conformacional de un solo residuo en un péptido; restricciones regionales, que implican restringir la movilidad conformacional de un grupo de residuos, residuos que pueden formar alguna unidad estructural secundaria; y restricciones globales, que implican la estructura del péptido total.

La conformación activa del péptido puede estar estabilizada por una modificación covalente, tal como ciclación o por incorporación de gamma-lactama u otros tipos de puentes. Por ejemplo, las cadenas laterales pueden ciclarse a la cadena principal a fin de crear un resto L-gamma-lactama en ambos lados del sitio de interacción. Véase, en líneas generales, Hruby et al., "Applications of Synthetic Peptides," en Synthetic Peptides: A User's Guide: 259-345 (W. H. Freeman & Co. 1992). La ciclación puede conseguirse también, por ejemplo, por formación de puentes cisteína, acoplamiento de los grupos terminales amino y carboxi de aminoácidos terminales respectivos, o acoplamiento del grupo amino de un residuo Lys o un homólogo afín con un grupo carboxi de Asp, Glu o un homólogo afín. Puede realizarse también el acoplamiento del grupo alfa-amino de un polipéptido con el grupo épsilon-amino de un residuo lisina, utilizando anhídrido yodoacético. Véase Wood y Wetzell, 1992, Int'l J. Peptide Protein Res. 39:533-39.

Otro enfoque descrito en US 5.891-418 consiste en incluir una cadena principal complejante de iones metálicos en la estructura del péptido. Típicamente, la cadena principal metal-péptido preferida está basada en el número exigido de grupos de coordinación particulares requeridos por la esfera de coordinación de un ion metálico complejante dado. En general, la mayor parte de los iones metálicos que pueden demostrar utilidad tiene un número de coordinación de 4 a 6. La naturaleza de los grupos de coordinación en la cadena del péptido incluye átomos de nitrógeno con funcionalidades amina, amida, imidazol, o guanidino; átomos de azufre de tioles o disulfuros; y átomos de oxígeno de funcionalidades hidroxilo, fenólica, carbonilo, o carboxilo. Adicionalmente, la cadena peptídica o los aminoácidos individuales pueden estar modificados químicamente para incluir un grupo de coordinación, tal como por ejemplo oxima, hidracino, sulfhidrido, fosfato, ciano, piridino, piperidino, o morfolino. El constructo peptídico puede ser lineal o cíclico; no obstante, se prefiere típicamente un constructo lineal. Un ejemplo de un péptido lineal pequeño es Gly-Gly-Gly-Gly que tiene cuatro nitrógenos (un sistema de complejación N₄) en la cadena principal que puede complejarse a un ion metálico con un número de coordinación de 4.

Una técnica adicional para mejorar las propiedades de los péptidos terapéuticos consiste en utilizar peptidomiméticos no peptídicos. Una gran diversidad de técnicas útiles pueden utilizarse para dilucidar la estructura precisa de un péptido. Estas técnicas incluyen secuenciación de aminoácidos, cristalografía de rayos X, espectroscopia de masas, espectroscopia de resonancia magnética nuclear, modelización molecular asistida por computadora, mapeado de péptidos, y combinaciones de las mismas. El análisis estructural de un péptido proporciona generalmente un gran

cuerpo de datos que comprenden la secuencia de aminoácidos del péptido así como el posicionamiento tridimensional de sus componentes atómicos. A partir de esta información, pueden diseñarse peptidomiméticos no peptídicos que tengan las funcionalidades químicas requeridas para actividad terapéutica pero que sean más estables, por ejemplo menos susceptibles a la degradación biológica. Un ejemplo de este enfoque se proporciona en US 5.811.512.

Las técnicas para síntesis química de péptidos terapéuticos de la invención se describen en las referencias anteriores y han sido revisadas también por Borgia y Fields, 2000, TibTech 18:243-251 y se describen en detalle en las referencias contenidas en dichos lugares.

Variantes, Derivados y Fragmentos de Péptidos

Los términos "variante" o "derivado" en relación con las secuencias de aminoácidos de la presente invención incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, delección de o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia con la condición de que la secuencia de aminoácidos resultante tenga preferiblemente actividad de direccionamiento, teniendo preferiblemente al menos 25 a 50% de la actividad de los polipéptidos presentados en los listados de secuencias, más preferiblemente al menos sustancialmente la misma actividad.

Así, las secuencias pueden modificarse para uso en la presente invención. Típicamente, se hacen modificaciones que mantienen la actividad de la secuencia. Así, en una realización, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones con tal que la secuencia modificada retenga al menos aproximadamente 25 a 50% de, o sustancialmente la misma actividad. Sin embargo, en una realización alternativa, las modificaciones a las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de la invención pueden hacerse intencionalmente para reducir la actividad biológica del polipéptido. Por ejemplo, pueden ser útiles polipéptidos truncados que siguen siendo capaces de fijarse a la molécula diana pero que carecen de dominios efectores funcionales.

En general, preferiblemente menos de 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos de una variante o derivado están modificados en comparación con la región correspondiente representada en los listados de secuencia.

Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos no existentes naturalmente, por ejemplo para aumentar la semivida en el plasma sanguíneo de un polipéptido administrado terapéuticamente (véase más adelante para detalles adicionales acerca de la producción de derivados peptídicos para uso en terapia).

Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse unos por otros:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		ILV
	Polar – sin carga	CSTM
		N Q
	Polar – con carga	D E
		K R H
AROMÁTICO		F W Y

Los polipéptidos de la invención incluyen también fragmentos de los polipéptidos arriba mencionados y variantes de los mismos, con inclusión de fragmentos de las secuencias. Fragmentos preferidos incluyen aquéllos que comprenden un epítipo o dominio de fijación. Fragmentos adecuados tendrán al menos aproximadamente 5, v.g., 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud. Los mismos pueden tener también una longitud menor que 200, 100 ó 50 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptidos de las proteínas y variantes alélicas y de especie de los mismos pueden contener una o más (v.g. 2, 3, 5, ó 10) sustituciones, delecciones o inserciones, con inclusión de sustituciones conservadas. En los casos en que se han hecho sustituciones, delecciones y/o inserciones, por ejemplo por medio de tecnología recombinante, preferiblemente menos de 20, 10, ó 5% de los residuos de aminoácidos representados en los listados de las secuencias están modificados.

Los polipéptidos y conjugados de la invención se producen típicamente por medios recombinantes, por ejemplo como se describe más adelante. Sin embargo, los mismos pueden producirse también por medios sintéticos utilizando técnicas bien conocidas para las personas expertas tales como síntesis en fase sólida. Diversas técnicas para síntesis química de péptidos han sido revisadas por Borgia y Fields, 2000, TibTech 18:243-251 y descritos en detalle en las referencias contenidas en dicho lugar.

Polinucleótidos

Los polinucleótidos para uso en la invención comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos y conjugados de la invención. En particular, los polinucleótidos pueden codificar péptidos o conjugados precursores que comprenden el resto NGR que, después de desamidación, proporciona péptidos y conjugados que comprenden el resto DGR correspondiente.

Será comprendido por una persona experta que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Adicionalmente, debe entenderse que las personas expertas pueden, utilizando técnicas de rutina, realizar sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia del polipéptido codificado por los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el cual deban expresarse los polipéptidos de la invención.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender DNA o RNA. Los mismos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Pueden ser también polinucleótidos que incluyen en su interior nucleótidos sintéticos o modificados. Cierta número de tipos diferentes de modificación de nucleótidos se conocen en la técnica. Éstos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que los polinucleótidos descritos en esta memoria pueden estar modificados por cualquier método disponible en el campo de la invención.

Tales modificaciones pueden realizarse a fin de mejorar la actividad *in vivo* o la duración de vida de los polinucleótidos.

Los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en un vector recombinante replicable. El vector puede utilizarse para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Así, en una realización adicional, la invención proporciona un método de producción de nucleótidos de la invención por introducción de un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introducción del vector en una célula hospedadora compatible, y cultivo de la célula hospedadora en condiciones que den como resultado la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula hospedadora. Células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas de células de mamífero y otras líneas de células eucariotas, por ejemplo células de insecto Sf9.

Preferiblemente, un polinucleótido de la invención en un vector está enlazado operativamente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula hospedadora, es decir que el vector es un vector de expresión. El término "enlazado operativamente" significa que los componentes descritos se encuentran en una relación que permite que los mismos funcionen de su manera deseada. Una secuencia reguladora "enlazada operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Las secuencias de control pueden estar modificadas, por ejemplo por la adición de elementos adicionales reguladores de la transcripción que hacen el nivel de transcripción dirigido por las secuencias de control más sensible a los moduladores de la transcripción.

Los vectores de la invención pueden transformarse o transfectarse en una célula hospedadora adecuada como se describe más adelante para proporcionar la expresión de una proteína de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión como se ha descrito arriba en condiciones que proporcionen la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifique la proteína, y recuperar opcionalmente la proteína expresada.

Los vectores pueden ser por ejemplo vectores de plásmido o de virus provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a la neomicina para un vector de mamífero. Los vectores pueden utilizarse, por ejemplo, para transfectar o transformar una célula hospedadora.

Las secuencias de control enlazadas operativamente a secuencias que codifican la proteína de la invención incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control pueden seleccionarse de modo que sean compatibles con la célula hospedadora para la cual está diseñado a ser utilizado el vector de expresión. El término "promotor" es bien conocido en la técnica y abarca regiones de ácido nucleico que están comprendidas en tamaño y complejidad desde promotores mínimos a promotores que incluyen elementos e intensificadores aguas arriba.

El promotor se selecciona típicamente de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque pueden utilizarse promotores procariotas y promotores funcionales en otras células eucariotas. El promotor se deriva típicamente de secuencias promotoras de genes virales o eucariotas. Por ejemplo, puede tratarse de un promotor derivado del genoma de una célula en la cual debe producirse la expresión. Con respecto a los promotores eucariotas, los mismos pueden ser promotores que funcionan de una manera ubicua (tales como promotores de α -actina, β -actina, tubulina) o, alternativamente, de una manera específica de tejido (tales como promotores de los genes para piruvato-quinasa). Pueden utilizarse también promotores con especificidad tisular específicos para ciertas células. Pueden ser también promotores que responden a estímulos específicos, por ejemplo promotores que fijan receptores de hormonas esteroidales. También pueden utilizarse promotores virales, por ejemplo el promotor de la replicación terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) o el promotor humano IE del citomegalovirus (CMV).

Puede ser también ventajoso que los promotores sean inducibles a fin de que los niveles de expresión del gen heterólogo puedan regularse durante el tiempo de vida de la célula. Inducible significa que los niveles de expresión obtenidos utilizando el promotor pueden ser regulados.

Adicionalmente, cualquiera de estos promotores puede modificarse por la adición de secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo secuencias intensificadoras. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes arriba descritos.

Los vectores y polinucleótidos de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para el propósito de replicación de los vectores/polinucleótidos y/o expresión de las proteínas de la invención codificadas por los polinucleótidos de la invención. Aunque las proteínas de la invención pueden producirse utilizando las células procariotas como células hospedadoras, se prefiere utilizar células eucariotas, por ejemplo células de levadura, insecto o mamífero, en particular células de mamífero.

Los vectores/polinucleótidos de la invención pueden introducirse en células hospedadoras adecuadas utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica, tales como transfección, transformación y electroporación. En los casos en que los vectores/polinucleótidos de la invención deben administrarse a animales, se conocen varios métodos en la técnica, por ejemplo infección con vectores virales recombinantes tales como retrovirus, virus del herpes simplex y adenovirus, inyección directa de ácidos nucleicos y transformación biolística.

Las células hospedadoras que comprenden los polinucleótidos de la invención pueden utilizarse para expresar los conjugados de la invención. Las células hospedadoras pueden cultivarse en condiciones adecuadas que permiten la expresión de los polipéptidos y conjugados de la invención. La expresión de los productos de la invención puede ser constitutiva, de tal modo que los mismos se produzcan continuamente, o inducible, requiriendo un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de la expresión inducible, la producción de la proteína puede iniciarse en el momento requerido, por ejemplo por adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo dexametasona o IPTG.

Conjugados

La presente invención se refiere a un conjugado que es una molécula que comprende un péptido o resto de direccionamiento de la invención enlazado a al menos otro agente, con inclusión, pero sin carácter limitante, de un fármaco, una citoquina, una toxina, un péptido apoptótico, un radionucleido, una partícula viral, un gen o un compuesto de producción de imágenes, formado por fusión genética o acoplamiento químico. Una lista no limitante de citoquinas utilizadas en el conjugado de la presente invención es $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1, 2, 4, 6, 7, 12, 15, EMAP II, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), PDGF, PD-ECGF o una quimioquina.

Los conjugados incluyen proteínas de fusión en las cuales el péptido o resto de direccionamiento está enlazado a un agente por la vía de su cadena principal polipeptídica por expresión genética de una molécula de DNA que codifica estas proteínas, proteínas sintetizadas directamente y proteínas acopladas en las cuales las secuencias preformadas están asociadas con un agente de reticulación. El término se utiliza también en esta memoria para incluir asociaciones, tales como agregados.

El péptido o resto de direccionamiento puede acoplarse directamente al agente o indirectamente a través de un espaciador, que puede ser un aminoácido simple (v.g., G (glicina)), una secuencia de aminoácidos o un residuo orgánico, tal como 6-aminocapril-N-hidroxisuccinimida.

En una realización, el péptido o resto de direccionamiento está enlazado al término N o al término C de la citoquina, minimizando así cualquier interferencia en la fijación de la citoquina modificada a su receptor. Alternativamente, el péptido o resto de direccionamiento puede estar enlazado a residuos de aminoácidos que son aceptores de enlaces amido o carboxílicos, que pueden existir naturalmente en la molécula o pueden insertarse artificialmente utilizando técnicas de ingeniería genética.

En una realización, el ligando del péptido está enlazado preferiblemente al término N o al término C de la citoquina, minimizando así cualquier interferencia en la fijación de la citoquina modificada a su receptor. Alternativamente, el péptido puede estar enlazado a residuos de aminoácidos que son aceptores de enlaces amido o carboxílicos, que

se encuentran naturalmente en la molécula o se insertan artificialmente con técnicas de ingeniería genética. La citoquina modificada se prepara preferiblemente por el uso de un cDNA que comprende una secuencia contigua 5' que codifica el péptido.

- 5 De acuerdo con una realización preferida, se proporciona un producto de conjugación entre TNF y el péptido CDGRC, CisoDGRC, C_LisoDGRC o C_DDGRC. Preferiblemente, el terminal amino de TNF está enlazado al péptido, preferiblemente a través de un espaciador. Con preferencia, el espaciador es G (glicina).

De acuerdo con otra realización preferida, se proporciona un producto de conjugación entre IFN γ y el péptido CDGRC, CisoDGRC, C_LisoDGRC o C_DDGRC. Preferiblemente, el terminal amino de TNF está enlazado al péptido, con preferencia a través de un espaciador. Preferiblemente, el espaciador es G (glicina).

- 10 De acuerdo con otra realización preferida, se proporciona un producto de conjugación entre IL-12 y el péptido CDGRC, CisoDGRC, C_LisoDGRC o C_DDGRC. Preferiblemente, el terminal amino de TNF está enlazado al péptido, con preferencia a través de un espaciador. Preferiblemente, el espaciador es G (glicina).

- 15 El índice terapéutico de los conjugados TNF/DGR puede mejorarse adicionalmente por utilización de una forma mutante de TNF capaz de fijarse selectivamente a uno de los dos receptores de TNF, p75TNFR y p55TNFR. Dicho mutante de TNF puede obtenerse por mutagénesis orientada (Loetscher et al., 1993, Van Ostade et al., 1993).

La farmacocinética de las citoquinas modificadas acuerdo con la invención puede mejorarse por preparación de derivados de polietilenglicol, que permiten prolongar la semivida plasmática de las citoquinas propiamente dichas.

Derivados bifuncionales

- 20 Una realización adicional de la invención es proporcionada por derivados bifuncionales en los cuales los péptidos o conjugados de la invención están conjugados con anticuerpos, o sus fragmentos, contra antígenos tumorales u otros marcadores angiogénicos de tumores, v.g. integrinas α_v , metaloproteasas o el factor de crecimiento vascular, o anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos contra componentes de la matriz extracelular, tales como anticuerpos anti-tenascina o el dominio EDB anti-fibronectina. La preparación de un producto de fusión entre TNF y la región bisagra de un mAb contra el antígeno TAG72 asociado a tumores expresado por el adenocarcinoma gástrico y ovárico ha sido publicada recientemente (Yang et al., 1995).

- 25 Una realización adicional de la invención es proporcionada por el pre-direccionamiento tumoral con el sistema biotina/avidina. De acuerdo con este enfoque, se obtiene un complejo ternario en el sitio antigénico tumoral, en diferentes etapas, que está formado por 1) mAb biotinilado, 2) avidina (o estreptavidina) y 3) un péptido o conjugado de la invención y biotina. Varios artículos han demostrado que el enfoque de pre-direccionamiento, comparado con el direccionamiento convencional con inmunoconjugados, puede aumentar realmente la ratio de molécula activa alojada en la diana a molécula activa libre, reduciendo así la toxicidad del tratamiento (Colombo et al., 1993; Modorati et al., 1994; Paganelli et al., 1995, 1991). Este enfoque produjo resultados favorables con TNF biotinilado, que era capaz de inducir citotoxicidad *in vitro* y reducir el crecimiento de las células tumorales en condiciones en las cuales el TNF normal era inactivo (Moro et al., Gasparry et al., 1999). El enfoque de pre-direccionamiento puede realizarse también con un procedimiento de dos fases utilizando un anticuerpo biespecífico que fija al mismo tiempo el antígeno tumoral y la citoquina modificada.

El uso de un anticuerpo biespecífico dirigido contra un antígeno carcinoembrionario y TNF ha sido descrito recientemente como medio para el pre-direccionamiento tumoral de TNF (Robert et al., 1996).

- 40 De acuerdo con una realización adicional, la invención comprende una molécula de TNF conjugada a la vez con un péptido de la invención (v.g., el péptido que comprende DGR) y un anticuerpo, o un fragmento del mismo (directa o indirectamente a través de un puente biotina-avidina), en diferentes subunidades de TNF, donde el anticuerpo o sus fragmentos están dirigidos contra un antígeno expresado en células tumorales u otros componentes del estroma del tumor, v.g., el dominio EDB de tenascina y fibronectina. Esto da como resultado una mejora adicional de las propiedades de regresión del tumor de la citoquina modificada y la liberación lenta de la última en el microentorno del tumor por transcripciones trímero- monómero-trímero. Como se ha demostrado en trabajos previos, de hecho, las subunidades modificadas de los conjugados de TNF pueden disociarse de los complejos de direccionamiento y reasociarse de tal modo que formen moléculas de TNF trímeras no modificadas, las cuales se difunden luego en el microentorno del tumor. Se ha demostrado que la liberación de TNF bioactivo ocurre dentro de 24-48 horas después del direccionamiento (Corti et al., 1998).

- 50 Matriz extracelular

El término "componente de la matriz extracelular" (ECM), como se utiliza en esta memoria, significa una molécula que ocupa los espacios extracelulares de los tejidos.

- 55 En una realización, el componente ECM se selecciona de fibronectina, vitronectina, colágeno o laminina. Componentes preferidos del ECM son los módulos FN-I₅, FN-I₇, FN-II₁ o FN-III₉ de fibronectina, o fragmentos de los mismos. Preferiblemente, los fragmentos comprenden el resto NGR o, después de desamidación, el resto DGR.

Los componentes preferidos del ECM de acuerdo con la presente invención son aquéllos que exhiben propiedades modificadas, tales como adhesión incrementada de células endoteliales y/o fijación incrementada de integrinas (v.g., $\alpha_5\beta_3$) después de desamidación de los residuos asparagina. Componentes particularmente preferidos del ECM son aquéllos que comprenden un resto NGR que sufre desamidación a DGR, preferiblemente α -DGR o β -DGR.

5 Citoquinas

La penetración del fármaco en las células neoplásticas es crítica para la eficacia de la quimioterapia de los tumores sólidos. Para alcanzar las células del cáncer en los tumores sólidos, los fármacos quimioterapéuticos deben penetrar en los vasos sanguíneos del fármaco, atravesar la pared de los vasos y finalmente migrar a través del intersticio. La perfusión tumoral heterogénea, la permeabilidad vascular y la densidad de células, así como la presión intersticial incrementada pueden representar barreras críticas que pueden limitar la penetración de los fármacos en las células neoplásticas y, en consecuencia, la eficacia de la quimioterapia. Las citoquinas que tienen el efecto de afectar a estos factores son por tanto útiles en la presente invención. Una lista no limitante de citoquinas que pueden utilizarse en la presente invención es TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-1, 2, 4, 6, 7, 12, 15, IP-10, EMAP II, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), PDGF, PD-ECGF o una quimioquina.

15 TNF

El TNF actúa como una citoquina inflamatoria y tiene el efecto de inducir la alteración de la función de barrera endotelial, reducir la presión intersticial tumoral, y aumentar la penetración de los fármacos quimioterapéuticos y el deterioro de los vasos tumorales.

La primera sugerencia de que existía una molécula necrotizante de los tumores se hizo cuando se observó que los pacientes de cáncer exhibían ocasionalmente una regresión espontánea de sus tumores después de infecciones bacterianas. Estudios subsiguientes en los años 1960 indicaron que mediadores asociados al hospedador (o endógenos), producidos en respuesta a productos bacterianos, eran probablemente responsables de los efectos observados. En 1975 se demostró que un factor circulante inducido bacteriamente tenía fuerte actividad anti-tumoral contra tumores implantados en la piel de los ratones. Este factor, designado factor de necrosis tumoral (TNF), se aisló y clonó subsiguientemente, y se encontró que era el prototipo de una familia de moléculas que están implicadas con la regulación inmunitaria y la inflamación. Los receptores para TNF y los otros miembros de la superfamilia TNF constituyen también una superfamilia de proteínas afines.

Los ligandos afines a TNF comparten usualmente cierto número de características comunes. Estas características no incluyen un alto grado de homología de la secuencia global de aminoácidos (aa). Con la excepción del factor de crecimiento de los nervios (NGF) y TNF-beta, todos los ligandos son sintetizados como proteínas transmembranales tipo II (término C extracelular) que contienen un segmento citoplásmico corto (10-80 residuos aa) y una región extracelular relativamente larga (140-215 residuos aa). NGF, que no es estructuralmente afín a TNF, se incluye en esta superfamilia únicamente debido a su capacidad para fijarse al receptor de NGF de afinidad baja TNFRSF (LNGFR). NGF tiene un péptido de secuencia señal clásico y es secretado. En contraste, TNF- β , aunque también es secretado completamente, tiene una estructura primaria mucho más afín a las proteínas transmembranales tipo II. TNF- β podría considerarse como una proteína tipo II con un segmento transmembranal no funcional, o ineficiente. En general, los miembros TNFSF forman estructuras trímeras, y sus monómeros están compuestos de cadenas beta que se orientan a sí mismas en una estructura de dos hojas. Como consecuencia de la estructura trímera de estas moléculas, se sugiere que los ligandos y receptores de las superfamilias TNFSF y TNFRSF sufren "aglomeración" durante la transducción de las señales.

TNF- α : El TNF- α humano es un polipéptido no glucosilado de 233 aa, que existe como una proteína transmembranal o soluble. Cuando se expresa como una proteína de 96 kDa fijada a la membrana, el TNF- α está constituido por un dominio citoplásmico residual de 29 aa, un segmento transmembranal residual de 28 aa, y una región extracelular residual de 176 aa. La proteína soluble es creada por un suceso de escisión proteolítica por la vía de una enzima convertidora de TNF-alfa (TACE) de 85 kDa, que genera una molécula residual de 17 kDa con 157 aa, que circula normalmente como un homotrímero.

TNF- β /LT- α : El TNF- β , conocido de otro modo como linfotóxina- α (LT- α) es una molécula cuya clonación fue contemporánea con la de TNF- α . Aunque TNF- β circula como un polipéptido glucosilado de 25 kDa que tiene 171 residuos aa, se ha encontrado una forma mayor que tiene una longitud de 194 residuos aa. El cDNA del TNF- β humano codifica un marco de lectura abierto de 205 residuos aa (202 en el ratón), y presumiblemente ocurre algún tipo de procesamiento proteolítico durante la secreción. Como en el caso del TNF- α , existe TNF- β circulante como un trímero enlazado no covalentemente y se sabe que se fija a los mismos receptores que TNF- α .

En una realización, el TNF es una forma mutante de TNF capaz de fijarse selectivamente a uno de los receptores de TNF (Loetscher H *et al* (1993) J Biol Chem 268:26350-7; Van Ostade X *et al* (1993) Nature 361:266-9).

La dosis máxima tolerada de TNF en bolus en humanos es 218-410 μ g/m² (Fraker *et al.*, 1995), aproximadamente 10 veces menor que la dosis eficaz en animales. Basándose en datos de modelos murinos se cree que es necesaria una dosis al menos 10 veces mayor para alcanzar efectos anti-tumorales en humanos (Schraffordt Koops *et al.*, 1998). En el primer estudio clínico de perfusión de miembros hipertérmicos aislados, se obtuvieron tasas de res-

puesta altas con la dosis única de 4 mg de TNF en combinación con melfalán e interferón- γ (Lienard et al., 1992). Otros trabajos han demostrado que el interferón γ puede omitirse y que pueden ser suficientes dosis incluso menores de TNF para inducir una respuesta terapéutica (Hill et al., 1993; Eggermont et al., 1996). Como las dos citoquinas ejercen efectos sinérgicos en las células endoteliales, su direccionamiento combinado selectivo a las mismas da probablemente como resultado una actividad antitumoral más fuerte, permitiendo así resolver los problemas de toxicidad sistémica encontrados usualmente en la terapia del cáncer con las mismas citoquinas utilizadas en combinación. Adicionalmente, es sabido que TNF puede reducir la función de barrera de los vasos de revestimiento endoteliales, aumentando así su permeabilidad a las macromoléculas. Aprovechando la ventaja de la menor toxicidad del tratamiento con las moléculas TNF modificadas de acuerdo con la invención, y de sus propiedades de alojamiento de los vasos tumorales, una aplicación alternativa es su utilización para aumentar la permeabilidad de los vasos tumorales a otros compuestos, sea para propósitos terapéuticos o diagnósticos. Por ejemplo, el TNF modificado puede utilizarse para aumentar la absorción por el tumor de anticuerpos u hormonas radiomarcados (compuestos de producción de imágenes del tumor) en radioinmunoescintigrafía o radioinmunoterapia de los tumores. Alternativamente, la absorción de fármacos quimioterapéuticos, inmunotoxinas, liposomas portadores de fármacos o genes, u otros fármacos anticáncer podría incrementarse también, con lo que sus efectos antitumorales se mejorarían.

Muchas otras citoquinas inflamatorias tienen también la propiedad de aumentar la permeabilidad de los vasos endoteliales, y se apreciará que la invención puede aplicarse a tales citoquinas, junto con agentes que aumentan la expresión de dichas citoquinas. Las citoquinas inflamatorias, conocidas también como citoquinas pro-inflamatorias, son cierto número de polipéptidos y glicoproteínas con pesos moleculares comprendidos entre 5 kDa y 70 kDa. Las mismas tienen un efecto estimulante sobre la respuesta inflamatoria. Las citoquinas inflamatorias más importantes son TNF, IL-1, IL-6 e IL-8.

A continuación se muestra una tabla de algunas citoquinas clasificadas como citoquinas inflamatorias:

Citoquinas Inflamatorias

Grupo	Citoquinas individuales
Citoquinas endógenas	IL-1, TNF- α , IL-6
Regulación creciente	Quimioquinas IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- α , IFN- β ,
Estimulación de la producción de sustancias reaccionantes de fase aguda	IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , LIF, OSM, CNTF
Citoquinas quimioatrayentes	
Quimioquinas CXC	IL-8, PF-4 , PBP , NAP-2, β -TG
Quimioquinas CC	M1P-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES
Quimioquinas C	Linfotactina
Estimulación de citoquinas inflamatorias	IL-12

TGF- β : factor del crecimiento transformante, LIF: factor inhibidor de leucemia; OSM: oncostatina M; CNTF: factor neurotóxico ciliar; PF-4: factor 4 de las plaquetas; PBP: proteína básica de las plaquetas; NAP-2: proteína 2 activadora de los neutrófilos; β -TG: β -tromboglobulina; MIP: proteína inflamadora de los macrófagos; MCP: proteína quimioatrayente de los monocitos.

La regulación creciente de la respuesta inflamatoria es realizada también por IL-11, IFN- α , IFN- β , y especialmente por los miembros de la superfamilia quimioquinas. En algunas situaciones, TGF- β tiene cierto número de actividades inflamatorias que incluyen efectos quimioatrayentes sobre los neutrófilos, linfocitos T y monocitos desactivados.

IFN- γ

Un abundante cuerpo de evidencia sugiere que el interferón- γ (IFN γ), una citoquina pleiotrópica producida principalmente por los linfocitos T y las células agresoras naturales (Farrar et al., 1993; Boehm et al., 1997) puede promover respuestas antitumorales (Curnis et al., 2005). Por ejemplo, IFN γ puede inducir efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos sobre muchos tipos de células tumorales, puede inhibir la angiogénesis tumoral y activar las células

agresoras naturales y los macrófagos para destruir una diversidad de dianas de células tumorales. IFN γ es también un regulador importante de las células adyuvantes CD4⁺ T, es el factor fisiológico principal de activación de los macrófagos y puede aumentar la expresión de MHC-I y II sobre las células del cáncer y endoteliales. Dentro del estroma tumoral, IFN γ puede inducir secreción de citoquinas y quimioquinas, que incluyen IP-10 (proteína inducible 10 del IFN), una proteína angioestática y un factor quimioatractivo para linfocitos y monocitos. Se han obtenido pruebas que sugieren que el IFN γ producido por macrófagos de infiltración tumoral juega un papel en la destrucción de los vasos sanguíneos tumorales. El tratamiento combinado de células endoteliales con IFN γ y factor- α de necrosis tumoral (TNF) da como resultados efectos citotóxicos sinérgicos, probablemente importantes para la destrucción de la vasculatura tumoral. IFN- γ puede aumentar también la producción de TNF por macrófagos activados, así como la expresión de receptores de TNF en diversos tipos de células. Como consecuencia de estos efectos sobre la vasculatura tumoral y sobre las células del sistema inmunitario, IFN γ puede activar respuestas inflamatorias/inmunitarias contra tumores establecidos e inhibir el crecimiento del tumor.

IFN γ existe como un homodímero de dos subunidades polipeptídicas enlazadas de modo no covalente. La secuencia primaria del IFN γ humano de tipo salvaje (huIFNG) fue publicada por Gray et al., 1982; Taya et al., 1982; Devos et al., 1982; y Rinderknecht et al., 1984, y en EP 77670, EP 89676 y EP 110044. La estructura 3D de huIFNG fue publicada por Ealick et al., 1991.

IL-12

La interleuquina 12 (IL-12), a la que se hace referencia también como factor estimulador de las células agresoras naturales ("NKSF") o factor de maduración de los linfocitos citotóxicos ("CLMF"), es una molécula inmunorreguladora potente que juega un papel en una amplia gama de enfermedades. La IL-12 humana ha sido caracterizada como una citoquina con una estructura singular y efectos pleiotrópicos (Kobayashi, et al., 1989; Seder, et al., 1993; Ling, et al., 1995; Podlaski, et al., 1992). IL-12 juega un papel crítico en la patología asociada con varias enfermedades que implican respuestas inmunes e inflamatorias. Una revisión de IL-12, sus actividades biológicas, y su papel en las enfermedades puede encontrarse en Gately et al., 1998. Un papel importante de IL-12 *in vivo* es su capacidad para inducir la producción de IFN γ por las células agresoras naturales (NK) y las células T.

Estructuralmente, IL-12 es una proteína heterodímera que comprende una subunidad de 35 kDa (p35) y una subunidad de 40 kDa (p40) que están enlazadas ambas una a otra por un puente disulfuro (a lo que se hace referencia como la "subunidad p70"). La proteína heterodímera es producida fundamentalmente por células presentadoras de antígeno tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Este tipo de células secretan también un exceso de la subunidad p40 con relación a la subunidad p70.

IL-2

Debido al papel central del sistema IL-2/IL-2R en la mediación de las respuestas inmunes e inflamatorias, es obvio que la monitorización y manipulación de este sistema tiene implicaciones diagnósticas y terapéuticas importantes. IL-2 ha dado resultados prometedores como fármaco anticáncer debido a su capacidad para estimular la proliferación y actividades de las células atacantes de los tumores LAK y TIL (linfocitos infiltrantes de tumores). Sin embargo, problemas con la toxicidad de IL-2 son todavía preocupantes y requieren investigación. La presente invención aborda este problema.

IL-15

La interleuquina 15 (IL-15) es una nueva citoquina que comparte muchas propiedades biológicas con IL-2, pero carece de homología de secuencia de aminoácidos con ella. IL-15 fue identificada originalmente en medios condicionados por una línea de células epiteliales de riñón de mono (CVI/EBNA) basándose en su actividad mitógena sobre la línea de células T murinas, CTLL-2. IL-15 fue descubierta también independientemente como una citoquina producida por una línea de células de leucemia de las células T humanas adultas (HuT-102) que estimulaba la proliferación de las células T y fue designada IL-T. En virtud de su actividad como estimuladora de células T, células NK, células LAK, y TILs, IL-2 está siendo sometida actualmente a pruebas clínicas con objeto de testar su uso potencial en tratamientos para cáncer y para infecciones virales. Debido a sus actividades biológicas similares, IL-15 debería tener un potencial terapéutico similar.

Quimioquinas

Las quimioquinas son una superfamilia de proteínas secretadas, en su mayoría pequeñas, que funcionan en el tráfico, el reclutamiento, y la reticulación de los leucocitos. Las mismas juegan también un papel crítico en muchos procesos patofisiológicos tales como las respuestas alérgicas, enfermedades infecciosas y autoinmunes, angiogénesis, inflamación, crecimiento de tumores, y desarrollo hematopoyético. Aproximadamente el 80% de estas proteínas tienen de 66 a 78 aminoácidos (aa) en su forma madura. Las restantes son mayores, existiendo aa adicionales aguas arriba del núcleo de la proteína o como parte de un segmento C-terminal extendido. Todas las quimioquinas emiten señales a través de receptores acoplados a proteína G con 7 dominios transmembranales. Existen al menos 17 receptores de quimioquinas conocidos, y muchos de estos receptores exhiben propiedades de fijación promiscua, con lo cual varias quimioquinas diferentes pueden señalizar a través del mismo receptor.

Las quimioquinas se dividen en subfamilias basándose en restos conservados de secuencia aa. La mayoría de los miembros de la familia tienen al menos 4 residuos cisteína conservados que forman dos enlaces disulfuro intramoleculares. Las subfamilias se definen por la posición de los dos primeros residuos cisteína:

- La subfamilia alfa, denominada también las quimioquinas CXC, tienen un aa que separa los dos primeros residuos cisteína. Este grupo puede subdividirse ulteriormente basándose en la presencia o ausencia de un resto glu-leu-arg (ELR) aa que precede inmediatamente al primer residuo cisteína. Existen actualmente 5 receptores específicos de CXC y se designan CXCR1 a CXCR5. Las quimioquinas ELR⁺ se fijan a CXCR2 y actúan generalmente como quimioatrayentes y activadores de neutrófilos. Las quimioquinas ELR⁻ fijan CXCR3 a CXCR5 y actúan fundamentalmente sobre los linfocitos. En el momento de escribir esta memoria, han sido consignados en la literatura científica 14 genes humanos diferentes que codifican quimioquinas CXC, siendo aportada cierta diversidad adicional por remodelación alternativa.
- En la subfamilia beta, denominada también las quimioquinas CC, las dos primeras cisteínas son adyacentes una a otra sin aa interpuesto alguno. Existen actualmente 24 miembros de la subfamilia beta humana distintos. Los receptores para este grupo se designan CCR1 a CCR11. Las células diana para diferentes miembros de la familia CC incluyen la mayoría de los tipos de leucocitos.
- Existen dos proteínas conocidas con homología de quimioquinas que caen fuera de las subfamilias alfa y beta. La linfotactina es el único miembro de la clase gamma (quimioquina C) que ha perdido las cisteínas primera y tercera. El receptor de linfotactina se designa XCR1. La fractalkina, el único miembro conocido de la clase delta (quimioquina CX₃C), tiene tres aa interpuestos entre los dos primeros residuos cisteína. Esta molécula es singular entre las quimioquinas en el sentido de que es una proteína transmembranal con el dominio N-terminal de la quimioquina fusionado a un tallo largo semejante a mucina. El receptor de fractalkina es conocido como CX₃CR1.

VEGF

- La presente invención es aplicable también al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). La angiogénesis es un proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. La misma juega un papel esencial en el desarrollo embrionario, el crecimiento normal de los tejidos, la curación de las heridas, el ciclo reproductivo de las hembras (es decir, la ovulación, la menstruación y el desarrollo de la placenta), así como un papel fundamental en muchas enfermedades. Un interés particular se ha enfocado en el cáncer, dado que los tumores no pueden crecer más allá de unos pocos milímetros de tamaño sin desarrollar un nuevo suministro de sangre. La angiogénesis es necesaria también para la propagación y crecimiento de las metástasis de las células tumorales.
- Uno de los factores más importantes de crecimiento y supervivencia para el endotelio es VEGF. VEGF induce angiogénesis y proliferación de células endoteliales y juega un papel importante en la regulación de la vasculogénesis. VEGF es una glicoproteína de fijación de heparina que se secreta como un homodímero de 45 kDa. La mayoría de los tipos de células, pero usualmente no las células endoteliales propiamente dichas, secretan VEGF. Dado que el VEGF descubierto inicialmente, VEGF-A, aumenta la permeabilidad vascular, fue conocido como factor de permeabilidad vascular. Adicionalmente, VEGF causa vasodilatación, parcialmente por estimulación de la sintasa del óxido nítrico en las células endoteliales. VEGF puede estimular también la migración celular e inhibir la apoptosis. Existen varias variantes de remodelación de VEGF-A. Las principales incluyen: 121, 165, 169 y 206 aminoácidos (aa), comprendiendo cada una de ellas una adición de exón específica.

EMAP II

- El Polipéptido-II Activador de los Monocitos Endoteliales (EMAP-II) es una citoquina que es un factor antiangiogénico en el desarrollo de la vasculatura tumoral, e inhibe fuertemente el crecimiento de los tumores. La EMAP-II humana recombinante es una proteína de 18,3 kDa que contiene 166 residuos de aminoácidos. Se ha encontrado que EMAP II aumenta también la permeabilidad de los vasos endoteliales.

PDGF

- Se ha propuesto también que los antagonistas del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) podrían aumentar la absorción de los fármacos y los efectos terapéuticos de una extensa gama de agentes anti-tumorales en los tumores sólidos comunes. PDGF es una citoquina de 30 kDa y es liberada por las plaquetas cuando se produce una herida, y estimula las células vecinas a crecer y reparar la herida.

PD-ECGF

- Como sugiere su nombre, el factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de las plaquetas (PD-ECGF) fue aislado originalmente de plaquetas basándose en su capacidad para inducir mitosis en las células endoteliales. Su proteína afín es gliostatina.

Anticuerpos

- Como se utiliza en esta memoria, un "anticuerpo" hace referencia a una proteína constituida por uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por los genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los

anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como cierto número de fragmentos, que incluyen los fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Si bien se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona con experiencia apreciará que pueden sintetizarse *de novo* fragmentos de anticuerpo sea químicamente o por utilización de la metodología del

5 DNA recombinante. Así, el término anticuerpo, como se utiliza en esta memoria, incluye también fragmentos de anticuerpo producidos sea por la modificación de anticuerpos enteros o sintetizados *de novo* utilizando metodologías de DNA recombinante. Fragmentos de anticuerpo abarcados por el uso del término "anticuerpos" incluyen, pero sin carácter limitante, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv diacuerpo, y Fd.

10 La invención proporciona también anticuerpos monoclonales o policlonales para las proteínas de la superficie. Así, la presente invención proporciona adicionalmente un proceso para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales para los polipéptidos de la invención.

Si se desean anticuerpos policlonales, un mamífero seleccionado (v.g., ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) se inmuniza con un polipéptido inmunógeno que lleva uno o más epítopes. Se recoge el suero del animal inmunizado y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales para un epítipo

15 contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Se conocen en la técnica métodos para producir y procesar antisueros policlonales. Con objeto de que puedan producirse tales anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos haptenizados para otro polipéptido para ser utilizados como inmunógenos en animales o humanos.

20 Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la fijación de epítopes de la superficie celular en los polipéptidos pueden ser producidos fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para la producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida. Pueden crearse por fusión celular líneas de células inmortales productoras de anticuerpos, y asimismo por otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con el virus Epstein-Barr. Pueden cribarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra epítopes respecto a diversas propiedades; a saber, para afinidad de isotipo y de epítipo.

25

Una técnica alternativa implica el cribado de bibliotecas de presentación de fago en las cuales, por ejemplo, el fago expresa fragmentos scFv en la superficie de su recubrimiento con una gran diversidad de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Este método es bien conocido en la técnica.

30 Para los propósitos de esta invención, el término "anticuerpo", a no ser que se especifique lo contrario, incluye fragmentos de anticuerpos enteros que retienen su actividad de fijación para un antígeno diana. Como se ha mencionado arriba, tales fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos monocatenarios (scFv). Adicionalmente, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, como se describe por ejemplo en EP-A-239400.

Agentes

35 Como se utiliza en esta memoria, el término "agente" incluye, pero sin carácter limitante, un compuesto, tal como un compuesto de test, que puede obtenerse a partir de o producirse por cualquier fuente adecuada, sea natural o no. El agente puede diseñarse u obtenerse a partir de una biblioteca de compuestos que pueden comprender péptidos, así como otros compuestos, tales como moléculas orgánicas pequeñas y particularmente nuevos compuestos líder. A modo de ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica, o un extracto producido

40 a partir de materiales biológicos tales como bacterias, hongos o células o tejidos animales (particularmente de mamífero), una molécula orgánica o inorgánica, un compuesto de test sintético, un compuesto de test semi-sintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un peptidomimético, un compuesto de test derivatizado, un péptido escindido de una proteína entera, o un péptido producido por síntesis (tal como, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos) o por técnicas recombinantes o combinaciones de las mismas, un compuesto de test recombinante,

45 un compuesto de test natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de la misma y mutantes, derivados o combinaciones de los mismos.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de la misma. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro producto químico. El agente puede ser incluso una secuencia de nucleótidos - que puede ser una secuencia sentido o una secuencia anti-sentido.

50 Formulaciones farmacéuticas

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica para tratamiento de un individuo en donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido, polinucleótido, conjugado y combinaciones de fármacos de la presente invención.

55 Una composición de la presente invención que comprende un péptido o conjugado que comprende un resto isoDGR está sustancialmente exenta de péptidos o conjugados que comprendan otras formas de DGR. Por sustancialmente exenta, se entiende que el % p/p de péptido o conjugado que contiene isoDGR (es decir, péptido o conjugado en el cual el resto DGR se encuentra totalmente en la forma isoDGR) presente en la composición con relación al péptido o

conjugado que contiene DGR total (es decir en todas sus formas isómeras) presente en la composición es mayor que 50%, más preferiblemente mayor que 55%, más preferiblemente mayor que 60%, más preferiblemente mayor que 65%, más preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que 75%, más preferiblemente mayor que 80%, más preferiblemente mayor que 85%, más preferiblemente mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 97%, y más preferiblemente mayor que 99%.

Una composición de la presente invención que comprende un péptido o conjugado que comprende un resto α -isoDGR está sustancialmente exenta de péptidos o conjugados que comprenden otras formas de DGR. Por sustancialmente exenta, se entiende que el % p/p del péptido o conjugado que contiene α -isoDGR (es decir, péptido o conjugado en donde el resto DGR se encuentra totalmente en la forma α -isoDGR) presente en la composición con relación al péptido o conjugado que contiene DGR total (es decir, en todas sus formas isómeras) presente en la composición es mayor que 50%, más preferiblemente mayor que 55%, más preferiblemente mayor que 60%, más preferiblemente mayor que 65%, más preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que 75%, más preferiblemente mayor que 80%, más preferiblemente mayor que 85%, más preferiblemente mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 97%, y más preferiblemente mayor que 99%.

La composición farmacéutica puede estar destinada a humano o animal. Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un sujeto individual y la misma variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular.

La composición puede comprender opcionalmente un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con relación a la ruta de administración pensada y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como - o además de - el portador, excipiente o diluyente cualesquiera aglomerantes, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s), y otro u otros agentes portadores que puedan favorecer o aumentar la entrada de virus en el sitio diana (tal como por ejemplo un sistema de suministro de lípidos). Portadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Detalles de los excipientes pueden encontrarse en The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Edición, Eds Wade & Weller, American Pharmaceutical Association.

En caso apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por una o más vías cualesquiera de: inhalación, en la forma de un supositorio o pesario, tópicamente en la forma de una loción, solución, crema, ungüento o polvo para espolvoreo, por el uso de un parche en la piel, oralmente en forma de tabletas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos sea solos o en mixtura con excipientes, o en la forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o las mismas pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse óptimamente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la solución isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en la forma de tabletas o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Se prefieren formulaciones para administración parenteral comprenden soluciones o suspensiones inyectables y líquidos para infusiones. Para la preparación de las formas parenterales, una cantidad eficaz del ingrediente activo se disolverá o suspenderá en un portador estéril, añadiendo opcionalmente excipientes tales como solubilizadores, agentes de isotonicidad, conservantes, estabilizadores, emulsionantes o agentes dispersantes, y se distribuirá subsiguientemente en viales herméticamente cerrados o ampollas.

La composición puede formularse de tal modo que la administración diaria, semanal o mensual proporcione la dosificación diaria deseada. Se apreciará que la composición puede formularse convenientemente para ser administrada con menor frecuencia, por ejemplo cada 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 horas.

Los polinucleótidos/vectores que codifican los componentes polipeptídicos pueden administrarse directamente como un constructo de ácido nucleico desnudo, que comprende preferiblemente además secuencias flanqueantes homólogas al genoma de la célula hospedadora.

La absorción de constructos de ácido nucleico desnudo por las células de mamífero se mejora por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo aquéllas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo Lipofectam™ y Transfectam™). Típicamente, los constructos de ácido nucleico se mezclan con el agente de transfección para producir una composición.

Preferiblemente, el polinucleótido o vector de la invención se combina con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Portadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica.

Las rutas de administración y los regímenes de dosificación descritos tienen por objeto servir únicamente de guía, dado que un técnico experto podrá determinar fácilmente la ruta de administración y los regímenes de dosificación óptimos para cualquier paciente y condición particulares.

- 5 La preparación de péptidos, y en particular citoquinas, la forma de liposomas puede mejorar la actividad biológica de los mismos. De hecho, se ha observado que la acilación de los grupos amino del TNF induce un aumento en su hidrofobicidad sin pérdida de actividad biológica in vitro. Adicionalmente, se ha publicado que el TNF fijado a lípidos tiene una citotoxicidad inafectada in vitro, efectos inmunomoduladores y toxicidad reducida in vivo (Deb et al., 1989, 1990).

- 10 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención que comprenden péptidos y conjugados que contienen restos DGR de acuerdo con la presente invención están sustancialmente exentas de los péptidos y conjugados correspondientes que contienen el resto NGR correspondiente. Preferiblemente, la proporción del péptido que contiene DGR con relación al péptido total (es decir, péptido que contiene DGR y NGR) es mayor que 60%, más preferiblemente 70%, más preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 97%, y más preferiblemente 99% p/p.

15 Tratamiento

Los péptidos, conjugados y composiciones de la invención pueden utilizarse en tratamiento terapéutico.

Debe apreciarse que todas las referencias en esta memoria a tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

- 20 El paciente tratado en la presente invención en sus muchas realizaciones es deseablemente un paciente humano, aunque debe entenderse que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todos los mamíferos, que debe entenderse están incluidos en el término "paciente". En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en la cual sea deseable el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis, particularmente especies de mamíferos de uso en agricultura y domésticos.

- 25 En una realización, los péptidos, conjugados o composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para tratar o prevenir el cáncer, con inclusión, pero sin carácter limitante, de cáncer de pulmón, páncreas, mama, colon, laringe u ovario. Preferiblemente el cáncer comprende un tumor sólido.

En otra realización, los péptidos y/o conjugados pueden utilizarse para tratar o prevenir enfermedades que implican angiogénesis, tal como enfermedades asociadas con la expresión de $\alpha_v\beta_3$.

- 30 La angiogénesis es un proceso de vascularización tisular que implica el crecimiento de vasos sanguíneos de nuevo desarrollo en un tejido, y se hace referencia también al mismo como neo-vascularización. El proceso está mediado por la infiltración de células endoteliales y células de la musculatura lisa. Se cree que el proceso transcurre por una cualquiera de tres vías: los vasos pueden brotar a partir de vasos pre-existentes, puede producirse desarrollo de vasos de novo a partir de células precursoras (vasculogénesis), o pequeños vasos existentes pueden aumentar de diámetro (Blood et al., 1990).

- 35 Existen una diversidad de enfermedades en las cuales se cree que es importante la angiogénesis, a las que se hace referencia como enfermedades angiogénicas que incluyen, pero sin carácter limitante, trastornos inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune, artritis, trastornos asociados con invasión inadecuada o inoportuna de vasos tales como retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular, restenosis, proliferación capilar en placas ateroscleróticas y osteoporosis, y trastornos asociados con el cáncer, tales como tumores sólidos, metástasis de tumores sólidos, angiofibromas, fibroplasia retrolental, hemangiomas, sarcoma de Kaposi y análogos, que requieren neovascularización para soportar el crecimiento del tumor.

- 40 Así pues, los métodos que inhiben la angiogénesis en un tejido enfermo mejoran los síntomas de la enfermedad y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a la curación de la enfermedad.

- 45 En otra realización afín, un tejido a tratar es un tejido retiniano de un paciente con retinopatía diabética, degeneración macular o glaucoma neovascular, y la angiogénesis a inhibir es angiogénesis del tejido retiniano en el que existe neovascularización del tejido retiniano.

- 50 En una realización afín adicional, un tejido a tratar es un tejido tumoral de un paciente que padece un tumor sólido, una metástasis, un cáncer de piel, un cáncer de mama, un hemangioma o angiofibroma y cánceres análogos, y la angiogénesis a inhibir es angiogénesis de un tejido tumoral en donde existe neovascularización de un tejido tumoral. Tejidos tumorales sólidos típicos que pueden ser tratados por los presentes métodos incluyen tejidos de pulmón, páncreas, mama, colon, laringe, ovario, y análogos. En los ejemplos se describe la angiogénesis ilustrativa de un tejido tumoral, y la inhibición de la misma.

La inhibición de la angiogénesis del tejido tumoral es una realización particularmente preferida debido al importante papel que juega la neovascularización en el crecimiento tumoral. En la ausencia de neovascularización del tejido

tumoral, el tejido tumoral no contiene los nutrientes requeridos, su crecimiento se ralentiza, cesa el crecimiento adicional, experimenta regresión y finalmente se vuelve necrótico, dando como resultado la destrucción del tumor.

Los métodos son particularmente eficaces también contra la formación de metástasis dado que (1) su formación requiere vascularización de un tumor primario a fin de que las células metastásicas del cáncer puedan salir del tumor primario y (2) su establecimiento en un sitio secundario requiere neovascularización para soportar el crecimiento de las metástasis.

En una realización afín, la invención contempla la práctica del método en asociación con otras terapias tales como quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para control del establecimiento de metástasis. La administración del inhibidor de la angiogénesis se realiza típicamente durante o después de la quimioterapia, aunque es preferible inhibir la angiogénesis después de un régimen de quimioterapia a veces donde el tejido tumoral responderá al asalto tóxico por inducción de la recuperación de la angiogénesis por provisión de suministro de sangre y nutrientes al tejido tumoral. Adicionalmente, se prefiere administrar métodos de inhibición de la angiogénesis después de la cirugía donde los tumores sólidos se han eliminado como una profilaxis contra las metástasis.

En la medida en que los presentes métodos se aplican a la inhibición de la neovascularización de los tumores, los métodos pueden aplicarse también a la inhibición del crecimiento del tejido tumoral, a la inhibición de la formación de metástasis del tumor, y a la regresión de tumores establecidos.

La restenosis es un proceso de migración y proliferación de células de la musculatura lisa (SMC) en el sitio de una angioplastia coronaria transluminal percutánea que dificulta el éxito de la angioplastia. La migración y proliferación de SMC's durante la restenosis puede considerarse como un proceso de angiogénesis que es inhibido por los presentes métodos. Por esta razón, la invención contempla también la inhibición de la restenosis por inhibir la angiogénesis de acuerdo con los métodos presentes en un paciente después de procedimientos de angioplastia.

Los péptidos, conjugados y composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse en preparaciones combinadas, separadas o secuenciales, asimismo con otras sustancias diagnósticas o terapéuticas.

Combinaciones TNF-IFN

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una combinación del TNF modificado, e IFN γ . Esta combinación puede utilizarse en preparaciones combinadas, separadas o secuenciales. Ventajosamente, la combinación tiene lugar también con otras sustancias diagnósticas o terapéuticas, en el tratamiento o en la diagnosis del cáncer, tales como doxorubicina y melfalán. Así, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación del TNF modificado e IFN γ , y opcionalmente otra sustancia terapéutica diagnóstica de tumores o antitumoral. Una vez más, esta combinación puede utilizarse en preparaciones combinadas, separadas o secuenciales.

En la publicación de Patente internacional de la misma Solicitante, número WO 03/093478, los inventores encontraron que el suministro direccionado de dosis de picogramos de citoquinas mejora la penetración de los fármacos quimioterapéuticos, proporcionando una estrategia nueva y sorprendente para aumentar el índice terapéutico de los fármacos empleados en quimioterapia. La publicación de Patente internacional número WO 03/093478 se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. De modo más detallado, se ha encontrado que el suministro de dosis muy bajas de citoquinas a los tumores y el entorno asociado a los tumores con inclusión de la vasculatura tumoral, representa un nuevo enfoque para evitar mecanismos de realimentación negativos y preservar su aptitud para modificar las barreras de penetración de los fármacos.

En una realización de este aspecto de la presente invención, puede administrarse un conjugado de la presente invención a una dosis comprendida en el intervalo de 0,5 a 500 ng/kg, preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 ng/kg, y más preferiblemente en el intervalo de 5 a 15 ng/kg.

En una realización alternativa de este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente invención en combinación con IFN γ , en donde el conjugado está presente en una cantidad tal que se proporciona al plasma sanguíneo del individuo a tratar el conjugado o un metabolito del mismo en una cantidad no mayor que aproximadamente 35.000 ng/día, con preferencia aproximadamente 3.500 ng/día, y de modo más preferible aproximadamente 1000 ng/día.

La dosificación anterior se refiere a una dosificación para un individuo de 70 kg.

Una persona experta en la técnica podría modificar fácilmente la dosificación indicada para un individuo que tenga un peso distinto de 70 kg.

Las rutas de administración y los regímenes de dosificación descritos se proponen sólo como orientación, dado que un técnico experto podrá determinar fácilmente la ruta de administración y los regímenes de dosificación óptimos para cualquier paciente y condición particulares.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Representación esquemática, estructura tridimensional y secuencia primaria de los fragmentos de fibronectina.

(A) Se representan esquemáticamente las repeticiones en cada fragmento y en la subunidad de fibronectina: repeticiones tipo I (rectángulos); repeticiones tipo II (óvalos); repeticiones tipo III (cuadrados). Se indican los módulos que contienen secuencias NGR y RGD. Se muestran esquemáticamente los fragmentos naturales obtenidos por digestión proteolítica con cathepsina (FN-70 KDa) o cathepsina-tripsina (FN-45 y FN-30 KDa). Se representan también retronectina, fragmento recombinante FN-I₄₋₅, y FN-I₅ sintético.

(B) Estructura PDB tridimensional de FN-I₄₋₅ (código del Banco de Datos de Proteínas: 1FBR.pdb). Se muestran las cadenas laterales del resto NGR (Asn²⁶³, Gly²⁶⁴ y Arg²⁶⁵).

(C) Secuencia primaria de los péptidos sintéticos FN-I₅ y Loop-GNGRG y Loop-RGGNG, y de los péptidos FN-I₇ y Loop-GNGRG (véase Métodos).

Figura 2. Propiedades promotoras de la adhesión celular de los fragmentos naturales de fibronectina

Las placas de microtitulación recubiertas con fragmentos proteolíticos naturales (FN-70 KDa, FN-45 KDa y FN-30 KDa) promueven la adhesión de las células endoteliales EA.hy926.

Figura 3. El envejecimiento acelerado de los fragmentos FN aumenta sus propiedades pro-adhesivas.

Adhesión de las células EA.hy926 a placas de microtitulación recubiertas con diversos péptidos y proteínas antes y después de envejecimiento acelerado. El envejecimiento acelerado se realizó por incubación de los péptidos en tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M, de pH 8,5, durante 16 horas a 37°C ("tratamiento térmico"). Adhesión a: FN-I₄₋₅ recombinante o proteína de control (FN-I₄₋₅ (SGS)) (A), FN-I₅ sintético (B), NGR-TNF recombinante, CNGRCG-TNF₁₋₁₁ y el péptido de control CARACG-TNF₁₋₁₁ (C), DGR-TNF (D). Los productos tratados térmicamente (37°C) y sin tratar (-20°C) se adsorbieron sobre la superficie de plástico de pocillos de microtitulación (una noche a 4°C). Microfotografía de pocillos recubiertos con 30 µg/ml de FN-I₅ o BSA tratados térmicamente (B, derecha) o con 10 µg/ml de NGR-TNF recombinante o DGR-TNF (C, derecha), x 200. El ensayo de adhesión celular se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

Figura 4. Las propiedades pro-adhesivas de los fragmentos FN son inhibidas por PIMT.

Se recubrieron placas de microtitulación con FN-I₅ o NGR-TNF tratados térmicamente (A), o con FN-30 KDa, FN-45 KDa o retronectina (RN) naturales (B). Las proteínas adsorbidas se trataron luego con la enzima PIMT durante 16 horas a 37°C. Después de incubación, la solución de enzima se separó por lavado. Se realizó luego el ensayo de adhesión de las células EA.hy926 como se describe en *Materiales y Métodos*.

Figura 5. Estabilidad de los restos NGR, DGR e isoDGR.

Análisis RP-HPLC de NGR-pep y sus productos sintéticos de desamidación (DGR-pep e isoDGR-pep) antes y después de incubación durante 4 horas a 37°C en tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M, de pH 8,5 (A y B) y en DMEM, de pH 7,3 (A, recuadro). La RP-HPLC se realizó en una columna C-18 (PepMap C18, PerSeptive Biosystems) como sigue: tampón A, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua; tampón B, acetonitrilo al 95%, TFA al 0,1%; 0% B durante 10 min, gradiente lineal 20-40% B en 30 min, 100% B durante 10 min; 0% B durante 15 min (caudal 0,5 ml/min). Se identificaron los picos 1, 2 y 3 por purificación del NGR-pep, después de 2 horas de incubación, con una cantidad igual del péptido indicado (C). NGR-pep (pico 1) se convierte rápidamente en los compuestos correspondientes a DGR-pep (pico 2) e isoDGR-pep (pico 3) (semivida, 2-4 horas).

Figura 6. FN-I₅ y los péptidos que contienen el resto NGR se fijan a la integrina $\alpha_v\beta_3$ después de envejecimiento acelerado.

(A) Fijación de CNGRC-TNF y RNF tratados térmicamente a fases sólidas recubiertas con integrinas humanas purificadas. Se utilizaron concentración simple (5 µg/ml) o concentraciones variables (recuadro) de CNGRC-TNF y TNF. La fijación se detectó con anticuerpos anti-TNF como se describe en Materiales y Métodos.

(B) Fijación de CNGRC-TNF₁₋₁₁, CARAC-TNF₁₋₁₁ y FN-I₅ biotinilados (complejados con estreptavidina-peroxidasa) a integrinas humanas purificadas. La fijación se detectó por reacción cromógena con o-fenilenodiamina.

(C) Fijación competitiva de los complejos FN-I₅ estreptavidina-peroxidasa biotinilados a placas recubiertas con $\alpha_v\beta_3$ con cantidades variables de FN-I₄₋₅ o FN-I₄₋₅SGS (panel superior) o péptidos correspondientes al bucle NGR (residuos 258-271) o FN-I₅ antes y después de tratamiento térmico (panel inferior).

Figura 7. Fijación competitiva de NGR-TNF a $\alpha_v\beta_3$ con NGR-pep y sus productos desamidados a $\alpha_v\beta_3$.

Se mezcló NGR-TNF biotinilado (4 µg/ml) con cantidades diferentes de los péptidos indicados y se añadió a placas recubiertas con $\alpha_v\beta_3$. La fijación se detectó como se describe en *Materiales y Métodos*. Se determinó CI₅₀ por análisis

sis de regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism. La cinética de desamidación de FN-I₅ se determinó representando gráficamente la concentración inhibidora (CI₅₀) frente a los tiempos de incubación. Las barras representan los intervalos de confianza para cada CI₅₀ determinada.

Figura 8. El fragmento FN-I₅ desamidado inhibe la adhesión celular in vitro a vitronectina y el crecimiento de los tumores en un modelo de ratón.

(A) Inhibición de la adhesión de las células EA.hy926 a vitronectina por FN-I₅ tratado térmicamente. Se adsorbió vitronectina (3 µg/ml) a una placa de microtitulación y se realizó el ensayo de adhesión celular como se describe en Materiales y Métodos.

(B) Efectos antitumorales de la administración repetida de FN-I₅ "tratado térmicamente" a ratones portadores de tumor RMA. Los animales (5/grupo) se trataron con 200 µg de FN-I₅ "tratado térmicamente" (i.p.) durante los tiempos indicados (flechas) comenzando 4 días después de la implantación del tumor. * p = 0,0003 el día 14, análisis estadístico por test t de dos colas.

Figura 9. Análisis RP-HPLC de NGR-TNF.

El análisis RP-HPLC de NGR-TNF reveló los picos principales, F2 y F4, y dos picos menores, F1 y F3. La presencia de formas desamidadas en estos picos se identificó por medición de la cantidad de isoAsp en esta fracción. Los resultados demostraron que F2 contenía mucho más isoAsp que F4 (Tabla 1).

Figura 10. RP-HPLC y SDS-PAGE de F2 y F4.

A) La re-cromatografía de F2 y F4 por RP-HPLC demostró que el tiempo de detección no cambiaba después de la separación. B) La tinción con Coomassie de la SDS-PAGE no reductora reveló una banda mayor de 17-18 kDa en ambos productos F2 y F4, como se esperaba para los monómeros de TNF.

Figura 11. Actividad anti-tumoral de F2 en el modelo de linfoma RMA.

Se realizaron dos experimentos (Exp. 1 y Exp. 2). Ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italia) que pesaban 16-18 g se enfrentaron a una inyección subcutánea en el ijar izquierdo de 7×10^4 células RMA vivas. Diez días más tarde, se trataron los ratones con 0, 25 ó 100 µg de F2 (100 µl) seguido dos horas más tarde por administración de melfalán (50 µg en 100 µl). Los tamaños de los tumores se muestran como valor medio \pm SE (5 animales/grupo).

Figura 12. RP-HPLC de NGR-TNF después de tratamiento a 37°C en bicarbonato de amonio de pH 8,5 durante tiempos variables.

Se diluyó NGR-TNF en tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M, de pH 8,5, y se incubó a 37°C durante diversos tiempos. El NGR-TNF tratado térmicamente se analizó por RP-HPLC.

Figura 13. RP-HPLC (A) y SDS-PAGE (B) de DGR-TNF y NGR-TNF recombinantes.

Los ejemplos que siguen ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1 - Materiales y métodos para los Ejemplos 1 a 7

Líneas de células y reactivos

Se cultivaron células de linfoma RMA de ratón y células EA-hy926 (células endoteliales humanas fusionadas con células A549 de carcinoma de pulmón humano) como se ha descrito previamente (Curnis et al., 2005; Ljunggren y Karre, 1985). Violeta cristal (Fluka Chemie); seroalbúmina bovina (BSA), conjugado de IgG anti-conejo de cabra-peroxidasa de rábano picante, FN-70 KDa, FN-45 KDa, y fragmentos FN-30 KDa (Sigma); RetroNectina (Takara Biomedicals). Integrinas humanas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$ (Immunological Sciences); estreptavidina-peroxidasa (Società Prodotti Antibiotici).

Preparación y caracterización de FN-I₄₋₅ y FN-I₄₋₅SGS recombinantes

El cDNA codificante de las repeticiones de fibronectina humana 4-5th tipo I (FN-I₄₋₅; residuos 184-273 de fibronectina) se preparó por RT-PCR sobre RNA total de células MSR-3-mel (Tanzarella et al., 1999) utilizando los iniciadores siguientes: 5'-CTGGATCCGAGAAGTGMTGATCATGCTGCTGGG (directo) y 5'-TATATTAAGCTTTTCAGTGCCTCTCACACTTCC (inverso). Se generó un fragmento de control con NGR reemplazada con SGS (FN-I₄₋₅SGS), por PCR en plásmido FN-I₄₋₅ utilizando el iniciador directo anterior y el iniciador inverso siguiente:

5'-TATATTAAGCTTTTCAGTGCCTCTCACACTTCCACTCTCCACTGCGCTG. Los fragmentos amplificados se clonaron en un plásmido pRSET-A (Invitrogen), expresado en células BL21(DE3)pLysS de *E. coli* como proteínas solubles (con un marcador His en el término N) y se purificaron de los extractos de células por cromatografía de afinidad con quelatos metálicos.

Preparación y caracterización de los péptidos sintéticos

Se prepararon diversos péptidos (biotinilados y no biotinilados) por síntesis química utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems Modelo 433A. Se utilizaron aminoácidos en configuración L excepto cuando se indica. Se sintetizó también un péptido sintético correspondiente a la repetición 5ª tipo I de fibronectina humana (FN-I₅), residuos 230-274 de la proteína madura (número de acceso P02751, Swiss-Prot), con una acetil-glicina N-terminal adicional y con Glu²⁵⁰ en lugar de Asp²⁵⁰. Para promover la formación de disulfuro entre Cys²⁵⁸-Cys²⁷⁰ y Cys²³¹-Cys²⁶⁰ en FN-I₅ (véase Fig. 1), se protegieron Cys²⁵⁸ y Cys²⁷⁰ con grupos S-tritilo (separables por ácido trifluoroacético después de desprotección de la cadena lateral y escisión de la resina), mientras que Cys²³¹ y Cys²⁶⁰ se protegieron con grupos S-acetamidometilo (separables por tratamiento con yodo). Después de la purificación por RP-HPLC del péptido, se formó el puente disulfuro Cys²⁵⁸-Cys²⁷⁰ por incubación de 20 µmoles de péptido en 300 ml de DMSO al 8% a pH 7 (temperatura ambiente, una noche). Se purificó luego el péptido por RP-HPLC y se liofilizó. Para formar el segundo puente disulfuro Cys²³¹-Cys²⁶⁰, se disolvieron 13,5 µmoles de péptido en 67 ml de ácido acético al 80% v/v y se mezclaron con 0,135 ml de ácido clorhídrico 1 N. Se añadieron luego a la solución de péptido con agitación 21 mg de yodo, disueltos en 2 ml de metanol. Después de 90 min, se añadió 1 mmol de ácido ascórbico para extinguir el yodo. El péptido se purificó luego por RP-HPLC.

Todos los péptidos se disolvieron en agua estéril y se guardaron en partes alícuotas a -20°C. La pureza de los péptidos se analizó por RP-HPLC. Los grupos sulfhidrilo libres en todas las preparaciones de péptidos eran < 0,1% como se comprobó por titulación con reactivo de Ellman (Pierce, Rockford, Illinois). La identidad de los péptidos se comprobó por espectrometría de masas MALDI-TOF o ESI-MS. El peso molecular de los péptidos utilizado a lo largo de este trabajo era similar al valor esperado. El análisis ESI-MS de FN-I₅ demostró la presencia de un componente adicional de +144 Da, correspondiente a FN-I₅ con grupos acetamidometilo sin eliminar.

Preparación y caracterización de conjugados CNGRC-TNF, CDGRC-TNF y CNGRC-TNF₁₋₁₁

Se prepararon TNF murino y CNGRC-TNF (consistente en TNF murino fusionado con el término C de CNGRCG) por tecnología de DNA recombinante como se ha descrito (Curnis et al., 2000).

El cDNA codificante de CDGRC-TNF (TNF murino fusionado con el término C de CDGRCG) se preparó por PCR en un plásmido CNGRC-TNF (Curnis et al., 2000) utilizando los iniciadores siguientes: 5'-CACCATGGGCAACGGCCGTGGCGGCGTC (directo); 5'-TCAGGATCCTCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGAC (inverso).

El cDNA amplificado se clonó en el plásmido pET101/D-TOPO (Invitrogen), se expresó en células BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) y se purificó de los extractos celulares por cromatografía de afinidad sobre el receptor soluble p75-TNF-Sepharose, esencialmente como se ha descrito con anterioridad para CNGRC-TNF (Colombo et al., 2002). CNGRC-TNF y CDGRC-TNF se sometieron ambos a un procedimiento de replegado como se ha descrito anteriormente (Curnis et al., 2000).

La pureza e identidad de las proteínas se comprobaron por SDS-PAGE, espectrometría de masas por electropulverización y cromatografía de filtración con gel. Las actividades citolíticas *in vitro* de CNGRC-TNF y CDGRC-TNF, medidas por ensayo citolítico estándar con fibroblastos L-M de ratón (Corti et al., 1994), eran 2,96 (± 0,56) x 10⁸ U/mg y 2,59 (± 0,69) x 10⁸ U/mg, respectivamente.

Se prepararon CNGRC-TNF₁₋₁₁, correspondiente a la secuencia N-terminal de NGR-TNF (sin actividad de TNF) y el péptido CARAC-TNF₁₋₁₁, por síntesis química como se ha descrito arriba.

40 Envejecimiento acelerado (tratamiento térmico) de fragmentos y péptidos de fibronectina

Fragmentos de fibronectina, péptidos y conjugados péptido-TNF se diluyeron en tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M, de pH 8,5, se incubaron durante 16 h a 37°C, y se guardaron a -20°C hasta su análisis. Estos productos se designan en lo sucesivo como "tratados térmicamente".

Cuantificación de isoaspartato (isoAsp)

45 El contenido de isoAsp en CNGRC-TNF y en los péptidos sin tratar y "tratados térmicamente" se cuantificó utilizando el Kit de Detección de Isoaspartato ISOQUANT™ (Promega).

Ensayo de adhesión celular y tratamiento con PIMT

Fragmentos de fibronectina sin tratar y "tratados térmicamente", péptidos y conjugados péptido-TNF se diluyeron a la concentración deseada con cloruro de sodio 150 mM, fosfato de sodio 50 mM, de pH 7,3, y se añadieron a placas de microtitulación de poli(cloruro de vinilo) de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickinson). Después de incubación durante una noche a 4°C, se lavaron las placas, se sembraron con células EA.hy926 en DMEM que contenía 0,1% de BSA (40.000 células/pocillo) y se dejaron incubar durante 2-3 horas a 37°C, 5% CO₂. Las células adherentes se fijaron y se tiñeron con violeta cristal como se ha descrito (Curnis et al., 2005).

El efecto de protein-L-isoAsp/D-AspO-metiltransferasa (PIMT) sobre las propiedades pro-adhesivas de diferentes fragmentos se investigó como sigue: se recubrieron placas de microtitulación con diversos productos como se ha descrito arriba y se lavaron con cloruro de sodio al 0,9%. Cada pocillo se llenó luego con 45 µl de una solución que contenía S-adenosil-L-metionina 0,02 mM en cloruro de sodio 150 mM, tampón de fosfato de sodio 50 mM, de pH 6,8, y 5 µl de solución de PIMT (del Kit de Detección de Isoaspartato IsoQuant, Promega) (volumen final 50 µl/pocillo) y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Después de la incubación, se lavaron las placas con cloruro de sodio al 0,9% y se realizó el ensayo de adhesión celular como se ha descrito arriba.

Fijación de péptidos y proteínas a las integrinas

Se añadieron soluciones de integrinas humanas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$, 0,5-2 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato con Ca^{2+} y Mg^{2+} (DPBS, Cambrex) a placas de microtitulación de 96 pocillos de poli(cloruro de vinilo) (50 µl/pocillo) y se dejaron incubar durante una noche a 4°C. Todos los pasos subsiguientes se realizaron a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron con DPBS y se incubaron luego con DPBS que contenía 3% de BSA (200 µl/pocillo, 1 hora). Se lavaron luego las placas y se llenaron con soluciones de CNGRC-TNF o TNF (5 µg/ml, 50 µl/pocillo en BSA-DPBS al 3%) y se dejaron incubar durante 2 h. Después de lavado con DPBS, se incubó cada pocillo con IgGs de TNF anti-murino purificado de conejo en BSA-DPBS al 3% que contenía 1% de suero normal de cabra (10 µg/ml, 50 µl/pocillo, 1 h) seguido por un conjugado de peroxidasa anti-conejo de cabra en el mismo tampón (50 µl/pocillo, 1 h). La peroxidasa fijada se detectó por adición de sustrato cromógeno de o-fenilenodiamina.

La fijación de los péptidos biotinilados (CNGRC-TNF₁₋₁₁, CARAC-TNF₁₋₁₁ y FN-I₅) a las integrinas purificadas se estudió utilizando complejos conjugados estreptavidina-peroxidasa. Los complejos se prepararon por mezcla de diversas cantidades (0,5-1 µg) de péptidos biotinilados tratados térmicamente en DPBS que contenía 3% de BSA con 0,03 unidades de estreptavidina-peroxidasa (capacidad de fijación: 1 µg de biotina/unidad de estreptavidina-peroxidasa) (volumen final 15 µl). Los complejos se diluyeron en 3% BAS-DPBS (1:500), se añadieron a placas de microtitulación recubiertas con integrinas como se ha descrito arriba, y se incubaron durante 2 h a la temperatura ambiente. Después de lavado con DPBS, la peroxidasa fijada se detectó por reacción cromógena como se ha descrito arriba. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Estudios in vivo

Los modelos de estudios en animales fueron aprobados por el Comité Ético del Instituto Científico San Raffaele H y se realizaron de acuerdo con las directrices prescritas. Ratones C57BL/6N (Charles River Laboratories, Calco, Italia) que pesaban 16-18 g se enfrentaron con inyecciones subcutáneas en el ijar izquierdo de 7×10^4 células RMA vivas; 4 días más tarde, se trataron los ratones diariamente con 200 µg de FN-I₅ tratado térmicamente (100 µl) en cloruro de sodio al 0,9% (i.p.). Se monitorizó el crecimiento de los tumores por medida de los tumores con calibres como se ha descrito previamente (Gasparri et al., 1999). Los animales se sacrificaron antes que los tumores alcanzaran 1,0-1,3 cm de diámetro. Los tamaños de los tumores se muestran como valor medio \pm SE (5 animales/grupo).

Ejemplo 2 - El envejecimiento acelerado de los fragmentos de fibronectina genera sitios de adhesión dependientes de NGR.

El envejecimiento acelerado de los fragmentos de fibronectina genera sitios de adhesión dependientes de NGR.

Se estudió la adhesión de las células EA.hy926 a fragmentos naturales, recombinantes y sintéticos de fibronectina que contenían el resto NGR. En primer lugar, se estudiaron los fragmentos proteolíticos de fibronectina siguientes: a) FN-70 Kda, que contenía las repeticiones FN-I₁₋₉ y NF-II₁₋₂; b) FN-30 KDa, que contenía las repeticiones FN-I₁₋₅; c) FN-45 KDa, que contenía FN-I₆₋₉ y FN-II₁₋₂ (véase Fig. 1 para una representación esquemática). Todos los fragmentos, después de absorción a placas de microtitulación, inducían adhesión y diseminación de las células (Fig. 2), lo que sugería la presencia de sitios pro-adhesivos en estas regiones.

Para investigar el papel del resto NGR en la repetición NF-I₅, se analizaron luego las propiedades pro-adhesivas de los fragmentos FN-I₅, FN-I₄₋₅ y FN-I₄₋₅SGS, correspondiendo el último a un mutante con SGS en lugar de NGR (residuos 263-265). El FN-I₄₋₅ recombinante, pero no el mutante SGS, promovía la adhesión celular (Fig. 3A). Cuando se incubaron estos fragmentos en tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M, de pH 8,5, durante 16 h a 37°C (de aquí en adelante este tratamiento se designa "tratamiento térmico") se observó un aumento de la adhesión celular a FN-I₄₋₅, pero no a FN-I₄₋₅SGS (Fig. 3A). Esto sugiere que un sitio de adhesión celular, relacionado de algún modo con la secuencia NGR, era generado por envejecimiento acelerado. Se obtuvieron resultados similares con FN-I₅ sintético (Fig. 3B).

Para evaluar si el resto NGR era suficiente para mediar este fenómeno, se investigaron las propiedades pro-adhesivas de péptidos cortos que contenían el resto NGR, antes y después de tratamiento térmico. Dado que es improbable que el tripéptido NGR se pliegue y se fije a las placas de microtitulación, se introdujeron dos cisteínas flanqueantes. La explicación racional para la utilización de cisteínas flanqueantes estaba basada en el hecho de que la conformación predicha del péptido CNGRC, por simulación molecular dinámica, es similar a la del bucle GNGRG de la repetición FN-I₅ (Colombo et al., 2002). Adicionalmente, se fusionó este péptido a TNF (CNGRC-TNF) o a los 11 primeros residuos de TNF (CNGRC-TNF₁₋₁₁, desprovisto de actividad TNF) a fin de hacer posible la adsorción a

las placas de microtitulación. Como era de esperar, el tratamiento térmico de CNGRC-TNF aumentaba la adhesión celular (Fig. 3C). No se observó adhesión alguna a TNF solo antes o después del tratamiento térmico (datos no presentados). Análogamente, el tratamiento térmico de GNGRC-TNF₁₋₁₁, pero no de CARAC-TNF₁₋₁₁ (un péptido de control), aumentaba la adhesión celular (Fig. 3C, derecha).

- 5 Estos resultados respaldan la hipótesis de que el resto NGR es suficiente para promover la adhesión celular después de tratamiento térmico. Es interesante que un conjugado CDGRC-TNF, preparado por tecnología de DNA recombinante, era completamente inactivo (Fig. 3D) incluso después de tratamiento térmico (no representado), lo que sugiere que Asn es un residuo crucial para la actividad mejorada. En conclusión, estos resultados sugieren que cambios estructurales afines de algún modo al residuo Asn del resto NGR en FN-I₅ conducen a la generación de un sitio pro-adhesivo.

Ejemplo 3 - La desamidación del NGR está asociada con adhesión celular incrementada

- Es bien sabido que los residuos Asn, particularmente cuando van seguidos por Gly, pueden sufrir desamidación no enzimática al pH fisiológico (Robinson y Robinson, 2001; Robinson et al., 2004; Stephenson y Clarke, 1989; Tyler-Cross y Schirch, 1991). Esta reacción conduce a la formación de Asp o isoAsp, L-Asp (L_D), L-isoAsp, (L_{isoD}), D-Asp (D_D), y D-isoAsp (D_{isoD}), aunque predomina la configuración L (Geiger y Clarke, 1987). De acuerdo con ello, se encontró que la masa molecular de los péptidos FN-I₅, CNGRC-TNF y CNGRC aumentaba aproximadamente 1 Da, por análisis espectrométrico de masas, después del tratamiento térmico. Adicionalmente, el análisis isoAsp de CNGRC-TNF demostró la presencia de > 0,5 pmol de isoAsp/mol de la subunidad CNGRC-TNF después de tratamiento térmico.

- 20 Para evaluar si las propiedades adhesivas mejoradas de FN-I₅ después del tratamiento térmico dependían de la desamidación de NGR, se incubaron los FN-I₅ y CNGRC-TNF "tratados térmicamente" con la proteína L-isoAsp/D-AspO-metiltransferasa (PIMT), una enzima que convierte los residuos L-isoAsp y D-Asp en L-Asp (Aswad, 1984; Galletti et al., 1988; Lowenson y Clarke, 1992; McFadden y Clarke, 1987; Murray y Clarke, 1984). PIMT inhibía casi por completo la actividad pro-adhesiva de FN-I₅ y CNGRC-TNF tratados térmicamente (Fig. 4A). Además, este tratamiento enzimático inhibía parcialmente las propiedades pro-adhesivas del FN-30 KDa natural (Fig. 4B) y el fragmento FN-45 KDa (no representado), lo que sugería que la desamidación de Asp puede ocurrir también en los fragmentos naturales de fibronectina. Para evaluar la especificidad de esta reacción se evaluó también el efecto de PIMT sobre retronectina, un fragmento de FN que se sabe promueve la adhesión celular por RGD (véase Fig. 1). Como era de esperar, en este caso no se observó inhibición alguna después de tratamiento enzimático (Fig. 4B).
- 30 Por el contrario, se observó en este caso un aumento moderado pero significativo. Esto no era totalmente inesperado, dado que también RGD puede sufrir isomerización de los residuos Asp, con formación de isoAsp y pérdida de función (Geiger y Clarke, 1987; Lanthier y Desrosiers, 2004; Reissner y Aswad, 2003; Stephenson y Clarke, 1989). Así pues, en este caso se espera que PIMT "repare" RGD y aumente la adhesión celular. En conclusión, estos resultados sugieren que la desamidación de NGR, en contraste con la isomerización de RGD, está asociada a una "ganancia de función" en los ensayos de adhesión celular.

Ejemplo 4 - Cinética de la desamidación de NGR.

- Se investigaron luego la estabilidad de NGR y la cinética de la formación de L_{isoDGR} o D_{DGR} a pH 7,3 (DMEM) y pH 8,5 (bicarbonato de amonio). Para este objeto se sintetizó el péptido CNGRCGVRY (denominado NGR-pep) y se analizó por HPLC de fase inversa, antes y después de incubación a 37°C. Se añadieron residuos GVRY al término C de CNGRG para permitir la adsorción en la columna. Adicionalmente, se prepararon 5 péptidos denominados DGR-pep, D-DGR-pep, isoDGR-pep, D-isoDGR y SGR-pep, correspondientes a la misma secuencia de NGR-pep excepto por la presencia de D, D-D, L_{isoD}, D-isoD y S, respectivamente en lugar de N. La semivida de NGR-pep a pH 7,3 y 8,5, estimada a partir de la altura del pico cromatográfico principal (pico 1), era aproximadamente 4 y 2 horas, respectivamente (Fig. 5A, recuadro). Los péptidos correspondientes a los productos de desamidación eran estables en estas condiciones (Fig. 5B).

- Para identificar los picos y comprobar que la semivida medida corresponde a la desamidación de Asn, y no a otros cambios y no a otros cambios estructurales, se analizó el péptido NGR-pep tratado térmicamente impurificado con péptidos NGR-pep, o DGR-pep o isoDGR-pep recientes. Los resultados demostraron que los picos 1, 2 y 3 observados después de la incubación de NGR-pep corresponden a NGR-pep, DGR-pep e isoDGR-pep, respectivamente. Debe indicarse que NGR-pep era estable durante más de una semana a 37°C cuando se guardó en agua.

Ejemplo 5 - $\alpha_v\beta_3$ es un receptor de los restos D_{isoDGR} y D_{DGR}.

La fijación de FN-I₅, CNGRC-TNF y péptidos cortos tratados térmicamente a las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$ purificadas se investigó luego por ELISA directa y competitiva con integrinas adsorbidas sobre placas de microtitulación.

- 55 Se observó fijación de todas las moléculas que contenían NGR (tratadas térmicamente) a $\alpha_v\beta_3$, pero poca, o absolutamente ninguna, a las otras integrinas (Fig. 6A y B). No se observó fijación alguna con TNF tratado térmicamente o con un péptido de control CARAC-TNF₁₋₁₁ (Fig. 6A y B), lo que sugería que NGR era crítica. Debe indicarse que se observó fijación de CNGRC-TNF a $\alpha_v\beta_3$ incluso antes de tratamiento térmico (datos no presentados), aunque en

menor proporción, debido posiblemente a que ocurría desamidación durante la preparación y/o incubación del ensayo.

Para comprobar la importancia del bucle NGR de FN-I₅ para la fijación de integrinas, se realizaron experimentos competitivos de fijación con FN-I₄₋₅ y FN-I₄₋₅SGS recombinantes, la última de las cuales carecía de NGR. Como era de esperar, únicamente el fragmento con NGR podía competir con la fijación de F-I₅ a $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 6C). Se observó también competición de fijación con un péptido correspondiente al bucle 256-271 entero de FN-I₅ (véase Fig. 1C), pero no con el péptido de control con una secuencia enmarañada en el sitio GNGRG (Fig. 6C).

De acuerdo con ello, esta fijación competía eficientemente con α DGR-pep e isoDGR-pep (CE₅₀, 0,1 μ M) y FN-I₅ tratado térmicamente (CE₅₀, 0,4 μ M) y menos eficientemente con β isoDGR-pep o DGR-pep, NGR-pep, SGR-pep (CE₅₀ > 10 μ M) (Fig. 7).

Considerando que los péptidos isoDGR-pep o α DGR-pep son estables en estas condiciones de ensayo, estos resultados sugieren que los restos isoDGR-pep o α DGR-pep son nuevos ligandos de $\alpha_v\beta_3$.

Ejemplo 6 - Cinética de la formación de sitios de fijación de integrinas en FN-I₅.

Para investigar la cinética del sitio de fijación de integrinas en FN-I₅ se han realizado estudios de fijación competitiva adicionales con diversas dosis de FN-I₅, incubada durante tiempos diferentes a 37°C en DMEM. Resulta interesante que cuando se representó gráficamente la concentración inhibitoria (CE₅₀) frente a los tiempos de incubación, se observó que la actividad de fijación competitiva máxima se alcanzaba después de 24-48 horas de incubación (semivida 3,4 horas) (Fig. 7B). Este valor se corresponde muy bien con la semivida de desamidación de NGR-pep arriba descrita, y respalda adicionalmente el concepto de que las propiedades de fijación de integrinas de FN-I₅ tratado térmicamente estaban relacionadas de hecho con la desamidación de NGR.

Ejemplo 7 - Los fragmentos desamidados de FN-I₅ inhiben in vitro la adhesión celular a vitronectina y el crecimiento tumoral en un modelo de ratón.

Es bien sabido que la integrina $\alpha_v\beta_3$, el receptor de vitronectina, juega un papel crítico en la angiogénesis (Hynes, 2002). Se sabe que los compuestos capaces de inhibir la interacción de esta integrina con las proteínas ECM inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Brooks et al., 1994; Brooks et al., 1995; Friedlander et al., 1995; Friedlander et al., 1996; Hammes et al., 1996). Se ha observado que los fragmentos desamidados de FN-I₅ podrían inhibir la adhesión de las células EA.hy296 a vitronectina (Fig. 8A). Adicionalmente, cuando se administró este fragmento diariamente a ratones portadores del linfoma RMA, inhibía significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* (Fig. 8B). Estos resultados sugieren que los fragmentos desamidados de FN podrían jugar un papel en la adhesión celular y la biología de los tumores.

Ejemplo 8 - Aislamiento de una forma desamidada de NGR-TNF.

Para preparar Cys-Asp-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (DGR-TNF) y Cys-isoAsp-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (isoDGR-TNF) murinos se clonó y expresó Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (NGR-TNF) en células de *E. coli* y se purificaron las formas desamidadas (producidas espontáneamente durante el proceso de producción) a partir de este producto.

El cDNA codificante de NGR-TNF (constituida por TNF fusionado con el término C de CNGRCG) se preparó primeramente por tecnología de DNA recombinante utilizando células de *E. coli* y se purificó como se ha descrito (Curnis et al., 2000). Para aislar las formas desamidadas de esta preparación, se realizó un paso de purificación ulterior basado en cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) en una columna C-4 (columna Hi-pore Reversed Phase, 250 x 4,6 mm, Biorad), como sigue: fase móvil A; tampón de fosfato de sodio 5 mM, de pH 6,8, que contenía acetonitrilo al 5% en agua; fase móvil B; tampón de fosfato de sodio 5 mM, de pH 6,8, que contenía acetonitrilo al 70% en agua; 0% B durante 10 min, 30% B durante 5 min, gradiente lineal 30-65% B durante 35 min, 100% B durante 10 min, 0% B durante 10 min, velocidad de flujo 2 ml/min. La elución se monitorizó a 214 nm y 280 nm (HPLC, LC-126 nM, Beckman Coulter). La RP-HPLC o la NGR-TNF revelaron dos picos principales, denominados F2 y F4, y dos picos menores denominados F1 y F3 (Fig. 9). La presencia de formas desamidadas en estos picos se identificó por medida de la cantidad de isoAsp en estas fracciones. Los resultados demostraron que F2 contenía mucho más isoAsp que F4 (Tabla 1).

La re-cromatografía de F2 y F4 por RP-HPLC demostró que el tiempo de retención no cambiaba después de la separación, lo que sugería que estos productos eran estables. La tinción con Coomassie de SDS-PAGE no reductora reveló una banda principal de 17-18 kDa en ambos productos F2 y F4, como era de esperar para los monómeros de TNF (Fig. 10, recuadro).

Se caracterizaron ulteriormente las propiedades bioquímicas y biológicas de F2 y F3 (Tabla 1). El análisis por espectrometría de masas con electropulverización demostró que la masa molecular de F2 era 1 Da mayor que la de F4. Además, las actividades citolíticas de F2 y F4 contra las células L-M eran similares. Este resultado, junto con los datos concernientes al contenido de isoAsp, sugieren que F2 corresponde a una forma desamidada de NGR-TNF.

Para evaluar si la desamidación tenía lugar en el dominio CNGRC N-terminal, se realizó el análisis de la secuencia del término N por el método de degradación de Edman (no representado). Los resultados confirmaron que la desamidación tenía lugar en el término N, dado que se detectaba Asp² en lugar de Asn². Esto y los datos anteriores sugieren que F2 era una mezcla de isoDGR-TNF (75%) y DGR-TNF, con residuos isoaspartilo y aspartilo en posición 2.

Se investigaron luego las propiedades antitumorales *in vivo* de F2 utilizando el modelo de linfoma RMA. Los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Ético del Instituto Científico San Raffaele H y se realizaron de acuerdo con las directrices prescritas. Ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italia) que pesaban 16-18 gramos se enfrentaron a inyecciones subcutáneas en el jar izquierdo de 7×10^4 células RMA vivas; 10 días más tarde, se trataron los ratones con 0, 25 ó 100 pg de F2 (100 µl) seguido 2 horas más tarde por administración de melfalán (50 µg en 100 µl) (Glaxo Wellcome Operations, Dartford, Gran Bretaña). Todos los fármacos, diluidos con cloruro de sodio al 0,9% que contenía 100 µg/ml de soroalbúmina humana exenta de endotoxinas (Farma-Biagini SpA, Lucca, Italia), se administraron por vía intraperitoneal. El crecimiento de los tumores se monitorizó diariamente por medida de los tumores con calibres como se ha descrito previamente (34). Los animales se sacrificaron antes que los tumores alcanzaran 1,0-1,3 cm de diámetro. Los tamaños de los tumores se indican como valor medio \pm SE (5 animales/grupo).

Los resultados demostraron que dosis muy bajas (25 pg) de F2 podían inducir efectos antitumorales cuando se administraban en combinación con melfalán (Fig. 11).

Ejemplo 9 - Preparación de isoDGR-TNF/DGR-TNF por tratamiento de NGR-TNF con tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M

La composición del tampón, la fuerza iónica, el pH y la temperatura pueden aumentar la tasa de desamidación/isomerización del residuo Asn. Así, para desarrollar un método rápido para la preparación de F2 (iDGR-TNF/DGR-TNF) se diluyó NGR-TNF en tampón de bicarbonato de amonio 0,1 M, de pH 8,5, y se incubó a 37°C durante diversos tiempos. El NGR-TNF tratado térmicamente se analizó por RP-HPLC. La Figura 12 muestra que F4 se convertía rápidamente en F2 después de este tratamiento. Notablemente, no se observó pérdida alguna de actividad citotóxica después de 4 h de tratamiento, lo que indica que este proceso puede ser aprovechado para producir isoDGR-TNF/DGR-TNF.

Ejemplo 10 - Preparación de DGR-TNF por tecnología de DNA recombinante

El cDNA codificante para DGR-TNF (TNF de ratón fusionado con el término C de CDGRCG) se obtuvo por PCR sobre un plásmido NGR-TNF, utilizando los iniciadores siguientes:

5' CACCATGTGCGACGGCCGTTGCGGC 3' (iniciador 5');
5'CTGGATCCTCACAGAGCAATGATCCCAAAG 3' (iniciador 3').

Ambos iniciadores se diseñaron para permitir la clonación direccional en un kit de expresión de plásmido pET101/D-TOPO (Invitrogen). La secuencia subrayada en el iniciador 5' contiene la secuencia necesaria para permitir la clonación direccional y el codón de traducción inicial, mientras que el iniciador 3' contiene el codón de parada (subrayado). La reacción PCR y el procedimiento de clonación se llevaron a cabo como se recomendaba en las instrucciones del fabricante. El cDNA de DGR-TNF se expresó en células BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) y se purificó de los extractos celulares por cromatografía de afinidad sobre el receptor p75-TNF soluble-Sepharose como sigue: se acoplaron 10 mg de receptor recombinante p75-TNF disponible comercialmente (Embrel) a 2,5 ml de CH-Sepharose activada (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna se lavó concienzudamente con tampón Tris-HCl 100 mM que tenía pH 8,0, cargado con extracto bruto de DGR-TNF, diluido en tampón Tris-HCl 20 mM que contenía EDTA 2 mM de pH 8,0, y se desorbió por elución con urea 7 M, Tris-HCl 100 mM, de pH 8,0. Se replegó luego DGR-TNF como se ha descrito (1). Resumidamente, los puntos desnaturalizados se dializaron contra urea 2,33 M, Tris-HCl 100 mM, de pH 8,0 a 4°C (140 min), seguido por urea 1,55 M, Tris-HCl 100 mM de pH 8,0 (140 min), y urea 1 M (Tris-HCl 100 mM de pH 8 (140 min). Finalmente, los productos se dializaron contra Tris-HCl 100 mM, de pH 8 (140 min). Finalmente, los productos se dializaron contra Tris-HCl 100 mM, de pH 8,0 (48 h). Los productos se centrifugaron a $13.000 \times g$ (10 min, 4°C) y se concentraron por ultra-filtración a través de un filtro con punto de corte 10 KDa. Todas las soluciones utilizadas en los pasos de purificación y replegado se prepararon con agua estéril y exenta de endotoxinas (S.A.L.F., Laboratorio Farmacológico SpA, Bérgamo, Italia). La concentración de proteínas se midió utilizando el Reactivo de Ensayo de Proteínas BCA (Pierce, Rockford, Illinois). La purificación y la identidad de las proteínas se comprobaron por SDS-PAGE, espectrometría de masas con electropulverización (ESI-MS) y cromatografía analítica de filtración con gel. Los resultados confirmaron la identidad del producto (datos no presentados). La actividad citotóxica *in vitro* de DGR-TNF ($2,5 \times 10^5$ U/mg) se midió por ensayo citotóxico estándar con fibroblastos de ratón L-M.

La RP-HPLC de DGR-TNF demostró que su tiempo de retención era similar al de F2 obtenido a partir de NGR-TNF (Fig. 13).

Tabla 1: Peso molecular, actividad citolítica y contenido de isoAsp de F2 y F4.

Muestra	Peso molecular (Da) ^{a)}	Actividad (U/mg) ^{b)}	Citolítica	isoAsp (A) (%) ^{c)}
NGR-TNF	-	$2,9 \times 10^8$		29,8
F2	17844,5	$(3,5 \pm 0,6) \times 10^8$		75
F4	17843,5	$(2,9 \pm 0,7) \times 10^8$		14
TNF	-	8×10^8		2,6

a) Por espectrometría de masas con electropulverización

b) Por ensayo citolítico utilizando fibroblastos murinos L-M (1).

5 c) Los residuos isoaspartilo se cuantificaron por ensayo enzimático (ISOQUANT, kit de detección de desamidación de proteínas, Promega) y se expresaron como pmol de isoAsp/pmol de péptido (%).

Referencias

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende una secuencia seleccionada de Ciso-DGRCVSGCAGRC, GisoDGRG, CisoDGRC, CisoDGRCG, LQCICTGisoDGRGEWKCE, LQCICTG-isoDGRGEWKCE, CICTGisoDGRGEWKCE, CISTGisoDGRGEWKCE, MRCTCVGisoDGRGEWTCY, MRCTSVGisoDGRGEWTCY, CTCVG-isoDGRGEWTC o CTSVGisoDGRGEWTC, en donde isoD es ácido isoaspártico.
2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido comprende CisoDGRC lineal, CisoDGRC cíclico, CisoDGRCG lineal o CisoDGRCG cíclico.
3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde isoDGR es LisoDGR.
4. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el péptido comprende una vuelta que implica los residuos G y R del resto isoDGR.
5. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el péptido comprende hasta 350 aminoácidos.
6. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores distinto del que se forma por metabolismo de un péptido que comprende el resto NGR.
7. Un producto de conjugación que comprende un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un fármaco, citoquina, fragmento de citoquina, toxina, péptido apoptótico, modificador de la respuesta biológica, radionucleido, partícula viral, gen o un compuesto de producción de imágenes.
8. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una citoquina.
9. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la citoquina está derivatizada con polietilenglicol o un residuo acilo.
10. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en donde la citoquina está enlazada al péptido por un espaciador.
11. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el espaciador es una glicina (G).
12. Un producto de conjugación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde la citoquina es TNF, IFN γ , IL-12, IP-10, IL-7 o EMAP II.
13. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la citoquina es TNF o IFN γ .
14. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la citoquina es TNF.
15. Un producto de conjugación de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la citoquina es TNF α o TNF β .
16. Una composición farmacéutica que comprende un péptido o producto de conjugación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
17. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un producto de conjugación como se define en la reivindicación 14 ó 15, y una cantidad eficaz de IFN γ o un polinucleótido que codifica el mismo.
18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, en la forma de una solución o suspensión inyectable o un líquido para infusiones.
19. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la forma de liposomas.
20. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, que comprende adicionalmente un agente antitumoral o un compuesto de producción de imágenes de tumores de diagnóstico.
21. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el otro agente antitumoral es doxorrubicina, melfalán, cis-platino, gemcitabina o taxol.
22. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 que no comprende esencialmente péptido o conjugado alguno que tenga un resto NGR correspondiente.
23. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el producto de conjugación de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de osteoporosis, artritis, retinopatía diabética, degeneración macular, restenosis o hemangioma.

24. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el producto de conjugación de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

25. Uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el cáncer comprende un tumor sólido.

5 26. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el producto de conjugación de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 para uso en el tratamiento de osteoporosis, artritis, retinopatía diabética, degeneración macular, restenosis o hemangioma.

10 27. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el producto de conjugación de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 para uso en el tratamiento del cáncer.

15 28. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el producto de conjugación de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el cáncer comprende un tumor sólido.

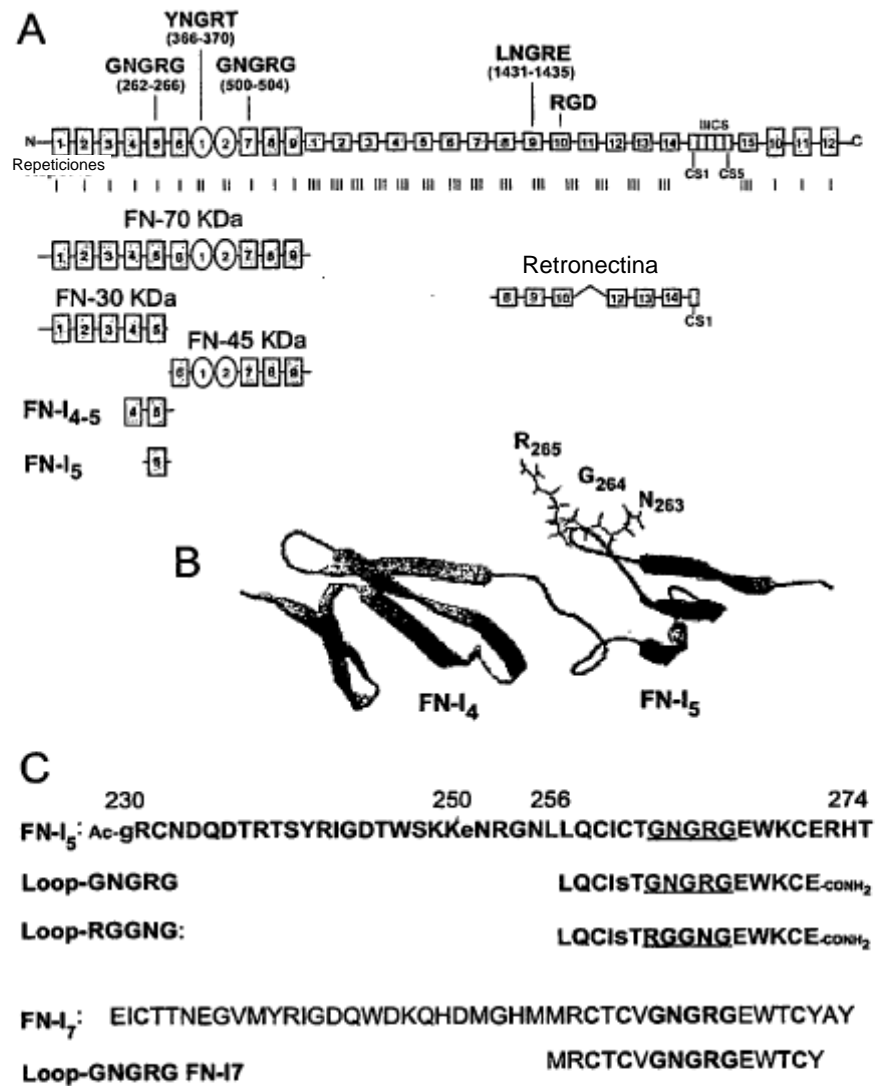


Figura 1

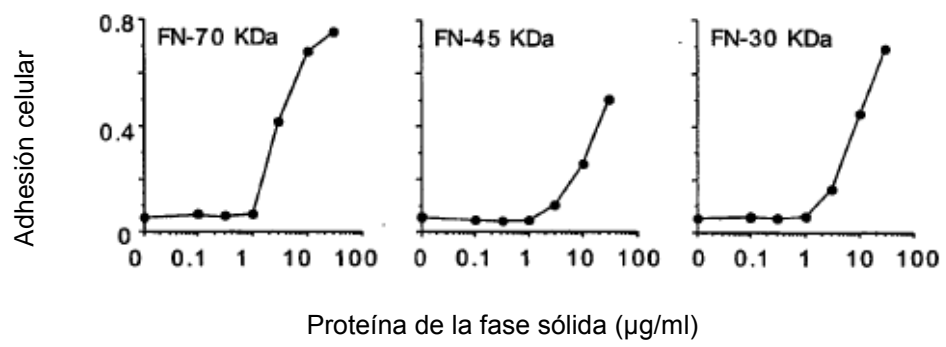


Figura 2

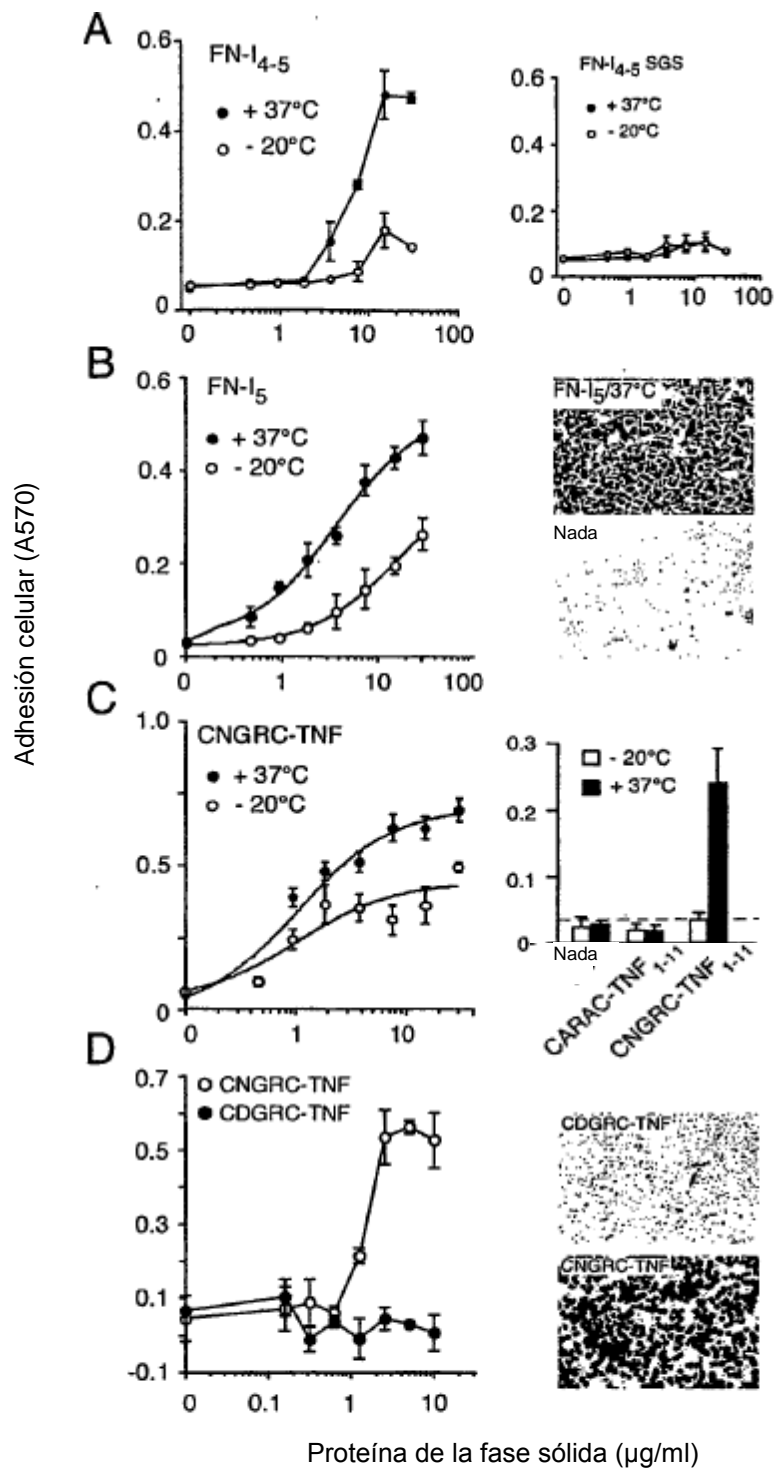


Figura 3

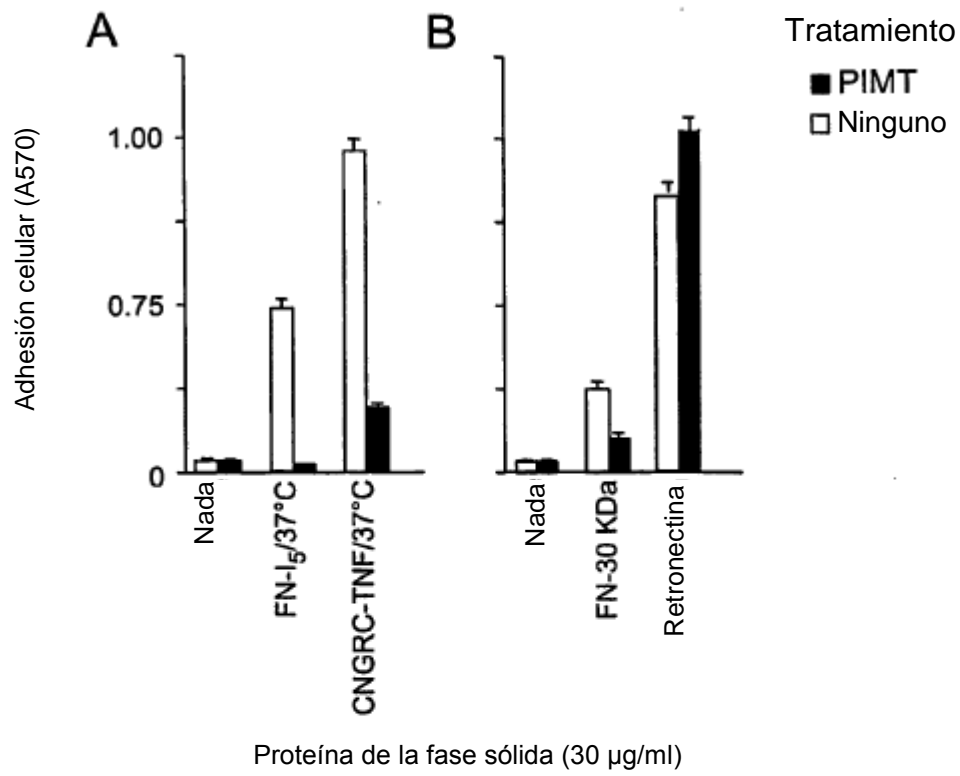


Figura 4

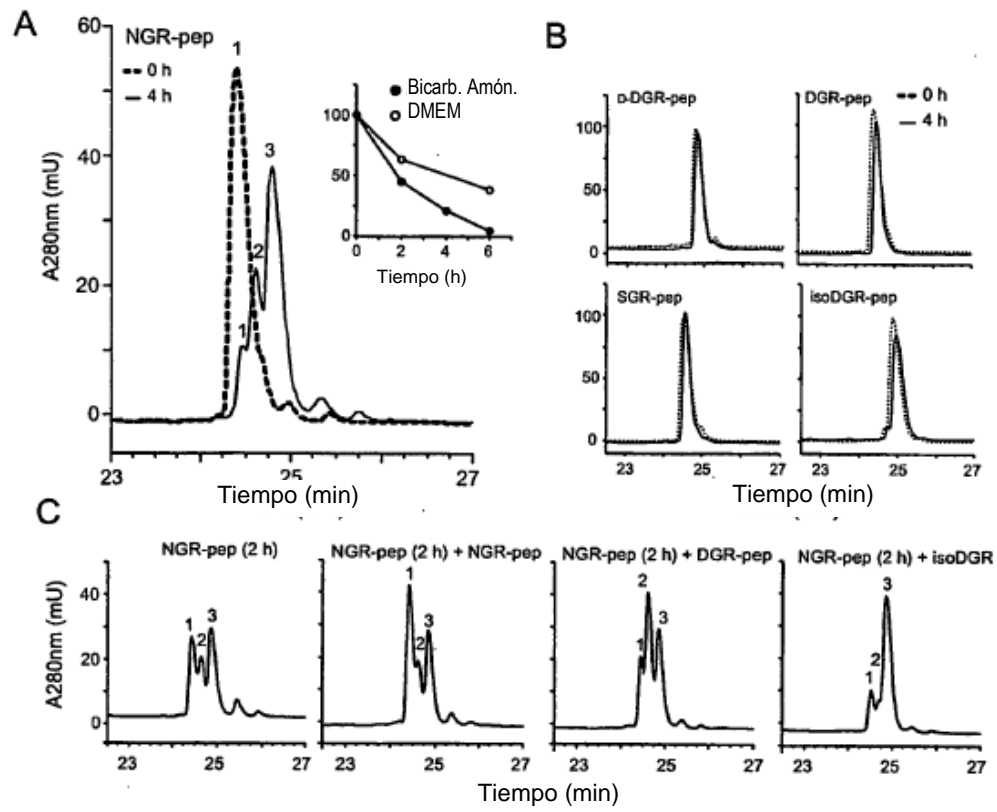


Figura 5

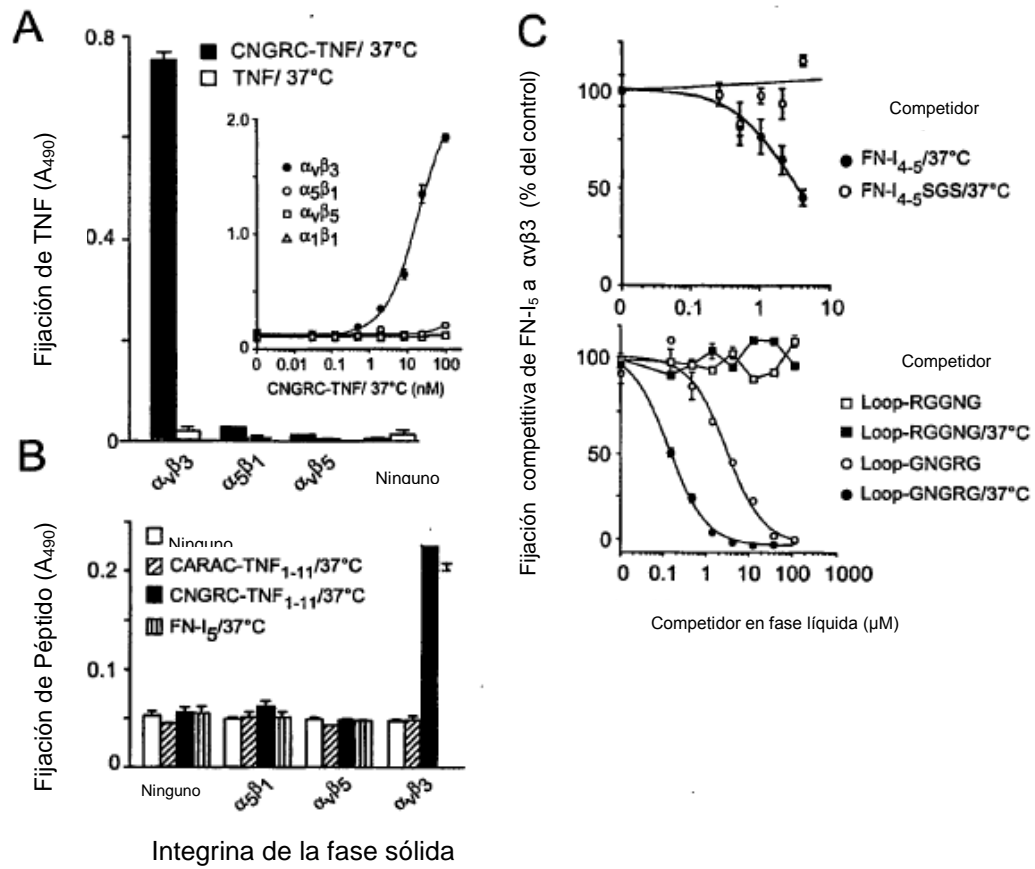


Figura 6

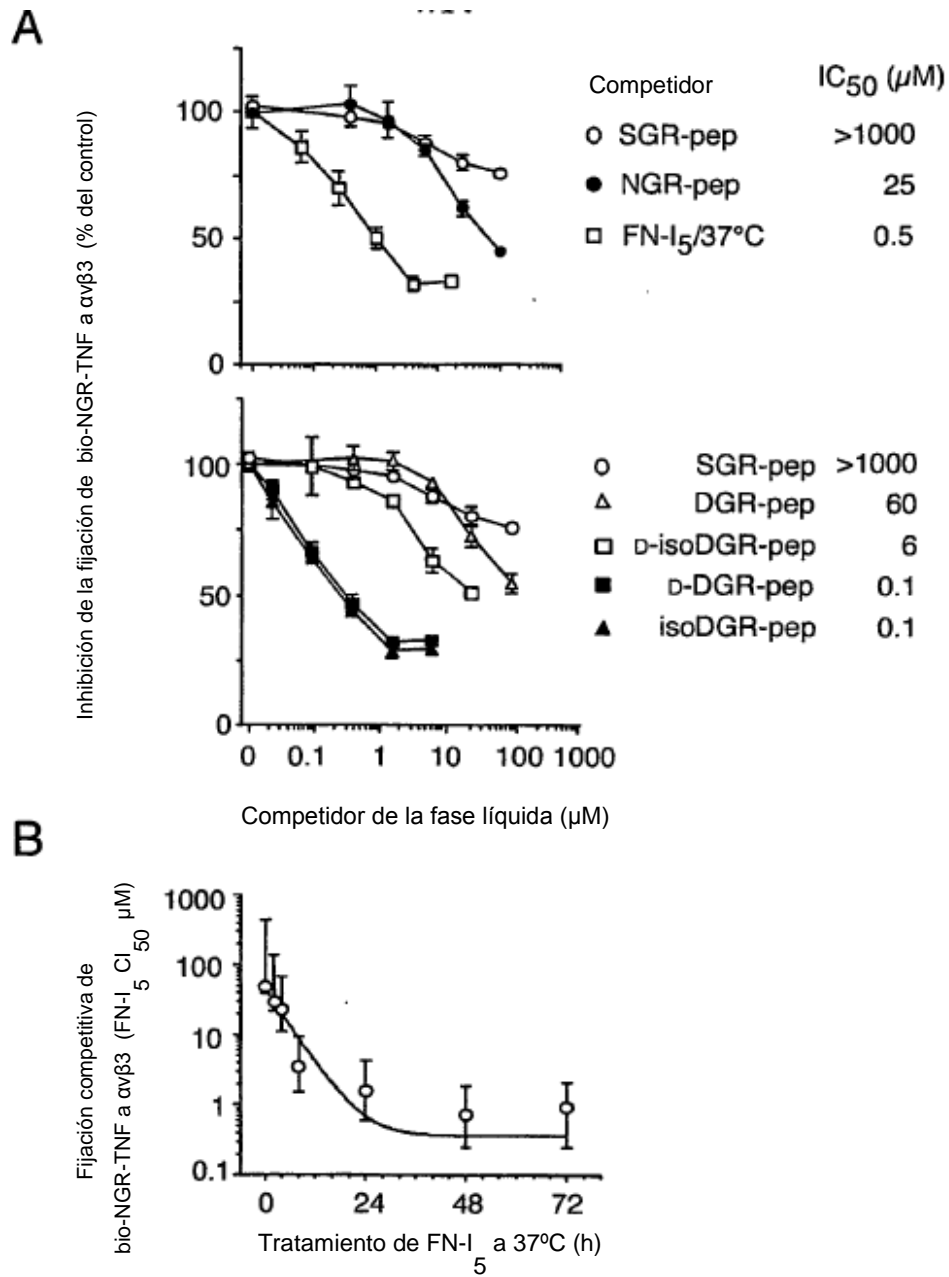


Figura 7

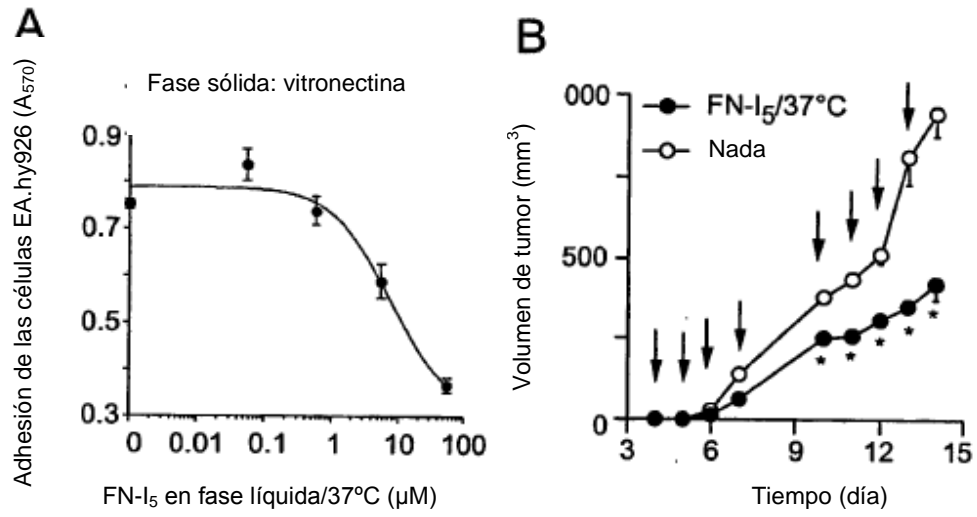


Figura 8

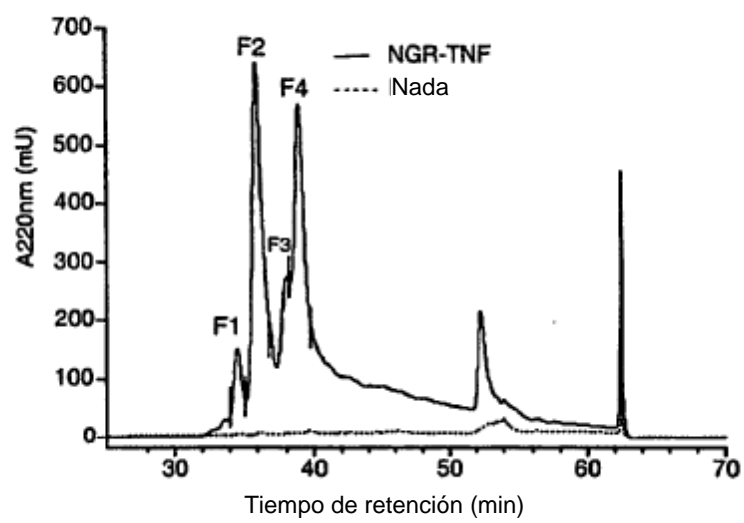


Figura 9

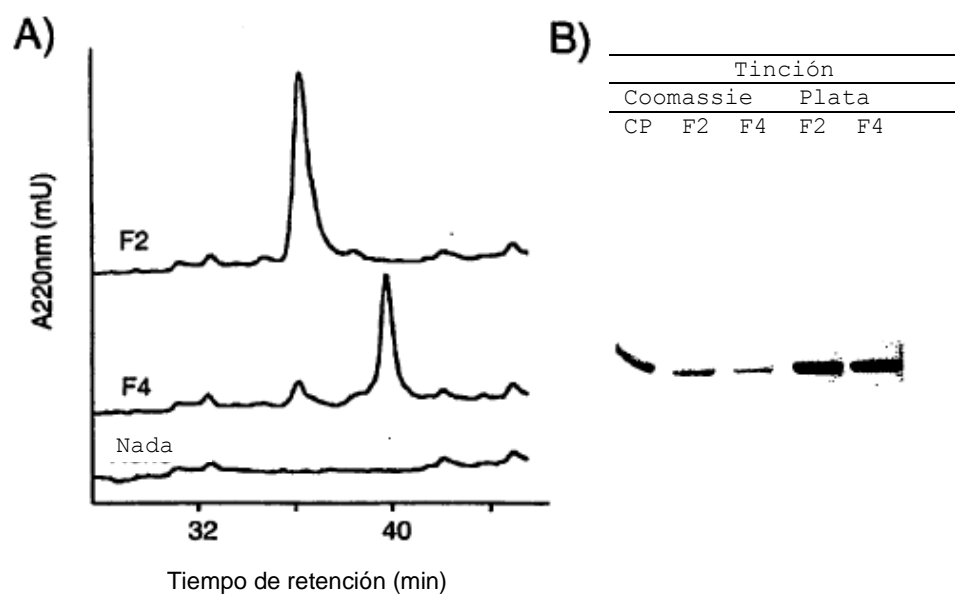


Figura 10

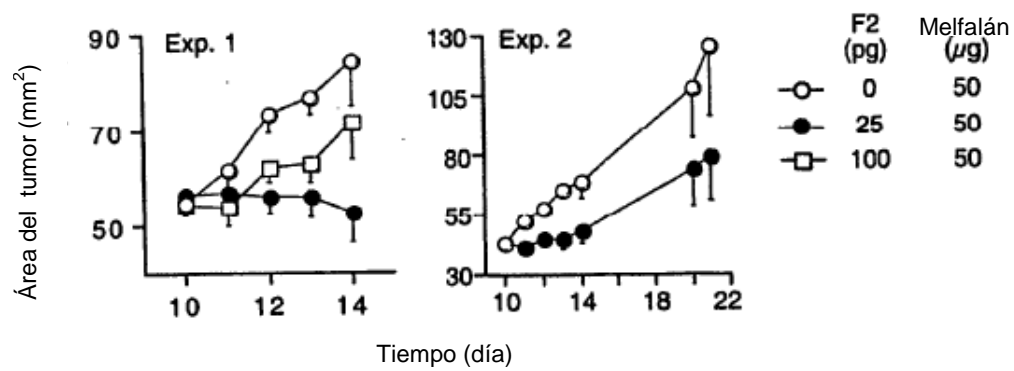


Figura 11

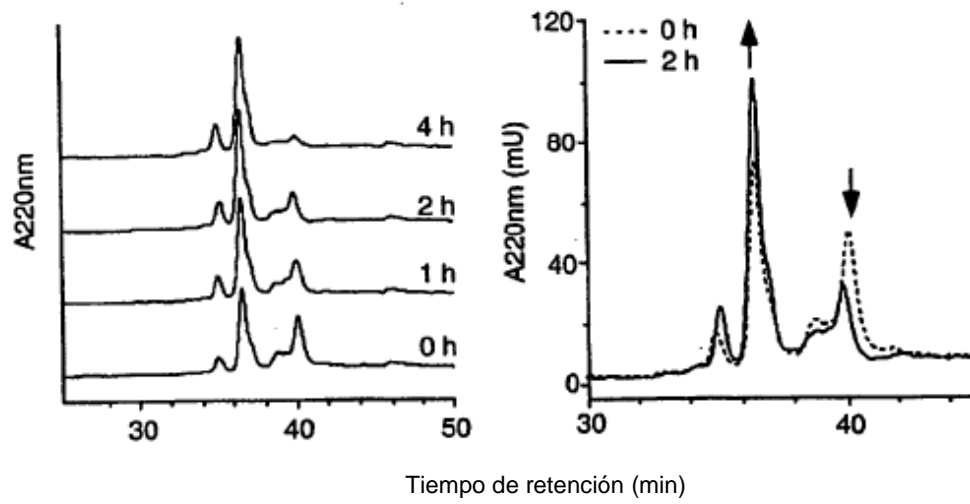


Figura 12

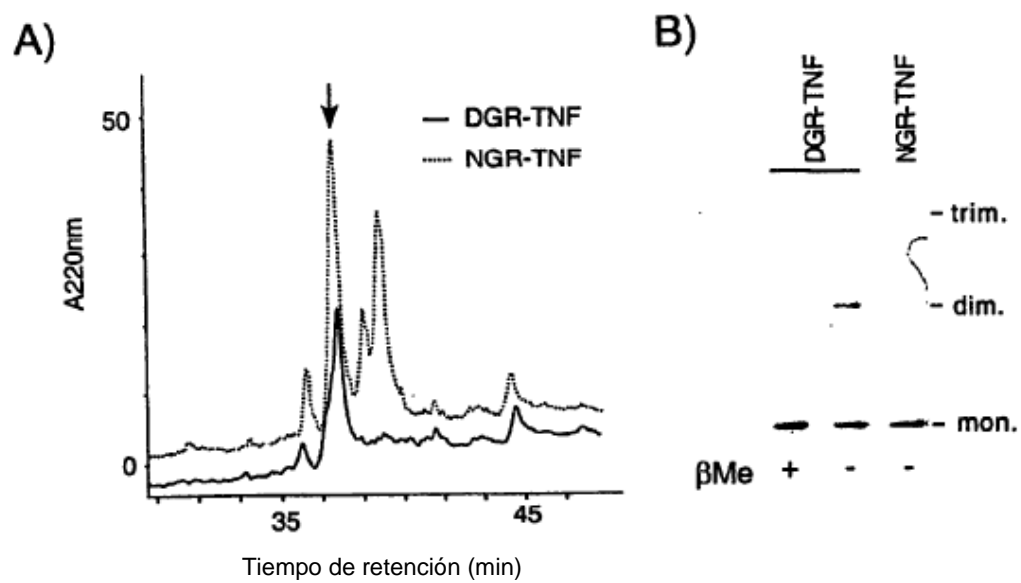


Figura 13

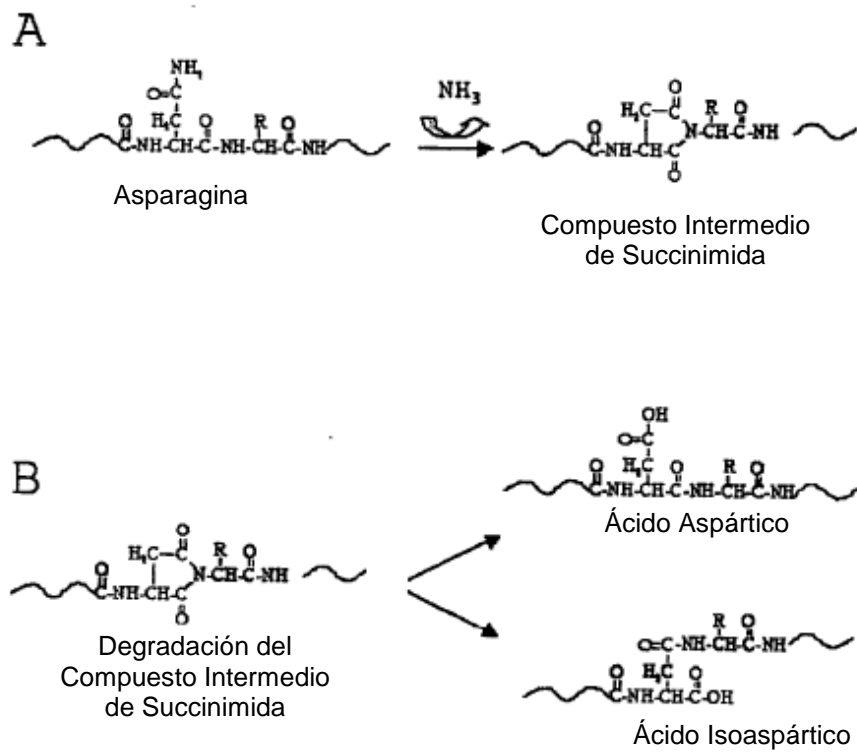


Figura 14