

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 056**

51 Int. Cl.:

C07K 14/46 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2006 E 06806112 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1934248**

54 Título: **Antagonista del péptido receptor Alfabeta3 selectivo para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico**

30 Prioridad:

12.10.2005 US 725294 P

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

15.07.2013

73 Titular/es:

**ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS
(100.0%)
20, rue Diesel
01630 Saint Genis Pouilly , FR**

72 Inventor/es:

**DEL GATTO, ANNARITA;
ZACCARO, LAURA;
PEDONE, CARLO y
SAVIANO, MICHELE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 413 056 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonista del péptido receptor Alfabeta3 selectivo para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Las integrinas son miembros de una familia de receptores de superficie celular transmembrana heterodiméricos que desempeñan una función crucial en los procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz (Hynes, R.O. Cell 1992, 69, 11-25). Estos receptores consisten de una subunidad α y una β , que no se asocian covalentemente en las combinaciones definidas (Eble, J.A. Integrin-Ligand Interaction; Springer: Heidelberg, 1997; pág 1-40). La mayoría de ellos reconoce la triada Arg-Gly-Asp (RGD) que se encuentra en muchas proteínas de la matriz extracelular (es decir, vitronectina) (Serini, G.; y otros. A sticky business. Exp. Cell. Res. 2005, in press) y desintegrinas de veneno de serpiente (Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. Cell 1986, 44, 517-518; D'Souza, S.E.; y otros Trends Biochem. Sci. 1991, 16, 246-250; Gould, R.J.; y otros Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1990, 195, 168-171). Aún si diferentes integrinas reconocen diferentes proteínas que contienen la secuencia RGD, varios estudios han demostrado que los residuos de aminoácidos que flanquean la secuencia RGD de ligandos de alta afinidad modulan su especificidad de interacción con complejos de integrina. A pesar de los numerosos estudios reportados en la literatura, la selectividad del ligando hacia diferentes subtipos de integrina es aún un problema desafiante debido principalmente a que la mayoría de las estructuras 3D de los subtipos de integrina siguen siendo desconocidos (Marinelli, L.; y otros J. Med. Chem. 2004, 47, 4166-4177).

20 Un miembro ampliamente estudiado de esta clase de receptor es la integrina $\alpha_v\beta_3$. Esta integrina se expresa muy fuerte en células endoteliales y de melanoma activadas, en contraste, se expresa débilmente en vasos sanguíneos quiescentes y melanomas pre-neoplásicos (Hood, J.D.; Cheresch, D.A. Nat. Rev. Cancer 2002, 2, 91-100). Junto con la integrina $\alpha_v\beta_5$, se reporta que $\alpha_v\beta_3$ está involucrada en procesos fisiológicos que incluyen la angiogénesis y la reparación del tejido así como afecciones patológicas como la angiogénesis inducida por tumores (Eliceiri, B.P.; Cheresch, D.A. J. Clin. Invest. 1999, 103, 1227-1230; Kumar, C.C. Curr. Drug Targets 2003, 4, 123-131), emigración e invasión de las células tumorales (Clezardin, P. Cell. Mol. Life Sci. 1998, 54, 541-548). A pesar de que ambas integrinas promueven la adhesión celular a la vitronectina y participan en los mismos procesos, se reportaron como estructuralmente diseñadas para responder a diferentes eventos de señalización. Los estudios previos proporcionaron evidencia de que la angiogénesis inducida por bFGF es mediada por $\alpha_v\beta_3$ mientras que la angiogénesis inducida por VEGF es mediada por $\alpha_v\beta_5$ (Friedlander, M.; y otros Science 1995, 270, 1500-1502). Las células de melanoma que expresan $\alpha_v\beta_3$ migran in vitro y hacen metástasis in vivo sin la necesidad de la estimulación de citocinas exógenas (Filardo, E.J.; y otros. J Cell Biol. 1995, 130, 441-450). Por el contrario, las células tumorales que expresan la integrina $\alpha_v\beta_5$ requieren de un evento de señalización mediado por un receptor tirosina cinasa para la motilidad en vitronectina y la diseminación in vivo (Brooks, P.C.; y otros J Clin Invest. 1997, 99, 1390-1398). Aunque $\alpha_v\beta_5$ se expresa ampliamente por muchas célula tumorales malignas, $\alpha_v\beta_3$ tiene una distribución celular relativamente limitada en comparación con la de $\alpha_v\beta_5$ (Pasqualini, R.; y otros J. Cell Science 1993, 105, 101-111; Walton, H.L.; y otros J. Cell. Biochem. 2000, 78, 674-680.). Por lo tanto, con el fin de orientar los procesos mediados por $\alpha_v\beta_3$ a propósitos de diagnóstico o terapéuticos, se requiere el desarrollo de nuevos compuestos que puedan discriminar entre $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

40 Hasta la fecha, varios candidatos terapéuticos, incluyendo los anticuerpos (Gutheil, J.C. y otros Clin. Cancer Res. 2000, 6, 3056-3061), moléculas pequeñas (Miller, W.H.; y otros Drug Discov. Today 2000, 5, 397-408; Marugan, J.J.; y otros J. Med. Chem. 2005, 48, 926-934), peptidomiméticos (Sulyok, G.A.; y otros J. Med. Chem. 2001, 44, 1938-1950; Belvisi, L.; y otros Org. Lett. 2001, 3, 1001-1004), y péptidos cíclicos (Mitjans, F. y otros Int. J. Cancer 2000, 87, 716-723; Dechantsreiter, M.A.; y otros J. Med. Chem. 1999, 42, 3033-3040) se evaluaron clínicamente y mostraron que modulan exitosamente los procesos mediados por $\alpha_v\beta_3$. Hasta ahora, el pentapéptido ciclo (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal-), referido como c(RGDf[NMe]V) (Eskens, F.A.; y otros Eur. J. Cancer 2003, 39, 917-926), es uno de los $\alpha_v\beta_3$ antagonistas más activos reportados en la literatura. Los estudios previos demostraron una mayor afinidad de este péptido por la integrina $\alpha_v\beta_3$ en comparación con $\alpha_v\beta_5$ y se reportó la inhibición de la adhesión celular mediada por $\alpha_v\beta_3$ con valores de IC₅₀ en el intervalo micromolar cuando se ensayó en diferentes líneas celulares tumorales (Goodman, S.L.; y otros. J. Med. Chem. 2002, 45, 1045-1051).

50 Las estructuras cristalinas del segmento extracelular de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en su estado no ligado y en el complejo con c(RGDf[NMe]V) y los estudios de acoplamiento en ligandos de integrina $\alpha_v\beta_3$ demostraron que las principales interacciones son entre la arginina cargada positivamente y la subunidad α y entre el ácido aspártico aniónico y la subunidad β (Marinelli, L.; y otros. J. Med. Chem. 2003, 46, 4393-404; Xiong, J.P. y otros, Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. Science 2001, 294, 339-345; Xiong, J.P.; y otros. Science 2002, 296, 151-155), y que la selectividad entre las diferentes subunidades se consigue mediante la configuración molecular de la secuencia RGD. Estudios anteriores además reportaron que la equistatina, la más pequeña (49 residuos) de las desintegrinas de víbora (*Echis carinatus*), es un potente antagonista de las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_{11b}\beta_3$ (Wierzbicka-Patynowski, I.; y otros. J. Biol. Chem. 1999, 274, 37809-37814) y que los aminoácidos adyacentes al motivo RGD junto con los 41-49

residuos C-terminales parecen ser críticos para el reconocimiento selectivo de las integrinas. Experimentos de mutación y entrecruzamiento por fotoafinidad, y análisis conformacional NMR combinado con estudios de acoplamiento Yahalom, D.; y otros. *Biochemistry* 2002, 41, 8321-8331; Saudek, V.; y otros. *Biochemistry* 1991, 30, 7369-7372), proporcionaron evidencias de que la región C-terminal de equistatina se une a un sitio dentro de la subunidad β_3 del receptor $\alpha_v\beta_3$, que es distinto de los sitios que se unen a los residuos que flanquean la tríada RGD en pequeños péptidos ligandos.

SUMARIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a compuestos de péptidos o miméticos de péptido, que contienen la secuencia Arg-Gly-Asp, como antagonistas potentes y selectivos del receptor $\alpha_v\beta_3$: los compuestos de la invención se pueden usar como nuevos medicamentos contra el cáncer y/o una nueva clase de marcadores de diagnóstico no invasivos como herramientas adecuadas para la terapia orientada a $\alpha_v\beta_3$ e imagenología.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

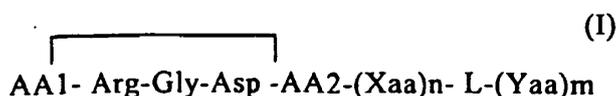
Figura 1. Es una representación esquemática de los péptidos sintetizados.

Figura 2. Muestra las curvas de inhibición representativas obtenidas a partir de ensayos de adhesión realizados en células $K\alpha_v\beta_3$. Las células se preincubaron con concentraciones crecientes de c(RGDfV) (panel A, IC_{50} 0.68 μ M) y RGDechi (panel B, IC_{50} 0.88 μ M) durante 1 hora a 4°C y después se sembraron en placas recubiertas con vitronectina. Las células se dejaron adherir durante 1 hora a 37°C y finalmente se contaron.

Figura 3. Muestra la selectividad de RGDechi por $\alpha_v\beta_3$. **Panel A.** Curvas de inhibición representativas obtenidas a partir de ensayos de adhesión realizados en células $K\alpha_v\beta_5$. Las células se preincubaron con concentraciones crecientes de c(RGDfV) (cuadrados cerrados) y RGDechi (cuadrados abiertos) durante 1 hora a 4°C y la adhesión se determinó como se describe en la Figura 2. Los resultados se expresan como el porcentaje de células adherentes considerando la muestra control sin tratar como 100%. **Panel B** Curvas de inhibición representativas obtenidas a partir de ensayos de adhesión realizados en células $K\alpha_{11b}\beta_3$. Las células se pre-incubaron con anticuerpo monoclonal bloqueador LM609 anti- $\alpha_v\beta_3$ y se sometieron al ensayo de adhesión sobre el fibrinógeno (10 μ g/ml).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los compuestos de la invención tienen la siguiente fórmula (I):



en donde:

AA1 es un aminoácido alfa que contiene al menos tres grupos funcionales, seleccionados en el grupo de Cys, Asp, Glu, Lys, Orn, Pen, Dab o Dap;

AA2 es un aminoácido alfa que contiene al menos tres grupos funcionales, seleccionados en el grupo de Cys, Asp, Glu, Lys, Orn, Pen, Dab o Dap;

L es una secuencia enlazadora que consiste en un número de residuos de aminoácido comprendidos entre 0 y 2, tal como la secuencia PG;

(Xaa)n es una secuencia de aminoácido en la que n está en el intervalo de 1 a 3, cuya secuencia es sustancialmente homóloga a aquella de la secuencia 28-30 de Equistatina: MDD.

(Yaa)m es una secuencia de aminoácido en la que m está en el intervalo de 2 a 9, cuya secuencia es sustancialmente homóloga a aquella del C-terminal (41-49) de Equistatina: RNPHKGPAT.

La estructura cíclica del pentapéptido se obtiene a través de la formación de un enlace peptídico entre el CO de AA1 y la NH de AA2.

AA2 es preferentemente un D-aminoácido.

La secuencia (Xaa)n preferida es MDD mientras que la secuencia (Yaa)m preferida es RNPHKGPAT.

El grupo Xaa se une a AA2 a través de la formación de un enlace amida entre la cadena lateral de AA2 y el N-terminal de Xaa.

- 5 Los péptidos de la invención tienen grupos amino libres o acetilados en el N-terminal y grupos carboxilo libres o amidados en la posición C-terminal; uno o dos más residuos de aminoácido pueden añadirse en el extremo C-terminal.

10 La invención se refiere también a los compuestos de la fórmula (I) que se marcan, ya sea con el uso de un grupo quelante o directamente con metales radiactivos o paramagnéticos o halógenos radiactivos y las sales de los mismos con bases orgánicas o inorgánicas fisiológicamente aceptables o con aniones de ácidos orgánicos o inorgánicos fisiológicamente aceptables.

15 Para los compuestos de la invención que contienen aminoácidos, los residuos de aminoácidos se indican mediante designaciones de una sola letra o de tres letras de acuerdo con las prácticas convencionales. A11 de los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser D-o L-isómero. Los L-isómeros se prefieren cuando no se especifique de cualquier otra forma. Los aminoácidos que comúnmente se encuentran y que no son codificados por genes también se pueden usar en la presente invención.

20 El término "sustancialmente homóloga" significa que la secuencia de aminoácidos de un compuesto en particular muestra una correspondencia sustancial a la secuencia de aminoácidos de la secuencia C-terminal de la equistatina, en la que al menos tres aminoácidos en las secuencias pueden mutarse con aminoácidos, por sustituciones conservativas. El término "cualquier aminoácido" usado anteriormente se refiere a los isómeros L y D de los aminoácidos naturales y aminoácidos "no proteínas" comúnmente usados en la química de péptidos para preparar análogos sintéticos de péptidos naturales, tales como los alfa aminoácidos sustituidos y no sustituidos en las posiciones alfa y beta de las configuraciones L y D, y aminoácidos alfa y beta insaturados. Los ejemplos de aminoácidos "no proteína" son
 25 norleucina, norvalina, aloisoleucina, alo-treonina, homoarginina, tioprolina, dehidroprolina, hidroxiprolina, ácido pipicolico, ácido azetidina, homoserina, ciclohexilglicina, ácido alfa-amino-n-butírico, ciclohexilalanina, ácido aminofenilbutírico, fenilalanina mono y di -sustituidas en las posiciones orto, meta y para del anillo aromático, derivados O-alquilados de serina, treonina y tirosina, cisteína S-alquilada, lisina épsilon-alquilada, ornitina delta-alquilada, aminoácidos aromáticos, sustituido en las posiciones meta o para del anillo tales como fenilalanina-nitrato, -sulfato, -
 30 fosfórico, -acetato, -carbonato, -metilsulfonato, -metilfosfonato, tirosina-sulfato, -fosfato, -sulfonato, -fosfonato, para-amido-fenilalanina, C-alfa, alfa-dialquilados, aminoácidos tales como alfa,alfa-dimetilglicina (Aib), ácido alfa-aminociclopropanocarboxílico (Ac3c), ácido alfa-aminociclobutanocarboxílico (Ac4c), ácido alfaaminociclopentanocarboxílico (Ac5c), ácido alfa-aminociclohexanocarboxílico (Ac6c), dietilglicina (Deg), dipropilglicina (Dpg), difenilglicina (Dph). Los ejemplos de beta-aminoácidos son beta-alanina (beta-Ala), ácido cis y
 35 trans 2,3-diaminopropiónico (Dap). Otros aminoácidos no proteína se identifican en el sitio web <http://CHEMLIBRARY.BRI.NRC.CA/>.

40 El péptido o compuestos peptidomiméticos de la presente invención pueden sintetizarse por métodos convencionales usados en la química de péptido ordinaria, como se describe, por ejemplo, en M. Bodansky and M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, published by Interscience Publishing Co., Nueva York, 1966; F.M. Finn and K. Hofmann, The Proteins, volumen 2, editado por H. Neurath, R.L. Hill, Academic Press Inc., Nueva York, 1976;. Nobuo Izumiya y otros, Peptide Synthesis, publicado por Maruzen Co., 1976; Nobuo Izumiya y otros, Fundamental Peptide Synthesis and Experiment, publicado por Maruzen Co., 1985; Lecture Series on Biochemical Experiment, editado por la Association of Biochemistry, Japón, volumen 1, "Chemistry of Protein IV", capítulo II, Haruaki Yajima, Peptide Synthesis, 1977.

45 El péptido se puede sintetizar mediante la selección del método de fase líquida o el método de fase sólida, dependiendo de la estructura del péptido. Los compuestos peptídicos además se pueden sintetizar mediante la combinación de los métodos de solución y de fase sólida.

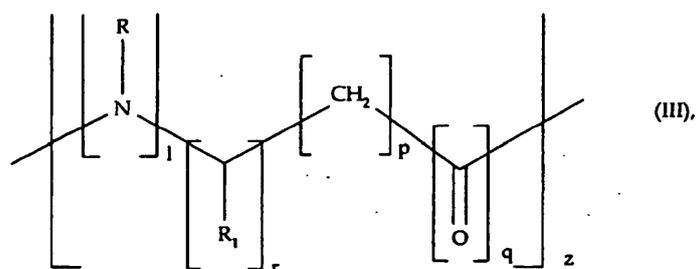
50 Los compuestos de la invención se purifican por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa. Los compuestos se identifican por espectrometría de masa, análisis de aminoácidos, espectroscopia de NMR.

La invención se refiere además a los compuestos de la fórmula general (II):

55 A-[Y]_z-C (II)

5 en donde A es un péptido de fórmula general (I); z es un entero entre 0 y 5; Y es una cadena espaciadora respectivamente unida a una de las funcionalidades presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos individuales presentes en el péptido A, o a un grupo N-terminal (-NH₂) o un grupo C-terminal (-CO₂H) de A, y a C; cuando z es un entero entre 2 y 5, las unidades Y pueden ser iguales o diferentes entre sí;

Y es preferentemente un grupo de la fórmula (III):



10

en donde:

r, l, y q son cada uno independientemente 0 o 1, y p es independientemente un entero de 0 a 10, siempre que al menos uno de l, r y q sean diferente de cero;

R es hidrógeno;

15

R1 es un hidrógeno o un grupo -CH₃;

C puede ser un agente quelante, covalentemente unido al espaciador Y o directamente al péptido A, o a más de una de las unidades de aminoácido del péptido A, que es capaz de acomplejar un metal paramagnético o un radioisótopo.

Los grupos quelantes preferidos se seleccionan del grupo que consiste de:

20

un residuo de un ácido poliaminopolicarboxílico y derivados de este, en particular seleccionados de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (D03A), ácido [10-(2-hidroxiopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (HPDO3A), ácido 4-carboxi-5,8,11-tris(carboximetil)-1-fenil-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico (BOPTA), N-[2-[bis(carboximetil)amino]-3-(4-etoxifenil)propil]-N-[2-[bis(carboximetil)amino]etilglicina (EOB-DTPA), N,Nbis[2[(carboximetil)(metilcarbamoil)metil] amino]etil]-glicina (DTPA-BMA), ácido 2-metil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (MCTA), ácido (α,α',α'',α''')-tetrametil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético (DOTMA); o es el residuo de un ligando del ácido de poliaminofosfato o derivados de este, en particular ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)etilenodiamina-N,N'-diacético (DPDP) y ácido etilenodinitrilotetrakis(metilfosfónico) (EDTP); o es el residuo de un ligando del ácido poliaminofosfónico y derivados de este, o ácido poliaminofosfónico y derivados de este, en particular ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis[metileno (metilfosfónico)] y ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis[metileno-(metilfosfónico)]; o es el residuo de quelantes macrocíclicos tales como texafrinas, porfirinas, ftalocianinas; o es ácido N,N-bis[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-glutámico (DTPA-GLU) o DTPA conjugado con Lys (DTPA-Lys). Otros grupos quelantes se reportan en la publicación "Radionuclide Peptide Cancer Therapy" editado por M. Chinol y G. Paganelli, Taylor & Francis CRC Press, 2006 (ISBN: 0824728874).

25

30

35

40

C puede ser además un radiotrazador para medicina nuclear, tal como el grupo F18-galacto, covalentemente unido al espaciador Y o directamente al péptido A, o a más de una unidad de aminoácido del péptido A. Otros radiotrazadores son aquellos reportados en la publicación "Radionuclide Peptide Cancer Therapy" editado por M. Chinol and G. Paganelli, Taylor & Francis CRC Press, 2006 (ISBN: 0824728874).

Estos péptidos pueden usarse en MRI y aplicación en Medicina Nuclear para el diagnóstico y el tratamiento de cánceres.

45

La invención en consecuencia proporciona el uso en un tratamiento de un trastorno que comprende la administración a

un individuo que padece de dicho trastorno de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista $\alpha_v\beta_3$ de la fórmula I o II.

5 Los ejemplos de trastornos específicos incluyen patologías relacionadas con la angiogénesis y la metástasis, tal como cáncer de mamas, tumores musculoesqueléticos, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma humano, cáncer cervical, restenosis vascular, osteoporosis, artritis reumatoide.

Más particularmente, los compuestos de la invención son capaces de disminuir la proliferación de células tumorales y/o modular la angiogénesis patológica.

10 Los compuestos de la invención se pueden usar además en el diagnóstico de trastornos usando métodos de MRI y de Medicina Nuclear (PET, SPECT etc.) mediante la administración de una cantidad eficaz de los mismos a un sujeto, particularmente para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y la metástasis tales como
15 cáncer de mama, tumores musculoesqueléticos, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma humano, cáncer cervical, restenosis vascular, osteoporosis, artritis reumatoide.

20 La invención se refiere además a un kit de diagnóstico que comprende el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ tal como se definió anteriormente para la detección temprana de patologías en el plasma, tales como cáncer de mama, tumores musculoesqueléticos, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma humano, cáncer cervical, restenosis vascular, osteoporosis, artritis reumatoide.

La invención se ilustra con más detalle mediante el siguiente ejemplo.

EJEMPLO

25 El péptido que tiene la secuencia reportada en la Figura 1, y de aquí en adelante referida como RGDechi, es una molécula quimérica bifuncional que contiene un motivo RGD cíclico y una secuencia correspondiente a la cola C-terminal de la equistatina conectados por un enlazador. Con el fin de evaluar la actividad de la molécula bifuncional RGDechi, se diseñaron echiL, echi 11-19 y echi8-19 (figura 1). Echi11-19 y echi 6-19 abarcan las secuencias 11-19 y 8-19 de RGDechi respectivamente, y echiL corresponde al precursor lineal de RGDechi.

30 **Síntesis:** Todos los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos ABI433A automatizado usando la estrategia en fase sólida Fmoc (0.25 mmol). La síntesis se llevó a cabo con resina Novasyn TGA (sustitución de 0.29 mmol g^{-1}), usando todos los aminoácidos estándar, excepto por Fmoc-D-Glu-OAll con el fin de insertar el residuo D-Glu⁵ en la
35 secuencia peptídica por su cadena lateral carboxilo. El primer aminoácido se unió a la resina mediante tratamiento con Fmoc-Thr (tBu)-OH (5 eq) / MSNT (5 eq) / Melm (3.75 eq) en DCM durante 3 h. La etapa de desprotección de Fmoc se llevó a cabo con 30% de piperidina en DMF durante 10 min y las reacciones de acoplamiento del éster activo se llevaron a cabo en un exceso de cuatro veces el aminoácido y HBTU (4 eq) / HOBt (4 eq) / DIPEA (8 eq) en DMF (Fields, C. G.; y otros Pept. Res. 1991, 4, 95-101). Cada acoplamiento se repitió dos veces durante 1 h seguido de un paso de finalización (5 min) realizado con anhídrido acético /DIPEA/DMF (2.6:4.8:92.6 v/v/v).

40 Después de la reacción de acoplamiento de Arg¹¹ se retiró una alícuota de la peptidil-resina para producir el péptido echi11-19. Al final del acoplamiento de Met⁶, otra parte de la resina se retiró para obtener el péptido echi6-19. Durante la síntesis de RGDechi antes de la desprotección de Fmoc de Lys¹, la desprotección selectiva del α -carboxilo del residuo D-Glu⁵ a partir del grupo alilo se llevó a cabo mediante el tratamiento de la peptidil-resina con PhSiH₃ (24eq)/Pd(PPh₃)₄ (0.25 eq) en DCM. Antes de la ciclación final la resina se dividió en dos partes, con el fin de obtener echiL y para
45 continuar la síntesis de RGDechi. La ciclación entre el α NH de Lys¹ y el α CO de D-Glu⁵ se realizó con PyBop (1.5 eq)/HOBt (1.5 eq)/DIPEA (2 eq) en DMF.

Los péptidos se escindieron de la resina y se desprotegieron usando una mezcla de TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:1 v/v/v/v). Las resinas se filtraron después y los péptidos se precipitaron usando éter de dietilo anhidro frío.

50 Los productos crudos se purificaron mediante RP-HPLC preparativa en el sistema Shimadzu LC-8A, equipado con un detector Uv-Vis SPD-10A usando una columna C18 Phenomenex (21 x 250 mm; 15 μm ; 300 \AA) y un gradiente lineal de H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1 % TFA) de 5% a 70% de CH₃CN (0.1% TFA) en 30 min a un régimen de flujo de 20 ml/min. Los péptidos purificados se caracterizaron mediante espectrometría de MALDI-TOF en un espectrómetro

MALDI-TOF Voyager-DE (Perseptive Biosystem), que dio los picos esperados de iones moleculares $[M-H]^+$ de 2061.2, 978.1, 1493.6, 2079.2 para RGDechi, echi11-19, echi 8-19 y echiL, respectivamente.

5 Todos los péptidos se sintetizaron por el método en fase sólida usando química de Fmoc. Todos los aminoácidos se acoplaron de acuerdo con el procedimiento de HBTU/HOBt/DIPEA (Fields, C. G.; y otros Pept. Res. 1991, 4, 95-101). La desprotección final y la escisión de la resina se lograron con TFA y depuradores. Durante la síntesis de RGDechi, antes de la desprotección de Fmoc de Lys¹, la desprotección selectiva del α -carboxilo del residuo D-Glu⁵ a partir del grupo alilo se llevó a cabo mediante el tratamiento de la peptidil-resina con PhSiH_3 /Pd(PPh₃)₄/DCM (Dangles, O. y otros.. J. Org. Chem. 1987, 52, 4984-93). Antes de la ciclación final, la resina se dividió en dos partes, para obtener echiL y para continuar la síntesis de RGDechi. La ciclación entre el grupo αNH de Lys' y el grupo αCO de D-Glu⁵ se realizó con PyBop /HOBt /DIPEA (Coste, J. y otros. Tetrahedron Lett. 1990, 31, 205-8) en DMF.

10 La pureza y la identidad de los péptidos se confirmaron por RP-HPLC analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF. Los rendimientos globales de RGDechi, echiL, echi6-19 y echi 11-19, purificados mediante RP-HPLC preparativa, fueron 24%, 30%, 54% y 58%, respectivamente.

15 **Adhesión celular y ensayo competitivo:** Las células de eritroleucemia humana K562, establemente cotransfectadas con ADNc de la subunidad α_v o α_{11b} y las subunidades β_3 o β_5 , fueron amablemente proporcionadas por el Dr. S. D. Blystone (SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY). Las células se mantuvieron en medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 UI/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 en una incubadora humidificada con 5% CO_2 a 37°C. La expresión de $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_{11b}\beta_3$ en los clones transfectados se confirmó por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales marcados con FITC LM609, P1F6 y A2A9/6. Las células se usaron para determinar la afinidad por $\alpha_v\beta_3$ y la reactividad cruzada con integrina $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_{11b}\beta_3$. RGDechi se ensayó para determinar su capacidad de inhibir la adhesión celular a la vitronectina o fibrinógeno inmovilizados y competir por la unión con el péptido RGD cíclico marcado con ¹²⁵I. Otros péptidos cíclicos, tales como c(RGDfV) y su variante c(RGDyV), así como también la secuencia específica de RGDechi, se usaron para la comparación.

20 Los ensayos de adhesión celular se realizaron como se describió previamente (Chiaradonna, F.; y otros EMBO J. 1999, 18, 3013-3023). En resumen, las placas de 24 pocillos de fondo plano se incubaron durante la noche con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitronectina. Las placas pre-recubiertas se lavaron con PBS, se incubaron durante 1 h a 23 °C con 1% de albúmina sérica bovina desnaturalizada por calor, y se lavaron nuevamente. Después, las células K562 que sobreexpresan $\alpha_v\beta_3$ se incubaron con varias concentraciones de péptidos RGD cíclicos o diluyentes durante 1 h a 4 °C. Las células tratadas con péptido (0.2-0.5 x 106/100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) se sembraron en placas pre-recubiertas y se dejaron adherir durante 1 hora a 37 °C en 5% de CO_2 . Las células no adherentes se eliminaron con un lavado suave, mientras que las células adherentes se desprendieron mediante tratamiento con tripsina y se contaron. Tres ensayos de adhesión diferentes se realizaron por duplicado. Los resultados de cada ensayo se analizaron por GraphPad Prism Software Inc, San Diego, CA, usando el método de regresión no lineal de mínimos cuadrados, para estimar los valores de IC₅₀ de cada péptido.

30 Para ensayar la selectividad del nuevo péptido, las células K562 que sobreexpresan $\alpha_v\beta_5$ o $\alpha_v\beta_3$ se incubaron con concentraciones crecientes de c(RGDfV) o RGDechi y la adhesión celular se determinó como se describió anteriormente usando vitronectina o fibrinógeno como se indicó.

35 El péptido c(RGDyV) se marcó con ¹²⁵I usando el método de Iodo-Gen como se describió previamente (Del Vecchio, S. y otros. Cancer Res. 1993, 53, 3198-3206). En resumen, 100 μg de péptido reaccionaron con 500 μCi de Na ¹²⁵I y 12 μg de Iodo-Gen. Después de 15 min la reacción se detuvo mediante la adición de 1 μmol de N-acetiltilosina. El péptido radiomarcado se purificó por yoduro no unido mediante cromatografía de exclusión por tamaño en poliacrilamida (Felding-Habermann, B. Pathophysiol. Haemost Thromb. 2003, 33 Supl 1, -58). El producto radiomarcado contenía menos de 3% de yoduro libre según lo evaluado por HPLC. Las células (1×10^6) se incubaron después con c(RGDyV) marcado con ¹²⁵I en presencia o ausencia de un gran exceso de competidores no marcados durante 1 h a 4°C. Después de un extenso lavado, la radiactividad asociada a las células se determinó por el contador γ .

40 Todos los péptidos sintetizados se ensayaron para su capacidad de inhibir la adhesión celular a la vitronectina. Las células de eritroleucemia humana K562 que sobreexpresan $\alpha_v\beta_3$ ($K\alpha_v\beta_3$) se incubaron con concentraciones crecientes del péptido ensayado y después se les permitió adherirse a las placas revestidas con vitronectina. Ambos c(RGDfV) (Sulyok, G.A.; y otros J. Med. Chem. 2001, 44, 1938-1950; Dechantsreiter, M.A.; y otros J. Med. Chem. 1999, 42, 3033-3040), un análogo de c(RGDf[NMe]V) con una actividad biológica comparable, y RGDechi fueron capaces de inhibir la adhesión de las células $K\alpha_v\beta_3$ a la vitronectina. La figura 2 muestra las curvas de inhibición representativas obtenidas

5 mediante la incubación de $K\alpha_v\beta_3$ con c(RGDfV) y RGDechi, respectivamente. El valor de IC_{50} para c(RGDfV) osciló entre 0.64 μ M y 3.48 μ M, mientras que el IC_{50} de RGDechi osciló entre 0.79 μ M y 7.59 μ M. Se ensayaron fragmentos RGDechi para determinar su capacidad de inhibir la adhesión celular de $K\alpha_v\beta_3$. La incubación con 10 μ M de secuencias de aminoácidos seleccionadas, tales como echi11-19, echi6-19 y echiL, no inhibió la adhesión celular, que se mantuvo en 97.5%, 99.0%, y 89.5% en comparación con células control sin tratar.

10 Para ensayar la selectividad de la unión del nuevo péptido RGDechi, las células que sobreexpresan $\alpha_v\beta_5$ ($K\alpha_v\beta_5$) se usaron en el ensayo de adhesión. En la Figura 3A se reportan curvas de inhibición representativas. Aunque c(RGDfV) fue capaz de inhibir de manera eficiente la adhesión de las células a la vitronectina, RGDechi no mostró ningún efecto inhibitor significativo sobre la adhesión celular de $K\alpha_v\beta_5$, lo que indica la falta de reactividad cruzada con $\alpha_v\beta_5$. En experimentos paralelos, las células que sobreexpresan, $\alpha_{11b}\beta_3$ se pre-incubaron con el anticuerpo monoclonal LM609 y después se les permitió adherirse al fibrinógeno en la presencia o ausencia del péptido seleccionado. La figura 3B muestra que, si bien c(RGDfV) fue capaz de inhibir eficazmente la adhesión de las células al fibrinógeno, RGDechi no mostró ningún efecto inhibitor significativo sobre las células que sobreexpresan $\alpha_{11b}\beta_3$.

15 Se obtuvieron resultados consistentes a partir de los experimentos de unión competitiva que indican que el nuevo péptido RGDechi compite eficazmente con un análogo de c(RGDf[NMe] V) marcado con ^{125}I [c(RGDyV)] por la unión a las células que sobreexpresan $\alpha_v\beta_3$ y no a clones que sobreexpresan $\alpha_v\beta_5$.

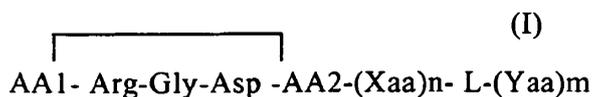
20 En conclusión, los resultados anteriores muestran que el péptido quimérico RGDechi es un ligando novedoso y selectivo para la integrina $\alpha_v\beta_3$.

25

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antagonista de la integrina $\alpha_v\beta_3$, que muestra una afinidad selectiva para la integrina $\alpha_v\beta_3$, que contiene un motivo RGD cíclico y dos restos C-terminales de equistatina covalentemente unidos por una secuencia espaciadora.

5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente fórmula (I):



en donde:

10 AA1 es un aminoácido alfa que contiene al menos tres grupos funcionales, seleccionados en el grupo de Cys, Asp, Glu, Lys, Orn, Pen, Dab o Dap;

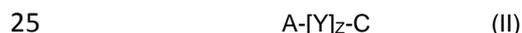
AA2 es un aminoácido alfa que contiene al menos tres grupos funcionales, seleccionados en el grupo de Cys, Asp, Glu, Lys, Orn, Pen, Dab o Dap;

15 L es una secuencia enlazadora que consiste en un número de residuos de aminoácido comprendido entre 0 y 2, tal como la secuencia PG;

(Xaa)n es una secuencia de aminoácido en la cual n está en el intervalo de 1 a 3, cuya secuencia **corresponde a la secuencia 28-30 de Equistatina: MDD, y secuencias homólogas derivadas de las sustituciones conservativas de aminoácidos.**

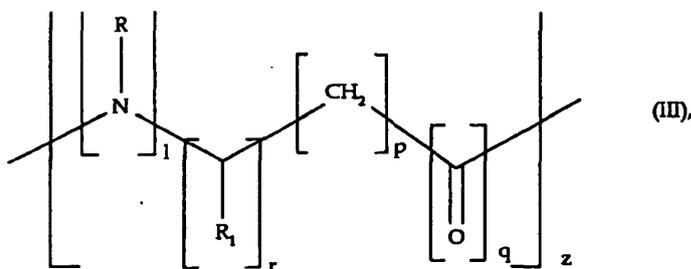
20 (Yaa)m es una secuencia de aminoácido en la m está en el intervalo de 2 a 9, **cuya secuencia corresponde al C-terminal (41-49) de Equistatina: RNPHKGPAT, y secuencias homólogas derivadas de las sustituciones conservativas de aminoácidos.**

3. Un compuesto de la fórmula (II)



en donde A es un péptido de fórmula general (I); z es un entero de 0 a 5; Y es una cadena espaciadora respectivamente unida a una de las funcionalidades presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos individuales presentes en el péptido A, o a un grupo N-terminal (-NH₂) o un grupo C-terminal (-CO₂H) de A, y a C; cuando z es un entero entre 2 y 5, las unidades Y pueden ser iguales o diferentes entre sí;

Y que tiene la siguiente fórmula (III):



en donde:

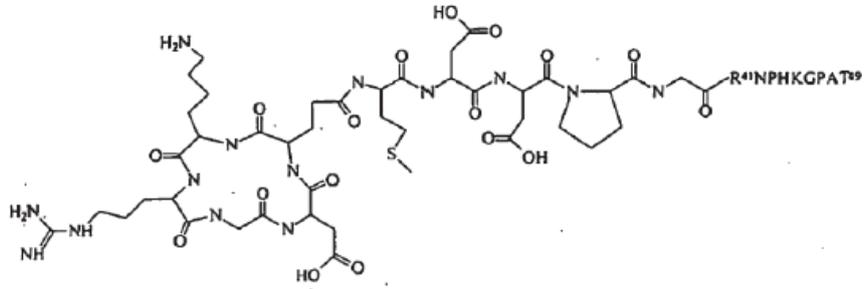
r, l, y q son cada uno independientemente 0 o 1, y p es independientemente un entero de 0 a 10, siempre que al menos uno de l, r y q sean diferente de cero;

R es hidrógeno;

R1 es hidrógeno o metilo;

- 5 C es un agente quelante, covalentemente unido al espaciador Y o directamente al péptido A, o a más de una de las unidades de aminoácido del péptido A, que es capaz de acomplejar un metal paramagnético o un radioisótopo o un radiotrazador.
4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista $\alpha_v\beta_3$ de las reivindicaciones 1-3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. Un compuesto antagonista de $\alpha_v\beta_3$ integrina de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 para usar como medicamento.
6. Un compuesto antagonista de $\alpha_v\beta_3$ integrina de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 para usar en el tratamiento de las patologías relacionadas con la angiogénesis y metástasis seleccionado del grupo que consiste de cáncer de mamas, tumores musculoesqueléticos, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma humano, cáncer cervical, restenosis vascular, osteoporosis, artritis reumatoide.
- 15 7. Un kit diagnóstico o trazador que comprende el antagonista $\alpha_v\beta_3$ de las reivindicaciones 1-3 para la detección temprana en plasma o diagnóstico por MRI o medicina nuclear del cáncer de mamas, tumores musculoesqueléticos, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma humano, cáncer cervical, restenosis vascular, osteoporosis, artritis reumatoide.

20



echiL ¹KRGDeMDDPGRNPHKGPAT¹⁹

echi6-19 M⁶DDPGRNPHKGPAT¹⁹

echi11-19 ¹¹RNPHKGPAT¹⁹

Figura 1

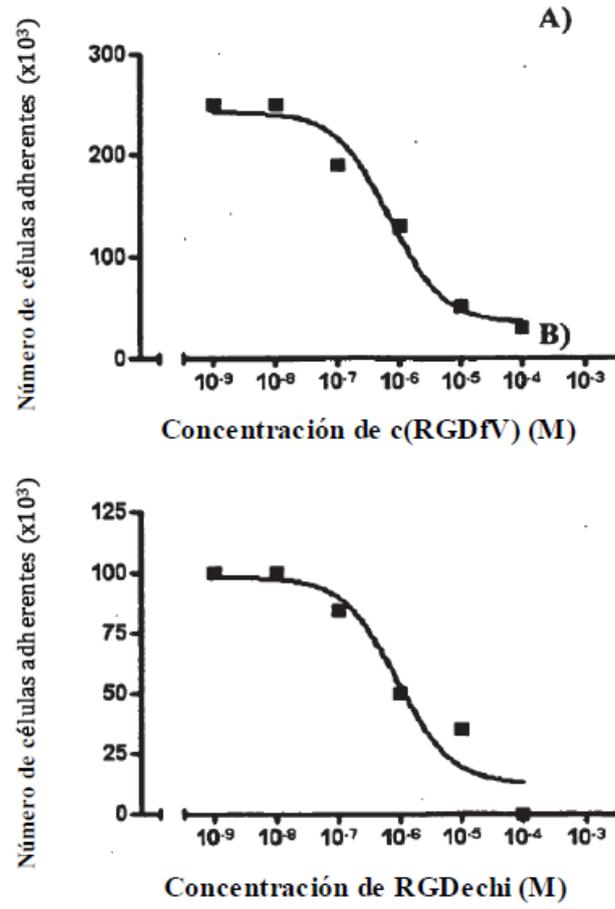


Figura 2

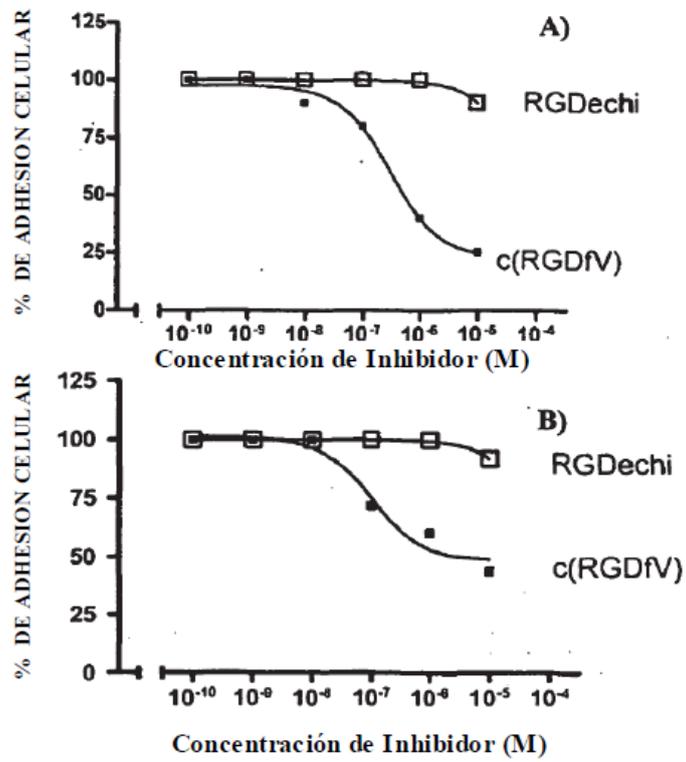


Figura 3