

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 954**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 7/23** (2006.01)

**A61K 38/09** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2007 E 07722808 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1991561**

54 Título: **Péptidos multiméricos ramificados para diagnóstico y terapia de tumores**

30 Prioridad:

**14.02.2006 US 773693 P**

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

**07.09.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA (100.0%)  
55, VIA BANCHI DI SOTTO  
I-53100 SIENA, IT**

72 Inventor/es:

**BRACCI, LUISA;  
FALCIANI, CHIARA;  
PINI, ALESSANDRO y  
FABBRINI, MONICA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 544 954 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Péptidos multiméricos ramificados para diagnóstico y terapia de tumores

5 La presente invención se refiere a péptidos ramificados estables in vivo, en particular derivados de la secuencia de Neurotensina (NT), conjugados con unidades funcionales para abordar específicamente células cancerosas, para diagnóstico o terapia de tumores que expresan NT.

**Técnica antecedente**

10 Uno de los problemas principales en quimioterapia clásica es la toxicidad no específica de la mayoría de los agentes anticancerosos contra células normales. El abordaje específico de tumores ha sido el desafío principal en las investigaciones en terapia y diagnóstico de cánceres.

15 Actualmente, las terapias innovadoras específicas de tumor siguen la estrategia de abordar proteínas asociadas a tumor, específicamente expresadas o sobreexpresadas en células tumorales.

20 La observación de que receptores para diferentes péptidos reguladores endógenos se expresan en varios cánceres humanos primarios, abrió nuevas perspectivas sobre el uso de péptidos sintéticos para abordaje selectivo de tumor<sup>1-3</sup>.

25 La Neurotensina (NT) es un péptido de 13 aminoácidos (QLYENKPRRPYIL) originalmente aislado de hipotálamo de ternera<sup>6</sup>. Tiene la doble función de neurotransmisor o neuromodulador en el sistema nervioso y hormona local en la periferia. Los receptores de NT se sobreexpresan en varias neoplasias como cáncer pulmonar microcítico, carcinomas de colon, pancreático y de próstata. Se han propuesto análogos estabilizados por NT para terapia tumoral desde hace varios años<sup>4-10</sup> y la NT aún se considera el mejor candidato posible para terapia basada en péptidos de carcinomas pancreáticos exocrinos<sup>11</sup> en consideración de la alta incidencia y densidad de receptores de NT en estos tumores. Más del 75 % de todos los carcinomas pancreáticos ductales sobreexpresan receptores de NT, mientras que el tejido normal del páncreas, el páncreas con pancreatitis y el páncreas endocrino no<sup>12</sup>.

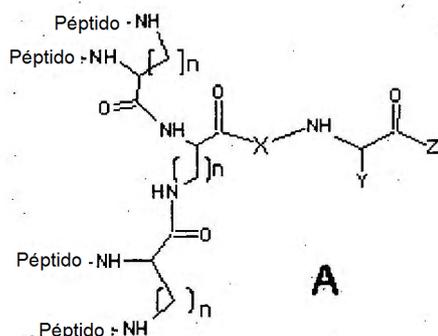
30 La presencia de receptores específicos sobre membranas de diversas células tumorales hace que los análogos de NT sean excelentes elecciones como moléculas de vehículo. El abordaje de receptores tumorales es fundamental para enfocar el problema de toxicidad no específica de quimioterapias contra el cáncer y es una herramienta valiosa para localización de tumores por radioisótopos. No obstante, el uso de péptidos *in vivo* ha estado muy limitado por su corta semivida.

35 Los inventores demostraron previamente que la síntesis de péptidos en forma multimérica ramificada produce moléculas que pueden retener actividad biológica peptídica y son muy resistentes a la actividad proteolítica de los fluidos biológicos, teniendo por tanto una semivida marcadamente mayor respecto a los péptidos monoméricos correspondientes<sup>14</sup>.

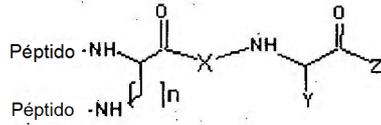
40 La presente invención se refiere a péptidos multiméricos estables in vivo derivados de NT conjugados a unidades funcionales para el abordaje específico de células cancerosas, para diagnóstico o terapia de tumores que expresan NT.

**Descripción de la invención**

45 Un objeto de la presente invención es un péptido multimérico que tiene la fórmula general A o B.

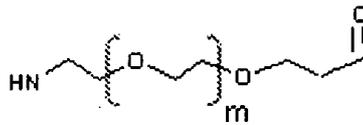


50 o

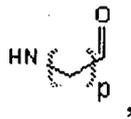


**B**

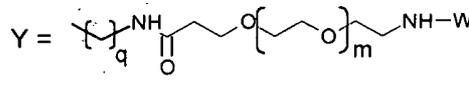
5 en la que  
 $n = 1$  a  $5$ ,  
 $X =$



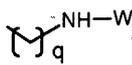
10 en la que  $m = 1$  a  $27$ ,  
o



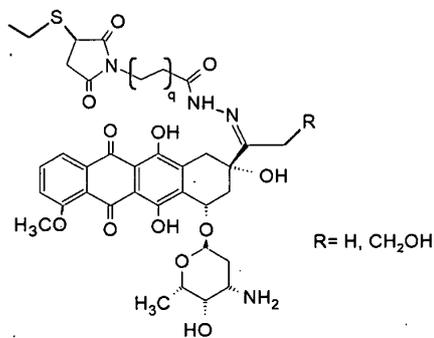
15 en la que  $p = 1$  a  $5$ ,



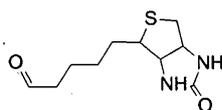
20 en la que  $m = 1-27$  y  $q = 1$  a  $5$ ,  
o



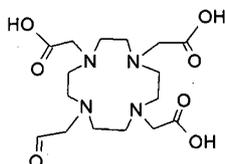
25 en la que  $q = 1$  a  $5$ ,  
o



30 en la que  $q = 1$  a  $5$   
 $W =$

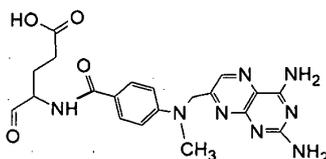


o



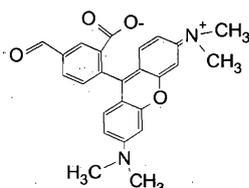
5

o



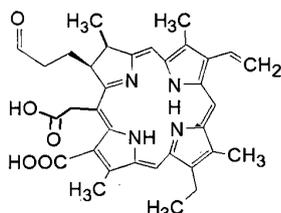
10

o



15

o



20

y Z = NH<sub>2</sub> u OH,

en las que cada péptido tiene esencialmente una secuencia derivada de Neurotensina (NT), para su uso como agente antitumoral.

25

Preferiblemente, el péptido multimérico es para uso como agente antitumoral, en el que cada péptido que tiene una secuencia derivada de Neurotensina (NT) tiene esencialmente la siguiente secuencia de aminoácidos: QLYENKPRRPYIL o RRPYIL. En una realización preferida, el péptido multimérico para su uso como agente antitumoral está conjugado con una unidad funcional.

30

Un objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el péptido multimérico, o una sal farmacéuticamente aceptable y eficaz del mismo y diluyentes, y/o disolventes y/o vehículos y/o excipientes.

35

Un objetivo de la presente invención es el uso del péptido multimérico para diagnóstico de tumores, preferiblemente para tumores que expresan neurotensina.

Un objetivo de la presente invención es un método para diagnosticar in vitro un tumor en una muestra que comprende las etapas de:

- a) incubar la muestra con el péptido multimérico en condiciones apropiadas para permitir la unión específica del péptido a la muestra, y
- b) detectar el péptido unido.

Preferiblemente el tumor expresa receptores de neurotensina, más preferiblemente el tumor es un carcinoma pulmonar microcítico, de colon, pancreático, de próstata, de endometrio u ovario, o un cáncer de mama.

La invención se describirá ahora por ejemplos no limitantes que se refieren a las siguientes figuras:

5 **Figura 1.** Estructura de **1**: NT(8-13)<sub>4</sub> tetramérico-PEG-Biotina (NT4(8-13)-Bio) y **2**: NT(8-13)<sub>4</sub> tetramérico-PEG-Tetrametil rodamina (NT4(8-13)-TMR).

**Figura 2.** Síntesis de **3**: NT(8-13)<sub>4</sub> tetrarramificado-PEG-Cloro e6 (NT4(8-13)-Che6) y **4**: NT(8-13)<sub>4</sub>tetrarramificado-PEG-Metotrexato (NT4(8-13)-MTX).

10 **Figura 3.** Unión e internalización en la célula del péptido NT4(8-13). Imágenes de microscopia confocal de células HT29 incubadas con NT4(8-13)-TMR (5 µg/ml en PBS-BSA al 1 %) durante 1 h a 4°C para permitir la unión del péptido, lavadas y después incubadas a 37°C con medio previamente calentado durante 0 h (panel A, NT4(8-13)-TMR está sobre la superficie de la membrana, véase la flecha), 2 h (panel B, NT4(8-13)-TMR está sobre la superficie de la membrana o dentro de la célula, véanse las flechas), 4h (panel C, NT4(8-13)-TMR está solamente dentro de la célula, véase la flecha) y 18 horas (panel D, sin señal de NT4(8-13)-TMR). Después de fijar con formalina al 4 %, la membrana plasmática se tiñó de verde con concanavalina A-biotina y avidina-FITC. Se realizaron experimentos similares incubando células HT29 con NT4(8-13) mezclado-TMR (panel E, sin señal de rodamina) y células HaCat con NT4(8-13)-TMR (panel F, sin señal de rodamina) durante 1h a 4°C.

15 **Figura 4.** Localización lisosómica de NT4(8-13)-TMR. Se incubaron células HT29 con NT4(8-13)-TMR en condiciones de internalización (incubación de 1 h a 4°C con NT4(8-13)-TMR seguida por incubación durante 4 en DMEM a 37°C) y después se trataron con lysotracker verde para teñir los lisosomas. El panel A muestra el lysotracker verde, el panel B muestra la señal roja del péptido y el panel C muestra su colocalización que da una señal amarilla (véanse las flechas).

20 **Figura 5.** Unión de NT4(8-13) a biopsias tumorales de colon y páncreas. Imágenes de microscopia confocal de (A) secciones de carcinoma de colon humano, (B) colon sano, (C) carcinoma pancreático y (D) páncreas sano. Después de fijar con paraformaldehído al 4 % y saturación con FCS, las secciones se incubaron con NT4(8-13)-biotina (0,5 µg/ml en PBS-BSA al 3 %) durante 30' a 37°C, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con avidina-FITC (0,5 µg/ml en PBS-BSA al 3 %) durante 30' a temperatura ambiente.

25 **Figura 7.** Regeneración de NTR. (A) Primero se incubaron células HT29 con NT4(8-13)-TMR (100 µg/ml) durante 1 h a 4°C y después, tras lavar, con NT4(8-13)-Bio seguido por avidina-FITC, solamente es visible tinción roja de NT4(8-13)-TMR. (B) Se incubaron células HT29 con NT4(8-13)-TMR como en (A), lavadas, mantenidas durante 18 h a 37°C en medio de cultivo y tratadas con NT4(8-13)-Bio y avidina-FITC. La punta de la flecha indica la localización en rojo de NT4(8-13)-TMR, la flecha completa indica la señal verde de NT4(8-13)-Bio-avidina FITC.

30 **Figura 8.** Citotoxicidad de NT4(8-13)-Che6. Se sembraron células HT29 en una microplaca de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en la oscuridad durante 4 horas con diferentes concentraciones de NT4(8-13)-Che6 (●), NT4(8-13) mezclado-Che6 (A) y Che6 libre (■). Las células después se lavaron para eliminar el conjugado no unido y se irradiaron (excepto para controles de oscuridad) con una dosis total de luz 3 J/cm<sup>2</sup>. Se evaluó la fototoxicidad del fármaco midiendo la supervivencia celular, usando el ensayo de MTT 24 horas después de la irradiación. Los controles negativos (-) incluyeron células HT29 incubadas con el conjugado y no irradiadas, células irradiadas y no incubadas y células no tratadas.

35 **Figura 9.** Actividad citostática de NT4(8-13)-MTX. Se sembraron células HT29 en una microplaca de 96 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de NT4(8-13)-MTX (▲), NT4(8-13) mezclado-MTX (■) y MTX (●). Se ensayó la inhibición del crecimiento celular por un ensayo de MTT después de 72 horas de incubación.

40 **Figura 10.** Retardo del crecimiento tumoral *in vivo* mediado por NT4(8-13)-MTX. Se dividieron aleatoriamente ratones que albergaban tumores HT29 en cuatro grupos y se les inyectó i.v. en el día 0, 5, 10 y 15 con 500 µg de NT4(8-13)-MTX, 500 µg de NT4(8-13) mezclado-MTX, 40 µg MTX libre y PBS solo. Cinco días después de la última inyección, se sacrificó a los animales y se retiraron y pesaron los tumores.

## Ejemplos

### Síntesis de péptidos

50 Se sintetizaron NT(8-13)<sub>4</sub> tetramérico-PEG-Biotina [NT4(8-13)-Bio] **1** y NT(8-13)<sub>4</sub> tetramérico-PEG-Tetrametil rodamina [NT4(8-13)-TMR] **2** (Fig. 1) usando la estrategia Fmoc con Fmoc-Lys(Biotina)-OH (Novabiochem, Cat. Nº 04-12-1237) y Fmoc-Lys(TMR)-OH (Molecular Probes, Cat. Nº F11830), respectivamente, como primera etapa de acoplamiento y Fmoc-PEG-OH (Novabiochem, Cat. Nº 01-63-0109) como segunda etapa de acoplamiento. Se usó Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (Novabiochem, Cat. Nº 04-12-1085) para construir el núcleo ramificado de tres lisinas y se realizó elongación automatizada por etapas C-terminal del siguiente modo. Se añadió una mezcla de 5 equivalentes de aminoácido protegido con N-(9-fluorenil)metoxicarbonilo (Fmoc), 5 equivalentes de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) (Novabiochem, Cat. Nº 01-62-0010) disuelto en DMF, y 10 equivalentes de N,N-diisopropiltilamina (DIPEA) (Aldrich, Cat. Nº 387649) a las perlas de resina. La reacción se realizó automáticamente a temperatura ambiente durante 40 minutos y se repitió dos veces la etapa de acoplamiento. Se usó un enfoque similar para sintetizar NT(8-13)<sub>4</sub> tetrarramificado-PEG-Cloro e6 [NT4(8-13)-Che6] **3** y NT(8-13)<sub>4</sub> tetrarramificado-PEG-Metotrexato [NT4(8-13)-MTX] **4**, pero el grupo amino de la cadena lateral para el acoplamiento de la unidad funcional se hizo más accesible por estiramiento con Fmoc-PEG-OH. Por tanto, se sintetizaron NT4(8-13)-Che6 y NT4(8-13)-MTX usando Fmoc-Lys(Dde)-OH (Novabiochem, Cat. Nº 04-12-1121)

como primero y  $\beta$ -Ala como segundo aminoácido en resina Novasyn TGR (Novabiochem, Cat. N° 01-64-0060). Después se construyó el tetrámero como anteriormente pero usando arginina protegida con Boc en lugar de arginina protegida con Fmoc como último aminoácido de la secuencia de neurotensina, de modo que las dos últimas etapas de acoplamiento sucedieron de forma selectiva en el brazo de la cadena lateral (Fig. 2).

5

### **Unión del péptido de neurotensina a membranas de células HT29**

Se analizaron NT4(8-13), NT4(8-13)-Che6, NT4(8-13)-MTX, NT4(8-13)-Bio y NT4(8-13)-TMR para su capacidad de unirse a receptores de NT (NTR) midiendo la inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -NT (Amersham Biosciences) a membranas de células de adenocarcinoma humano HT29, que sobreexpresan NTR siguiendo el procedimiento presentado en la referencia 14. Se usó un péptido tetramérico que portaba aminoácidos de NT mezclados (LRIPRY), NT4(8-13) mezclado, como control y se permitió verificar la especificidad de secuencia. Todas las nuevas moléculas mantenían la actividad biológica en el desplazamiento de  $^{125}\text{I}$ -NT aunque con diferente CI50 con respecto al NT4(8-13) no conjugado (CI50 =  $1,9 \times 10^{-10}$  M). NT4(8-13)-Bio (CI50 =  $1 \times 10^{-10}$  M) mantuvo completamente la bioactividad del péptido no conjugado, mientras que la CI50 del péptido aumentó en NT4(8-13)-Che6 (CI50 =  $2,2 \times 10^{-6}$  M), NT4(8-13)-MTX (CI50 =  $5 \times 10^{-7}$  M) y NT4(8-13)-TMR (CI50 =  $2 \times 10^{-8}$  M). Por otro lado el análogo mezclado mostró afinidad muy baja (CI50 >  $10^{-5}$  M).

10

15

20

Estos resultados demuestran que la capacidad de unión específica de los péptidos tetrarramificados se mantiene después de acoplar su extremo C-terminal a unidades funcionales. Sin embargo, el tamaño, hidrofobicidad y carga del resto funcional junto con la presencia de moléculas espaciadoras, puede modificar la capacidad de unión del péptido.

25

### **Unión de péptidos de neurotensina e internalización en células HT29**

30

35

Se usó microscopia láser confocal para realizar ensayos de unión a receptor. Para este fin se incubaron células HT29 (línea celular de adenocarcinoma humano, Instituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italia) durante 1 hora a 4°C con NT4(8-13)-TMR (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %). Se realizaron experimentos similares incubando las mismas células con la misma concentración de péptido tetramérico mezclado de NT(8-13) acoplado con tetrametil rodamina o incubando células HaCat (línea celular de queratinocitos humanos, Instituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italia), que no expresan el NTR, con NT4(8-13)-TMR (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %). Después de fijar con formalina al 4 %, se tiñó la membrana plasmática por incubación con concanavalina A-biotina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %, Molecular Probes, Cat. N° C21420) a 4°C durante 15 min y avidina-FITC (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %, Sigma, Cat. N° S3762).

40

La señal fluorescente roja en la membrana plasmática (indicada por la flecha en la Fig.3) indica unión del péptido a receptores de membrana (Fig. 3A), mientras que la ausencia de fluorescencia roja en ambas imágenes de control (Fig. 3E-F) demostró la especificidad de unión de NT4(8-13)-TMR.

45

La internalización en la célula se analizó siguiendo la señal roja de NT4(8-13)-TMR en células HT29 en el tiempo (Figura 3A-C).

50

Las células se incubaron durante 1 h a 4 °C con NT4(8-13)-TMR (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %) para posibilitar la unión del péptido a receptores de membrana, después, tras lavar para retirar el péptido no unido, las células se mantuvieron a 37 °C durante diferentes intervalos de tiempo. A tiempo 0, la fluorescencia del péptido se localizaba exclusivamente en la membrana plasmática (Fig. 3, panel A, véase la flecha). Dos horas después el péptido estaba presente en la membrana plasmática y en el citoplasma (Figura 3, panel B, flechas), mientras que después de 4 horas de incubación, el péptido estaba completamente internalizado (Fig. 3, panel C, flecha). Finalmente, 18 horas de incubación a 37 °C condujeron a degradación completa del conjugado peptídico (Fig. 3, panel D) supuestamente debido a la acción proteolítica de enzimas lisosómicas.

55

Para verificar si NT4(8-13)-TMR tenía una localización lisosómica, se incubaron células HT29 con NT4(8-13)-TMR (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %) en condiciones de internalización (1 h de incubación a 4°C con NT4-TMR seguido por 4 horas de incubación en DMEM a 37°C) y después se trataron con lysotracker verde (Molecular Probes, Cat. N° L7526) para teñir los lisosomas. En la Fig. 4C, se observó colocalización de NT4(8-13)-TMR con lysotracker verde, es decir, la señal roja del péptido (Fig. 4A) se añade a la señal verde del lysotracker verde (Fig. 4B) dando una señal amarilla (flecha).

60

La capacidad del péptido tetrarramificado conjugado con una unidad funcional para internalizarse rápidamente en células y aún ser detectable en células después de 4 horas convierte al péptido en adecuado para aplicaciones terapéuticas de las moléculas.

### **Detección de receptores de NT en tumores humanos, usando NT4(8-13)-Bio**

65

Se recogieron tejidos tumorales y sanos de colon y páncreas de pacientes oncológicos que estaban experimentando resección tumoral. Se rebanaron tejidos incrustados en tejido congelado tek® (Sakura Finetechnical, Tokio, Japón) a

15  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato (Reichert- Jung 2800 frigocut N) y se colocaron en portaobjetos de vidrio. Se analizaron secciones en serie de la misma biopsia tanto por microscopía óptica con hematoxilina/eosina (H&E) como por microscopía confocal fluorescente. Para el análisis inmunofluorescente las secciones se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 3 % en PBS durante 15' a temperatura ambiente, se lavaron una vez y se almacenaron durante una noche a 4 °C con glicina 0,1 M en PBS. Después de saturación con suero de ternera fetal, las rebanadas se incubaron durante 30' a 37 °C con NT4(8-13)-Bio (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS-BSA al 3 %) o con el péptido ramificado no correlacionado (DDHSAV, SEC ID N° 4)4-Bio (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS-BSA al 3 %), se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con avidina-FITC (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS-BSA al 3 %) durante 15' a temperatura ambiente. Después de lavarlas, las secciones se montaron con Mowiol® (Calbiochem, Cat. N° 475904) y se sellaron con laca de uñas. Se realizaron controles negativos incubando las rebanadas (tejido tanto tumorales como normales) con avidina-FITC sin incubación previa con NT4(8-13)-Bio. La señal fluorescente se observó por microscopía láser confocal (BIO-Rad MRC600) con una luz de excitación de 488 nm.

El análisis inmunofluorescente con NT4(8-13)-Bio y avidina-FITC realizado sobre secciones congeladas de muestras de biopsia reveló una clara unión preferente del péptido a tumores de colon humano frente a tejido sano (Figura 5, A-B). Se compararon diez biopsias tumorales de colon con el correspondiente tejido normal proveniente del mismo paciente. Todas las muestras tumorales de colon se tiñeron positivamente con NT4(8-13)-Bio, mientras que solamente uno de los tejidos sanos mostró una baja señal fluorescente. Se obtuvieron resultados análogos comparando tejidos pancreáticos sanos y tumorales (Figura 5, C-D). Se realizaron experimentos adicionales incubando biopsias tumorales con el péptido no correlacionado. La ausencia de una señal fluorescente (datos no mostrados) observada con el péptido no correlacionado indicó la especificidad del péptido multimérico de neurotensina. Finalmente, un análisis por microscopía óptica comparativa de secciones en serie teñidas con H y E, reveló que el receptor de NT está presente principalmente en la mucosa degenerada de las biopsias tumorales y solamente sobre la superficie celular de células tumorales (datos no mostrados).

### **Regulación del receptor de NT**

Se estudió la regulación del receptor tras unión del péptido NT4(8-13)-TMR por microscopía láser confocal. Los receptores primero se saturaron incubando células HT29 con un gran exceso de NT4(8-13)-TMR (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 1 %) durante 1 h a 4 °C, para saturar los receptores y excluir la unión posterior de NT4(8-13)-Bio detectable con avidina-FITC. Los receptores de membrana de hecho se saturaron por NT4(8-13)-TMR, ya que la incubación posterior con NT4(8-13)-Bio (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 3 %) y avidina FITC (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS - BSA al 3 %) no produjo ninguna señal verde detectable (Fig. 7, panel A). Cuando las mismas células, tratadas con NT4(8-13)-TMR, se lavaron, se mantuvieron a 37 °C en medio de cultivo durante una noche y se trataron nuevamente con NT4(8-13)-Bio y avidina-FITC como anteriormente, los autores observaron que el receptor estaba de nuevo disponible para la unión del ligando (Fig. 7, panel B, la flecha completa indica la señal verde de NT4(8-13)-Bio-avidina-FITC y la punta de flecha la señal roja residual de NT4(8-13)-TMR). Los receptores de péptidos reguladores, que son principalmente receptores acoplados a proteína G, tienen la importante capacidad de internalizarse en células después de la unión del ligando. Esta característica es uno de los elementos que han hecho de la estrategia de proyectiles de péptido un enfoque prometedor para terapia contra tumores<sup>2, 15-19</sup>. No obstante, la regulación negativa de receptores y su eliminación de la membrana puede alterar drásticamente la eficacia de una terapia basada en péptidos.

La capacidad de los receptores de NT de volver a exponerse sobre la membrana y estar aún disponibles para la unión de péptidos hace del abordaje de tumores basado en péptidos una estrategia prometedora para diagnóstico y terapia.

### **Citotoxicidad de NT4(8-13)-Che6**

La terapia fotodinámica (PDT) es un enfoque terapéutico prometedor contra el cáncer basado en la eliminación selectiva de células malignas por oxígeno singlete,  $^1\text{O}_2$ , y otros productos reactivos generados por moléculas fotoactivadas-fotosensibilizadas (PS), que se acumulan en tejido tumoral<sup>20</sup>. El Cloro e6 (Che6) y sus derivados son sensibilizantes prometedores para PDT aunque su selectividad por células cancerosas necesita mejorarse<sup>21</sup>. También se sabe que Che6 es citotóxico para la mayoría de las células cuando se irradia a la longitud de onda apropiada<sup>20</sup>. Su hidrofobicidad posibilita su internalización no específica en la célula, causando toxicidad celular.

Para evaluar la fototoxicidad del conjugado NT4(8-13)-Che6, se realizaron experimentos de fotoeliminación sobre células HT29. Se sembraron células HT29 ( $2 \times 10^4$ /pocillo) en microplacas de 96 pocillos. Después de cultivar durante 2 días, las células se incubaron a 37 °C en la oscuridad con diferentes concentraciones de NT4-Che6 (de 100  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$  en RPMI con FCS al 10 %) durante 4 horas. Las células después se lavaron para eliminar el conjugado no unido y se irradiaron (excepto los controles de oscuridad) con una lámpara alógena de tungsteno Zeiss KL1500 (Zeiss, Jena, Alemania) equipada con un filtro paso banda 600-800 nm (Corion, Franklin, MA) y con dos fibras ópticas colocadas a 1 cm del pocillo. La placa se colocó de nuevo en la incubadora durante una noche y se controló la fototoxicidad del conjugado en un ensayo de MTT. Se realizaron experimentos similares con NT4(8-13) mezclado-Che6 [(LRIPRY)4-Che6] y con Che6 libre. Controles adicionales incluyeron células HT29 incubadas con el conjugado y no irradiadas, células irradiadas y no incubadas y células no tratadas.

Como se muestra en la Fig. 8, Che6 mantenía su citotoxicidad después de conjugación con NT(8-13) tetramérica. La ausencia de actividad del análogo mezclado indica que el péptido conjugado de NT(8-13) tetramérico adquiría selectividad y especificidad con respecto a Che6 libre. Se ha demostrado que la conjugación con péptidos ramificados evita la difusión de Che6 a través de membranas celulares. En la presente invención los autores demuestran que el péptido conjugado de NT(8-13) tetramérico permite la internalización en células de Che6 a través de endocitosis mediada por el receptor de NT, proporcionando Che6 citotoxicidad específica celular.

#### **Actividad citostática de NT4(8-13)-MTX**

El metotrexato como antagonista de folato es eficaz en muchas neoplasias ya que inhibe la dihidrofolato reductasa. Esto causa una ausencia de sustratos folato reducidos, alterando por lo tanto la síntesis de nucleótidos de purina, timidilato, y ciertos aminoácidos, que finalmente puede conducir a muerte celular. El uso clínico de este fármaco está limitado por sus efectos secundarios tóxicos relacionados con la dosis. Además, a menudo se desarrolla resistencia a metotrexato por diversos mecanismos, incluyendo transporte disminuido en membrana mediado por vehículo folato<sup>22</sup>.

Para evaluar la actividad citostática de NT4(8-13)-MTX, se realizaron experimentos in vitro usando células HT29 (Fig. 9) y experimentos in vivo usando tumores HT29 injertados en ratones desnudos (Fig. 10).

#### Experimentos citostáticos de NT4(8-13)-MTX in vitro

Se sembraron células HT29 en alícuotas de 0,2 ml a una densidad de  $5 \times 10^3$  en una microplaca de 96 pocillos. Se añadieron diferentes concentraciones de NT4-MTX 24 horas después de la siembra en placa. Se evaluó la inhibición del crecimiento por ensayo de MTT 6 días después. Se realizaron los mismos experimentos con el análogo mezclado del conjugado y con MTX libre.

Se realizaron los mismos experimentos con el análogo mezclado [(LRIPRY)4-MTX] y con MTX no conjugado. También se ensayaron SW620 (línea celular de carcinoma humano de colon que expresa NTR, Instituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italia) y HCT116 (línea celular de carcinoma humano de colon que expresa NTR, Instituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italia) con el mismo procedimiento.

La Fig. 9 muestra que MTX conjugado era activo solamente cuando el conjugado es un péptido tetramérico de NT. De hecho, el análogo mezcla conjugado con MTX no tenía ninguna actividad citostática. Este resultado demostró claramente que la capacidad de direccionamiento del péptido NT es necesaria para conseguir la eficacia terapéutica de MTX conjugado. Por tanto, puede ser cierto lo mismo para la especificidad adquirida de toxicidad de MTX, una vez unido a un vehículo peptídico específico, como para la citotoxicidad de Che6. La conjugación de estos restos tóxicos con moléculas peptídicas ramificadas los convierte en compuestos tipo pro-fármaco, que ya no pueden transportarse a través de las membranas plasmáticas por los mecanismos de los correspondientes fármacos libres y solamente pueden "activarse" mediante unión péptido-receptor que media su translocación específica dentro de la célula. Esta característica disminuye profundamente la toxicidad no específica del fármaco. Además, el transporte mediado por receptor del péptido a través de la membrana celular diana, puede ayudar a esquivar los mecanismos de resistencia a fármacos basados en transportadores de membrana específicos, como los de MTX. Se obtuvieron los mismos resultados en las líneas celulares SW620 y HCT116 (no mostrados).

#### Experimentos in vivo

Se inyectó a ratones hembra desnudos CD-1 (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, MA) de 6-7 semanas de edad (peso medio de 25 g), por vía subcutánea en el costado derecho  $2 \times 10^6$  células HT29. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 4-5 mm, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos (al menos 4 ratones/grupo) y se les inyectó repetidamente i.v. (en los días 0, 5, 10 y 15) 500  $\mu$ l de las siguientes soluciones:

- grupo I: 1 mg/ml de NT4-MTX (4,05  $\mu$ mol/kg) en PBS;
- grupo II: 1 mg/ml de mezcla (LRIPRY)4-MTX (4,05  $\mu$ mol/kg) en PBS, control;
- grupo III: 72 mg/ml de MTX libre (4,05  $\mu$ mol/kg), control;
- grupo IV: PBS, control.

Se midieron los volúmenes tumorales diariamente con un calibre usando la siguiente fórmula: Volumen = longitud x anchura<sup>2</sup> x  $\pi/6$ . Los volúmenes tumorales para cada grupo se combinaron para representar curvas de crecimiento tumoral medio. Al final del experimento, se sacrificó a los ratones. Los tumores se retiraron y pesaron y se compararon los pesos entre ratones tratados y de control. NT4(8-13)-MTX evitó el crecimiento del tumor en comparación con todos los ratones de control (Fig. 10). La reducción fue evidente tan pronto como después de la primera inyección y el volumen de los tumores para animales tratados con NT4(8-13)-MTX permaneció en aproximadamente un tercio el de los tumores de ratones inyectados con PBS, sobre el tratamiento completo. Se encontró una ligera disminución en el crecimiento del tumor en animales tratados con MTX solamente así como en ratones tratados con NT4(8-13) mezclado-MTX. El peso del tumor, medido al final del experimento, fue casi el mismo en los tres grupos de control (PBS, NT4(8-13) mezclado-MTX, MTX solo) y se redujo significativamente en el

grupo tratado con NT4(8-13)-MTX (Fig. 10). Estos resultados demuestran que la acción específica de la molécula NT4(8-13)-MTX mostrada *in vitro* se confirma *in vivo*.

5 Además, los animales tratados con NT4(8-13)-MTX pierden menos del 10 % del peso corporal y no se observó ninguna muerte de ratones en dicho grupo, excluyendo citotoxicidad de NT4(8-13)-MTX a la dosis administrada.

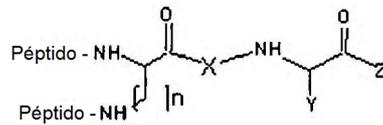
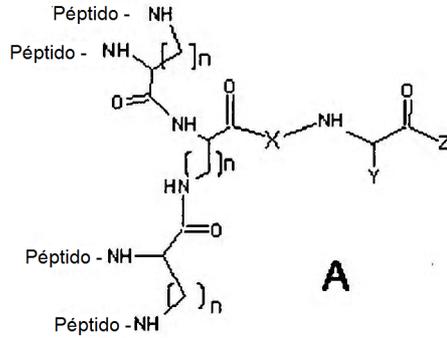
10 Debe apreciarse que NT4(8-13)-MTX, NT4(8-13) mezclado-MTX y MTX se inyectaron a la misma concentración molar. La concentración administrada representa una dosis de MTX que era aproximadamente una décima parte de la dosis habitualmente usada para el tratamiento de xenoinjertos de tumores en ratones desnudos<sup>23</sup>, lo que sugiere una potencia aumentada de la molécula NT4(8-13)-MTX.

### Bibliografía

- 15 1. Reubi JC. J Nucl Med. 1995; 36(10): 1825-35.
2. Reubi JC. Endocr Rev. 2003; 24(4): 389-427.
3. Langer M y Beck-Sickingher AG. Curr Med Chem Anti-Canc Agents. 2001; 1(1): 71-93.
4. Garcia-Garayoa E et al., Nucl Med Biol. 2001; 28(1): 75-84.
5. Hillairet De Boisferon M et al., Bioconjug Chem. 2002; 13(3): 654-62.
- 20 6. Achilefu S et al., JMed Chem. 2003; 46(15): 3403-11.
7. Bergmann R et al., Nucl Med Biol. 2002; 29(1): 61-72.
8. de Visser M et al., Eur JNucl Med Mol Imaging. 2003; 30(8): 1134-9.
9. Buchegger F et al., JNucl Med. 2003; 44(10): 1649-54.
10. Morinville A et al., IntJBiochem Cell Biol. 2004; 36(11): 2153-68.
11. Reubi JC, Mäcke HR, Krenning EP. JNucl Med. 2005; 46: 67S-75S
- 25 12. Reubi JC, Waser B, Friess H, Buchler M, Laissue J. Gut. 1998; 42(4):546- 550
13. Nagy AN, Schally AV. Biol Rep 2005; 73: 851-859
14. Bracci L et al., J Biol Chem. 2003; 278(47): 46590-5.
15. Nouel D et al., J Neurosci. 1997; 17(5): 1795-803.
16. Mantyh PW et al., Science. 1995; 268: 1629-32.
- 30 17. Roettger BF et al., J Cell Biol. 1995; 128: 1029-41.
18. Mazella J et al., Brain Res. 1991; 564(2): 249-55.
19. Ottaway CA. Regul Pept. 1992; 41(1): 49-59.
20. Yarmush ML et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1993; 10(3): 197-252.
21. Hamblin MR et al., Cancer Res. 2001; 61(19): 7155-62.
- 35 22. Zhao R, Goldman ID. Oncogene. 2003; 22(47): 7431-57.
23. Wosikowski K et al., Clin Cancer Res. 2003; 9(5): 1917-26.

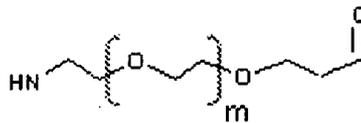
REIVINDICACIONES

1. Un péptido multimérico que tiene las fórmulas generales A o B:

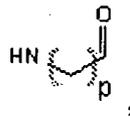


**B**

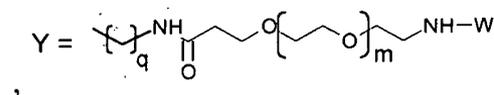
10 en las que  
n = 1 a 5,  
X =



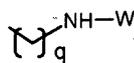
15 en la que m = 1 a 27,  
o



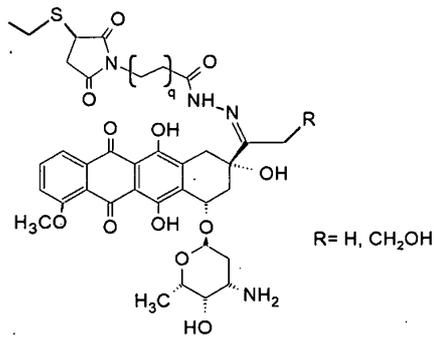
20 en la que p = 1 a 5,



25 en la que m = 1-27 y q = 1 a 5,  
o

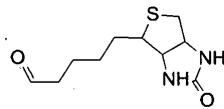


30 en la que q = 1 a 5,  
o

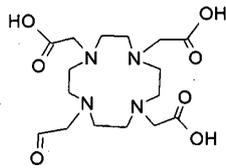


en la que q = 1 a 5  
W =

5

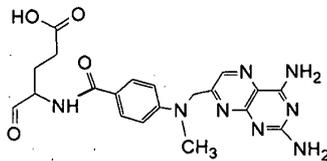


o



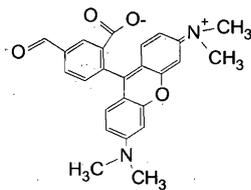
10

o



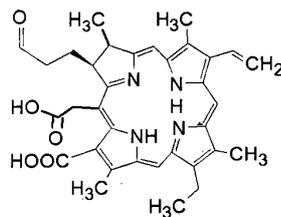
15

o



20

o



y Z = NH<sub>2</sub> u OH,

25 en las que cada péptido tiene una secuencia derivada de Neurotensina (NT), para su uso como agente antitumoral.

2. El péptido multimérico de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como agente antitumoral, en donde cada péptido que tiene una secuencia derivada de Neurotensina (NT) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

QLYENKPRRPYIL o RRPYIL.

- 5 3. El péptido multimérico de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso como agente antitumoral que está conjugado con una unidad funcional.
- 5 4. Composición farmacéutica que comprende el péptido multimérico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable y eficaz del mismo y diluyentes, y/o disolventes y/o vehículos y/o excipientes.
- 10 5. Uso del péptido multimérico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para diagnóstico de tumores.
- 10 6. Método para diagnosticar in vitro un tumor en una muestra, que comprende las etapas de:
- 15 a) incubar la muestra con el péptido multimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones apropiadas para permitir la unión específica del péptido a la muestra, y
- 15 b) detectar el péptido unido.

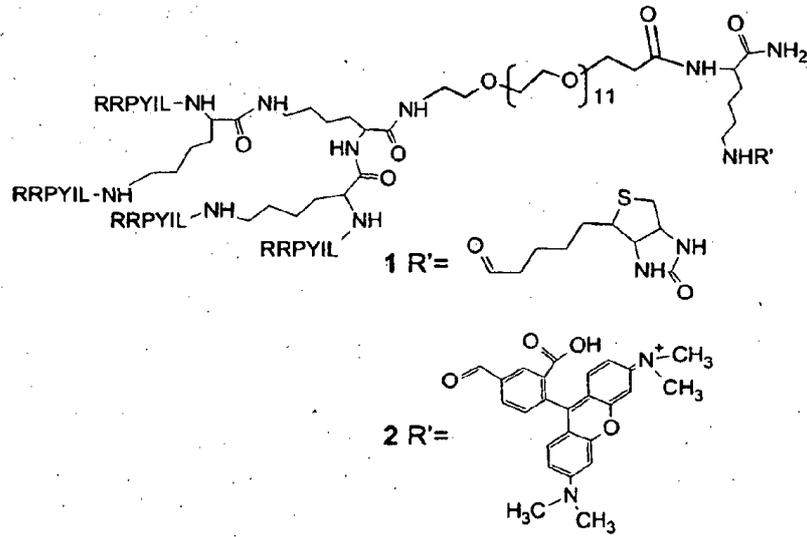


Fig. 1

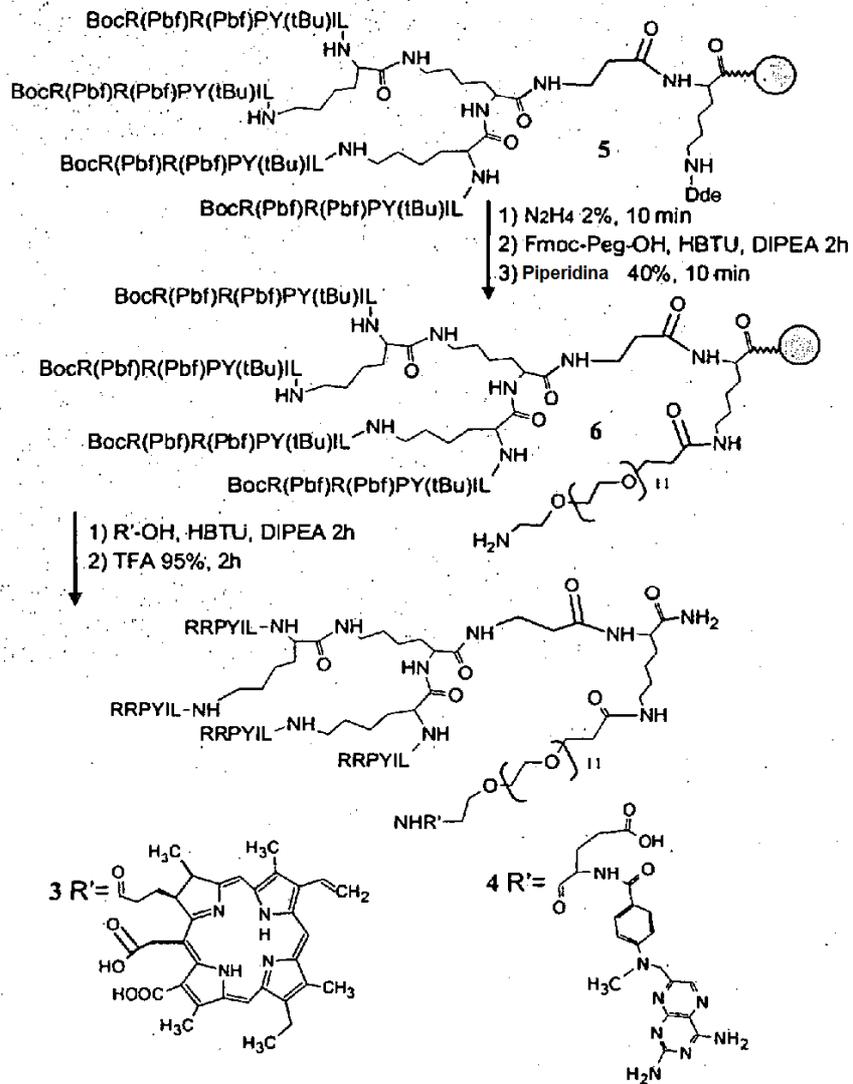


Fig. 2

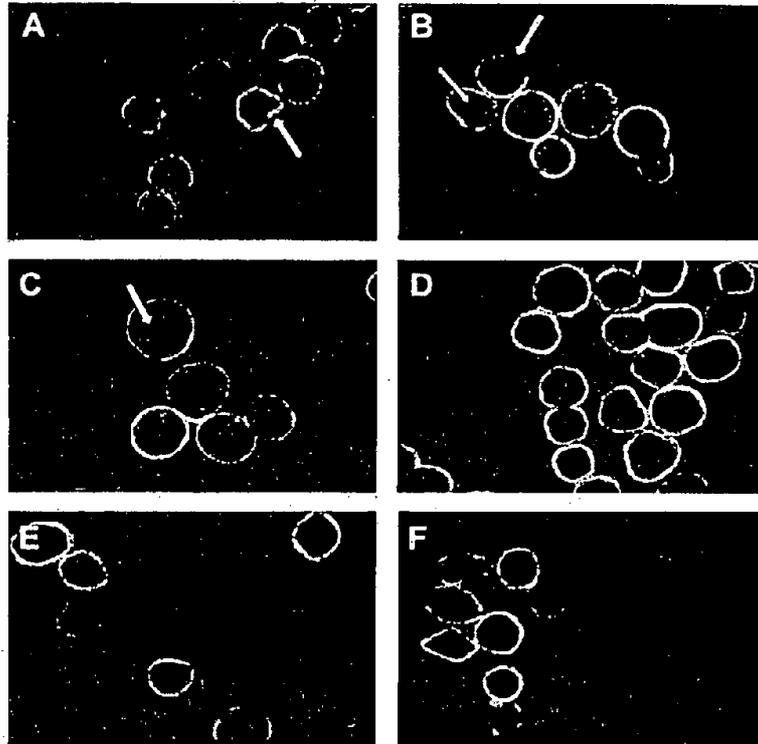


Fig. 3



Fig. 4

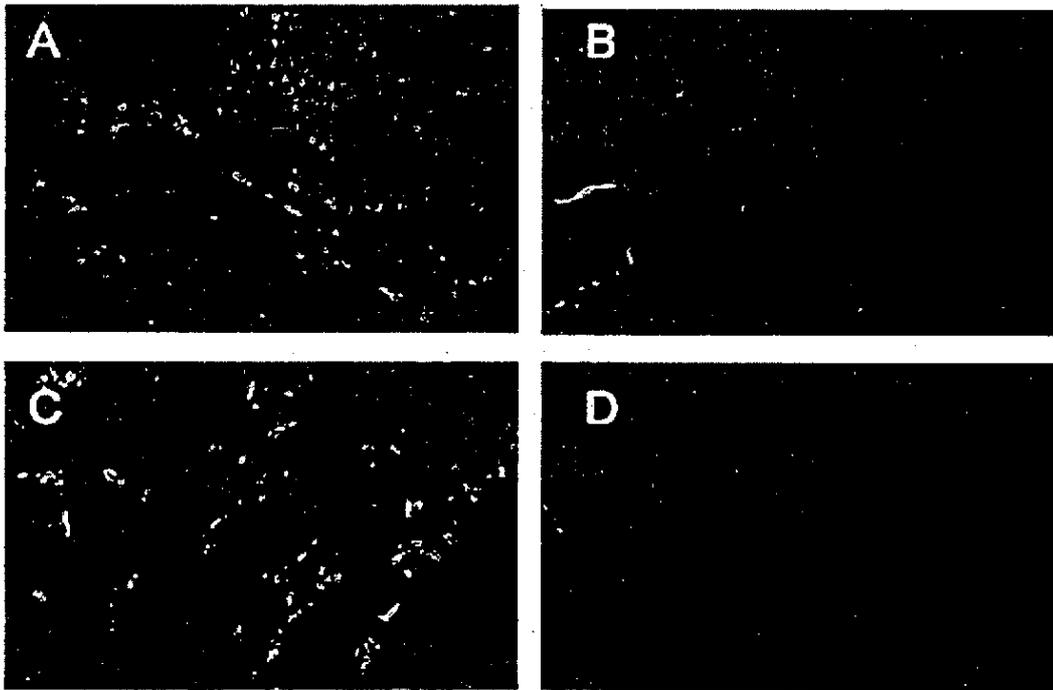


Fig. 5

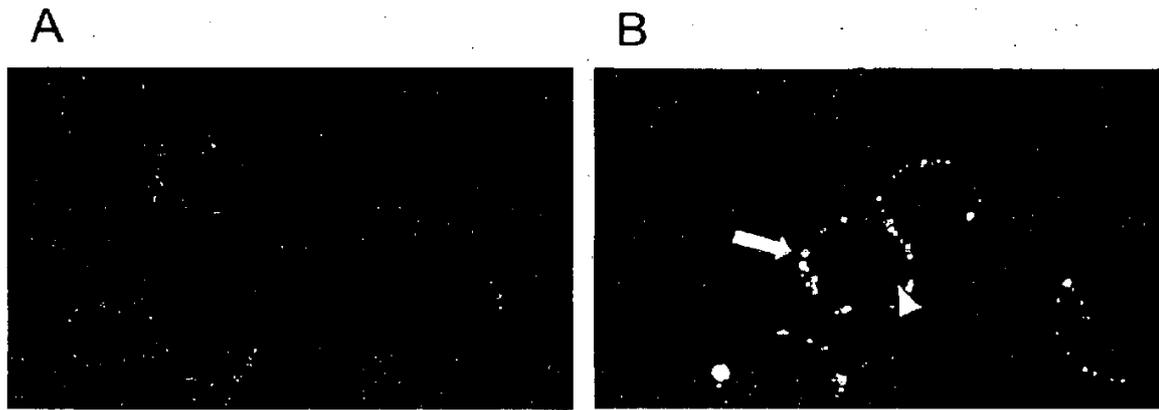


Fig. 7

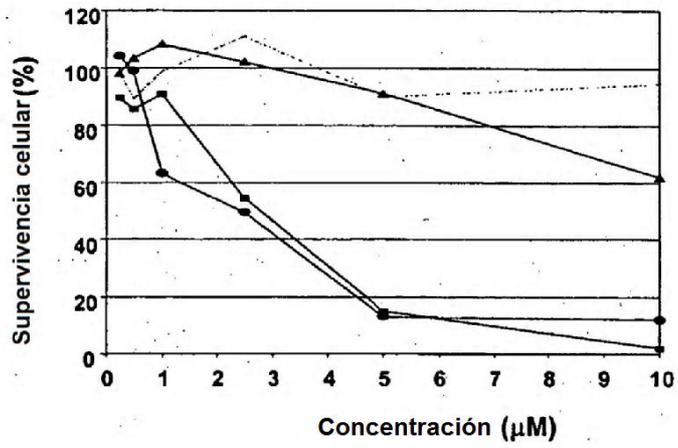


Fig. 8

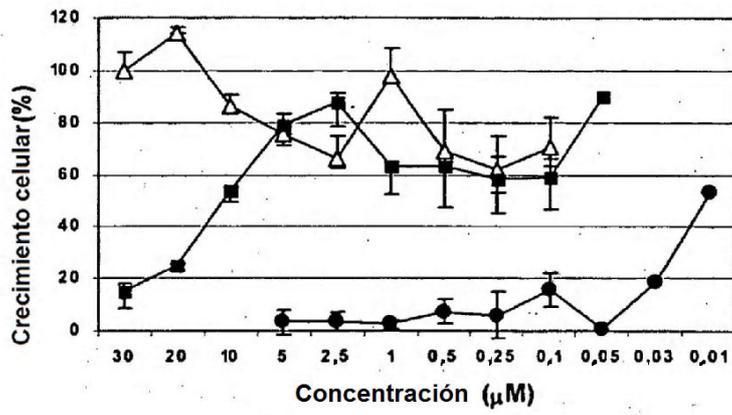


Fig. 9

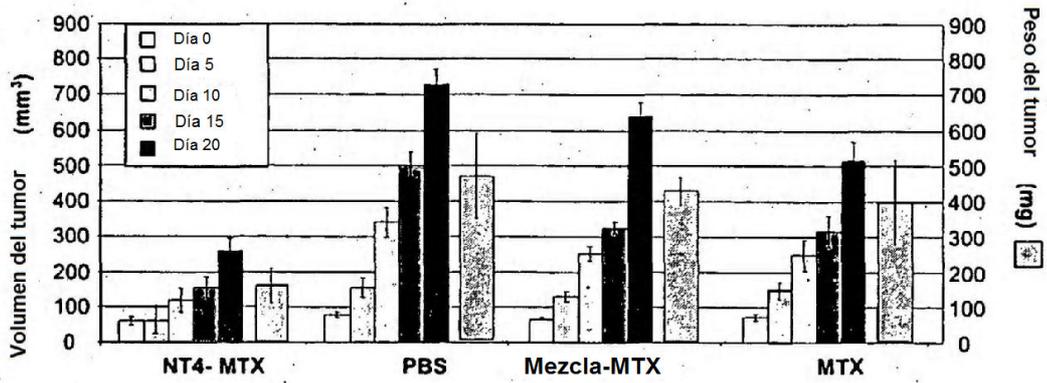


Fig. 10