

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 032**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2002 E 10010931 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2332964**

54 Título: **Péptidos con actividad apoptótica**

30 Prioridad:

20.12.2001 DE 10163130

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

16.09.2016

73 Titular/es:

**CYTOTOOLS AG (100.0%)
Klappacher Strasse 126
64285 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**FREYBERG, MARK;
KAISER, DIRK y
FRIEDL, PETER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 583 032 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 con actividad apoptótica

La presente invención se refiere a péptidos con actividad apoptótica, así como a su uso para la preparación de medicamentos.

5 La apoptosis es un programa de suicidio genéticamente codificado, el cual es inducido en células eucarióticas bajo determinadas condiciones fisiológicas o patológicas. La inducción de la apoptosis debe ser regulada de manera extraordinariamente precisa, dado que una hiperactividad puede conducir a enfermedades degenerativas. Por otra parte, una inducción reducida de la apoptosis puede cooperar en el progreso del tumor.

10 Ya se describieron diferentes inductores de bajo peso molecular de la apoptosis. Una clase importante son los citostáticos de tumores. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se desconoce de qué manera estos citostáticos u otras sustancias pueden inducir a la apoptosis.

15 La inducción de la apoptosis puede tener lugar, por ejemplo, a través de una serie de los denominados receptores de la muerte, es decir, receptores que contienen un "Dominio de la Muerte" (DD), tales como CD95, TNF-RI, DR3, DR4 o DR5, que después de la unión de sus ligandos inducen vías de señales de la apoptosis. Por ejemplo, el receptor CD95 interactúa, después de la unión del ligando CD95, con la proteína adaptadora FADD/MORT1, con lo que se induce el "reclutamiento" y la activación de la proteasa FLICE/caspasa-8 en el DISC "Complejo de Señalización Inductor de la Muerte". FADD y FLICE contienen en cada caso "Dominios Efectores de la Muerte" (DED). La inducción de la apoptosis a través de estas de vías de señales de la apoptosis es posible desde fuera, por ejemplo, mediante la administración de venenos celulares (sustancias citotóxicas), irradiación, virus, retirada de factores de crecimiento o lesión mecánica de las células. Estas posibilidades de la inducción de la apoptosis van acompañadas, no obstante, de determinados inconvenientes. Así, la administración de venenos celulares tales como citostáticos, o la irradiación de células cancerosas conducen al desarrollo de resistencia y, además de ello, a un deterioro de células normales en las que, en realidad, no debería desencadenarse apoptosis alguna.

25 Por lo general, p. ej., la inducción de la apoptosis se propone para el tratamiento del cáncer, para impedir procesos angiogénicos, etc. Aunque ya aquí se describieron inductores, éstos siguen presentando todavía una serie de inconvenientes. Por ejemplo, los citostáticos generan graves efectos secundarios.

30 Existe, por lo tanto, una alta demanda de sustancias que influyan sobre la apoptosis de forma positiva. Además, existe una elevada demanda de formulaciones farmacéuticas que contengan este tipo de sustancias y que pueden emplearse para el tratamiento de afecciones en las que esté indicada la inhibición de la apoptosis, en particular para el tratamiento del cáncer. En este caso, estas sustancias deben ser de un peso molecular lo más bajo posible y/o péptidos pequeños, con el fin de garantizar una buena biodisponibilidad.

Por lo tanto, era misión de la presente invención proporcionar sustancias de actividad apoptótica, preferiblemente péptidos. Otra misión de la presente invención era proporcionar preparados farmacéuticos con los cuales se puedan tratar enfermedades, tales como el cáncer, en las que esté indicada la inhibición de la apoptosis.

35 Estos y otros problemas, no mencionados explícitamente, pero que resultan sin más de la reseña que antecede del estado de la técnica, son resueltos por los ejemplos de realización de la presente invención, definidos en las reivindicaciones.

En particular, este problema se resuelve al proporcionar sustancias con todas las características de la reivindicación 1.

40 Para los fines de la presente invención, se utiliza el código internacional usual de una letra para aminoácidos, A representa, por lo tanto, alanina (Ala), C representa cisteína (Cys), D representa ácido aspártico (Asp), E representa ácido glutámico (Glu), F representa fenilalanina (Phe), G representa glicina (Gly), L representa leucina (Leu), M representa metionina (Met), N representa asparagina (Asn), P representa prolina (Pro), R representa arginina (Arg), S representa serina (Ser), T representa treonina (Thr), V representa valina (Val), W representa triptófano (Trp) e Y representa tirosina (Tyr). Los L-aminoácidos se simbolizan en este caso por mayúsculas y los D-aminoácidos se simbolizan por el empleo de minúsculas.

Bajo un punto de vista particularmente preferido, la presente invención se refiere, por lo tanto, a sustancias inhibidoras de la apoptosis, preferiblemente proteínas o péptidos, que comprenden una de las secuencias de péptidos mostradas bajo SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 18 y SEQ ID NO 19, o sus correspondientes sales farmacéuticamente aceptables.

50 Además, la presente invención se refiere al uso de los péptidos de acuerdo con la invención, que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos representada en las SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 18 y SEQ ID NO 19, para la preparación de medicamentos, en particular para la preparación de medicamentos en los cuales se ha de provocar una muerte de las células tal como, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer.

Como ejemplos de realización de la presente invención muy particularmente preferidos, se proporcionan los

siguientes péptidos/secuencias de péptidos:

12. M-V-V-Y-F-R (SEQ ID NO 12)
18. m-v-v-y-f (SEQ ID NO 18)
19. m-v-v-y-a-r (SEQ ID NO 19)

5 Para los fines de la presente invención, por el término "péptido" se entiende una sustancia que se compone de una cadena de 2 o más aminoácidos unidos a través de enlaces péptido. En particular, péptidos de acción apoptótica de acuerdo con la invención presentan una longitud de cadena de < 100 aminoácidos, preferiblemente < 75, de manera particularmente preferida de < 50, de manera muy particularmente preferida de < 25 y de la forma más preferida de < 15 aminoácidos.

10 Por lo tanto, para los fines de acuerdo con la invención, se prefieren particularmente péptidos que comprendan una de las SEQ ID NOs 12, 18 y 19 y que en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal comprendan en cada caso 1 a 3 aminoácidos adicionales.

15 Para los fines de la presente invención, por el término "proteína" se entiende una sustancia en la que están unidos entre sí varios "péptidos", por ejemplo mediante enlaces moleculares tales como puentes disulfuro o mediante puentes de sales. Esta definición comprende de igual manera proteínas nativas al igual que también proteínas al menos parcialmente "artificiales", en donde estas proteínas "artificiales" pueden estar modificadas, p. ej., mediante adición de restos químicos a la cadena del aminoácido, que normalmente no se presentan en el caso de proteínas nativas.

20 Para los fines de la presente invención, por "actividad apoptótica" se entiende que la adición de la correspondiente sustancia en el sistema de ensayo mostrado en los Ejemplos 5 y 6 genera un índice de inhibición positivo o negativo. En particular, para ello se cultivan células endoteliales, de manera particularmente preferida HUVEC, en un medio que contiene 1 µg de TSP-1 por cada ml. Los valores en porcentaje de la apoptosis de este testigo positivo sirven entonces, como se muestra en los Ejemplos, para el cálculo del índice de inhibición para las sustancias que se emplean como inhibidores potenciales junto con el inductor TSP-1 en investigaciones paralelas. Un testigo negativo
25 indica la ausencia de demás inductores.

Un índice de inhibición positivo indica en este caso que la sustancia correspondiente inhibe la apoptosis. Un índice de inhibición negativo indica en este caso que la sustancia utilizada induce la apoptosis, es decir, intensifica la apoptosis inducida por TSP-1.

30 No obstante, los péptidos nativos presentan, a menudo, una escasa estabilidad metabólica frente a las peptidasas y una biodisponibilidad relativamente mala.

Partiendo de los péptidos arriba mostrados, el experto en la materia puede desarrollar, sin una actividad inventiva, toda una serie de compuestos derivados que poseen un modo de acción similar o equiparable y que, entre otros, se denominan también miméticos de péptidos.

35 En calidad de miméticos de péptidos se designan en este caso, para los fines de la presente invención, compuestos que imitan la estructura de péptidos y que, en calidad de ligandos, están en condiciones de imitar (agonista) o bloquear (antagonista) la actividad biológica en el plano del receptor/enzima. Ante todo, los miméticos de péptidos deben presentar una biodisponibilidad mejorada y una estabilidad metabólica mejorada. El tipo de mimetismo puede abarcar desde la estructura de partida ligeramente modificada hasta el no péptido puro. Véase, por ejemplo, A. Adang *et al.*, Recl. Trav. Chim. Países Bajos 113 (1994), 63-78.

40 En principio, se ofrecen las siguientes posibilidades para el mimetismo/derivatización de una estructura peptídica:

- Uso de D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos
- Modificación de la cadena lateral de aminoácidos
- Variación/prolongación de la cadena principal del péptido
- Ciclación para la estabilización de la conformación
- 45 • Uso de moldes que obligan a una estructura secundaria determinada
- Uso de una columna vertebral no peptídica, la cual imita con restos/cadenas

laterales adecuados la estructura del péptido

Mientras que la estabilidad proteolítica de un péptido puede ser aumentada por la sustitución de L-aminoácidos por D-aminoácidos, la modificación de las cadenas laterales de uno de los aminoácidos conduce a menudo a una

mejora de las propiedades de unión de todo el péptido.

En el caso de la modificación de la columna vertebral del péptido tiene lugar, por norma general, un intercambio de un grupo amida por agrupaciones similares a amida (J. Gante, *Angew. Chem.* 106 (1994), 1780-1802). Mediante estas medidas se puede influir tanto sobre la afinidad de unión como sobre la estabilidad metabólica del péptido nativo.

Mediante la ciclación de un péptido lineal se establece su flexibilidad y, con ello, su conformación global. En la fijación de la conformación biológicamente activa se aumenta la afinidad del péptido por el receptor, dado que la reducción de la entropía en la unión es menor que en la unión de un péptido lineal flexible. Para este fin, cadenas laterales de aminoácidos, que no participan en el reconocimiento del receptor se enlazan entre sí o con la columna vertebral del péptido.

La estructura secundaria del péptido juega un papel decisivo para el reconocimiento molecular del receptor. Junto a la hélice α y la hoja plegada β , los denominados giros en calidad de puntos de inflexión en la cadena peptídica son importantes elementos de conformación. El reemplazo de estas unidades estructurales por un eslabón el cual, tras la incorporación en un péptido, estabiliza una estructura secundaria definida, ha conducido al concepto del mimético de la estructura secundaria.

También la solubilidad en agua de los péptidos puede aumentarse, por ejemplo, mediante la introducción de derivados de S- y C-glicopéptidos. Otras medidas pueden ser, por ejemplo, la PEGilación de los péptidos.

También puede aumentarse la lipofilia de los hexapéptidos, por ejemplo al colgar a la secuencia de péptidos, por ejemplo, fenilalaninas.

La ciclación o bien la modificación N-terminal de péptidos se describe, p. ej., por Borchard, *Journal of controlled Release* 62 (1999), 231-238 y por Blackwell *et al.*, *J. Org. Chem.* 10 (2001), 5201-302.

Por lo tanto, resulta claro que el experto en la materia, partiendo del conocimiento impartido por la presente invención, puede acceder fácilmente a toda una serie de miméticos de péptidos derivados, los cuales están todos, sin embargo, comprendidos por la presente invención.

Bajo otro punto de vista preferido, la presente invención proporciona, por lo tanto, también miméticos de péptidos que se derivan de las SEQ ID NOs 12, 18 ó 19, así como sustancias que comprenden a este tipo de miméticos de péptidos. En particular, la presente invención proporciona, bajo otro punto de vista preferido, el uso de miméticos de péptidos que se derivan de las SEQ ID NOs 12, 18 ó 19, y a sustancias que comprenden a este tipo de miméticos de péptidos para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Bajo otro punto de vista preferido de la presente invención, estos péptidos o bien péptidos correspondientemente derivatizados pueden emplearse también como agentes de diagnóstico. Tal como se demostró por parte de los autores de la invención, las sustancias de acuerdo con la invención, preferiblemente los péptidos de las SEQ ID NOs 12, 18 ó 19, se unen a células apoptóticas y, por lo tanto, se pueden emplear extraordinariamente como herramienta de diagnóstico, así, por ejemplo, para detectar células apoptóticas en la zona de lesiones arterioescleróticas y, con ello, poder incluso detectar las lesiones. Para ello, las sustancias se marcan. Para este marcaje es conocida por el experto en la materia una pluralidad de métodos, los cuales son elegidos en función de la finalidad de empleo.

Por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. US 4.479.830 (Hnatowich), US 4.652.440 (Paik et al. y US 4.668.503 (Hnatowich) se describen métodos adecuados.

Para los fines de la presente invención, por lo tanto por "sustancia conforme a la invención marcada" se entiende toda sustancia conforme a la invención que contiene sustancias de marcaje previamente conocidas en el estado de la técnica y utilizadas de forma estandarizada para el marcaje de péptidos tales como, en general, radioisótopos tales como, por ejemplo, renio o tecnecio, pero también enzimas, sustratos de enzimas, anticuerpos, epítomos para el reconocimiento a través de fragmentos de anticuerpos específicos. El experto en la materia reconocerá la enumeración anterior sin problemas a modo de ejemplo y no de forma exclusiva.

Si las sustancias de acuerdo con la invención se utilizan como herramienta de diagnóstico, puede utilizarse, por lo tanto, cualquier método de marcaje previamente conocido en el estado de la técnica.

Sustancias de acuerdo con la invención, que son componentes activos de un preparado farmacéutico son disueltas, en general, en un soporte farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones tampón tal como tampón fosfato o tampón citrato. Para conservar la actividad de los péptidos pueden añadirse también reactivos que sean farmacéuticamente aceptables y que mantengan, por ejemplo, un medio reductor en el preparado farmacéutico.

La dosificación y posología específicas depende para cada uno de los pacientes de un número de factores, incluida la actividad de los compuestos específicos utilizados, la edad del paciente, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la alimentación, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, el

compuesto con otros medicamentos y la gravedad de la enfermedad particular, para los que se aplique la terapia. Son calculadas por el médico en función de estos factores.

5 Medicamentos peptídicos se administran habitualmente por vía parenteral, p. ej. mediante un spray de inhalación, por vía rectal, mediante técnicas de inyección e infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular e intratecal, o exteriormente en formulaciones farmacéuticas que contienen soportes, adyuvantes y vehículos convencionales y farmacéuticamente aceptables. En función del tipo de sustancia identificada, entran en consideración también otras vías de administración, p. ej., la oral. En el caso de la cicatrización, los identificados de acuerdo con la invención se administran preferiblemente en forma de pomadas o polvos espolvoreables.

10 La invención proporciona asimismo composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una sustancia apoptóticamente activa, preferiblemente de un péptido, proteína o mimético de péptido, en combinación con un soporte farmacéutico convencional. Un soporte farmacéutico es, p. ej., una carga sólida o líquida, un material de encapsulación o un disolvente. Ejemplos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticos son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidón tal como almidón de maíz y fécula de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto pulverizado; 15 malta; gelatina; sebo; soportes medicamentosos tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; polioles tales como propilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laureato de etilo; agar, agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua apirógena; disolución salina isotónica; disolución de Ringer, alcohol etílico y disoluciones de tampón fosfato, al igual que también otras sustancias no tóxicas compatibles que se utilizan en 20 formulaciones farmacéuticas. Humectantes, emulsionantes y agentes deslizantes tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, al igual que colorantes, agentes de revestimiento así como agentes de perfume y sustancias conservantes pueden estar asimismo presentes en los preparados, de manera correspondiente a los requisitos del galénico. La cantidad del principio activo que se combina con los materiales de soporte con el fin de producir una dosis individual variará en función del paciente tratado y del método especial de administración.

25 Sales farmacéuticamente aceptables de las sustancias de acuerdo con la invención, preferiblemente péptidos, proteínas o miméticos de péptidos, pueden prepararse por una vía bien conocida, por ejemplo mediante disolución de los compuestos de acuerdo con la invención en el correspondiente ácido o base diluido, p. ej. ácido clorhídrico o lejía de sosa, y subsiguiente liofilización. Sales de metales se pueden obtener mediante disolución de los compuestos de acuerdo con la invención en disoluciones que contienen el ion correspondiente, y subsiguiente aislamiento del compuesto a través de HPLC o procedimientos de permeación en gel.

Los siguientes Ejemplos explican la invención con mayor detalle:

EJEMPLO 1: Cultivo de células endoteliales humanas procedentes de venas del cordón umbilical (HUVEC)

Disoluciones (estériles):

35 Medio de cultivo: medio basal IF + NCS al 15% (v/v), 5 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de heparina, 0,7 µg/ml de FGF, L-glutamina 2 mM [medio basal IF: mezcla 1:1 a base de medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) y F12 de Ham, ambos de Life Technologies, Paisley (Inglaterra)]

NCS: suero de terneros neonatales (Sebak, Aidenbach)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (preparación propia, purificado a partir de cerebro de cerdo)

40 Materiales:

Recipientes para el cultivo de células, gelatinizados

Realización:

45 El cultivo de HUVEC tiene lugar en recipientes de cultivo revestidos con gelatina a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada con vapor de agua. El medio de cultivo se sustituye cada 2-3 días; en el caso de confluencia, las células se hacen pasar con una tasa de división de 1:3 a 1:5. Las HUVEC crecen fuertemente inhibidas en su contacto y forman céspedes de células monocapa con la típica morfología de empedrado. En el caso de confluencia, los cultivos alcanzan densidades celulares de 4-9 x 10⁴ células/cm². Para los análisis de la apoptosis se utilizan exclusivamente cultivos de HUVEC de los pasajes 1-4.

Revestimiento de recipientes de cultivo:

50 Disoluciones (estériles):

Disolución de gelatina, al 1% (v/v) en agua milli-Q

Suspender 1 g de gelatina (testada en el cultivo celular) en 100 ml de agua milli-Q, disolver mediante autoclave

durante 20 min a 121°C y 2 bar y almacenar a la temperatura ambiente.

PBS (NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM)

8 g/l de NaCl

0,2 g/l de KCl

5 1,44 g/l de Na₂HPO₄ x 2 H₂O

0,2 g/l de KH₂PO₄

Disolver las sales en un volumen correspondiente de agua milli-Q, someter a autoclave durante 20 min a 121°C y 2 bar y almacenar a la temperatura ambiente. Se verifica el valor del pH y éste se encuentra entre 7,2 y 7,4.

Materiales:

10 Recipientes para el cultivo de células

Realización:

Para el cultivo de células que crecen de forma adherente, recipientes de cultivo se revisten con gelatina. El fondo de los recipientes de cultivo se cubre con disolución de gelatina estéril y los recipientes de cultivo de células se dejan durante 15 min a la temperatura ambiente. La disolución de gelatina se filtra con succión, los recipientes de cultivo de células se lavan una vez con PBS y pueden utilizarse de esta manera.

Subcultivo de células adherentes

Disoluciones (estériles):

PBS

Disolución de tripsina/EDTA

20 Disolver tripsina al 0,05% (v/v) y EDTA al 0,02% (p/v) en PBS y filtrar en condiciones estériles.

Materiales:

Recipientes para el cultivo de células, gelatinizados

Realización:

25 Las células se desprenden por disolución de la superficie del cultivo con una disolución de tripsina/EDTA. El medio de cultivo se filtra con succión, el fondo del recipiente de cultivo se lava brevemente con PBS y se cubre con una disolución de tripsina/EDTA (~ 1 ml para un frasco de cultivo de 25 cm²). La disolución de enzimas se filtra de nuevo inmediatamente con succión de modo que quede una delgada película de líquido sobre las células. Las células se dejan durante 1-10 min a la temperatura ambiente y la separación por disolución de las células se vigila bajo el microscopio. La separación por disolución de las células puede ser acelerada mediante un suave golpeo en el borde del recipiente de cultivo. Las células se recogen en medio de cultivo de reciente aportación, eventualmente se recueñtan y se siembran en nuevos recipientes de cultivo.

EJEMPLO 2: Determinación de la tasa de apoptosis mediante tinción de células apoptóticas con DAPI

35 DAPI pertenece al grupo de colorantes de indol y es un colorante ADN selectivo. El colorante es excitado a 340-360 nm, y el máximo de emisión se encuentra en 480 nm. Se emplea para los ensayos de la apoptosis [véase Cohen *et al.*, Immunology Today, 14, Nº 3, 126-130 (1993)].

Valoración morfológica:

Disoluciones:

PBS

Disolución de formaldehído

40 Formaldehído al 4% (v/v) en PBS

Disolución DAPI (Molecular Probes, Leiden, Holanda)

2 µg/ml de DAPI en metanol

Materiales:

Placa de Petri (35 mm) con células en cultivo

Realización:

5 Se filtra con succión el sobrenadante del cultivo de una placa de Petri, el césped de células se fija sobre hielo durante 15 minutos con 1 ml de disolución de formaldehído, se lava dos veces con 2 ml de PBS, se mezcla durante 15 minutos con 0,5 ml de disolución de DAPI, se lava con PBS y se evalúa bajo el microscopio de fluorescencia. Se trabaja con un conjunto de filtros UV y un objetivo de 20 x o 40 x. Se seleccionan 500-1000 células al azar y se recuentan las células con núcleos apoptóticos.

El índice de la apoptosis se calcula según la fórmula siguiente:

10 **Índice de apoptosis [%] = Número de células apoptóticas/número total de células x 100**

Citometría de flujo:

Disoluciones:

PBS

Medio

15 Etanol (p.a.) enfriado con hielo (-20°C)

Tampón DAPI

Disolución madre DAPI

Disolución de tinción DAPI

Realización:

20 El sobrenadante del cultivo se filtra con succión y las células se tripsinizan sin lavarlas con PBS. La suspensión de células se recoge en un medio, se recuenta, se centrifuga a 800 x g durante 5 minutos, el sedimento se vuelve a suspender en 0,5 ml de IF y se añade gota a gota a 1,5 ml de etanol enfriado con hielo. La suspensión se almacena durante una noche a -20°C. Después de centrifugación renovada y de re-suspensión del sedimento en 2 ml de PBS sigue una incubación durante media hora a 37°C, otra centrifugación, re-suspensión del sedimento en 5 ml de disolución DAPI y recuento en el citómetro de flujo a una tasa de recuento de 50-300 episodios por segundo. La representación obtenida muestra un pico alto en células en la fase G₁ del ciclo celular, seguido de una fracción de células en la fase S (intensidades de fluorescencia medias) y un último pico de elevadas intensidades de fluorescencia, el cual representa a las células en la fase G₂. Células apoptóticas aparecen, condicionado por la cantidad de ADN absoluta decreciente por célula, en un sub-pico G₁ [Darzynkiewicz Z. et al., Cytometry, **13**, 795-808 (1992); Zamai et al., Cytometry, **14**, 891-897 (1993)]. Esto muestra la aparición de una apoptosis bajo las condiciones elegidas.

25

30

EJEMPLO 3: Inducción de la apoptosis y sistema de ensayo para péptidos o proteínas de actividad apoptótica en células endoteliales cultivadas

35 Las células se cultivan como se describe en el Ejemplo 1. Después de alcanzar la confluencia completa, las células se emplean para el ensayo. Primero se añade trombospondina 1 (1 µg/ml) a medio de reciente aportación y se compara con la acción de medio de reciente aportación sobre la tasa de apoptosis de HUVEC. La Tabla 1 muestra que la adición de trombospondina conduce a un incremento significativo de la tasa de apoptosis. La apoptosis observada en el caso de adición de medio de reciente aportación es inducida por la trombospondina secretada durante la duración del experimento.

40 **Tabla 1: Inducción de la apoptosis en HUVEC con TSP-1**

Medio de cultivo	Tasa de apoptosis (%) después de 24 h
Medio de reciente aportación	0,9 ± 0,1
Reciente + TSP-1 (1 µg/ml)	3,0 ± 0,4

EJEMPLO 4: Síntesis de péptidos

Los péptidos utilizados fueron sintetizados según las premisas de CytoTools por parte del NMI (Instituto de Ciencias

Naturales y Médico de la Universidad de Tübingen, Reutlingen, Alemania).

EJEMPLO 5: Identificación de péptidos hexámeros de actividad apoptótica con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención

5 Las células se cultivan como se describe en el Ejemplo 1. Las células se siembran en los respectivos recipientes de cultivo (p. ej. placa de 24 pocillos/0,5 ml por cavidad) y, tras alcanzar la confluencia completa, se emplean para el ensayo. Las células se abastecen con medio nuevo:

(a) Medio de cultivo reciente [**tasa base de la apoptosis**],

(b) Medio reciente con 1 µg/ml de TSP-1 [**sustancia inductora de la apoptosis; control**],

(1) Medio (b) + péptido de SEQ ID NO: 12, 1 mM

10 (r) Medio (b) + péptido de SEQ ID NO: 18, 1 mM

(s) Medio (b) + péptido de SEQ ID NO: 19, 1 mM

15 Después de 24 h de incubación bajo condiciones de cultivo (Ejemplo 1) se fijan las células, se tiñen con DAPI y se examinan morfológicamente bajo el microscopio de fluorescencia o se examinan por citometría de flujo. Se determinan las células apoptóticas y el número total de células y se calcula el índice de la apoptosis (porcentaje de células apoptóticas). En la Tabla 2 se indican los datos de 3 experimentos independientes con el dato de los valores medios y la desviación estándar. Péptidos de acción inhibitoria presentan, de acuerdo con la invención, un índice de inhibición positivo, mientras que péptidos inductores presentan, de acuerdo con la invención, un índice de inhibición negativo.

Tabla 2: Se sometieron a ensayo los siguientes péptidos:

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Índice de la apoptosis [%]	Índice de inhibición [%]*
K	Control	3,28 ± 0,55	
(12)	M-V-V-Y-F-R	4,40 ± 0,53	-34,1 ± 6,2
(18)	m-v-v-y-f-r	14,6 ± 0,75	-345,1 ± 5,1
(19)	m-v-v-y-a-r	11,4 ± 0,63	-247,1 ± 5,4

*índice de inhibición positivo = sustancia inhibida; índice de inhibición negativo = sustancia inducida

20

De acuerdo con la invención, el índice de inhibición se calcula como sigue:

$$- \text{índice de inhibición [\%]} = (\text{índice de apoptosis medido} \cdot 100 / \text{control del índice de apoptosis}) - 100$$

Protocolo de secuencias

- <110> CytoTools GmbH
- 5 <120> Péptidos con actividad apoptótica
- <130> C 688wo
- <160> 17
- 10 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 6
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 20 <400> 1

Arg Ala Tyr Val Val Met
1 5

- 25 <210> 2
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Péptido sintético
- <400> 2

Arg Trp Tyr Val Val Met
1 5

- 35 <210> 3
- <211> 6
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 45 <400> 3

Arg Tyr Tyr Val Val Met
1 5

- 50 <210> 4
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 55 <223> Péptido sintético
- <400> 4

ES 2 583 032 T3

Arg Glu Tyr Val Val Met
1 5

5 <210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 5

Lys Arg Ala Tyr Val Val Met Trp Lys Lys
1 5 10

15 <210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 6

Lys Arg Glu Tyr Val Val Met Trp Lys Lys
1 5 10

25 <210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 7

Arg Gly Tyr Val Val Met
1 5

40 <210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 8

Arg Met Tyr Val Val Met
1 5

50 <210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 583 032 T3

<223> Péptido sintético

<400> 9

Arg Thr Tyr Val Val Met
1 5

5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <400> 10

Arg Asn Tyr Val Val Met
1 5

20 <210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 11

Arg Asp Tyr Val Val Met
1 5

30

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 12

40

Met Val Val Tyr Phe Arg
1 5

45 <210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 13

Arg Ala Tyr Val Val Ala
1 5

55 <210> 14

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 14

Arg Leu Tyr Val Val Met
1 5

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

20 <400> 15

Arg Pro Tyr Val Val Met
1 5

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

30 <400> 16

Arg Ser Tyr Val Val Met
1 5

<210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 17

Arg Cys Tyr Val Val Met
1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial a base de D-aminoácidos

50 <220>
 <223> Péptido sintético

55 <400> 18

met val val tyr phe arg
1 5

5 <210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial a base de D-aminoácidos

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 19

met val val tyr ala arg
1 5

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Sustancia de actividad apoptótica, caracterizada por que comprende al menos una porción peptídica con una de las secuencias de aminoácidos representadas en las SEQ ID n°s 12, 18 y 19 e induce la apoptosis.
- 5 2.- Sustancia de actividad apoptótica según la reivindicación 1, caracterizada por que la sustancia de actividad apoptótica es un péptido que presenta una longitud de cadena de < 100 aminoácidos.
- 3.- Sustancia de actividad apoptótica según la reivindicación 2, caracterizado porque la sustancia de actividad apoptótica es un péptido que presenta una longitud de cadena de < 50 aminoácidos.
- 4.- Composición farmacéutica, que comprende al menos una sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable de esta sustancia y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 10 5.- Uso de una sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 o de una sal farmacéuticamente aceptable para ello, para la producción de un medicamento.
- 6.- Uso de una sustancia según la reivindicación 5 o de una sal farmacéuticamente aceptable para ello, para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 15 7.- Medicamento para el tratamiento del cáncer, que comprende al menos una sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable de esta sustancia y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 8.- Sustancia según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, que está marcada.