

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 031**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2008 PCT/US2008/088438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09086516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2008 E 08868377 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2224946**

54 Título: **Compuestos antiproliferativos y su utilización**

30 Prioridad:  
**28.12.2007 US 9382**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2017**

73 Titular/es:  
**KALOS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
4370 LA JOLLA VILLAGE DRIVE STE 400  
SAN DIEGO, CA 92122, US**

72 Inventor/es:  
**KOZLOWSKI, MICHAEL, R.**

74 Agente/Representante:  
**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 613 031 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

Compuestos antiproliferativos y su utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención es definida mediante las reivindicaciones. Se describen en la presente memoria unos motivos antiproliferativos celulares (por ejemplo, anticancerosos) conservados en proteínas, péptidos, y peptidomiméticos, y métodos para tratar cáncer, y medicamentos que utilizan el motivo descrito.

10

**Introducción**

Desde hace tiempo se ha observado que los péptidos de origen natural, ciertos medicamentos, y sustancias naturales tienen más de una actividad observada. Por ejemplo, muchos medicamentos tienen efectos secundarios, que parecen estar totalmente no relacionados y algunas veces son perjudiciales para el efecto pretendido principal del fármaco. Sin embargo, no todos dichos efectos secundarios son perjudiciales para la salud de un paciente al que se le administran dosis con tales fármacos.

15

En ciertos casos, el efecto secundario puede ser tan útil como para proporcionar aplicaciones totalmente nuevas al fármaco o a la sustancia de origen natural. Sus ejemplos incluyen finasterida (Propecia), usada como un tratamiento en hiperplasia prostática benigna (BPH) y cáncer de próstata en mayores dosis, que está registrada en muchos países para la calvicie de patrón masculino. Otro ejemplo es el citrato de sildenafil (Viagra), ahora famoso en el mercado por su efecto secundario, en lugar de la aplicación originalmente pretendida del mismo.

20

En algunos casos, las observaciones de un efecto de una sustancia de origen natural indican una posibilidad de que tales sustancias pueden tener cierta utilidad novedosa, pero el efecto observado principal de esa sustancia puede sobrepasar cualquier "nueva actividad" *in vivo* observada. Como resultado, tales observaciones permanecen como curiosidades *in vitro*, o como curiosidades *ex vivo*, puesto que el efecto deseado de la nueva actividad es simplemente un efecto secundario de la sustancia activa.

25

30

Un ejemplo de tal observación es el hallazgo de que los péptidos natriuréticos (NPs), que incluyen ANP, BNP, CNP, y urodilatina, en seres humanos, tienen muchas actividades biológicas además de sus efectos cardiovasculares principales (por ejemplo, la regulación del volumen sanguíneo, de la tensión arterial, y de la función cardíaca), que incluyen efectos metabólicos (por ejemplo, control del metabolismo de las grasas) y efectos moduladores del crecimiento celular (por ejemplo antiproliferativos) [Potter, et al. *Endocrine Rev.* 27:47 (2006) y referencias allí; Vesely, D.L., *Curr Heart Fail Rep.* 4(3):147 (2007).

35

Recientemente, se ha demostrado que ciertos NPs también tienen la capacidad para exterminar células cancerosas, o para atenuar su crecimiento tanto en cultivo como en modelo de animales de cáncer humano [Baldini, et al, *Cell Death Diff.*, 11:S210-S212 (2004); Baldini, et al, *Melanoma Res.* 16:501-507 (2006); Lelievre, et al., *J. Biol. Chem.* 276(47):43668, (2001); Levin, et al., *Am. J. Physiol.* 30:R453-R457 (1991); Vesely, D.L., *Eur J Clin Invest* 38(8):562 (2008).

40

Mientras que cada uno de estos efectos puede ser beneficioso por sí mismo, la clasificación del ámbito de los efectos de los NPs puede impedir el desarrollo de una terapia segura y eficaz para cualquier área específica buscada como diana para tratamiento. Por ejemplo, un gran cambio en la tensión arterial que acompaña la dosificación de una sustancia antiproliferativa puede frustrar el intento de tratar el paciente en absoluto, creando una complicación seria mientras se trata otro problema. Como resultado, es esencial clasificar la estructura, motivo o acción que es responsable de una función, y separarla de las otras si es posible.

45

50

Los investigadores han observado que los NPs comparten rasgos estructurales comunes que se piensa que contribuyen tanto a sus características de unión al receptor como a sus actividades biológicas [He, X-L. et al, *Science* 293:1657 (2001); Moffatt, et al, *J. Biol. Chem.* 282(50):36454 (2007); Potter et al. *Endocrine Rev.* 27:47 (2006)]. Estos incluyen una estructura anular y una secuencia de aminoácidos o motivo compartido. Se han propuesto diferentes versiones de este motivo, incluyendo CFGXXXDRXXXXGLGC [Potter, et al., *Endocrine Rev.* 27:47 (2006)] y CFGXXXDRXXXXGLGCS [He, et al, *Science* 293:1657 (2001)]. En cada caso, los dos restos C están conectados mediante un puente de disulfuro. También se ha propuesto un motivo de NP que consiste en FGXX(L/M)DRI(G/S) [Moffatt, et al, *J. Biol. Chem.* 282(50):36454 (2007)]. Este motivo también se encuentra en otros péptidos endógenos, tales como osteocrina y musclina (con sustitución del resto I por un resto L en este último caso), que comparten algunos de los efectos metabólicos y moduladores del crecimiento celular de los NPs pero que carecen de sus efectos cardiovasculares [Moffatt, et al, *J. Biol. Chem.* 282(50):36454 (2007); Nishizawa, H., et al., *J. Biol. Chem.* 279:19391 (2004); Potter, et al., *Endocrine Rev.* 27:47 (2006) y referencias allí]. Este motivo se ha denominado el motivo del péptido natriurético (NM) [Moffatt, et al., *J. Biol. Chem.* 282(50):36454 (2007)]. La estructura anular de los NPs parece necesaria para la unión a NPRA y NPRB, y para la actividad cardiovascular [Collinson, P.O., *Bus. Brief. Eur. Cardiol.* 66 (2005) y referencias allí; Potter, et al. *Endocrine Rev.* 27:47 (2006)], y se cree que el resto R14 (numerado según ANP), que es un elemento de todos los motivos propuestos, es necesario

60

65

para la unión a NPRC [He, et al, Science 293:1657 (2001); Lanctot, et al, Patente US2007/0049251 A1; Moffatt, et al, J. Biol. Chem. 282(50):36454 (2007)].

5 Sería beneficioso definir un motivo específico, que pudiese predecir de forma fiable la eficacia anticancerosa, y proporcionar una terapia para tratamiento. Tal motivo proporcionaría no solo un péptido, sino peptidomiméticos, y pequeñas moléculas que serían útiles como medicamentos.

10 En el caso de los NPs, se cree que tres tipos específicos de receptores de NP (NPR) median las acciones de los NPs. Se piensa que el receptor de tipo A (NPRA) y el receptor de tipo B (NPRB) están implicados en la señalización de los NPs, puesto que tienen dominios de guanilil ciclasa integrales [Potter, et al., Endocrine Rev. 27:47 (2006) y referencias allí]. Se piensa que el receptor de tipo C (NPRC), que no tiene un dominio de guanilil ciclasa, es principalmente un receptor de aclaramiento (es decir, desactiva NPs mediante recaptación), pero también se ha sugerido que está relacionado con varias rutas de señalización intracelulares [Gower, et al., Mol. Cell Biochem, 293:103 (2006); Hashim et al. Am. J. Heart Cir. Physiol, 291:H3144-H3153 (2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668 (2001); Panayiotou et al. Proc. Brit. Pharm. Soc, 41:abs 009P (2005); Prins, et al, J. Bio. Chem. 15 271:14156 (1996); Segawa, et al., Naun.-Schmeid. Arch. Pharmacol. 357:70 (1998)].

20 Cada uno de los NPs parece interactuar con estos receptores de NPs, aunque sus afinidades difieren cada una para NPRA, NPRB y NPRC. Se ha especulado que las potencias anticancerosas relativas de los NPs están relacionadas con sus afinidades de unión a los NPRs [Vesely, D.L., Eur J Clin Invest 38(8):562 (2008) y referencias allí].

25 La técnica anterior no pudo reconocer el papel de NPRC en la predicción de la actividad anticancerosa. De hecho, aunque la técnica observó que la potencia anticancerosa observada para ANP es mayor que CNP [Vesely, D.L. Eur J Clin Invest 38(8):562 (2008), y referencias allí], de acuerdo con sus actividades en NPRC, el papel de NPRC no se reconoció claramente puesto que se razonó que los péptidos relacionados con NPs (VDL, LANP, KP) no actúan en NPRC, sino en receptores no de NPs [Vesely, D.L. et al., Peptides 11:193 (1991)].

30 Posiblemente debido a que los investigadores que relacionan la activación de NPRC con el cáncer tienen áreas dispares de experiencia, la relación de cómo estas observaciones se relacionan con el tratamiento del cáncer todavía no se ha entendido o apreciado claramente. En el caso de que la técnica anterior haya asignado cualquier valor predictivo, es posible que se hayan ensayado fármacos relacionados con cualquiera de tales predicciones.

35 De hecho, se han encontrado efectos antiproliferativos en análogos de NPs y en peptidomiméticos modelados tras ellos que tienden a mostrar actividad específica de NPRC. Otras moléculas conocidas [Baldini, et al, Cell Death Diff., 11:S210-S212 (2004); Baldini, et al, Melanoma Res. 16:501 (2006); Gower, et al., Mol. Cell Biochem, 293:103 (2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668 (2001); Levin E.R. y Frank, H.J.L., Am. J. Physiol. 30:R453-R457 (1991)] se correlacionan muy bien con este descubrimiento. Además, la estimulación de NPRC modula la ruta de MAP cinasa (MAPK) [Hashim, S., Li, Y, Anand-Srivastava, M.B., Am. J. Heart Cir. Physiol, 291:H3144-H3153 (2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668 (2001)]. Se ha encontrado que otros tipos de inhibidores de MAPK poseen actividad anticancerosa [Dhillon, et al., Oncogen 26:3279 (2007) y referencias allí].

45 Sin recurrir a razones mecanicistas para explicar por qué puede ser este el caso, el inventor ha descubierto que las interacciones relacionadas con NPRC con el motivo descrito en la presente memoria pueden influir o modular la ruta de MAPK, que puede tener un efecto sobre enfermedades hiperproliferativas [Hashim, S., Li, Y, Anand-Srivastava, M.B., Am. J. Heart Cir. Physiol, 291:H3144-H3153 (2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668 (2001)]. Esta invención muestra la implicación de NPRC en los efectos anticancerosos de los NPs, análogos y otros péptidos no relacionados que se ajustan al motivo anticanceroso. Los efectos antiproliferativos de los NPs observados tanto en células normales como cancerosas también se pueden producir mediante análogos de NPs y peptidomiméticos selectivos de NPRC [Baldini, et al, Cell Death Diff., 11:S210-S212 (2004); Baldini, et al, Melanoma Res. 16:501 (2006); Gower, et al., Mol. Cell Biochem, 293:103 (2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668 (2001); Levin E.R. and Frank, H.J.L., Am. J. Physiol. 30:R453-R457 (1991)].

## Sumario

55 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Con mayor detalle, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular, en el que el compuesto comprende un motivo conservado: (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)(Res 7)-(Res 8), en el que Res 1 se selecciona de fenilalanina (F), alanina (A), y leucina (L); Res 2 se selecciona de glicina (G) y lisina (K); R 3 se selecciona de glicina (G), asparagina (N), serina (S), leucina (L), y alanina (A); Res 4 es cualquier aminoácido natural; Res 5 se selecciona de leucina (L), isoleucina (I), y metionina (M); Res 6 se selecciona de serina (S), ácido aspártico (D), y arginina (R); Res 7 se selecciona de cualquier aminoácido natural; y Res 8 se selecciona de leucina (L), e isoleucina (I), y en el que cada uno de Res 1, Res 2, Res 3, Res 4, Res 5, Res 6, Res 7, y Res 8 están unidos covalente o no covalentemente al resto adyacente respectivo, y en el que el compuesto tiene menos de 20 restos, para uso en un método para tratar un trastorno de proliferación celular en un sujeto. La presente invención se refiere además a un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular, en el que el compuesto comprende cualquiera de SEC ID NOs: 21, 22, 24, 25, 30, 65 43, 61, 64, 65, 75, 81, 82, 84, 85, 87, 90, 93, 105 y 106, y en el que el compuesto tiene menos de 20 restos.

Se describen en la presente memoria, en general, compuestos que tienen actividad antiproliferativa celular, que comparten un motivo conservado, que se puede denominar como un "motivo anticanceroso" que es predictivo de actividad antiproliferativa celular (por ejemplo, anticancerosa, antineoplásica o antitumoral). Tales compuestos se pueden unir opcionalmente a NPRC, o pueden modular opcionalmente la actividad de NPRC. Estos compuestos que contienen el motivo conservado, pero que carecen de otros elementos estructurales de NPs o NPRC, pueden ser selectivos para tratar trastornos de proliferación celular (por ejemplo, cáncer, neoplasia o tumores), y pueden reducir uno o más efectos secundarios causados por otros elementos estructurales, tal como la aparición de efectos cardiovasculares u otros efectos secundarios mediados por otros NPs o NPRs.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de barras que representa la actividad antitumoral de los péptidos: arg-15-cys, Pro-15-Val, Ala-8-Leu, VDL y C-ANP4-23.

La figura 2 es una gráfica que representa la actividad antitumoral de los péptidos: arg-15-cys, Pro-15-Val, Ala-8-Leu, VDL y C-ANP 4-23.

### Descripción detallada

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Se describe en la presente memoria, en general, un motivo conservado que predice la actividad antiproliferativa celular ("motivo anticanceroso"). Por lo tanto, la descripción proporciona compuestos con el motivo conservado que tienen actividad antiproliferativa celular, así como métodos para usar tales compuestos, incluyendo, por ejemplo, métodos para tratar un trastorno de proliferación celular, métodos para diagnosticar a un sujeto que tiene una mayor probabilidad de responder al tratamiento con tales compuestos, y métodos para identificar (cribar) compuestos que tienen actividad antiproliferativa celular. Además, como se describe en la presente memoria, la estructura y especie del motivo conservado genérico en el motivo conservado genérico predice estructuras de NPs, análogos de NPs, péptidos relacionados con NPs, y miméticos de NPs de pequeña molécula, así como compuestos adicionales que tienen actividad antiproliferativa celular.

Un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular puede incluir un motivo conservado, a saber, un compuesto de ocho restos, representado (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7)-(Res 8) [Fórmula 1], en el que cada uno de los restos son contiguos y están enlazados (covalente o no covalentemente) a su resto adyacente respectivo. La cadena principal del motivo conservado puede ser una cadena lineal o cíclica, tal como una cadena peptídica o peptidomimética, típicamente una secuencia de aminoácidos, que puede comprender uno o más aminoácidos de origen natural o aminoácidos no de origen natural (incluyendo d- o l-aminoácidos, alfa-, beta- o gamma-aminoácido, etc.). Anejos al motivo conservado puede haber restos adicionales adyacentes a cualquiera de los ocho restos. Anejos a la cadena principal puede haber cadenas laterales como se expone en la presente memoria. De este modo, (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7)-(Res 8) puede tener restos adicionales (por ejemplo, aminoácidos) adyacentes a cualquiera de los restos del motivo conservado, así como cadenas laterales anejas a la cadena principal.

La supresión de un resto terminal no atenúa completamente la actividad, sino más bien la disminuye significativamente. Por ejemplo, se espera que la supresión de Res1 y Res8 de Fórmula 1 (ambos términos) disminuya proporcionalmente más la actividad, sin anularla totalmente. De este modo, un motivo conservado también incluye compuestos, péptidos y proteínas que contienen el siguiente motivo conservado anticanceroso: (Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7) [Fórmula 2]; (Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7)-(Res 8) [Fórmula 3]; y (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7) [Fórmula 4].

Cada uno de los restos (Res), mencionados en la presente memoria (como Res 1, Res 2, Res 3, Res 4, Res 5, Res 6, Res 7 y Res 8, respectivamente) se definen adicionalmente en la presente memoria a continuación, con especificidad creciente. Como será evidente, ciertas posiciones del motivo conservado permiten una variación significativa en la estructura, mientras que otras requieren que se definan más particularmente.

Res 1— es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, que tiene una cadena lateral seleccionada de una cadena lateral hidrófoba, no polar, y no ionizable, seleccionada de bencilo, alquilo, alquileo, alqueno, alquilarilo de menos de 12 átomos de carbono;

Res 2— es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, que tiene una cadena lateral que es una cadena lateral anfifílica, cadena lateral hidrófila, un zwitterión, glicina (G), lisina (K), arginina (R), glutamina (Q), y asparagina (N);

Res 3- es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter,

éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, que tiene una cadena lateral de menos de 5 miembros de longitud, excepto que cualquier anillo puede tener un tamaño de 5 o 6 miembros, y glicina (G), histidina (H) asparagina (N), serina (S), leucina (L), o alanina (A);

5 Res 4- es un enlazador de 5 o menos átomos o un aminoácido, un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo, amida, con una cadena lateral que comprende de 1 a alrededor de 12 átomos de carbono y con constituyentes en ella seleccionados de amino, hidroxilo, amido, carboxi, arilo, heteroarilo y cualquier aminoácido de origen natural;

10 Res 5- es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, que tiene una cadena lateral seleccionada de una cadena lateral hidrófoba, no polar, no ionizable, alifática, y leucina (L), isoleucina (I), valina (V), alanina (A), o metionina (M);

15 Res 6- es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, que tiene una cadena lateral polar, o aminoácidos serina (S), ácido aspártico (D), arginina (R), y ácido glutámico (E);

20 Res 7- es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, con una cadena lateral que comprende de 1 a alrededor de 12 átomos y con constituyentes en ella seleccionados de amino, hidroxilo, amido, carboxi, arilo, heteroarilo y cualquier aminoácido de origen natural;

25 Res 8- es un aminoácido o mimético del mismo, en el que la cadena principal se selecciona de un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida de 5 o menos átomos, que tiene una cadena lateral hidrófoba, no polar, y no ionizable, y aminoácidos alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), valina (V), que tiene una cadena lateral seleccionada de alquilo de C1 a C12, alquileo, y alqueno.

30 El motivo conservado, como se define en la presente memoria, comprende una "cadena principal", y una o más "cadenas laterales" anejas a la cadena principal. La expresión "cadena principal", a título de ilustración, es un péptido formado por aminoácidos de origen natural con una cadena principal de poliamida formada por alfa-aminoácidos. En la naturaleza, estos tienden a ser L-alfa-aminoácidos. Los motivos conservados, y los restos anejos a ellos, pueden incluir uno o más D-aminoácidos, y aminoácidos no naturales, y estos D-análogos, así como cualesquiera cadenas principales de aminoácidos no naturales están incluidos dentro de la definición de cadena principal. Además, en la definición de cadena principal también se incluyen beta-aminoácidos, o análogos gamma, delta o epsilon. Puesto que el motivo incluye peptidomiméticos, otros restos para imitar la cadena principal poliamídica, tales miméticos pueden proporcionar estabilidad biológica mejorada y mayor semivida en un sistema biológico (por ejemplo, un sujeto), debido, por ejemplo, a una mayor resistencia a la degradación enzimática, una mayor semivida en circulación, una mayor biodisponibilidad, una mayor eficacia, una duración prolongada del efecto, etc. Cuando se hace referencia a peptidomiméticos en uno o más de los restos, una "cadena principal" incluye, por ejemplo, un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquileo o amida, preferiblemente de 5 o menos átomos, con una "cadena lateral" aneja a la misma.

45 La expresión "cadena lateral" a título de ilustración, en un péptido de origen natural está constituida de un radical unido a la cadena principal de L-poliamida; las 20 "cadenas laterales" citadas en la bibliografía son ampliamente conocidas. Además, las cadenas laterales menos habituales que aparecen en la naturaleza, algunas de las cuales son derivados de estas cadenas laterales naturales, están incluidas en la definición de "cadena lateral". El hecho de que la cadena lateral esté unida a la cadena principal en una configuración L o D, o de que esté en una posición específica en un aminoácido alfa, beta, gamma, delta, o epsilon, es irrelevante puesto que todas están incluidas en la definición de cadena lateral. La expresión cadena lateral incluye la panoplia de funcionalidad encarnada en aminoácidos de origen natural y sus variaciones; por tanto, los radicales sulfhidrilo, sulfona, carboxi, amino, amido, hidroxilo, alquilo, alquilarilo (o heteroarilo), arilo o heteroarilo están todos ellos incluidos en esta definición. Por ejemplo, las cadenas laterales hidrófobas ejemplificativas incluyen, pero no se limitan a, bencilo, alquilo, alquileo, alqueno, alquilarilo de menos de 12 carbonos. El experto en la materia, a partir de la memoria descriptiva, comprende la amplitud y variedad en cuanto al término "cadena lateral". En lo que se refiere a los peptidomiméticos, la cadena principal tiene anejas a ella 1-3 radicales, como se define anteriormente como cadenas laterales. Típicamente, existen hasta 2 y más, típicamente una cadena lateral, por resto (por ejemplo Res 1, Res, 2, ... etc.)

60 Con el fin de ilustrar el motivo conservado, se ejemplifican en la presente memoria oligopéptidos usando aminoácidos conocidos, para ilustrar el motivo. Por ejemplo, un oligopéptido, que comprende alrededor de ocho aminoácidos, forma un motivo conservado antiproliferativo celular (anticanceroso, antineoplásico o antitumoral). Tales motivos pueden mostrar mayor actividad antiproliferativa celular mediante una mayor longitud (por ejemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 8, 19, 20, etc., o más restos). Por supuesto, se incluyen peptidomiméticos, incluyendo aminoácidos no naturales, derivados y análogos en una o más posiciones de la secuencia, ya sea dentro o fuera del motivo conservado.

## ES 2 613 031 T3

De este modo, se proporcionan en la presente memoria compuestos que tienen actividad antiproliferativa celular que tienen un motivo conservado. El motivo representado como (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7)-(Res 8) se puede definir como:

- 5 Res 1– una cadena lateral hidrófoba, no polar, y no ionizable, ilustrada mediante aminoácidos que incluyen fenilalanina (F), alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), valina (V). Las cadenas laterales ejemplificativas incluyen alquilo, alquilenilo, alquenilo, alquilarilo, y similares, típicamente de menos de 12 carbonos, más típicamente alquilo de C1-C5, o alquilo de C1-C3 con un sustituyente arílico en el mismo.
- 10 Res 2– es una cadena lateral anfífila o hidrófila, que puede incluir un zwitterión, ilustrada por aminoácidos que incluyen glicina (G), lisina (K), arginina (R), glutamina (Q), asparagina (N).

15 Res 3- es una cadena lateral de aminoácido que tiene un tamaño pequeño, típicamente una cadena de menos de 5 miembros de longitud, excepto que cualquier anillo puede tener un tamaño de 5 o 6 miembros, y más preferiblemente C1 a C3 de longitud si es alquilo, más preferiblemente C0-C2, ilustrada por aminoácidos que incluyen glicina (G), histidina (H) asparagina (N), serina (S), leucina (L), alanina (A).

20 Res 4– es un enlazador de alrededor del tamaño de un aminoácido, con una cadena lateral que puede variar de C1-C12, y tiene cualquier constituyente, como se representa por la diversidad encontrada en los 20 aminoácidos de origen natural. Como resultado, puede ser adecuado un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquilenilo o amida, con sustituyentes en él, de cualquier tamaño similar a un aminoácido.

25 Res 5- es una cadena lateral hidrófoba, no polar, no ionizable, alifática, como se ilustra mediante aminoácidos que incluyen leucina (L), isoleucina (I), valina (V), alanina (A), o metionina (M).

Res 6- es una cadena lateral polar, ilustrada por aminoácidos serina (S), ácido aspártico (D), arginina (R), y ácido glutámico (E).

30 Res 7- es un enlazador de alrededor del tamaño de un aminoácido, con una cadena ligera que puede variar de C1-C12, y tiene cualquier constituyente, como se representa por la diversidad encontrada en los 20 aminoácidos de origen natural. Como resultado, puede ser adecuado un enlazador de éter, éster, cetona, alquilo, alquilenilo o amida, con sustituyentes en él, de cualquier tamaño similar a un aminoácido.

35 Res 8- es una cadena lateral hidrófoba, no polar, y no ionizable, ilustrada por aminoácidos que incluyen alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), valina (V). Las cadenas laterales ejemplificativas serán alquilo, alquilenilo, alquenilo, y similares, típicamente de menos de 12 carbonos, más típicamente alquilo de C1-C5, o alquilo de C1-C3 con un sustituyente arílico en él.

40 Las cadenas laterales adecuadas se pueden seleccionar basándose en el tamaño, polaridad, acidez o basicidad, e hidrofobia, usando las estructuras conocidas y parámetros conocidos tales como los seleccionados e ilustrados a continuación:

AA de 1 letra	Cadena lateral	Hidrófobo	pKa	Polar	pl	pH	Aromático o alifático	Volumen de van der Waals
A	-CH <sub>3</sub>	X	-	-	6,01	-	-	67
C	-CH <sub>2</sub> SH	X	8,18	-	5,05	ácido	-	86
D	-CH <sub>2</sub> COOH	-	3,90	X	2,85	ácido	-	91
E	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-	4,07	X	3,15	ácido	-	109
F	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	X	-	-	5,49	-	Aromático	135
G	-H	-	-	-	6,06	-	-	48
H	-CH <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	-	6,04	X	7,60	básico débil	Aromático débil	118
I	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	X	-	-	6,05	-	Alifático	124
K	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	-	10,54	X	9,60	básico	-	135
L	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	X	-	-	6,01	-	Alifático	124
M	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	X	-	-	5,74	-	-	124
N	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-	-	X	5,41	-	-	96
P	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	X	-	-	6,30	-	-	90
Q	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-	-	X	5,65	-	-	114
R	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH-C(NH)NH <sub>2</sub>	-	12,48	X	10,76	fuertemente básico	-	148
S	-CH <sub>2</sub> OH	-	-	X	5,68	-	-	73
T	-CH(OH)CH <sub>3</sub>	-	-	X	5,60	ácido débil	-	93

U	-CH <sub>2</sub> SeH	X	5,73	-	-	-	
V	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	X	-		6,00	-	Alifático 105
W	-CH <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N	X	-	-	5,89	-	Aromático 163
Y	-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	-	10,46	X	5,64	-	Aromático 141

Además, también se contemplan la sustitución de uno o más aminoácidos, las alteraciones de la cadena principal para estabilidad, derivados, peptidomiméticos, y otras alteraciones.

5 Como se describe en la presente memoria, los compuestos descritos en la presente memoria que incluyen un motivo conservado pueden incluir restos adicionales (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos) adyacentes a cualquiera de los restos del motivo conservado (por ejemplo, uno cualquiera de (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)-(Res 7)-(Res 8)). Típicamente, el número de restos en un compuesto descrito en la presente memoria ascenderá a menos de aproximadamente 50 restos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos),  
10 incluyendo el motivo conservado. En diversos ejemplos particulares, el número de restos puede comprender de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 45 restos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos). Además, el número de restos puede comprender de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 30 restos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos). El número de restos puede comprender de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 25 restos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos). El número de restos también puede comprender de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 20 restos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos), o entre aproximadamente 10 a 25, 10 a 20, o 10 a 16 restos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos) de longitud.

Aunque no se pretende estar atado por ninguna teoría o mecanismo particular, el inventor ha encontrado que la  
20 unión al receptor de NPRC puede ser predictiva de actividad antiproliferativa celular (por ejemplo, anticancerosa). De este modo, aunque las especies que tienen el motivo conservado pueden ser incapaces de unirse al receptor de NPRC, típicamente aquellas que tienen el motivo conservado son capaces de unirse al receptor de NPRC, opcionalmente de forma selectiva, y más típicamente son capaces de unirse al receptor de NPRC con una afinidad de unión al receptor en el equilibrio al receptor de NPRC, determinada mediante el valor de K<sub>i</sub>, en por lo menos el  
25 intervalo micromolar.

Además, parece que el motivo conservado no requiere los restos C requeridos para una estructura anular, ni el resto R14, que se ha considerado crítico para la actividad en todos los motivos previamente identificados.

30 El motivo conservado es compartido por ANP, CNP, los péptidos relacionados con ANP LANP, KP, VDL y el análogo de ANP, cANF, todos los cuales tienen actividad anticancerosa. CNP, que es menos activo que ANP, LANP, KP o VDL, tiene una cadena lateral de aminoácido ligeramente más grande en uno de los restos del motivo (L en lugar de G, A, N o S). BNP, que es inactivo, tiene una cadena lateral incluso más grande en esta posición (K), y una que difiere en las características electrónicas. Los miméticos de ANP de pequeña molécula, que también se unen a  
35 NPRC, también tienen estructuras que son explicables en base al motivo. Por ejemplo, la eliminación del equivalente del resto R14 en una de estas moléculas no eliminó la actividad (Veale). Puesto que el motivo antiproliferativo celular conservado es significativamente diferente de los motivos de NPs descritos anteriormente, y se cree que los motivos de NPs subyacen a los efectos cardiovasculares de estos péptidos, se predice que los compuestos que contienen el motivo antiproliferativo celular sin el motivo o motivos de NPs tienen actividad antiproliferativa celular con muy pocos efectos secundarios cardiovasculares, si los tienen, de los péptidos o proteínas nativos, y por lo tanto están  
40 incluidos.

Los "restos" del motivo conservado (es decir, los aminoácidos o sus miméticos), así como sus subunidades, en esta descripción pueden ser a) de origen natural o no natural, b) producidos mediante síntesis química, c) producidos  
45 mediante tecnología de ADN recombinante, d) producidos mediante fragmentación química, bioquímica o enzimática de moléculas más grandes, e) producidos mediante métodos que resultan de una combinación de métodos a a d enunciados anteriormente, o f) producidos por cualquier otro medio para producir péptidos o secuencias de aminoácidos. Empleando la síntesis química, es posible introducir diversos aminoácidos que no aparecen de forma natural en el constructo, modificar el término N o C, y similar, proporcionando de ese modo estabilidad mejorada (en el almacenamiento o *in vivo*) y formulación mejorada, resistencia a la degradación por proteasas, etc., y es posible  
50 introducir uno o más sustitutos de aminoácidos en el constructo.

El término "péptido", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier estructura comprendida por dos o más aminoácidos, incluyendo modificaciones químicas y derivados de aminoácidos, enlazados covalentemente. Los  
55 aminoácidos que forman todo o una parte de un péptido pueden ser aminoácidos de origen natural, estereoisómeros y modificaciones de tales aminoácidos, aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados postraduccionalmente (por ejemplo, mediante glicosilación, escisión de éster o de amida, etc.), aminoácidos modificados enzimáticamente, aminoácidos con su resto de cadena lateral modificado, derivatizado de restos de origen natural, o totalmente sintetizados, o no de origen natural. El término "péptido" también incluye dímeros o multímeros de péptidos. Un péptido "fabricado" incluye un péptido producido mediante síntesis química, tecnología de ADN recombinante, fragmentación bioquímica o enzimática de moléculas más grandes, combinaciones de los anteriores, o, en general, obtenido mediante cualquier otro método que implique manipulación manual del hombre.

La expresión “resto de cadena lateral de aminoácido”, como se usa en la presente memoria, incluye cualquier cadena lateral de cualquier aminoácido, como se define en la presente memoria el término “aminoácido”. Por lo tanto, esto incluye el resto de cadena lateral presente en aminoácidos de origen natural. Incluye además restos de cadena lateral en aminoácidos de origen natural modificados, tales como restos de cadena lateral en estereoisómeros y modificaciones de aminoácidos proteicos de origen natural, aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados postraduccionalmente, aminoácidos sintetizados enzimáticamente, aminoácidos derivados, constructos o estructuras diseñados para imitar a los aminoácidos, etc. Por ejemplo, el resto de cadena lateral de cualquier aminoácido descrito en la presente memoria o conocido por un experto en la materia está incluido dentro de la definición. Un “derivado de cualquier resto de cadena lateral de aminoácido” está incluido dentro de la definición de un resto de cadena lateral de aminoácido.

El experto reconocerá que los restos de cadena lateral de aminoácidos se pueden derivar, incluyendo una modificación o variación en un resto de cadena lateral de aminoácido de origen natural o no natural, en el que la modificación o variación incluye, por ejemplo, pero no se limita a: (a) añadir uno o más átomos de carbono saturados o insaturados a una cadena de alquilo, arilo o aralquilo existente, (b) sustituir un carbono en la cadena lateral por otro átomo, preferiblemente oxígeno o nitrógeno; (c) añadir un grupo terminal a un átomo de carbono de la cadena lateral, incluyendo metilo (--CH<sub>3</sub>), metoxi (--OCH<sub>3</sub>), nitro (--NO<sub>2</sub>), hidroxilo (-OH), o ciano (--C=N); (d) para restos de cadena lateral que incluyen grupos hidroxilo, tiol o amino, añadir un grupo protector de hidroxilo, de tiol o de amino adecuado; o (e) para restos de cadena lateral que incluyen una estructura anular, añadir uno o sustituyentes anulares, incluyendo grupos hidroxilo, halógeno, alquilo, o arilo unidos directamente o a través de un enlace de éter. Para grupos amino, los grupos protectores adecuados son conocidos por el experto. Con la condición de que tal derivación proporcione actividad antiproliferativa celular en el compuesto final, todas las citadas derivaciones están incluidas en la definición de “resto de cadena lateral de aminoácido”.

Los “aminoácidos” en la presente memoria incluyen los aminoácidos proteicos de origen natural conocidos, que se citan mediante tanto su abreviatura de tres letras habitual como mediante la abreviatura de una sola letra (véase generalmente *Synthetic Peptides: A User's Guide*, G. A. Grant, editor, W.H. Freeman & Co., Nueva York (1992)). Un “aminoácido” incluye alfa-aminoácidos convencionales así como beta-aminoácidos, aminoácidos alfa,alfa-disustituidos y aminoácidos N-sustituidos, en los que al menos una cadena lateral es un resto de cadena lateral de aminoácido como se define en la presente memoria. Un “aminoácido” incluye además N-alquil alfa-aminoácidos, en los que el grupo amino del extremo N tiene un sustituyente alquilo lineal o ramificado de C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>. El término “aminoácido” incluye por lo tanto estereoisómeros y modificaciones de aminoácidos proteicos de origen natural, aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados postraduccionalmente, aminoácidos sintetizados enzimáticamente, aminoácidos derivados, constructos o estructuras diseñados para imitar aminoácidos, etc. Los aminoácidos modificados y no habituales están incluidos en los compuestos descritos en la presente memoria, y se describen generalmente, por ejemplo, en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, citado anteriormente; Hruby V. J., Al-obeidi F., Kazmierski W., *Biochem. J.* 268:249-262 (1990); y Toniolo C., *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:287 (1990).

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos y sus grupos protectores y modificadores: ácido gamma-aminobutírico, ácido 12-aminododecanoico, ácido alfa-aminoisobutírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-(aminometil)-ciclohexanocarboxílico, ácido 8-aminooctanoico, bifenilalanina, Boc-t-butoxicarbonilo, bencilo, benzoilo, citrulina, ácido diaminobutírico, pirrolisina, ácido diaminopropiónico, 3,3-difenilalanina, ortonina, citrulina, ácido 1,3-dihidro-2H-isoindolcarboxílico, etilo, Fmoc-fluorenilmetoxicarbonilo, heptanoilo (CH<sub>3</sub>--(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>--C(=O)--), hexanoilo (CH<sub>3</sub>--(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>--C(=O)--), homoarginina, homocisteína, homolisina, homofenilalanina, homoserina, metilo, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, norvalina (NVA), fenilglicina, propilo, isopropilo, sarcosina (SAR), terc-butilalanina, benciloxicarbonilo

En los compuestos descritos en la presente memoria, los restos de aminoácidos convencionales tienen su significado convencional. De este modo, “Nle” es norleucina, etc. Aunque se espera que los restos D o L sean activos y también se describen en la presente memoria, para los fines de los ejemplos, y para ahorrar espacio y tiempo en la información del Listado de Secuencias, los restos proporcionados en los ejemplos están en la configuración de isómero L, excepto que se especifique el isómero D, por ejemplo como en “D-Ala” o “D-A” para D-alanina. No obstante, se incluyen los D-aminoácidos en cualquiera o en todas las posiciones de los compuestos descritos en la presente memoria.

Un único aminoácido, incluyendo estereoisómeros y modificaciones de aminoácidos proteicos de origen natural, aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados postraduccionalmente, aminoácidos sintetizados enzimáticamente, aminoácidos no de origen natural, incluyendo aminoácidos derivados, un aminoácido alfa,alfa-disustituido derivado de cualquiera de los anteriores (es decir, un aminoácido alfa,alfa-disustituido en el que al menos una cadena lateral es la misma que la del resto del que deriva), un beta-aminoácido derivado de cualquiera de los anteriores (es decir, un beta-aminoácido que, excepto por la presencia de un carbono beta, es de otro modo el mismo que el resto del que deriva), etc., incluyendo todos los anteriores, se pueden denominar en la presente memoria como un “resto”. Los sustituyentes adecuados, además del resto de cadena lateral del alfa-aminoácido, incluyen alquilo lineal o ramificado de C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>. Aib es un ejemplo de un aminoácido alfa,alfa-disustituido. Aunque los aminoácidos alfa,alfa-disustituidos se pueden citar usando referencias L- y D-isoméricas convencionales, se ha de



entender que tales referencias son por conveniencia, y que, cuando los sustituyentes en la posición alfa son diferentes, tal aminoácido se puede citar de forma intercambiable como un aminoácido alfa,alfa-disustituido derivado del isómero L o D, según sea apropiado, de un resto con el resto de cadena lateral de aminoácido designado. De este modo, el ácido (S)-2-amino-2-metil-hexanoico se puede citar como un aminoácido alfa,alfa-disustituido derivado de L-Nle, o como un aminoácido alfa,alfa-disustituido derivado de D-Ala. De forma similar, Aib se puede citar como un aminoácido alfa,alfa-disustituido derivado de Ala. Siempre que se proporcione un aminoácido alfa,alfa-disustituido, se ha de entender que incluye todas sus configuraciones (R) y (S).

Un "aminoácido N-sustituido" incluye cualquier aminoácido en el que un resto de cadena lateral de aminoácido está enlazado covalentemente al grupo amino de la cadena principal, opcionalmente en el que no hay sustituyentes distintos de H en la posición del carbono alfa. La sarcosina es un ejemplo de un aminoácido N-sustituido. A título de ejemplo, la sarcosina se puede citar como un derivado de aminoácido N-sustituido de Ala, por cuanto el resto de la cadena lateral de aminoácido de sarcosina y de Ala es el mismo, el metilo.

El término "peptidomimético" incluye una molécula descrita en la presente memoria que es un mimo de un resto (denominado como "mimético"), incluyendo, pero sin limitarse a, moléculas centrales de piperazina, moléculas centrales de ceto-piperazina, y moléculas centrales de diazepina. Excepto que se especifique de otro modo, un mimético de aminoácido de un compuesto descrito en la presente memoria incluye tanto un grupo carboxilo como un grupo amino, y un grupo que corresponde a una cadena lateral de aminoácido, o en el caso de un mimético de glicina, ninguna cadena lateral distinta de hidrógeno.

A título de ejemplo, estos incluirían compuestos que imitan los efectos estéricos, la distribución de la carga de superficie, la polaridad, etc. de un aminoácido de origen natural, pero no necesita ser un aminoácido, que impartiese estabilidad en el sistema biológico. Por ejemplo, la prolina se puede sustituir por otras lactamas o lactonas de tamaño y sustitución adecuados; la leucina se puede sustituir por una alquil cetona, amida N-sustituida, así como variaciones en la longitud de la cadena lateral de aminoácido usando sustituyentes alquílicos, alquénílicos u otros sustituyentes, y otros pueden ser manifiestos para el experto. El elemento esencial para realizar tales sustituciones es proporcionar una molécula de aproximadamente el mismo tamaño y carga y configuración que el resto usado para diseñar la molécula. El refinamiento de estas modificaciones se hará evaluando los compuestos en un ensayo de unión o en otro ensayo, y comparando la relación de estructura con la actividad. Tales métodos están dentro del alcance del experto en la química médica y en el desarrollo de fármacos.

Se apreciará que los compuestos descritos en la presente memoria pueden tener más de un centro asimétrico, y por lo tanto son capaces de existir en más de una forma estereoisomérica. Algunos de los compuestos también pueden existir como isómeros geométricos y rotámeros. Además, algunos compuestos descritos en la presente memoria pueden tener también quiralidad axial conformacional. La descripción se extiende a cada una de estas formas individualmente o a mezclas de las mismas, incluyendo racematos. En un aspecto, los isómeros se pueden separar convencionalmente por métodos cromatográficos o mediante el uso de un agente de resolución. En otro aspecto, los isómeros individuales, o isómeros enantioméricamente puros, se preparan mediante esquemas sintéticos, tales como los descritos en la presente memoria, o variantes de tales esquemas, empleando síntesis asimétrica usando intermedios, reactivos o catalizadores quirales.

Cada extremo del motivo conservado, o cualquier péptido que comprenda el motivo conservado, se puede proteger de la degradación mediante cualquier grupo terminal. Por ejemplo, en el extremo C, un grupo terminal unido a través del átomo de carbono terminal, o, si se proporciona, grupo carboxilo terminal, del extremo C de un constructo unido a él. El átomo de carbono anular terminal, o, si se proporciona, el grupo carboxilo terminal, puede formar una parte de un resto, o puede formar una parte de un sustituto de aminoácido. Por ejemplo, el grupo de encaperuzamiento del extremo C forma una parte de un sustituto de aminoácido que está en la posición del extremo C del constructo. El grupo de encaperuzamiento del extremo C incluye, pero no se limita a,  $-(CH_2)_n-OH$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-OH$ ,  $-(CH_2)_m-OH$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-N(V_1)(V_2)$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-(CH_2)_m-N(V_1)(V_2)$ ,  $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-CH_3$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-CH_3$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-N(V_1)(V_2)$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-N-((CH_2)_m-N(V_1)(V_2))-2$ ,  $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-OH)-(CH_2)_m-N(V_1)(V_2)$ ,  $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-NH-C(=O)-CH(N(V_1)(V_2))-((CH_2)_m-N(V_1)(V_2))$ , o  $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-NH_2)-(CH_2)_m-N(V_1)(V_2)$ , incluyendo todas las configuraciones (R) o (S) de los anteriores, en el que V1 y V2 son cada uno independientemente H, una cadena de alquilo lineal o ramificado de C1 a C7, m es 0 a 7, y n es 0 a 2; o cualquier omega amino arilo o aralquilo alifático, terminal, incluyendo grupos tales como metilo, dimetilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, alilo, ciclopropanometilo, hexanoílo, heptanoílo, acetilo, propionoílo, butanoílo, fenilacetilo, ciclohexilacetilo, naftilacetilo, cinamoílo, fenilo, bencilo, benzoílo, 7'-aminoheptanoílo, otros grupos conocidos en la técnica, o cualquier alfa-aminoácido, beta-aminoácido o aminoácido alfa,alfa-disustituido individual natural o no natural, incluyendo todas las configuraciones de los anteriores, opcionalmente en combinación con cualquiera de los grupos de encaperuzamiento no de aminoácidos anteriores.

El extremo N del compuesto que incluye un motivo conservado, o un péptido que comprende el motivo, se puede proteger de la degradación mediante cualquier grupo terminal unido a través del grupo terminal unido a través de la amina terminal del extremo N de un constructo. La amina terminal puede formar una parte de un resto, o puede formar una parte de un sustituto de aminoácido. Por ejemplo, el grupo de encaperuzamiento del extremo N forma

una parte de un sustituto de aminoácido, que está en la posición del extremo N del constructo. El grupo de encaperuzamiento del extremo N incluye, pero no se limita a, cualquier grupo acilo amino alifático omega o arilo o aralquilo terminal, incluyendo grupos tales como metilo, dimetilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, alilo, ciclopropanometilo, hexanoílo, heptanoílo, acetilo, propionoílo, butanoílo, fenilacetilo, ciclohexilacetilo, naftilacetilo, cinamoílo, fenilo, bencilo, benzoílo, 7'-aminoheptanoílo, otros grupos conocidos en la técnica, o, como alternativa, un grupo de encaperuzamiento del extremo N es  $-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}(\text{V}_3)$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{--}(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{--}(\text{CH}_2)_m\text{-NH}(\text{V}_3)$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{--}(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})\text{--OH}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{--}(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})\text{--}(\text{V}_4)$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})\text{--OH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})\text{--}(\text{V}_4)$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{--}(\text{CH}_2)_m\text{-O}(\text{V}_3)$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{-O}(\text{V}_3)$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{--}(\text{CH}_2)_m\text{-S}(\text{V}_3)$ , o  $-(\text{CH}_2)_m\text{-S}(\text{V}_3)$ , en el que V3 es H o una cadena de alquilo lineal o ramificado de C1 a C17, y V4 es una cadena de alquilo lineal o ramificado de C1 a C17, y m es 0 a 17. Un anillo fenílico está "sustituido" cuando el anillo fenílico incluye uno o más sustituyentes que comprenden independientemente grupos hidroxilo, halógeno, alquilo, o arilo unidos directamente o a través de un enlace de éter. Cuando el anillo fenílico está sustituido de esta manera, el resto de aminoácido se puede citar como sustituido, como en Phe sustituido, HPhe sustituido.

Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos por un experto en la materia, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis de selección por restricción [Wells et al., Philo. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)], y otras técnicas, se pueden llevar a cabo en el ADN clonado para producir compuestos descritos en la presente memoria, o variaciones, derivados, sustituciones o modificaciones de los mismos.

También se describen en la presente memoria modificaciones covalentes del compuesto. Un tipo de modificación covalente incluye restos de aminoácidos seleccionados reactivos con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o con los restos N- o C-terminales del péptido. La derivación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el péptido a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en un método para purificar anticuerpos antipéptidos, y viceversa. Los agentes de reticulación usados habitualmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano, y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutamilo y asparaginilo a los correspondientes restos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serílicos o treonílicos, la metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)], la acetilación de la amina N-terminal, la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal, etc.

Otro tipo de modificación covalente del uno o más restos del compuesto descrito en la presente memoria incluye glicosilación. "Glicosilación" pretende significar la adición o supresión de uno o más restos de hidrato de carbono (ya sea eliminando el sitio de glicosilación subyacente o suprimiendo la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que pueden estar presentes o no en la secuencia nativa. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de hidrato de carbono presentes.

La adición de sitios de glicosilación al compuesto se puede lograr alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante adición de, o sustitución de, uno o más restos de serina o treonina (para sitios de glicosilación enlazados mediante O) o asparagina (sitio de glicosilación enlazado mediante N) al compuesto. Por supuesto, el compuesto se puede alterar opcionalmente a través de cambios al nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido peptídico en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. Otro medio para incrementar el número de restos de hidrato de carbono en el polipéptido peptídico es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido (véanse, por ejemplo, en el documento 87/05330; y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259 (1981)). La eliminación de los restos de hidrato de carbono se puede lograr química o enzimáticamente, o mediante sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Se conocen técnicas de desglicosilación química (véanse, por ejemplo, Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981)). La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas (véase, por ejemplo, Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138:350 (1987)).

Otro tipo de modificación covalente incluye el enlazamiento del compuesto a cualquiera de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos (véanse, por ejemplo, las patentes US n<sup>os</sup> 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 y 4.179.337).

Los compuestos descritos en la presente memoria también se pueden modificar para formar una molécula química. En consecuencia, también se proporcionan en la presente memoria compuestos que incluyen un dominio

heterólogo. Un dominio heterólogo puede ser una adición o inserción. Un dominio heterólogo puede consistir en una variedad de diferentes tipos de restos funcionales pequeños o grandes. Ejemplos no limitantes particulares de dominios heterólogos incluyen, por ejemplo, etiquetas, marcadores detectables y agentes citotóxicos. Tales restos incluyen péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos o compuestos orgánicos pequeños, tales como un fármaco (por ejemplo, un agente proliferativo celular), metales (oro, plata), etc.

Los ejemplos específicos de etiquetas y marcadores detectables incluyen enzimas (peroxidasa de rábano picante, ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, cloranfenicol transferasa); sustratos enzimáticos; ligandos (por ejemplo, biotina); receptores (avidina); radionúclidos (por ejemplo, C<sup>14</sup>, S<sup>35</sup>, P<sup>32</sup>, P<sup>33</sup>, H<sup>3</sup>, I<sup>125</sup>, I<sup>131</sup>, galio-67 y 68, escandio-47, indio-111, radio-223); etiquetas de T7, His, myc, HA y FLAG; reactivos densos en electrones; moléculas de transferencia de energía; marcadores paramagnéticos; fluoróforos (fluoresceína, rodamina, ficoeritrina); cromóforos; quimioluminiscentes (imidazol, luciferasa); y agentes bioluminiscentes. Los ejemplos específicos de agentes citotóxicos incluyen la toxina de la difteria, la toxina del cólera, y ricina.

Un dominio heterólogo puede comprender un péptido, polipéptido heterólogo o una secuencia de aminoácidos fusionada a un compuesto. Una molécula quimérica puede incluir una fusión del compuesto con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente el anticuerpo antietiqueta. La etiqueta epitópica está colocada generalmente al final del compuesto, por ejemplo en el extremo amino o carboxilo. Las formas etiquetadas con epítipo se pueden detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También, la etiqueta epitópica permite que el compuesto se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo antietiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epitópica. El experto en la materia conoce diversos polipéptidos etiqueta y sus anticuerpos respectivos. Como alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del compuesto con una inmunoglobulina, o con una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada como una "inmunoadhesina"), tal fusión podría ser a la región Fc de una molécula IgG.

Ejemplos adicionales de dominios heterólogos incluyen, por ejemplo, agentes antiproliferativos celulares (por ejemplo, agentes antineoplásicos, antitumorales o anticancerosos, o antimetastásicos). Los ejemplos no limitantes específicos de agentes antiproliferativos celulares se describen en la presente memoria, y son conocidos en la técnica.

Se pueden insertar secuencias enlazadoras entre el compuesto y el dominio heterólogo de manera que las dos entidades mantienen, al menos en parte, una función o actividad distinta. Las secuencias enlazadoras pueden tener una o más propiedades, que incluyen una estructura flexible, una incapacidad para formar una estructura secundaria ordenada, o un carácter hidrófobo o cargado que podría promover o interaccionar con cualquier dominio. Los aminoácidos típicamente encontrados en regiones proteicas flexibles incluyen Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, también se pueden usar en la secuencia enlazadora. La longitud de la secuencia enlazadora puede variar (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 6.087.329). Los enlazadores incluyen además agentes de reticulación y de conjugación químicos, tales como derivados de sulfo-succinimidilo (sulfo-SMCC, sulfo-SMPB), suberato de disuccinimidilo (DSS), glutarato de disuccinimidilo (DSG) y tartrato de disuccinimidilo (DST).

El término "aislado", usado como un modificador de un compuesto, significa que el compuesto se manipula o se obtiene manualmente por el hombre, o se separa de uno o más componentes adicionales en su entorno *in vivo* de origen natural. Generalmente, si tales compuestos existen de forma natural, los compuestos se separan para estar sustancialmente libres de uno o más materiales con los que normalmente se asocian en la naturaleza, por ejemplo una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, membranas celulares, etc. De este modo, un compuesto aislado está sustancialmente separado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que aparece el compuesto de forma natural, o del medio artificial en el que se produce (por ejemplo, sintéticamente o a través de cultivo celular). Por ejemplo, un polipéptido aislado está sustancialmente separado de otros polipéptidos y ácido nucleico, y no incluye una biblioteca de polipéptidos o polinucleótidos presentes entre millones de secuencias polipeptídicas o de ácidos nucleicos, tales como una biblioteca de polipéptidos, genómica o de ADNc, por ejemplo.

El término "aislado" no excluye formas físicas alternativas del compuesto, por ejemplo un péptido aislado podría incluir multímeros peptídicos, enlaces de disulfuro dentro de o con otros péptidos, modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glicosilación, fosforilación) y formas modificadas o derivadas. El término aislado tampoco está destinado a excluir compuestos descritos en la presente memoria que tienen actividad antiproliferativa celular que están presentes en un sujeto tras la administración. Tales compuestos en un sujeto pueden resultar de la administración del compuesto al sujeto, o de la conversión de una forma de profármaco en un compuesto después de que el profármaco se administre a un sujeto. De este modo, se pretende expresamente que los compuestos descritos en la presente memoria incluyan profármacos que se convierten en un compuesto descrito en la presente memoria tras la administración a un sujeto.

El término "purificado", usado como un modificador de un compuesto, se refiere a un compuesto libre de la mayoría o de todos los materiales con los que se asocia típicamente en la naturaleza. De este modo, un compuesto separado de células se considera que está purificado cuando está separado de los componentes celulares, mientras que un

compuesto sintetizado químicamente se considera que está sustancialmente purificado cuando está separado de sus precursores químicos. Por lo tanto, purificado no requiere pureza absoluta. Además, un compuesto "purificado" se puede combinar con una o más moléculas adicionales. De este modo, el término "purificado" no excluye combinaciones de compuestos.

5 Los compuestos "purificados" incluyen compuestos producidos mediante métodos de purificación estándar. El término también incluye proteínas y ácidos nucleicos producidos mediante expresión recombinante en una célula hospedante, así como síntesis química. "Purificado" también se puede referir a un compuesto en el que el nivel de contaminantes está por debajo de un nivel que es aceptable para una agencia reguladora para administración a un ser humano o animal no humano, por ejemplo la Food and Drug Administration (FDA).

10 La pureza sustancial puede ser al menos de aproximadamente 60% o más de la molécula en masa. La pureza también puede ser de aproximadamente 70% u 80% o más, y puede ser mayor, por ejemplo 90% o más. La pureza puede ser menor, por ejemplo en un vehículo farmacéutico, la cantidad de una molécula en % en peso puede ser menor que 60%, pero la proporción relativa del compuesto en comparación con otros componentes con los que normalmente está asociado será mayor. La pureza se puede determinar mediante cualquier método apropiado, incluyendo, por ejemplo, espectroscopía UV, cromatografía (por ejemplo, HPLC, fase gaseosa), electroforesis en gel (por ejemplo, tinción con plata o coomassie), y análisis de secuencia (péptido y ácido nucleico).

15 También se describen en la presente memoria métodos *in vivo*. Por ejemplo, una célula, tal como una célula que prolifera de forma indeseable, o un trastorno proliferativo celular puede estar presente en un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, un sujeto humano). Por lo tanto, un sujeto que tiene tales células se puede tratar administrando, por ejemplo, un compuesto descrito en la presente memoria, opcionalmente que se ha mostrado que se une a tales células o a NPs.

20 También se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular en un sujeto. Tales métodos se pueden poner en práctica con cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria. Un método puede incluir administrar a un sujeto una cantidad de compuesto que tiene un motivo conservado, eficaz para tratar la proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular en el sujeto.

25 Como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno hiperproliferativo", y sus variaciones gramaticales, cuando se usan en referencia a una célula, tejido u órgano, se refieren a cualquier crecimiento, proliferación, supervivencia diferenciación o fracaso para diferenciarse excesivos o anormales de una célula, tejido u órgano. Una célula hiperproliferativa representa una célula cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia es mayor que la deseada, o es anormal, según se compara con una célula normal de referencia, por ejemplo una célula que es del mismo tejido u órgano pero que no es una célula hiperproliferativa, o una célula que no se diferencia normal o completamente. Los trastornos proliferativos e hiperproliferativos celulares indeseables incluyen enfermedades y afecciones fisiológicas, tanto afecciones hiperplásicas benignas caracterizadas por números de células, crecimiento celular, proliferación celular, supervivencia o diferenciación celulares indeseables, excesivos o anormales en un sujeto. Ejemplos específicos de tales trastornos incluyen neoplasia no metastásica y metastásica, tumores y cánceres (malignidades), ya sea primarios o secundarios a la lesión primaria. Los ejemplos adicionales incluyen hiperplasia benigna (por ejemplo, marcas de la piel, mielodisplasia, lesiones precancerosas, e hipertrofia prostática benigna (BPH)), y otros trastornos no caracterizados como un tumor, cáncer o neoplasia pero que tienen rasgos de crecimiento, proliferación o supervivencia celulares anormales o indeseables, tales como fibrosis, cicatrización, quistes, psoriasis, aterosclerosis, etc.

30 Un método puede incluir administrar a un sujeto un compuesto descrito en la presente memoria en una cantidad eficaz para tratar el trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular en el sujeto. En aspectos particulares, el trastorno es una neoplasia, tumor y cáncer metastásico o no metastásico (malignidad). En aspectos adicionales, el trastorno afecta o está presente en parte al menos en mama, pulmón, glándula tiroidea, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, espina dorsal, glándula suprarrenal, glándula tiroidea, ganglios linfáticos, aparato gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleo, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), aparato genitourinario (útero, ovario, cuello uterino, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, ganglio linfático, sangre, músculo, piel, o sistema hematopoyético.

35 Los términos "tumor", "cáncer" y "neoplasia" se usan de forma intercambiable, y se refieren a una célula o población de células cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia es mayor que el crecimiento, proliferación o supervivencia de una célula homóloga normal, por ejemplo un trastorno proliferativo o diferenciador celular. Típicamente, el crecimiento es descontrolado. El término "malignidad" se refiere a la invasión de tejido cercano. El término "metástasis" se refiere a la extensión o diseminación de un tumor, cáncer o neoplasia a otros sitios, localizaciones, regiones o sistemas de órganos o tejidos en el sujeto, en cuyos sitios, localizaciones, regiones o sistemas de órganos o tejidos son distintos del tumor, cáncer o neoplasia primarios.

60 Los métodos descritos en la presente memoria también se pueden usar para reducir o inhibir el crecimiento, proliferación o supervivencia de tumor, cáncer o célula neoplásica primarios o secundarios (o cualquier lesión

posterior a la lesión primaria); para reducir o inhibir la malignidad o crecimiento o invasión del tumor, del cáncer o neoplasia al tejido cercano; para reducir o inhibir la metástasis tumoral, cancerosa o neoplásica de un tumor, cáncer o neoplasia primarios a otros sitios, regiones o sistemas, o la formación o establecimiento de tumores, cánceres o neoplasias metastásicos en otros sitios, regiones o sistemas distintos del tumor, cáncer o neoplasia primarios, inhibiendo o reduciendo de ese modo la recidiva o progresión. De este modo, los métodos descritos en la presente memoria también incluyen, entre otros, 1) reducir o inhibir el crecimiento, proliferación, supervivencia, movilidad o invasividad de un tumor, cáncer o neoplasia primarios; 2) reducir o inhibir el crecimiento, proliferación, supervivencia, movilidad o invasividad de un tumor, cáncer o neoplasia primarios que desarrolla potencialmente o con total seguridad metástasis; 3) reducir o inhibir la formación o establecimiento de metástasis que surgen de un tumor, cáncer o neoplasia primarios a uno o más sitios, localizaciones, regiones o sistemas adicionales distintos del tumor, cáncer o neoplasia primarios; 4) reducir o inhibir el crecimiento o proliferación de una metástasis en uno o más sitios, localizaciones, regiones o sistemas adicionales distintos del tumor, cáncer o neoplasia primarios después de que se haya formado o se haya establecido una metástasis; y 5) reducir o inhibir la formación o establecimiento de metástasis adicionales después de que se ha formado o establecido la metástasis.

Las neoplasias, tumores y cánceres incluyen un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia. Los cánceres ejemplificativos incluyen, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, adenocarcinoma, melanoma, trastornos neurales (blastoma, glioma), mesotelioma y trastornos reticuloendoteliales, trastornos neoplásicos linfáticos o hematopoyéticos (por ejemplo, mieloma, linfoma o leucemia). En aspectos particulares, una neoplasia, tumor o cáncer incluye un adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar, carcinoma gástrico difuso o intersticial, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de esófago, carcinoma de mama, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma ovárico, o adenocarcinoma uterino.

Las neoplasias, tumores y cánceres incluyen tipos benignos, malignos, metastásicos y no metastásicos, e incluyen cualquier etapa (I, II, III, IV o V) o grado (G1, G2, G3, etc.) de neoplasia, tumor, o cáncer, o una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis que progresa, empeora, se estabiliza, o está en remisión.

Las neoplasias, tumores y cánceres pueden surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo, pero sin limitarse a, mama, pulmón, glándula tiroidea, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, espina dorsal, glándula suprarrenal, glándula tiroidea, ganglios linfáticos, aparato gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleo, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), aparato genitourinario (útero, ovario, cuello uterino, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, ganglio linfático, sangre, músculo, piel, y el sistema hematopoyético, y se pueden metastatizar a sitios secundarios.

Una "neoplasia, tumor o cáncer sólido" se refiere a neoplasia, tumor o cáncer (por ejemplo, metástasis) que se agrega típicamente junto y forma una masa. Los ejemplos específicos incluyen tumores viscerales tales como melanomas, cánceres de mama, pancreáticos, uterinos y ováricos, cáncer testicular, incluyendo seminomas, cáncer gástrico o de colon, hepatomas, carcinomas adrenales, renales y de vejiga, cánceres de pulmón, cabeza y cuello, y tumores/cánceres del cerebro.

Los carcinomas se refieren a neoplasias del tejido epitelial o endocrino, e incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del tubo gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino, y melanomas. Unos carcinomas adicionales se pueden formar a partir del útero/cuello uterino, pulmón, cabeza/cuello, colon, páncreas, testículos, glándulas suprarrenales, riñón, esófago, estómago, hígado y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores neoplásicos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos.

El adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular, o el que el tumor forma una estructura semejante a una glándula. Los ejemplos no limitantes incluyen adenocarcinoma o un carcinoma de células escamosas, tal como un adenocarcinoma de estómago, pulmón, páncreas, colon, mama, o carcinoma de células escamosas del esófago. Otros ejemplos no limitantes incluyen un carcinoma carcinoide, carcinoma ductal invasivo, carcinoma de células germinales en cualquiera de estómago, pulmón, colon, páncreas, esófago, próstata, mama o testículos.

El melanoma se refiere a tumores neoplásicos de melanocitos y otras células derivadas de origen celular pigmentario que pueden surgir en la piel, el ojo (incluyendo la retina), u otras regiones del cuerpo.

Los sarcomas se refieren a tumores neoplásicos de origen celular mesenquimatoso. Los sarcomas ejemplificativos incluyen, por ejemplo, linfosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leiomioma, rhabdomyosarcoma y fibrosarcoma.

Las neoplasias neurales incluyen glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, oligodendrocitoma.

Los ejemplos no limitativos específicos de neoplasias, tumores y cánceres incluyen neoplasias, tumores y cánceres malignos y no malignos, y metástasis de cualquier gravedad, por ejemplo grado o etapa. En particular, carcinoma de tejido gástrico (estómago), carcinoma de células escamosas del pulmón, y adenocarcinoma de células del pulmón

de cualquier etapa (por ejemplo, etapas IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB o IV) o grado (por ejemplo, grados G1, G2 o G3).

Una "neoplasia, tumor o cáncer líquido" se refiere a una neoplasia, tumor o cáncer del sistema reticuloendotelial o hematopoyético, tal como un linfoma, mieloma, o leucemia, o una neoplasia que es de naturaleza difusa. Los ejemplos particulares de leucemias incluyen linfoblástica aguda y crónica, mieloblástica y mieloma múltiple. Típicamente, tales enfermedades surgen de leucemias agudas pobremente diferenciadas, por ejemplo leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides específicos incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML); las neoplasias linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL de estirpe B y ALL de estirpe T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Los linfomas neoplásicos malignos incluyen linfoma no de Hodgkin y variantes, linfomas periféricos de células T, leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL), linfoma de células T cutáneo (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Como se usan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratando", "tratamiento", y sus variaciones gramaticales, significan someter a un paciente individual a un protocolo, régimen, proceso o remedio, en el que se desea obtener una respuesta o resultado fisiológico en ese paciente. Puesto que cada paciente tratado puede no responder a un protocolo de tratamiento, régimen, proceso o remedio particular, el tratamiento no requiere que la respuesta o resultado fisiológico deseado se logre en todos y cada uno de los pacientes o población de pacientes. En consecuencia, un paciente o población de pacientes dada puede no responder o puede responder inadecuadamente al tratamiento.

Los métodos de administración también descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica mediante cualquier modo de administración o mediante cualquier vía, incluyendo, por ejemplo, la administración sistémica, regional y local, tal como en el sitio de un trastorno proliferativo celular. Por ejemplo, un trastorno proliferativo celular que está en o bajo la piel se puede tratar mediante inyección local, mientras que un trastorno proliferativo celular que afecta a la médula ósea puede requerir la administración sistémica. Las vías de administración ejemplificativas incluyen intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intrapleurales, transdérmica (tópica), transmucosal, intracraneal, intraespinal, intraocular, rectal, oral (vía alimentaria) y las mucosas. Las vías particulares de administración se pueden basar en parte en el tipo o localización del trastorno proliferativo celular, así como en la farmacología, biodisponibilidad, estabilidad del compuesto, etc.

Los métodos también descritos en la presente memoria incluyen, entre otros, métodos que proporcionan una mejora detectable o medible en una afección de un sujeto dado, tal como el alivio o mejora de uno o más síntomas adversos (físicos) o consecuencias asociados con la presencia de un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis, es decir, un beneficio terapéutico o un efecto beneficioso.

Un beneficio terapéutico o efecto beneficioso es cualquier mejora objetiva o subjetiva, transitoria, temporal, o a largo plazo, en el trastorno celular proliferativo, o una reducción en el comienzo, gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso asociado con o causado por un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Un criterio de valoración clínico satisfactorio de un método de tratamiento según la descripción se logra, por ejemplo, cuando hay una reducción creciente o parcial en la gravedad, duración o frecuencia de una o más patologías asociadas, efectos adversos o complicaciones, o hay una inhibición o inversión de una o más de las manifestaciones o características fisiológicas, bioquímicas o celulares del trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Por lo tanto, un beneficio terapéutico o mejora puede ser una cura, tal como la destrucción de células diana que proliferan (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis), o la eliminación de una o más, de la mayoría o de todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociados con o causados por el trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Sin embargo, un beneficio terapéutico o mejora no necesita ser una cura o destrucción completa de todas las células diana que proliferan (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis), o la eliminación de todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociados con o causados por el trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Por ejemplo, la destrucción parcial de una masa celular o de células tumorales, cancerosas o neoplásicas, o una estabilización de la masa, del tamaño o de los números celulares del tumor, cáncer o neoplasia al inhibir, ralentizar o retrasar la progresión o empeoramiento del tumor, cáncer o neoplasia, puede reducir o retrasar la mortalidad y prolongar la esperanza de vida incluso si es solamente durante unos pocos días, semanas o meses, incluso si permanece una porción o la gran parte de la masa, tamaño o células tumorales, cancerosas o neoplásicas.

Ejemplos no limitantes específicos de beneficio terapéutico incluyen una reducción en el volumen (tamaño o masa celular) del tumor, del cáncer o de la neoplasia, o de la metástasis, o en los números o proliferación de células, inhibiendo o evitando un incremento en el volumen, tamaño, masa, o números de células tumorales, cancerosas o neoplásicas (por ejemplo, estabilizando), ralentizando, retrasando o inhibiendo la malignidad de la neoplasia, tumor o cáncer, la progresión, el empeoramiento o metástasis, estimulando, induciendo o incrementando la lisis, apoptosis o diferenciación de las células tumorales, cancerosas o neoplásicas, o inhibiendo la proliferación, crecimiento o metástasis de células neoplásicas, tumorales o cancerosas. Un método también descrito en la presente memoria

5 puede no tener efecto inmediatamente. Por ejemplo, el tratamiento puede ser seguido de un incremento en el número o masa de células tumorales, cancerosas o neoplásicas, pero a lo largo del tiempo se puede producir subsiguientemente la ralentización, el retraso, la estabilización o la reducción eventuales en la masa, tamaño o número de células tumorales, cancerosas o neoplásicas en un sujeto dado tras la lisis o apoptosis celular del tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis.

10 Los síntomas adversos y complicaciones adicionales asociados con el tumor, cáncer o neoplasia y metástasis que se pueden inhibir, reducir, disminuir, retrasar o prevenir incluyen, por ejemplo, náuseas, falta de apetito, letargo, dolor y malestar. De este modo, una disminución o reducción parcial o completa en la gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso o complicación asociado con o causado por un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular, una mejora en el bienestar del sujeto, tal como una mayor energía, apetito, bienestar psicológico, son todos ellos ejemplos no limitantes particulares de beneficio terapéutico. Por lo tanto, un beneficio terapéutico o mejora también puede incluir una mejora subjetiva en la calidad de vida de un sujeto tratado.

15 Un método puede reducir o disminuir el volumen, números celulares o proliferación del tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis, puede inhibir o prevenir un incremento en el volumen, números de células o proliferación del tumor, cáncer o neoplasia, puede inhibir o retrasar la progresión o empeoramiento del tumor, cáncer o neoplasia, puede estimular la lisis, apoptosis o diferenciación de células tumorales o cancerosas, o metastásicas, o puede inhibir, reducir, disminuir o retrasar la proliferación, malignidad, crecimiento o metástasis del tumor, cáncer o neoplasia. Además, un método puede prolongar o extender la esperanza de vida del sujeto. Además, un método puede mejorar la calidad de vida del sujeto.

25 El examen de una muestra tomada por biopsia que contiene un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis (por ejemplo, muestra de sangre o de tejido) puede establecer la masa celular, el volumen o los números celulares del tumor, cáncer o neoplasia, y por lo tanto si ha ocurrido una reducción o estabilización en la masa, volumen o números de células tumorales, cancerosas o neoplásicas, o la inhibición o retraso de la proliferación, crecimiento, malignidad, metástasis o supervivencia (apoptosis) de células tumorales, cancerosas o neoplásicas. Para un tumor, cáncer o neoplasia sólidos, los métodos invasivos y no invasivos de formación de imágenes pueden averiguar el tamaño, masa, volumen o números de células. El examen de sangre o suero, por ejemplo, para determinar las poblaciones, números y tipos de células (por ejemplo, trastornos hiperproliferativos celulares hematopoyéticos), grados o etapas puede establecer si ha ocurrido una reducción o estabilización en la masa, volumen, números o el tipo, grado o etapa de las células tumorales, cancerosas o neoplásicas, o la inhibición de la proliferación, crecimiento, malignidad, metástasis o supervivencia (apoptosis) del tumor, cáncer o neoplasia.

35 Los compuestos y métodos descritos en la presente memoria se pueden combinar con cualquier otro tratamiento o terapia que proporcione un efecto deseado. En particular, son aplicables los tratamientos y terapias que se han caracterizado por tener una actividad o función antiproliferativa celular. Los tratamientos y terapias ejemplificativos incluyen agentes o fármacos que potencian la actividad antiproliferativa celular o el sistema inmunitario.

40 Los tratamientos y terapias se pueden realizar antes de, sustancialmente de forma contemporánea con cualesquiera otros métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo un trastorno antiproliferativo celular o antihiperproliferativo (por ejemplo, un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis).

45 Por lo tanto, también se proporcionan en la presente memoria métodos de combinación, en los que se usan cualesquiera de los compuestos, y formas modificadas y variantes, en combinación con cualquier régimen terapéutico, protocolo de tratamiento o composición, tal como un protocolo, agente o fármaco antiproliferativo celular expuesto en la presente memoria o conocido en la técnica. Un método puede incluir administrar un compuesto que tenga un motivo conservado, y un tratamiento, agente o fármaco antiproliferativo celular o que potencie el sistema inmunitario. El tratamiento, agente o fármaco antiproliferativo celular o que potencie el sistema inmunitario se puede administrar antes de, sustancialmente de forma contemporánea con, o tras la administración del compuesto.

50 Como se usa en la presente memoria, un tratamiento, terapia, actividad o efecto "antiproliferativo celular", "antineoplásico", "antitumoral", o "anticanceroso" significa cualquier terapia, régimen de tratamiento, agente, fármaco, protocolo o procedimiento que sea útil para tratar patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas con o causados por proliferación celular (hiperproliferación) anormal o indeseable, un trastorno hiperproliferativo celular, un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis. Las terapias, regímenes de tratamiento, agentes, fármacos, protocolos o procedimientos particulares pueden inhibir, disminuir, ralentizar, reducir, retrasar o prevenir la proliferación celular, el crecimiento celular, la hiperproliferación, el crecimiento, proliferación, supervivencia, malignidad o metástasis del tumor, cáncer o neoplasia (maligna). Tales tratamientos, terapias, regímenes, protocolos, agentes y fármacos pueden operar interrumpiendo, reduciendo, inhibiendo o retrasando la proliferación del ciclo celular o la proliferación o crecimiento celular; incrementando, estimulando o potenciando la apoptosis, la lisis, muerte o diferenciación celulares; inhibiendo la síntesis o el metabolismo de ácidos nucleicos o de proteínas; reduciendo, disminuyendo, inhibiendo o retrasando la división celular; o disminuyendo, reduciendo o inhibiendo la supervivencia celular, o la producción o utilización de un factor de supervivencia celular, factor de crecimiento o ruta de señalización (extracelular o intracelular).

Los ejemplos de tratamientos y terapias antiproliferativos celulares incluyen quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia (ionizante o química), terapia térmica (hipertermia) local o regional, y resección quirúrgica.

5 Las clases no limitativas específicas de agentes y fármacos antiproliferativos celulares incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, extractos vegetales, alcaloides vegetales, nitrosoureas, hormonas (esteroides), análogos nucleosídicos y nucleotídicos. Los ejemplos no limitativos específicos de toxinas microbianas incluyen la toxina bacteriana del cólera, toxina de pertussis, toxina del ántrax, toxina de la difteria y la toxina vegetal ricina. Ejemplos específicos de fármacos incluyen ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, melfalano, clorambucilo, mecloretamina, busulfano, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, 5-fluorouracilo, 5-fluorouridina, arabinósido de  
 10 citosina, AZT, 5-azacitidina (5-AZC) y compuestos relacionados con 5-azacitidina, bleomicina, actinomicina D, mitramicina, mitomicina C, carmustina, caliqueamicina, lomustina, semustina, estreptoizotocina, tenipósido, etopósido, hidroxiaurea, cisplatino, carboplatino, levamisol, mitotano, procarbazona, dacarbazina, taxol, vinblastina, vincristina, vindesina, doxorubicina, daunomicina y dibromomanitol. Ejemplos no limitativos específicos de  
 15 hormonas incluyen prednisona, prednisolona, dietilestilbestrol, flutamida, leuprolida, y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina.

La radioterapia incluye el suministro interno o externo a un sujeto. Por ejemplo, los rayos alfa, beta, gamma y X se pueden administrar a un sujeto de forma externa sin que el sujeto internalice o de otro modo entre en contacto físicamente con el radioisótopo. Los ejemplos específicos de dosis de rayos X oscilan desde dosis diarias de 50 a  
 20 200 roentgens para períodos prolongados de tiempo (3 a 5/semana) hasta dosis individuales de 2000 a 6000 roentgens. Las dosis pueden variar ampliamente, y dependen de la duración de la exposición, del período de semidesintegración del isótopo, del tipo de radiación emitida, del tipo celular y localización tratada, y de la etapa progresiva de la enfermedad. Los ejemplos no limitantes específicos de radionúclidos incluyen, por ejemplo, <sup>47</sup>Sc  
 25 <sup>67</sup>Cu, <sup>72</sup>Se, <sup>88</sup>Y, <sup>90</sup>Sr, <sup>90</sup>Y, <sup>97</sup>Ru, <sup>99</sup>Tc, <sup>105</sup>Rh, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>149</sup>Tb, <sup>153</sup>Sm, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>194</sup>Os, <sup>203</sup>Pb, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>212</sup>Pb, <sup>223</sup>Ra, <sup>225</sup>Ac, <sup>227</sup>Ac, y <sup>228</sup>Th.

Los anticuerpos que se unen a células tumorales, cancerosas o neoplásicas son un ejemplo particular de un tratamiento o terapia antiproliferativa celular. Los anticuerpos antitumorales incluyen, por ejemplo, el anticuerpo M195 que se une al antígeno de las células de leucemia CD33 (patente U.S. nº 6.599.505; el anticuerpo monoclonal DS6, que se une al antígeno asociado al tumor de carcinoma ovárico CA6 (patente U.S. nº 6.596.503); el anticuerpo monoclonal IBD12 humano, que se une al antígeno de la superficie de células epiteliales H (patente U.S. nº 4.814.275); y el anticuerpo BR96, que se une al epítipo de hidratos de carbono Le<sup>x</sup> expresado por carcinomas de colon, mama, ovario y pulmón. Otros anticuerpos antitumorales, anticancerosos o antineoplásicos que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, Herceptina (anticuerpo anti-Her-2 neu), Rituxan®, Zevalina, Bevacizumab (Avastina), Bexxar, Campath®, Oncolym, 17-1A (Edrecolomab), 3F8 (anticuerpo antineuroblastoma), MDX-CTL4, IMC-C225 (Cetuximab) y Mylotarg.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “que potencia el sistema inmunitario”, cuando se usa en referencia a un tratamiento, terapia, agente o fármaco, significa que el tratamiento, terapia, agente o fármaco proporciona un incremento, estimulación, inducción o promoción de una respuesta inmunitaria, humoral o mediada por células. Tales terapias pueden potenciar en general la respuesta inmunitaria, o pueden potenciar la respuesta inmunitaria hacia una diana específica, por ejemplo un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular tal como un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis.

45 Los ejemplos no limitativos específicos de agentes que potencian el sistema inmunitario incluyen anticuerpos, factores de crecimiento celular, factores de supervivencia celular, factores de diferenciación de células, citocinas y quimiocinas. Los ejemplos adicionales de agentes y tratamientos que potencian el sistema inmunitario incluyen células inmunitarias tales como linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, células NK y células B que expresan un anticuerpo frente al trastorno proliferativo celular, o de otro modo que es probable que monten una respuesta inmunitaria frente a un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tumor, cáncer o neoplasia). Las citocinas que potencian o estimulan la inmunogenicidad incluyen IL-2, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-7, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , y TNF $\beta$ , que también son ejemplos no limitantes de agentes que potencian el sistema inmunitario. Las quimiocinas que incluyen MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, SDF-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina, eotaxina-2, I-309/TCA3, ATAC, HCC-1, HCC-2, HCC-3, PARC, TARC, LARC/MIP-3 $\alpha$ , CK $\beta$ , CK $\beta$ 6, CK $\beta$ 7, CK $\beta$ 8, CK $\beta$ 9, CK $\beta$ 11, CK $\beta$ 12, C10, IL-8, ENA-78, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GCP-2, PBP/CTAPIII $\beta$ -TG/NAP-2, Mig, PBSF/SDF-1, y linfotactina, son otros ejemplos no limitantes de agentes que potencian el sistema inmunitario.

60 Los métodos descritos en la presente memoria también incluyen, entre otros, métodos que dan como resultado una necesidad o uso reducidos de otro tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, procedimiento o remedio. Por ejemplo, para un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis, un método descrito en la presente memoria tiene un beneficio terapéutico si en un sujeto dado da como resultado una dosis menos frecuente o reducida o la eliminación de un tratamiento o terapia antiproliferativa celular (por ejemplo, antineoplásica, antitumoral o anticancerosa) o que potencia el sistema inmunitario, tal como un fármaco quimioterapéutico, radioterapia, inmunoterapia, o cirugía para  
 65 el tratamiento o terapia de tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis.



Según la descripción, también se proporcionan en la presente memoria métodos para reducir la necesidad o uso de un tratamiento o terapia antiproliferativa celular (por ejemplo, antineoplásica, antitumoral, anticancerosa o antimetastásica). Un método puede incluir administrar a un sujeto un compuesto descrito en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis), y para reducir o eliminar la necesidad de una terapia antiproliferativa celular (antineoplásica, antitumoral o anticancerosa, o antimetastásica) o que potencia el sistema inmunitario. Los métodos se pueden llevar a cabo antes de, sustancialmente de forma contemporánea con, o tras la administración de una terapia antitumoral, anticancerosa o antineoplásica o antimetastásica, o una terapia que potencia el sistema inmunitario.

Las dosis o "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente", en un método de tratamiento o terapia, es una cantidad en la que existe un efecto deseado, tal como un beneficio terapéutico o mejora, que incluye, por ejemplo, cualquier alivio o mejora objetiva o subjetiva de una, de varias o de todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociados con o causados por la diana (por ejemplo, trastorno proliferativo celular), hasta un grado medible o detectable, aunque la prevención, inhibición o retraso de una progresión o empeoramiento de la patología, síntoma adverso o complicación diana (por ejemplo, trastorno proliferativo celular) es un resultado satisfactorio. De este modo, en el caso de un trastorno proliferativo celular, la cantidad será deseablemente suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto dado, o para aliviar o mejorar una patología, síntoma adverso o complicación del trastorno proliferativo en un sujeto dado. La dosis se puede incrementar o reducir proporcionalmente como se indica mediante el estado de tratamiento o la diana particular (por ejemplo, trastorno proliferativo celular) o cualquier efecto o efectos secundarios del tratamiento o terapia.

Las cantidades (dosis) no limitativas ejemplificativas están en un intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, y cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de tales intervalos. Se pueden administrar cantidades (dosis) mayores o menores, por ejemplo 0,01-500 mg/kg, y cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de tales intervalos. Cantidades (dosis) no limitativas ejemplificativas adicionales oscilan de aproximadamente 0,5-50 mg/kg, 1,0-25 mg/kg, 1,0-10 mg/kg, y cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de tales intervalos.

Los métodos también descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica una o más veces (por ejemplo, 1-10, 1-5 o 1-3 veces) por día, semana, mes, o año. El experto sabrá cuándo es apropiado modificar un régimen de administración, tal como para incrementar, o para reducir, retrasar o discontinuar la administración. Un calendario de dosificación no limitativo ejemplificativo es 1-7 veces por semana, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más semanas, y cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de tales intervalos.

Por supuesto, como es típico para cualquier tratamiento o terapia, sujetos diferentes mostrarán respuestas diferentes al tratamiento, y algunos pueden no responder o pueden responder inadecuadamente a un protocolo, régimen o proceso de tratamiento particular. Las cantidades eficaces o suficientes dependerán por lo tanto al menos en parte del trastorno tratado (por ejemplo, proliferación celular, hiperplasia benigna, o un tumor, cáncer o neoplasia, y el tipo, grado o etapa, por ejemplo el grado tumoral, de cáncer o de neoplasia, y si está avanzado, es de etapa tardía o temprana), del efecto terapéutico deseado, así como del sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad en el sujeto, género, edad, etc.) y de la respuesta del sujeto al tratamiento basado en una variación genética y epigenética (por ejemplo, farmacogenómica).

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan en la presente memoria de forma intercambiable, y se refieren a animales, típicamente mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (gorila, chimpancé, orangután, macaco, gibón), animales domésticos (perro y gato), animales de granja y de rancho (caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo), animales de laboratorio y experimentales (ratón, rata, conejo, cobaya). Los sujetos incluyen modelos de animales de enfermedad (por ejemplo, tales como ratones, ratas y primates no humanos) para estudiar la eficacia *in vivo* (por ejemplo, un modelo de animal de tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis). Los sujetos humanos incluyen niños, por ejemplo neonatos, lactantes, bebés más crecidos y adolescentes, entre las edades de 1 y 5, 5 y 10 y 10 y 18 años, adultos jóvenes entre las edades de 18 y 25, adultos entre 25 y 60 años, y ancianos, por ejemplo entre las edades de 60 y 65, 65 y 70 y 70 y 100 años.

Los sujetos incluyen mamíferos (por ejemplo, seres humanos) que necesitan tratamiento, es decir, tienen proliferación celular indeseable o aberrante (hiperproliferación celular) o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis). Los sujetos también incluyen aquellos en riesgo de tener proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo celular. Los sujetos incluyen además un sujeto que necesita un tratamiento o terapia antiproliferativo celular o que potencia el sistema inmunitario, debido a un diagnóstico clínico o de laboratorio que garantiza tal tratamiento, sujetos que sufren terapia antiproliferativa celular o potenciadora del sistema inmunitario, y sujetos que han sufrido una terapia o tratamiento antiproliferativo celular o que potencia el sistema inmunitario y están en riesgo de recaída o reaparición, incluyendo un sujeto que está en remisión para un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tumor, cáncer o neoplasia) pero que puede estar en riesgo de recaída.

Los sujetos en riesgo incluyen aquellos con historia familiar, predisposición genética, o aquellos que han sufrido una

aflicción previa con un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular (por ejemplo, una hiperplasia benigna, un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis), y están en riesgo de recaída o reaparición. Los sujetos en riesgo incluyen además exposición medioambiental a cardinógenos o mutágenos, tales como fumadores, o aquellos en un marco ocupacional (industrial, químico, agrícola). Tales sujetos en riesgo para desarrollar un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular tal como tumor, cáncer o neoplasia se pueden identificar con cribados genéticos para genes asociados a tumor, supresiones génicas o mutaciones génicas. Por ejemplo, los sujetos que carecen de *Brca 1* están en riesgo de desarrollar cáncer de mama. Por ejemplo, los sujetos en riesgo de desarrollar cáncer de colon tienen genes supresores de tumores mutados o suprimidos, tal como poliposis coli adenomatosa (*APC*). Los sujetos en riesgo que tienen predisposición genética particular a trastornos proliferativos celulares son conocidos por el experto (véanse, por ejemplo, *The Genetic Basis of Human Cancer 2ª ed.* por Bert Vogelstein (Editor), Kenneth W. Kinzler (Editor) (2002) McGraw-Hill Professional; *The Molecular Basis of Human Cancer*. Editado por WB Coleman y GJ Tsongalis (2001) Humana Press; y *The Molecular Basis of Cancer*. Mendelsohn et al., WB Saunders (1995)).

Los sujetos en riesgo se pueden tratar por lo tanto a fin de inhibir o reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular, o tras haber sido curados o tratados para un trastorno proliferativo celular, que sufren una recaída o reaparición del mismo trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular (por ejemplo, un tumor, cáncer o neoplasia), o uno diferente. El resultado de tal tratamiento puede ser reducir el riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular, o prevenir un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular, o una patología, síntoma adverso o complicación del mismo en el sujeto en riesgo tratado.

También se proporcionan en la presente memoria kits, que incluyen compuestos descritos en la presente memoria, formas modificadas y variantes, y formulaciones farmacéuticas, envasados en un material de envase adecuado, opcionalmente en combinación con instrucciones para usar los componentes del kit, por ejemplo instrucciones para llevar a cabo un método descrito en la presente memoria. Un kit puede incluir un compuesto descrito en la presente memoria, y las instrucciones son para tratar proliferación o hiperproliferación celular indeseable, o un trastorno hiperproliferativo. En un aspecto, las instrucciones son para tratar un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis. En otro aspecto, un kit incluye además un tratamiento, agente o fármaco antiproliferativo celular o que potencia el sistema inmunitario. En aspectos particulares, un kit incluye un agente antineoplásico, anticanceroso o antitumoral. En todavía otros aspectos, un kit incluye un artículo de fabricación, por ejemplo un artículo de fabricación para suministrar el compuesto, el tratamiento, agente o fármaco antiproliferativo celular o que potencia el sistema inmunitario a un sujeto en el sitio de la lesión, o localmente, regionalmente o sistémicamente.

La expresión "material de envase" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envase puede mantener los componentes de forma estéril, y puede estar hecho de material usado habitualmente para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, hoja metálica, ampollas, etc.). La etiqueta o inserto de envasado puede incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo para practicar un método descrito en la presente memoria, por ejemplo para tratar un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular, un ensayo para el cribado de, para detectar o identificar un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular. De este modo, un kit puede incluir una etiqueta o inserto de envase que incluye instrucciones para poner en práctica un método descrito en la presente memoria en disolución, *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Por lo tanto, las instrucciones pueden incluir instrucciones para practicar cualquiera de los métodos también descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden incluir en un recipiente, envase, o dispensador, junto con instrucciones para la administración a un sujeto, para tratar un trastorno proliferativo o hiperproliferativo celular, tal como un tumor, cáncer o neoplasia, o metástasis. Las instrucciones pueden incluir adicionalmente indicaciones de un criterio de valoración clínico satisfactorio o cualesquiera síntomas o complicaciones adversas que puedan aparecer, información sobre el almacenamiento, fecha de caducidad, o cualquier información requerida por las agencias reguladoras, tales como la Food and Drug Administration, para uso en un sujeto humano.

Las instrucciones pueden ser sobre "materia impresa", por ejemplo sobre papel o cartón en el kit, sobre una etiqueta fijada al kit o material de envase, o unidas a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender cinta de audio o de vídeo, y adicionalmente se pueden incluir en un medio legible por ordenador, tal como un disco (disco duro), CD óptico, tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM, e híbridos de tales medios de almacenamiento magnético/óptico.

Los kits descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente un agente amortiguador, un conservante, o un agente estabilizante. El kit también puede incluir componentes de control para ensayar la actividad, por ejemplo una muestra de control o un patrón. Cada componente del kit se puede introducir en un recipiente individual, o en una mezcla, y todos los diversos recipientes pueden ser envases individuales o múltiples.

Los compuestos descritos en la presente memoria, y otras composiciones y métodos descritos en la presente memoria, se pueden incluir o se pueden emplear en formulaciones farmacéuticas. Tales formulaciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento de, o la administración o suministro a, un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes o excipientes "farmacéuticamente aceptables" y

“fisiológicamente aceptables”. Como se usan en la presente memoria, las expresiones “farmacéuticamente aceptables” y “fisiológicamente aceptables” incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), disoluciones, emulsiones, medios de dispersión, revestimientos, agentes que promueven o retrasan la absorción e isotónicos, compatibles con la administración farmacéutica. Tales formulaciones pueden estar contenidas en una forma líquida, en emulsión, suspensión, jarabe o elixir, o en forma sólida, en comprimido (recubierto o no recubierto), en cápsula (dura o blanda), en polvo, gránulo, cristal, o microperla. También se pueden incorporar en las formulaciones componentes suplementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antiviricos y antifúngicos).

Las formulaciones farmacéuticas se pueden obtener para que sean compatibles con la administración o modo de suministro o ruta local, sistémica regional, o sistémica tisular u orgánica particular. De este modo, las formulaciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes o excipientes adecuados para la administración mediante rutas particulares. Los ejemplos no limitantes específicos de rutas de administración para composiciones descritas en la presente memoria son parenteral, por ejemplo intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intrapleural, transdérmica (tópica), transmucosal, intracraneal, intraespinal, intraocular, rectal, oral (alimentaria), por las mucosas, y cualquier otra formulación adecuada para el método de tratamiento o protocolo de administración.

Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral pueden incluir: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para ajustar la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico.

Las formulaciones farmacéuticas para inyección incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones, y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similar), y sus mezclas adecuadas. La fluidez se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Se pueden incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La inclusión de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina, puede prolongar la absorción de composiciones inyectables.

Las formulaciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes anteriores. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen, por ejemplo, el secado a vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución preparada previamente del mismo.

Para la administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan agentes de penetración apropiados a la barrera a permear. Tales agentes de penetración son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr a través del uso de pulverizaciones nasales, dispositivos de inhalación (por ejemplo, aspiradores) o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles, cremas o parches.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar con vehículos que protegen frente a la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada o un material de retraso en el tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo. Las formulaciones también se pueden suministrar usando artículos de fabricación tales como implantes y sistemas de suministro microencapsulados, para lograr el suministro local, regional o sistémico o la liberación controlada o sostenida.

Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, polioctoésteres, y poliácido láctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation (Palo Alto, CA). También se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células o tejidos usando anticuerpos o proteínas de la cubierta vírica). Éstas se pueden preparar según métodos conocidos, por ejemplo como se describe en la patente US nº 4.522.811.

Las formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración son conocidas en la técnica (véase,

por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999); Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3ª ed. (2000); y Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993).

Los compuestos usados según la descripción, incluyendo formulaciones farmacéuticas, se pueden envasar en una forma unitaria de dosificación por facilidad de administración y uniformidad de la dosis. "Forma unitaria de dosificación", como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como un tratamiento de dosificación unitaria; cada unidad contiene una cantidad del compuesto en asociación con el portador, excipiente, diluyente, o vehículo, calculada para producir un tratamiento o efecto terapéutico (por ejemplo, beneficioso) deseado. Las formas de dosificación unitarias dependerán de una variedad de factores, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, el compuesto particular empleado, el efecto a lograr, y la farmacodinámica y farmacogenómica del sujeto a tratar.

Según la descripción, también se proporcionan en la presente memoria métodos para identificar un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular, así como métodos para medir la actividad antiproliferativa celular de un compuesto. Un método puede incluir cribar un compuesto para la inhibición de la proliferación celular (por ejemplo, una célula tumoral, cancerosa o neoplásica). Un compuesto que se determina que inhibe la proliferación celular es un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular. Un método también puede incluir cribar un compuesto para la unión a NPRC o para la activación de NPRC. Un compuesto que se determina que se une a NPRC o que activa NPRC es un compuesto que tiene actividad antiproliferativa celular.

A fin de calcular, evaluar o identificar un compuesto dado para la actividad antiproliferativa celular o una cantidad de actividad antiproliferativa celular, se puede usar una variedad de ensayos. Por ejemplo, se puede medir la toxicidad y viabilidad celulares (apoptosis celular, lisis, crecimiento, proliferación, etc.) en base a ensayos colorimétricos, luminiscentes, radiométricos, o fluorométricos, conocidos en la técnica. Para determinar la viabilidad celular, se pueden usar técnicas colorimétricas, por ejemplo la exclusión con Azul de Tripán. De forma breve, las células se tiñen con Azul de Tripán y se cuentan usando un hemocitómetro. Las células viables excluyen el colorante, mientras que las células muertas y que mueren absorben el colorante azul y se distinguen fácilmente bajo un microscopio óptico. El Rojo Neutro es adsorbido por células viables y concentrados en lisosomas celulares; las células viables se pueden determinar con un microscopio óptico cuantificando los números de células teñidas con Rojo Neutro.

Las técnicas fluorométricas para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, yoduro de propidio, un agente intercalante de ADN fluorescente. El yoduro de propidio es excluido de las células viables, pero tiñe el núcleo de las células muertas. Entonces se puede usar citometría de flujo de células marcadas con yoduro de propidio para cuantificar las células viables y las células muertas. La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) indica daño estructural y muerte de las células, y se puede medir mediante ensayo enzimático espectrofotométrico. La bromodesoxiuridina (BrdU) se incorpora en ADN recientemente sintetizado, y se puede detectar con un anticuerpo marcado con fluorocromo. El colorante fluorescente Hoechst 33258 marca AND, y se puede usar para cuantificar la proliferación de células (por ejemplo, citometría de flujo). La incorporación cuantitativa del colorante fluorescente éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE o CFDA-SE) puede proporcionar análisis sobre la división celular (por ejemplo, citometría de flujo). Esta técnica se puede usar ya sea *in vitro* o *in vivo*. La 7-aminoactinomicina D (7-AAD) es un intercalador fluorescente que sufre un desplazamiento espectral al asociarse con ADN, y puede proporcionar análisis sobre la división celular (por ejemplo, citometría de flujo).

Las técnicas radiométricas para averiguar la proliferación celular incluyen, por ejemplo, [<sup>3</sup>H]-timidina, que se incorpora en ADN recientemente sintetizado de células vivas y se usa frecuentemente para determinar la proliferación de las células. La liberación de cromo (<sup>51</sup>Cr) a partir de células muertas se puede cuantificar mediante recuento por centelleo, a fin de cuantificar la viabilidad celular.

Las técnicas luminiscentes para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega Madison WI). Esta técnica cuantifica la cantidad de ATP presente, para determinar el número de células viables.

Los kits comercialmente disponibles para determinar la viabilidad celular y la proliferación celular, y por lo tanto el grado de actividad antiproliferativa celular de un compuesto descrito en la presente memoria, incluyen, por ejemplo, Cell Proliferation Biotrak ELISA (Amersham Biosciences Piscataway, NJ); el Guava ViaCount™ Assay, que proporciona recuentos rápidos de células y determinación de la viabilidad en base a la captación diferente de reactivos fluorescentes (Guava Technologies, Hayward, CA); el CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); y el Cytolux Assay Kit (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA). El DELFIA® Assay Kits (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) puede determinar la proliferación y viabilidad celulares usando un método fluorométrico resuelto en el tiempo. El Quantos™ Cell Proliferation Assay es un ensayo a base de fluorescencia que mide la fluorescencia de un complejo de ADN-colorante de células lisadas (Stratagene, La Jolla, CA). El ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo es un ensayo luminiscente para medir la viabilidad celular (Promega, Madison WI).

El término “poner en contacto”, cuando se usa haciendo referencia a una composición, tal como un compuesto (por ejemplo, un compuesto con un motivo conservado que tiene actividad antiproliferativa celular), material, muestra, o tratamiento, significa una interacción directa o indirecta entre el compuesto y la otra entidad citada como referencia. Un ejemplo particular de interacción directa es la unión. Un ejemplo particular de una interacción indirecta es cuando el compuesto actúa sobre una molécula intermedia, que a su vez actúa sobre la entidad citada como referencia. De este modo, por ejemplo, poner en contacto una célula (por ejemplo, que comprende un trastorno proliferativo celular) con un compuesto descrito en la presente memoria incluye permitir que el compuesto se una a la célula, o permitir que el compuesto actúe sobre un intermedio (por ejemplo, receptor), que a su vez actúa sobre la célula.

También se proporcionan en la presente memoria métodos libres de células (por ejemplo, en disolución, en fase sólida) o basados en células (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*) para diagnosticar a un sujeto que tiene o que tiene mayor probabilidad de responder al tratamiento con un compuesto descrito en la presente memoria. Un método puede incluir cribar un sujeto en busca de la presencia de una célula (por ejemplo, una célula de un trastorno proliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis) que se une al compuesto. Los métodos se pueden llevar a cabo usando material o muestra biológica, por ejemplo una biopsia de células sospechosas que puede comprender o ser indicativa de células, tejido u órgano neoplásicos, tumorales o cancerosos, o metastásicos. En un aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano). Los métodos también se pueden llevar a cabo *in vivo*, por ejemplo en un animal.

Los ensayos de identificación, detección, cribado y de diagnóstico también descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica mediante análisis de una muestra biológica, tal como células proliferantes sospechosas, por ejemplo una célula de un trastorno proliferativo celular. Las células incluyen estirpes celulares hiperproliferantes, inmortalizadas, neoplásicas, tumorales y cancerosas, y aislados primarios derivados de mama, pulmón, glándula tiroidea, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, espina dorsal, glándula suprarrenal, glándula tiroidea, ganglios linfáticos, aparato gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleo, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), aparato genitourinario (útero, ovario, cuello uterino, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, ganglio linfático, sangre, músculo, piel, y el sistema hematopoyético, y sitios de metástasis o secundarios.

Los términos “ensayar” y “medir”, y sus variaciones gramaticales, se usan en la presente memoria de forma intercambiable, y se refieren a determinaciones cualitativas o cuantitativas, o determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas. Cuando los términos se usan en referencia a la actividad (por ejemplo, actividad antiproliferativa celular o anticancerosa), se contempla cualquier medio de evaluación de la actividad relativa, incluyendo los diversos métodos expuestos en la presente memoria y conocidos en la técnica.

Según la descripción, también se proporcionan en la presente memoria métodos para producir compuestos descritos en la presente memoria. Un método puede incluir transformar una célula hospedante con un ácido nucleico que codifica un compuesto, y cultivar la célula hospedante en condiciones que permitan la expresión del compuesto codificado, y opcionalmente aislar o purificar el compuesto a partir de las células transformadas.

De este modo, también se proporcionan en la presente memoria células hospedantes que expresan compuestos como se describen en la presente memoria. Una célula hospedante transformada con un ácido nucleico que codifica un compuesto que tiene un motivo conservado que tiene actividad antiproliferativa celular puede expresar el compuesto.

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado como se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que se refiere esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, se describen en la presente memoria los métodos y materiales adecuados.

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “y”, y “el” incluyen los referentes plurales excepto que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a un “compuesto” o un “péptido” o “mimético” incluye una pluralidad de compuestos, péptidos o miméticos, y la referencia a “un tratamiento o terapia” puede incluir múltiples tratamientos o terapias simultáneos, consecutivos o secuenciales, etc.

Como se usa en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros dentro o que engloban tales intervalos y fracciones de los valores, o los números enteros dentro o que engloban intervalos, excepto que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 8 a 50, incluye cualquier valor numérico o intervalo en o que engloba tales valores, tal como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, etc.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones. Por ejemplo, los siguientes ejemplos no limitativos incluyen métodos para averiguar el motivo antiproliferativo celular para la actividad, así como describen un número limitado de péptidos y métodos de uso ejemplificativos. Estas composiciones y métodos de tratamiento ejemplificativos no limitan la invención, sino que

proporcionan una guía general para preparar y usar los compuestos, composiciones y métodos de la invención.

Por lo tanto, los estudios en la presente memoria no deberían de ser interpretados como específicamente limitativos de la invención.

5 Las marcas registradas usadas en la presente memoria son ejemplos solamente, y reflejan materiales ilustrativos usados en el momento de la invención. Por tanto, los ejemplos, y las marcas registradas usadas en ellos, no son limitativos, y no están destinados a ser limitativos, sino que son únicamente una ilustración de cómo un experto puede elegir para llevar a cabo una o más de las formas de realización de la invención.

10

## Ejemplos

### Ejemplo 1

15 Este ejemplo describe un método general para producir péptidos, proteínas, fragmentos y miméticos que incluyen un motivo antiproliferativo celular (por ejemplo, anticanceroso).

20 Los fragmentos peptídicos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos peptídicos mediante digestión enzimática, por ejemplo tratando la proteína con una enzima que escinde proteínas en sitios definidos mediante restos de aminoácidos particulares. Otro enfoque alternativo implica metodología genética. Tales técnicas incluyen la expresión de todo o una parte del gen que codifica el compuesto en una célula hospedante, tal como una célula de mamífero, células HeLa o Cos, o *E. coli*. Tales células hospedantes pueden expresar la longitud completa o un fragmento, por ejemplo un scFv (véanse, por ejemplo, Whitlow et al., en: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991), Bird et al., Science 242:423 (1988); y la patente U.S. n° 4.946.778). Por ejemplo, digiriendo un ADN que codifica un compuesto peptídico con una enzima de restricción adecuada, y aislando el fragmento deseado e insertándolo en un vector para la expresión celular del compuesto peptídico codificado. Aún otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento polipeptídico deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR.

30

35 Al preparar un péptido, se pueden realizar variaciones usando métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis (dirigida al sitio) mediada por nucleótidos, barrido de alanina, y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis de selección por restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)], u otras técnicas conocidas se pueden llevar a cabo sobre el ADN clonado para producir el ADN variante.

### Ejemplo 2

40 Este ejemplo describe datos que indican que dos péptidos ejemplificativos con un motivo conservado tienen actividad celular anticancerosa. Este ejemplo también incluye una descripción de un ensayo ejemplificativo a base de células para averiguar la actividad antiproliferativa celular.

45 Las células de adenocarcinoma pancreático humano (HPAC) se obtuvieron de ATCC y se propagaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio F12 de Ham (DME-F12) (1:1) que contiene 2,5 mM de glutamina, 2 mg/ml de insulina, 5 ug/ml de transferrina, 1 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico), más 5% de FBS (suero fetal bovino). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera de 100% de humedad. Las células se llevaron de forma rutinaria a confluencia en matraces T, se enjuagaron con disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), y se trataron con tripsina durante 5 min. a temperatura ambiente. Las células tripsinadas se enjuagaron de la placa con 10 ml de medio, y se contaron. La viabilidad en el subcultivo fue generalmente ≥ 95%.

50

55 Se colocaron aproximadamente 10.000 células en 100 ul de medio en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y se incubaron toda la noche. Se usaron los péptidos que tienen las siguientes secuencias: Arg-15-Cys (RSSCAGAALSPLGAC); Pro-15-Val (PNEEAGAALSPLPEV); Ala-8-Leu (AGALSPL); C-ANP 4-23 (RSSCFGGRIDRIGAC) y VDL (EVVPPQVLSEPNEEAGAALSPLPEVPPWTGEVSPAQR). Los péptidos se disolvieron en PBS, y se filtraron de forma estéril. Los péptidos se diluyeron en el medio de cultivo celular hasta las siguientes concentraciones finales: 1, 0,3, 0,1, 0,03, y 0,01 uM. Cada péptido se ensayó en 5 pocillos repetidos. Los cultivos se incubaron durante 48 horas adicionales a 37°C.

60 La viabilidad de las células se determinó usando un Calbiochem Rapid Cell Proliferation Kit (número de catálogo QIA127). Se añadieron diez ul de reactivo colorante de Calbiochem a cada pocillo, y se incubaron durante 1,5 horas adicionales a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 450 nm usando un lector de microplacas de Molecular Devices ThermoMax. El molde de la placa se muestra en la Tabla I (los pocillos no marcados contenían células sin péptido, y se usaron como blancos). Los resultados se presentan en la Tabla I, y se ilustran gráficamente en las figuras 1 y 2.

65

Tabla I. Localización de las muestras en placas de 96 pocillos

Placa 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Arg-15-Cys 1	0,3	0,1	0,03	0,01			0,01	0,03	0,1	0,3	1
B		0,01	1	0,3	0,1	0,03	0,03	0,1	0,3	1	0,01	
C	Pro-15-Val 0,03	0,1	0,3	1	0,01			0,01	1	0,1	0,3	0,03

Tabla II. Densidades ópticas en la placa de 96 pocillos

5	Arg-15-Cys	1,0 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	0,01 µM			0,0 µM	0,0 µM
		1,155	0,988	1,016	1,093	0,974			1,029	0,866
		1,005	0,957	0,917	0,894	0,920			0,858	0,988
		0,787	0,668	0,801	0,789	0,863			1,135	1,033
		0,944	0,913	0,990	0,955	0,840			1,279	1,003
		0,919	0,959	1,025	1,178	1,075			1,255	0,881
									0,999	1,013
	Promedio	0,962	0,897	0,950	0,982	0,934			1,050	0,854
	Desv. estándar	0,134	0,131	0,093	0,155	0,094				
									0,946	0,826
	Pro-15-Val	1,0 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	0,01 µM			0,922	0,971
		0,856	0,875	0,680	0,892	0,907			0,967	1,055
		0,752	0,817	0,895	0,765	0,905			0,804	0,871
		0,802	0,855	0,893	0,693	0,633			0,817	0,893
		1,083	1,024	1,156	1,151	1,209			0,966	0,774
		1,248	1,010	0,964	0,970	0,928			0,977	0,933
									0,892	1,014
	Promedio	0,948	0,916	0,918	0,894	0,916			0,962	0,873
	Desv. estándar	0,210	0,094	0,171	0,179	0,204				0,966
									0,974	1,010
Ala-8-Leu	1,0 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	0,01 µM			0,847	0,926	
	0,732	0,784	0,832	0,892	0,744			0,562	0,897	
	1,216	0,802	1,006	0,937	0,878			0,941	0,868	
	0,954	0,998	1,031	0,989	1,000			1,310	0,934	
	0,834	1,357	0,910	0,921	0,892				0,988	
	1,189	1,070	1,174	1,139	1,169					
								Placa 1 Promedio, Desv. estándar	0,976	0,965
Promedio	0,985	1,002	0,991	0,976	0,937				0,878	
Desv. estándar	0,214	0,234	0,130	0,098	0,159				0,945	
									1,005	
ANP	1,0 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	0,01 µM				0,932	
	1,018	1,001	0,884	0,948	0,981				0,922	
	0,819	0,889	0,889	0,882	0,815				0,744	
	0,954	0,837	0,907	0,911	0,822				0,936	
	0,829	0,934	0,862	0,951	0,965				0,892	
	0,951	1,209	0,650	0,982	0,955				0,895	
									0,906	
Promedio	0,914	0,974	0,838	0,935	0,908				0,914	
Desv. estándar	0,087	0,145	0,107	0,039	0,082				0,849	
									0,836	
C-ANP	1,0 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	0,01 µM				0,877	
	0,865	0,840	0,758	0,905	0,877				0,828	
	0,925	0,928	1,027	0,882	0,971				1,016	
	0,900	1,035	0,983	0,981	0,953				0,909	
	0,955	0,975	0,960	0,948	0,932				0,911	
	0,981	0,932	0,982	0,943	0,958				1,015	
									0,998	
Promedio	0,925	0,942	0,942	0,932	0,938				0,964	
Desv. estándar	0,045	0,071	0,106	0,039	0,037					

estándar

Placa 2  
Promedio 0,922  
Desv. estándar 0,071

**Ejemplo 3**

5 Este ejemplo describe la actividad de péptidos que tienen un motivo conservado y aminoácidos conservados que se predice que son funcionales en el motivo. (Tabla III). Este ejemplo también describe secuencias peptídicas ejemplificativas adicionales que tienen un motivo conservado que se predice que tiene actividad antiproliferativa celular (por ejemplo, anticancerosa) (Tabla IV).

Tabla III

Péptido	Actividad anti-cancerosa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
ANP	+								S	L	R	R	S	S	C	F	G	G	R	M	D	R	I	G	A	Q	S	G	L	G	C	N	S	F	R	Y				
CNP	+															F	G	L	K	L	D	R	I																	
KT-220 (VDL)	+	E	V	V	P	P	Q	V	L	S	E	P	N	E	E	A	G	A	A	L	S	P	L	P	E	V	P	P	W	T	G	E	V	S	P	A	Q	R		
LANP	+															F	K	N	L	L	D	H	L																	
KP	+															L	K	S	K	L	R	A	L																	
DNP	-															F	G	K	R	M	D	R	I																	
C-ANP 4-23	+											R	S	S	C	F	G	G	R	I	D	R	I	G	A	C														
aminoácidos conservados																F,A,L	G,K	N,S,G,L,A	cualquiera	L,M	S,D,R	cualquiera	I,L																	
Péptidos																																								
Pro-15-Val	+											P	N	E	E	A	G	A	A	L	S	P	L	P	E	V														
Arg-15-Cys	+											R	S	S	C	A	G	A	A	L	S	P	L	G	A	C														
3	N/D											R	S	S	C	A	G	K	A	L	S	P	L	G	A	C														
Ala-8-Leu																A	G	A	A	L	S	P	L																	

10 Las posiciones 15 a 21 en la Tabla III corresponden a Res1-Res8 del motivo conservado. Los aminoácidos conservados en cada uno de los Restos 1-8 incluyen, por ejemplo, los siguientes: (15) F, A, L; (16) G, K; (17) N, S, G, L, A; (18) cualquiera; (19) L, M; (20) S, D, R; (21) cualquiera; (22) I, L. Los aminoácidos conservados en cada uno de los Restos 1-8 incluyen, por ejemplo, Res1: un resto hidrófobo, no polar, no ionizable; Res2, un resto no hidrófobo (anfífilo o hidrófilo); Res3, un resto no ionizable o un resto con una cadena lateral pequeña (cadena principal de 0-2 carbonos, con 3 y 4 carbonos más débil); Res4, cualquier resto; Res5, un resto hidrófobo, no polar, no ionizable o alifático; Res6, un resto polar; Res7, cualquier resto; y Res8, un resto hidrófobo, no polar, no ionizable o alifático.

15 Las notaciones "Res 1, Res 2" etc., se refieren en la presente memoria mediante abreviatura de una sola letra al aminoácido en el 8-mero peptídico ejemplificativo. La "actividad" se puede determinar mediante un ensayo de proliferación celular, tal como un ensayo descrito en la presente memoria o conocido por un experto en la materia. Por supuesto, los péptidos ejemplificados en la Tabla IV pueden incluir el péptido del motivo conservado como parte de una proteína más grande. La SEC ID NO es la misma que el número del péptido.

Tabla IV

SEC ID n°	Res 1	Res 2	Res 3	Res 4	Res 5	Res 6	Res 7	Res 8	Actividad predicha
1	F	G	N	A	L	S	P	I	+
2	F	G	S	R	L	D	S	I	+
3	F	G	G	N	L	R	T	I	+
4	F	G	L	D	L	D	W	I	+
5	F	G	A	C	L	R	Y	I	+
6	F	G	N	E	M	S	V	I	+
7	F	G	S	Q	M	D	A	I	+
8	F	G	G	G	M	R	R	I	+
9	F	G	L	H	M	S	N	I	+
10	F	G	A	I	M	D	D	I	+



ES 2 613 031 T3

11	F	K	N	L	L	R	C	I	+
12	F	K	S	K	L	S	E	I	+
13	F	K	G	M	L	D	Q	I	+
14	F	K	L	G	L	R	G	I	+
15	F	K	A	F	L	S	H	I	+
16	F	K	N	P	L	D	I	I	+
17	F	K	S	S	M	R	L	I	+
18	F	K	G	T	M	S	K	I	+
19	F	K	L	W	M	D	M	I	+
20	F	K	A	Y	M	R	G	I	+
21	A	G	N	V	L	S	F	I	+
22	A	G	S	A	L	D	P	I	+
23	A	G	G	R	L	S	S	I	+
24	A	G	L	N	L	D	T	I	+
25	A	G	A	D	L	R	W	I	+
26	A	G	N	C	L	S	Y	I	+
27	A	G	S	E	M	S	V	I	+
28	A	G	G	Q	M	D	A	I	+
29	A	G	L	H	M	R	R	I	+
30	A	G	A	I	M	S	N	I	+
31	A	K	N	L	L	D	D	I	+
32	A	K	S	L	L	R	C	I	+
33	A	K	G	K	L	S	E	I	+
34	A	K	L	M	L	D	Q	I	+
35	A	K	A	G	L	R	G	I	+
36	A	K	N	F	M	S	H	I	+
37	A	K	S	P	M	D	I	I	+
38	A	K	G	S	M	R	L	I	+
39	A	K	L	T	M	S	K	I	+
40	A	K	A	W	M	D	M	I	+
41	L	G	N	Y	L	R	G	I	+
42	L	G	S	V	L	S	F	I	+
43	L	G	G	A	L	D	P	I	+
44	L	G	L	R	L	R	S	I	+
45	L	G	A	N	L	S	T	I	+
46	L	G	N	D	M	D	W	I	+
47	L	G	S	C	M	R	Y	I	+
48	L	G	G	E	M	S	V	I	+
49	L	G	L	Q	M	D	A	I	+
50	L	G	A	H	M	R	R	I	+
51	L	K	N	I	L	S	N	I	+
52	L	K	S	L	L	D	D	I	+
53	L	K	G	L	L	R	C	I	+
54	L	K	L	K	L	S	E	I	+
55	L	K	A	M	L	D	Q	I	+
56	L	K	N	G	M	R	G	I	+
57	L	K	S	F	M	S	H	I	+
58	L	K	G	P	M	D	I	I	+
59	L	K	L	S	M	R	L	L	+
60	L	K	A	T	M	S	K	L	+
61	F	G	N	W	L	S	M	L	+
62	F	G	S	Y	L	D	G	L	+
63	F	G	G	V	L	R	F	L	+
64	F	G	L	A	L	D	P	L	+
65	F	G	A	R	L	R	S	L	+
66	F	G	N	N	M	S	T	L	+
67	F	G	S	D	M	D	W	L	+
68	F	G	G	R	M	D	R	I	+
69	F	G	L	E	M	S	V	L	+
70	F	G	A	Q	M	D	A	L	+
71	F	K	N	H	L	R	R	L	+
72	F	K	S	I	L	S	N	L	+
73	F	K	G	L	L	D	D	L	+
74	F	K	L	L	L	R	C	L	+
75	F	K	A	K	L	S	E	L	+
76	F	K	N	M	M	D	Q	L	+

77	F	K	S	G	M	R	G	L	+
78	F	K	G	F	M	S	H	L	+
79	F	K	L	P	M	D	I	L	+
80	F	K	A	S	M	R	L	L	+
81	A	G	N	T	L	S	K	L	+
82	A	G	S	W	L	D	M	L	+
83	A	G	G	Y	L	R	G	L	+
84	A	G	L	V	L	S	F	L	+
85	A	G	A	A	L	S	P	L	+
86	A	G	N	R	M	R	S	L	+
87	A	G	S	N	M	S	T	L	+
88	A	G	G	D	M	D	W	L	+
89	A	G	L	C	M	R	Y	L	+
90	A	G	A	E	M	S	V	L	+
91	A	K	N	Q	L	D	A	L	+
92	A	K	S	G	L	R	R	L	+
92	A	K	G	H	L	S	N	L	+
94	A	K	L	I	L	D	D	L	+
95	A	K	A	L	L	R	C	L	+
96	A	K	N	K	M	S	E	L	+
97	A	K	S	M	M	D	Q	L	+
98	A	K	G	G	M	R	G	L	+
99	A	K	L	F	M	S	H	L	+
100	A	K	A	P	M	D	I	L	+
101	L	G	N	S	L	R	L	L	+
102	L	G	S	T	L	S	K	L	+
103	L	G	G	W	L	D	M	L	+
104	L	G	L	Y	L	R	G	L	+
105	L	G	A	V	L	S	F	L	+
106	L	G	N	A	M	D	P	L	+
107	L	G	S	R	M	R	S	L	+
108	L	G	G	N	M	S	T	L	+
109	L	G	L	D	M	D	W	L	+
110	L	G	A	C	M	R	Y	L	+
111	L	K	N	E	L	S	V	L	+
112	L	K	S	Q	L	D	A	L	+
113	L	K	G	G	L	R	R	L	+
114	L	K	L	H	L	S	N	L	+
115	L	K	A	I	L	D	D	L	+
116	L	K	N	L	M	R	C	L	+
117	L	K	S	K	M	S	E	L	+
118	L	K	G	M	M	D	Q	L	+
119	L	K	L	G	M	R	G	L	+
120	L	K	A	F	M	S	H	L	+

Cada uno de estos péptidos ejemplificativos se puede analizar *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* para determinar la actividad antiproliferativa celular usando un ensayo, tal como un ensayo *in vitro* a base de células descrito en los Ejemplos 1 o 4.

5

**Ejemplo 4**

Este ejemplo incluye una descripción de otro ensayo ejemplificativo a base de células para determinar la actividad antiproliferativa celular.

10

Se cultivan células de carcinoma ovárico humano, y los péptidos se evalúan según los métodos descritos previamente [Vesely, et al, Cancer Ther. 5:97-104 (2007)]. Para investigar si los péptidos inhiben la síntesis de ADN, y la indicación de la proliferación celular, se utilizó la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en las células de carcinoma ovárico humano como se describió anteriormente. [Vesely, D.L. Eur J Clin Invest. 38(8) 562:(2008) y referencias allí]. BrdU provenía de BD Bioscience, San Jose, California. Tras 24 horas en cultivo con 1 µM de vasodilatador VDL, o sin hormona peptídica (es decir, control), se añadió BrdU en una concentración final de 10 µM al medio de cultivo celular durante 45 minutos, que es el tiempo en el que las células están en la fase logarítmica de proliferación celular. Además, la adición del péptido descrito en la presente memoria disminuyó significativamente el número de células de cáncer ovárico en 24 horas, en comparación con el control.

20

**Ejemplo 5**

Este ejemplo incluye una descripción del ensayo de ANPs para la actividad antiproliferativa celular usando como representante la actividad de NPR.

5 Aunque no se desea estar limitados por la teoría, se predice que las potencias relativas (actividad antiproliferativa celular) de los NPs están relacionadas con las afinidades de unión en NPRs [Vesely, D.L., Eur J Clin Invest. 38(8) 562:(2008) y referencias allí]. Por ejemplo, la mayor potencia observada para ANP que para CNP se correlaciona con mayores afinidades de unión de ANPs en NPRA y NPRC, mientras que la mayor potencia de CNP en comparación con BNP concuerda con que CNP tenga una mayor afinidad de unión que BNP específicamente en NPRC [Vesely, D.L., Eur J Clin Invest. 38(8) 562:(2008) y referencias allí].

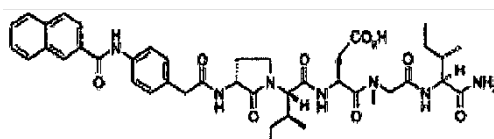
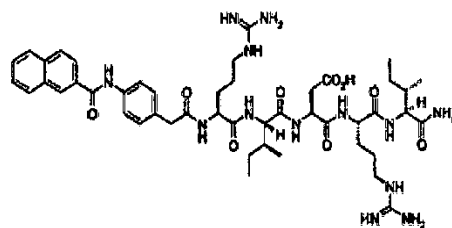
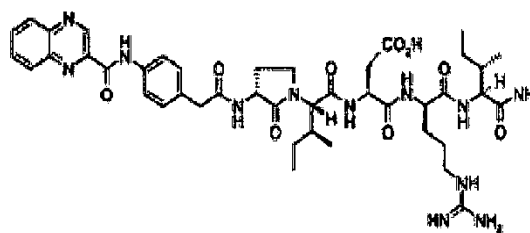
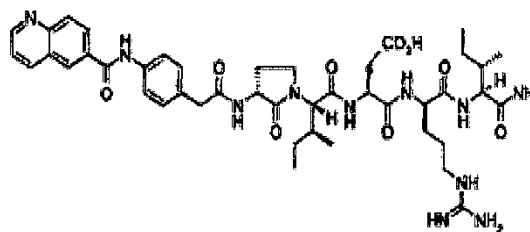
10 La selectividad de la familia de péptidos natriuréticos (ANP, BNP, CNP) por el receptor usando el sistema de ensayo homólogo descrito por Suga, et al., Endocrinol. 130:229-239 (1992). El orden de clasificación de la afinidad de unión por el receptor C sigue la tendencia del ensayo a base de células del Ejemplo 4.

15 De este modo, las afinidades de unión en los NPRs, tal como NPRC, puede ser una buena representación para la actividad antiproliferativa celular (anticancerosa).

**Ejemplo 6**

Este ejemplo incluye una descripción de peptidomiméticos que tienen el motivo conservado.

20 Los compuestos de la bibliografía, que parecen ser peptidomiméticos del motivo antiproliferativo celular (por ejemplo, anticanceroso), se evalúan para determinar la actividad (por ejemplo, Ejemplos 1 y 4), o se evalúan para determinar la unión a NPR (por ejemplo, Ejemplo 5), y demuestran la unión. Los peptidomiméticos predichos incluyen:

**Ejemplo 7**

Este ejemplo incluye una descripción del ensayo con un modelo de xenoinjerto *in vivo*.

40

La eficacia en un modelo de xenoinjerto, de la familia de péptidos natriuréticos (CNP, VDL, LANP, KP, BNP), puede emplear el ensayo descrito por Vesely, D. L., *In Vivo* 21:445 (2007), a fin de demostrar la actividad anticancerosa.

**Ejemplo 8**

5

Este ejemplo incluye una descripción de diversas rutas aceptables de administración sistémica, regional o local.

10

Para administración mediante inyección, una disolución inyectable se puede preparar por métodos convencionales usando 10,0 ml de disolución salina fisiológica y 7,0 mg de un péptido ajustado a pH = 7,4. Se puede administrar una inyección, una vez al día durante 4 días, a pacientes que pesen aproximadamente 70 kilogramos.

15

Para administración mediante infusión, una composición para infusión intravenosa se puede preparar por métodos convencionales usando 1000,0 ml de disolución salina fisiológica y 400,0 mg del péptido del Ejemplo 1 ajustado a pH = 7,4. Se puede administrar una infusión de una hora, una vez al día durante 4 semanas, a un paciente que pese aproximadamente 58 kilogramos.

20

Para administración continua, tal como administración mediante inyección subcutánea vía una bomba, se puede preparar una disolución inyectable mediante métodos convencionales usando 1000,0 ml de disolución salina fisiológica y 400,0 mg de un péptido ajustado a pH = 7,4. El paciente tiene una bomba implantada para dispensar la composición a lo largo del tiempo, como se describe en Vesely, D.L., *In vivo* 21:445-452 (2007). La bomba de infusión continua implantada dispensa la composición a intervalos, tres veces al día durante un tiempo de hasta 8 semanas, a un paciente que pese aproximadamente 47 kilogramos.

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto que presenta una actividad antiproliferativa celular, en el que el compuesto comprende un motivo conservado: (Res 1)-(Res 2)-(Res 3)-(Res 4)-(Res 5)-(Res 6)(Res 7)-(Res 8), en el que
- 5 Res 1– se selecciona de entre fenilalanina (F), alanina (A), y leucina (L);
- Res 2– se selecciona de entre glicina (G), y lisina (K);
- 10 Res 3- se selecciona de entre glicina (G), asparagina (N), serina (S), leucina (L), y alanina (A);
- Res 4– es cualquier aminoácido natural;
- Res 5- se selecciona de entre leucina (L), isoleucina (I), y metionina (M);
- 15 Res 6- se selecciona de entre serina (S), ácido aspártico (D), y arginina (R);
- Res 7- es cualquier aminoácido natural; y
- 20 Res 8- se selecciona de entre leucina (L), e isoleucina (I), y en el que cada uno de Res 1, Res 2, Res 3, Res 4, Res 5, Res 6, Res 7, y Res 8 están unidos covalente o no covalentemente al resto adyacente respectivo, y en el que el compuesto presenta menos de 20 restos, para su utilización en un método de tratamiento de un trastorno proliferativo celular en un sujeto.
- 25 2. Compuesto para su utilización según la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende cualquiera de las SEC ID nº: 1-120.
3. Compuesto para su utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto presenta entre 10 y 16 restos.
- 30 4. Compuesto para su utilización según las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el compuesto presenta actividad contra una célula cancerosa, tumoral o neoplásica, metastásica o no metastásica.
5. Compuesto para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es de origen no natural, es de origen natural, está aislado o está purificado.
- 35 6. Compuesto para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 7. Compuesto para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el trastorno proliferativo celular comprende una neoplasia, un tumor, o un cáncer metastásicos o no metastásicos.
8. Compuesto para su utilización según la reivindicación 7, en el que la neoplasia, el tumor, el cáncer, o la metástasis de los mismos
- 45 (i) afecta o se encuentra presente por lo menos en parte en cerebro, columna vertebral, cabeza o cuello, mama, esófago, boca, nasofaringe, nariz o senos paranasales, glándula tiroidea, tubo gastrointestinal, estómago, intestino delgado, duodeno, íleon, yeyuno, pulmón, hígado, páncreas, riñón, glándula suprarrenal, vejiga, colon, recto, aparato genitourinario, próstata, útero, endometrio, cuello uterino, ovario, médula ósea, linfa, sangre, hueso, testículo, pene, piel o músculo, o sistema hematopoyético,
- 50 (ii) comprende un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, osteosarcoma, fibrosarcoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma, o leucemia,
- 55 (iii) comprende un adenocarcinoma de estómago, cáncer colorrectal, carcinoma ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de mama o glándula mamaria, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer gastrointestinal, tumor de tejido nervioso o de cerebro, cáncer esofágico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer endometrial, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, o enfermedad de Hodgkin,
- 60 (iv) comprende una neoplasia, un tumor, un cáncer, o una metástasis de estadio I, II, III, IV o V,
- (v) empeora progresivamente o está en remisión, y/o
- 65 (vi) es sólido/a o líquido/a.

- 5 9. Compuesto para su utilización según la reivindicación 7 u 8, en el que el compuesto reduce o disminuye los números, la proliferación, el volumen o el tamaño de las células; inhibe o previene un aumento en los números, la proliferación, el volumen o el tamaño de las células; inhibe la progresión o el empeoramiento del trastorno proliferativo celular; estimula la lisis o la apoptosis celular; inhibe, reduce o disminuye el crecimiento, la proliferación o la supervivencia celulares del trastorno proliferativo celular; o prolonga o extiende la esperanza de vida del sujeto.
- 10 10. Compuesto para su utilización según la reivindicación 7 u 8, en el que el compuesto reduce o disminuye los números, la proliferación, el volumen o el tamaño de las células de neoplasia, de tumor, de cáncer, o de metástasis; inhibe o previene un aumento en los números, la proliferación, el volumen o el tamaño de las células de neoplasia, de tumor, de cáncer, o de metástasis; inhibe la progresión o el empeoramiento de la neoplasia, el tumor, el cáncer, o la metástasis de los mismos; estimula la lisis o apoptosis de las células de neoplasia, de tumor, de cáncer, o de metástasis; inhibe, reduce o disminuye el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de las células de neoplasia, de tumor, de cáncer, o de metástasis; inhibe la formación o establecimiento de neoplasia, tumor o cáncer metastásicos en uno o más sitios distintos de la neoplasia, el tumor o el cáncer primarios; inhibe el crecimiento de neoplasia, tumor o cáncer metastásicos establecidos en uno o más sitios distintos de la neoplasia, el tumor o el cáncer primarios; o prolonga o extiende la esperanza de vida del sujeto.
- 15 11. Compuesto para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un mamífero.
- 20 12. Compuesto para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un ser humano.
- 25 13. Compuesto que presenta una actividad antiproliferativa celular, en el que el compuesto comprende cualquiera de las SEC ID n°: 21, 22, 24, 25, 30, 43, 61, 64, 65, 75, 81, 82, 84, 85, 87, 90, 93, 105 y 106, y en el que el compuesto presenta menos de 20 restos.
- 30 14. Compuesto según la reivindicación 13, en el que el compuesto presenta entre 10 y 16 restos.
- 35 15. Método de diagnóstico de un sujeto que presenta una probabilidad aumentada de responder al tratamiento antiproliferativo celular con un compuesto según la reivindicación 13 o 14, que comprende cribar una muestra biológica que comprende unas células aisladas procedentes del sujeto para la unión al compuesto, en el que la unión identifica al sujeto como que presenta una probabilidad aumentada de responder al tratamiento antiproliferativo celular con el compuesto según la reivindicación 13 o 14.
- 40 16. Método *in vitro* de identificación de un compuesto que presenta una actividad antiproliferativa celular, que comprende cribar un compuesto según la reivindicación 13 o 14 para la inhibición de la proliferación celular, para la unión a NPRC, o para la activación de NPRC, en el que la inhibición de la proliferación celular, la unión a NPRC o la activación de NPRC identifica al compuesto como que presenta una actividad antiproliferativa celular.
17. Compuesto según la reivindicación 13 o 14, para una utilización en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular en un sujeto.

Figura 1

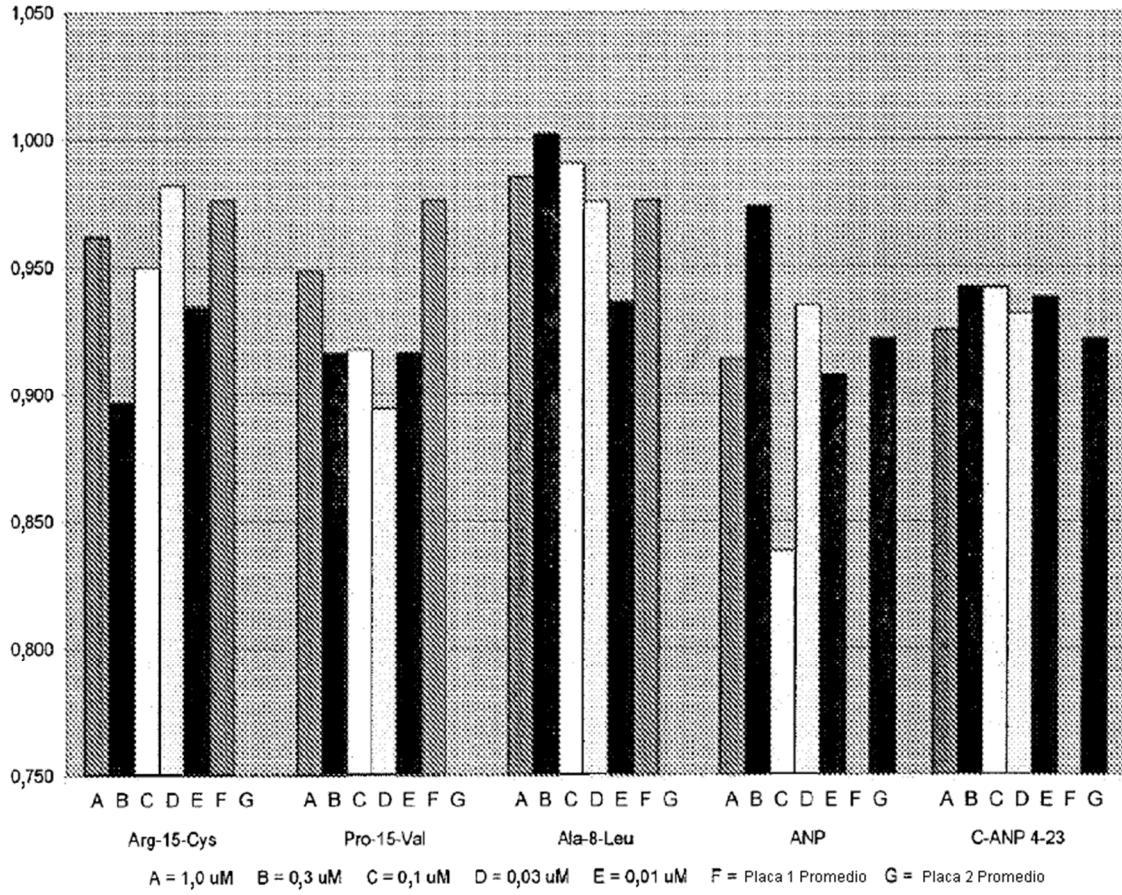


Figura 2

