(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 618 605**

(51) Int. CI.:

A61K 35/00 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2011 PCT/US2011/042948**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO2012102753**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011 E 11856626 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2667880**

(54) Título: **Oligopéptidos de metaloproteinasas y su uso terapéutico**

(30) Prioridad:

24.01.2011 US 201113012796

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

(73) Titular/es:

RATH, MATTHIAS (100.0%)
275 La Vida Road
Aptos, CA 95003, US

(72) Inventor/es:

RATH, MATTHIAS

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Oligopéptidos de metaloproteinasas y su uso terapéutico

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado como un archivo ASCII denominado RIPLLC018003CIP1sequence_ST25; fecha de creación: 5/7/2011, y el tamaño del archivo de texto ASCII en bytes es de 6 kb.

Campo tecnológico

La presente divulgación se refiere, en general, al diseño y a la síntesis de nuevas secuencias oligopeptídicas de metaloproteinasas para su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la matriz extracelular. Más concretamente, la presente divulgación se refiere al uso de oligopéptidos de metaloproteinasa de diversas especies como una vacuna, una composición farmacéutica, una dosis terapéutica y como un agente de diagnóstico para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

Las metaloproteinasas de la matriz son una familia de endopeptidasas neutras dependientes del cinc que desempeñan un papel importante en la angiogénesis tumoral, la remodelación tisular y la migración celular. En el cáncer, los niveles de algunas de las MMP son anormalmente elevados, lo que permite a las células cancerosas degradar la matriz extracelular (ECM), invadir la membrana basal vascular y crear metástasis en sitios distantes. Hay varias afecciones patológicas que se asocian con un aumento de la actividad de las metaloproteinasas (MMP), en particular, MMP-2 y MMP-9. Estas proteasas son capaces de digerir el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular (ECM) y como condición previa para la propagación de la enfermedad. Así pues, existe la necesidad de un agente terapéutico para bloquear de manera eficaz estas MMP a partir de la digestión de la ECM, bloqueando de este modo la propagación del cáncer y de otras enfermedades.

Actualmente, la prevención y el tratamiento de las metástasis representan el mayor reto en la terapia contra el cáncer. Los tratamientos disponibles en la actualidad son tóxicos, inespecíficos e imprevisibles para las enfermedades afectadas por las proteínas de la ECM. Existe la necesidad de un agente terapéutico para bloquear de manera eficaz las moléculas de MMP a partir de la digestión de la ECM, evitando así la degradación de la ECM y la propagación de enfermedades.

El documento US 2003/139345 A1 desvela el uso de la secuencia oligopeptídica PRKPKWDK derivada de MMP-2 como agente terapéutico, como vacuna y como agente de diagnóstico para el tratamiento del cáncer y de la metástasis.

Sumario

La presente divulgación desvela una secuencia y una composición de oligopéptido de MMP y un método de uso del oligopéptido de MMP como vacuna, una composición farmacéutica, una dosis terapéutica y como agente de diagnóstico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la ECM.

Se diseñaron y sintetizaron los análogos de oligopéptidos para las secuencias de MMP-9 y MMP-2. Estos oligopéptidos se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la invasión de las células cancerosas *in vitro* usando líneas celulares específicas.

Se ensayaron los análogos de oligopéptidos de MMP-9 y MMP-2 para determinar su eficacia para la supresión del crecimiento tumoral *in vivo* en ratones.

Se usaron las siguientes secuencias oligopeptídicas para producir una vacuna. De acuerdo con la invención, se puede diseñar una dosis de tratamiento para una persona que padezca cáncer que comprende los análogos de oligopéptidos sintéticos de SEC ID NO: 2-21.

Tabla 1- Secuencias de oligopéptidos sintéticos de MMP-9 (humanos):

SEQ ID NO: 2	MMP-9 A1	C	H	F	P	F	I	F	E	G	R	S	Y	S	A	C	
SEQ ID NO: 3	MMP-9 A2	D	T	D	D	R	F	G	F								
SEQ ID NO: 4	MMP-9 A3	D	R	D	K	L	F	G		F	C	P	T	R	A	D	S

Tabla 2- Secuencias de oligopéptidos sintéticos de MMP-9 (Otras especies):

SEQ ID NO:5	Ratón	MMP-9 A 5	D	K	D	G	K	F	G	F								
SEQ ID NO: 6	Bovina	MMP-9 A 6	D	A	D	R	Q	F	G	F								
SEQ ID NO: 7	Rata	MMP-9 A7	D	T	D	R	K	Y	G	F								
SEQ ID NO: 8	Carpa	MMP-9 A 8	D	K	D	K	I	F	G	F								
SEQ ID NO: 9	Pez globo	MMP-9A9	D	K	D	K	K	Y	G	F								
SEQ ID NO: 10	Conejo	MMP-9 A 10	D	T	D	R	R	F	G	F								
SEQ ID NO: 11	Ratón	MMP-9 A 11	D	K	D	G	K	F	G	F								
SEQ ID NO: 12	Rata	MMP-9 A 12	C	H	F	P	F	T	F	E	G	R	S	Y	L	S	C	
SEQ ID NO: 13	Pollo	MMP-9 A 13	C	H	F	P	F	I	F	E	G	R	S	Y	S	R	C	
SEQ ID NO: 14	Carpa europea	MMP-9 A 14	C	H	F	P	F	L	F	E	G	T	S	Y	S	S	C	
SEQ ID NO: 15	Pez globo	MMP-9 A 15	C	H	F	P	F	R	F	Q	N	K	P	Y	K	H	C	
SEQ ID NO: 16	Lenguado	MMP-9 A 16	C	H	F	P	F	T	F	E	G	K	S	Y	T	S	C	
SEQ ID NO: 17	Bovina	MMP-9 A 17	D	Q	D	K	L	Y	G	F	C		P	T	R	V	D	A
SEQ ID NO: 18	Rata	MMP-9 A 18	D	K	A	D	G	F	C	P	T		R	A	D	V	T	V
SEQ ID NO: 19	Ratón	MMP-9 A 19	D	Q	D	K	L	Y	G	F	C		P	T	R	V	D	A
SEQ ID NO: 20	Carpa	MMP-9 A 20	D	K	K	Y	G	F	C	P	N		R	D	T	A	V	I
SEQ ID NO: 21		Conejo	MMP-9 A 21	D	K	D	K	L	Y	G	F	C	P	T	R	A	D	S

Tabla 3: Secuencias de oligopéptido de MMP-2:

SEQ ID NO: 1	MMP-2 A 4	C	P	R	K	P	K	W	D	K	C

En una realización, la secuencia oligopeptídica puede tener, pero sin limitación, mutaciones, eliminaciones y sustituciones.

El oligopéptido de MMP-2 se puede usar como una vacuna, una composición farmacéutica, una dosis terapéutica y como una herramienta de diagnóstico. En una realización, se puede usar un oligopéptido de MMP-2 en combinación con uno cualquiera de los oligopéptidos de MMP-9 como una vacuna. En otra realización, los veinte oligopéptidos se pueden combinar para producir una vacuna.

Las secuencias oligopeptídicas, en una realización, pueden ser de diseño bien lineal o circular. En otra realización, el oligopéptido puede ser una repetición de secuencias.

En otra realización, el oligopéptido puede tener bien haptenos o poliglicanos unidos al mismo para el suministro eficaz.

En otra realización, se desvela un método de inmunización de un mamífero, tal como ratones, para generar anticuerpos contra una MMP específica. En una realización, se desvela una selección de un oligopéptido adecuado para elevar la antigenicidad. En otra realización, se realizó la inhibición de la invasión de las células cancerosas mediante el anticuerpo inducido contra el oligopéptido *in vitro*.

En otra realización, se pueden inmunizar mamíferos tales como ratones y, posteriormente, exponerlos a células cancerosas de melanoma murino B16F0 con el fin de ensayar la inhibición del crecimiento tumoral.

En una realización, la inmunización de los mamíferos puede no limitarse al cáncer, sino que puede incluir todo el tratamiento de las enfermedades basadas en la degradación de la ECM. En otra realización, la vacuna se puede realizar una vez o varias veces mediante la medición de los anticuerpos específicos contra el oligopéptido que se inyectó. En una realización, la especie específica puede ser de un mamífero y/o de un no mamífero.

En una realización, una composición para un oligopéptido en forma de una vacuna y una dosis de tratamiento comprende los oligopéptidos que comprenden las SEC ID 2-21 de forma individual o una combinación de los mismos.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede convertir, pero sin limitación, en una inyección. Otras realizaciones pueden incluir formulaciones perorales, tópicas, transmucosas, de inhalación, de administración dirigida y de liberación sostenida. La dosis de tratamiento puede componerse de combinaciones terapéuticamente eficaces y farmacéuticamente aceptables.

La composición, el método y el tratamiento desvelados en el presente documento se pueden implantar en cualquier medio para la consecución de diversos aspectos, y se pueden ejecutar de una forma adecuada para el mamífero. Otras características serán evidentes a partir las figuras anexas y de la descripción detallada que figura a continuación.

Breve descripción de las figuras

Las realizaciones de ejemplo se ilustran a modo ilustrativo y no de limitación en las figuras adjuntas, en las que las referencias similares indican elementos similares, y en las que:

La Figura 1 ilustra la técnica anterior de las MMP que digieren la ECM durante un estado patológico.
La Figura 2 muestra el método de tratamiento de un mamífero usando la vacuna.
La Figura 3 A-D muestra la vista del experimento de invasión de matrigel en células de control HeLa, así como las células de cáncer de cuello uterino HeLa y el efecto de los sueros inmunes del oligopéptido de metaloproteinasa de la matriz MMP-9 A 1-3 y MMP-2 A 4.
La Figura 4 ilustra el peso de los ratones antes y después del tratamiento.
La Figura 5 ilustra un efecto de la inmunización usando metalopeptidasa de la matriz MMP-9 A1-3 y MMP-2 A 4 sobre la inhibición del peso tumoral de xenoinjertos de la línea celular de melanoma B16FO en ratones C57BL/6 macho.
La Figura 6 es una vista del resultado de la carga del peso tumoral (longitud y anchura) sobre el ratones C57BL/6 macho antes y después del tratamiento de los xenoinjertos de melanoma.
La Figura 7A-E es una vista del crecimiento tumoral en el control y de la inhibición tumoral en ratones inmunizados. La Figura 8 muestra una vista de la unión situada para los diversos peptidomiméticos en una molécula de MMP.

Otras características de las presentes realizaciones serán evidentes a partir las figuras anexas y de la descripción

detallada que figura a continuación.

Descripción detallada

En el presente documento, se describen varias secuencias y métodos de inmunización, tratamiento del cáncer y reducción del tamaño tumoral usando el oligopéptido de metaloproteinasa de la matriz en forma de una vacuna. Aunque las presentes realizaciones se han descrito con referencia a realizaciones ilustrativas específicas, será evidente que se pueden realizar diversas modificaciones y cambios en dichas realizaciones sin apartarse del espíritu ni del alcance más amplios de las diversas realizaciones.

Las células cancerosas producen niveles más elevados de metaloproteinasas de la matriz (MMP), en concreto, de MMP-9 y MMP-2. Estas enzimas son capaces de digerir el tejido conjuntivo de la matriz celular (ECM) adicional que rodea las células cancerosas. Las MMP se unen a la ECM a través de sitios de unión específicos. El bloqueo de estos sitios de unión de las MMP evita que las MMP se unan a la ECM. La inhibición de la destrucción de la ECM impide la progresión del cáncer y la reducción del tamaño tumoral. En la presente divulgación, se identificaron varios posibles sitios de unión dentro de MMP-9 y MMP-2. La Figura 1 describe las células cancerosas 110 productoras de MMP 120 (etapa 1). Las MMP 120 se unen a los sitios de unión específicos en la ECM 130 (etapa 2). La etapa 3 de la Figura 1 muestra las MMP 120 que digieren la ECM 140.

La Figura 2 explica la presente divulgación en etapas de producción de la vacuna e inmunización 200. La identificación y el diseño de las MMP se llevan a cabo 210 usando las secuencias de MMP. Los oligopéptidos se sintetizan 220 y se representan por oligopéptidos sintéticos 240. Los oligopéptidos formulados para la vacunación son 222. Los anticuerpos se producen como se muestra en 226. Los ratones 242 se inmunizan 224 usando la vacuna con la jeringa 240. Los oligopéptidos pueden ser de longitud específica. Se ensayaron varias permutaciones y combinaciones de las secuencias. Las secuencias de la presente divulgación se muestran en el párrafo [0008] como MMP-9 A1-3 y 5-21 y MMP-2 A 4. Antes de la selección de estas veintiuna secuencias como posibles oligopéptidos, se identificaron varios posibles sitios de unión para MMP-9 y MMP-2. Se sintetizó un total de ocho oligopéptidos, y se ensayaron usando la línea celular de fibrosarcoma HT-1080 y la línea celular de cáncer de cuello uterino DoTC-2. Solo se siguieron las secuencias seleccionadas para la experimentación adicional. La MMP-9 A1-3 y 5-21 y MMP-2 A 4 se sintetizaron en un formato circular y lineal. También se realizaron muchas modificaciones de estas secuencias en una realización. Las modificaciones fueron las sustituciones de uno o más restos de aminoácidos en los extremos N-terminal, C-terminal y tanto C- como N- terminal, la sustitución de restos de aminoácidos basándose en la carga y la polaridad similares, sin tener en cuenta la carga ni la polaridad, omitiendo los aminoácidos del extremo C- y N-terminal, omitiendo solo los del extremo C-terminal y solo los del extremo N-terminal.

En otra realización, la sustitución y la omisión se pueden llevar a cabo de forma simultánea. Los oligopéptidos se pueden modificar adicionalmente mediante la repetición de las secuencias y la combinación de más de una SEQ ID NO: 1-3, 5-21 MMP-9 A1-3 y 5-21 y SEQ ID NO: 1, MMP-2 A 4 para la producción y la formulación de una vacuna. El peptidomimético de las MMP se puede usar para bloquear el sitio de unión de una MMP sobreexpresada en una enfermedad específica.

En una realización, el oligopéptido se puede usar como regulador de retroalimentación para prevenir o reducir específicamente la velocidad de síntesis de las producciones de MMP-9 y MMP-2 a nivel celular. En una realización, se produjo el proceso de bloqueo e inhibición de la destrucción de la ECM por los antígenos debido a la vacunación de los ratones.

En otra realización, los oligopéptidos sintetizados se biotinilaron en el extremo N-terminal usando veintiún espaciadores de carbono de Genscript (Pitcataway, NJ 08554 EE.UU.) y se conjugaron a la proteína KLH. En un experimento realizado en ratones, los animales se adquirieron, se inmunizaron, se sometieron a inducción tumoral y se observaron para determinar la eficacia del tratamiento de la inmunoterapia inducida por oligopéptidos.

Las inyecciones se prepararon usando 100 μl de péptidos biotinilados conjugados con KLH y 100 μl de adyuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO).

Los ratones C57BL/6 macho de 6 semanas de vida a la llegada se adquirieron en Simonsen Laboratorios, Gilroy, CA y se mantuvieron en jaulas microaislantes en condiciones exentas de patógenos en ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad durante una semana. Todos los animales se cuidaron de acuerdo con las directrices institucionales para el cuidado y uso de animales de experimentación. Después del alojamiento durante una semana, los ratones (n = 5/grupo) se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal el Día 0, y adyuvante incompleto de Freund (Sigma) el Día 7, 14 y 28. Se analizaron muestras de sangre para determinar su respuesta inmune mediante ensayo Elisa convencional usando placas de microvaloración. Las inyecciones repetidas de péptidos sintéticos en ratones producen una respuesta inmune a los péptidos individuales específicos. Se probaron diversas diluciones, siendo los ejemplos de diluciones probados 1:100, 1:1.000 y 1:10.000.

Conjugación de péptidos

Todos los péptidos de SEQ ID NO: 1-4 se conjugaron covalentemente a la proteína hemocianina de lapa californiana (KLH). En un experimento típico de 1 mg de péptido, se disolvieron 4 mg de KLH en 5 ml de $NaHCO_3$ 0,01 M y 2 ml de glutaraldehído, y se agitó durante una noche. Al finalizar, se añadieron 100 ml de etiléster de glicina 1 M hasta la concentración final de 0,1 M y se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se produjo la precipitación con 4-5 vol de acetona fría a -70 ºC durante 30 minutos. A continuación, se calentó brevemente a temperatura ambiente y se sedimentó a 10.000 g durante 10 min. El sedimento se disolvió en 1 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M y se almacenó a -20 ºC.

Ensayo de respuesta inmune contra el péptido

Se recubrieron placas de microvaloración con péptido individual en 100 µl/pocillo en tampón de carbonato 5 mM, pH 9,5 durante 20 horas a 20 ºC. Tras lavar, se incubaron los pocillos con una dilución en serie de suero de ratón en PBS/BSA al 0,5 %, Tween 20 (tampón de unión, BB). Tras el lavado, se incubaron los pocillos con anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en BB durante 30 minutos a 37 ºC. Tras lavar, se determinó el título de IgG de ratón anti-péptido mediante una reacción de color con solución de sustrato TMB a 450 nm.

En dilución 1:100, la intensidad de la respuesta inmune fue mayor para SEQ ID NO: 2-4 MMP-9 A 1-3 y un poco inferior para SEQ ID NO: 1, MMP-2 A 21 como se muestra en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4

	Elisa – Péptido A1-A4											
	Sin avidina	Sin péptido	Sin péptido esp. cox	Suero de control n.º3	Péptido de ensayo antes de la administración de B16FO				Péptido de ensayo después de la administración de B16FO			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CONT 1:100	,300	,166	,173	,352	,863	,241	,221	,267	,862	1,345	,218	,202
1:1000	,149	,443	,158	,215	,339	,174	,164	,286	,699	,234	,166	,164
1:10000	,119	,155	,154	,187	,261	,231	,212	,229	,287	,176	,155	,148
MMP-9 A-1 1:100	1,248	,336	,362	,418	3,898	3,868	3,843	3,895	3,897	3,864	3,820	3,87
1:1000	,417	,199	,299	,282	3,402	1,901	1,033	2,127	3,624	1,875	,999	2,01
1:10000	,146	,210	,227	,244	,394	,274	,228	,330	,645	,244	,226	,22
MMP-9 A-2 1:100	,927	,298	,299	,335	3,581	3,863	3,870	3,238	3,635	3,609	3,465	3,86
1:1000	,208	,210	,189	,242	,646	1,339	2,856	,360	,526	,859	,277	,274
1:10000	,224	,178	,181	,197	,224	,261	,477	,175	,203	,235	,161	,348
MMP-9 A-3 1:100	,706	,626	,339	,285	3,775	3,810	1,991	3,812	3,776	3,814	2,063	3,84
1:1000	,390	,162	,167	,176	,394	2,157	,272	2,281	,448	1,332	,448	2,34
1:10000	,123	,142	,151	,158	,159	,631	,159	,267	,167	,209	,158	,296
MMP-2 A-4 1:100	,926	,273	,258	,240	1,485	2,409	1,811	1,649	1,836	3,172	2,278	1,621
1:1000	,340	,162	,162	,192	,650	,974	,771	,289	,706	1,286	,775	,294
1:10000	,148	,142	,150	,179	,220	,257	,208	,168	,290	,313	,230	,167

ES 2 618 605 T3

La cantidad terapéuticamente eficaz de oligopéptido se puede administrar al mamífero de muchas maneras diferentes y no puede limitarse a las inyecciones. Los diversos métodos de administración son bien conocidos en la técnica y, a continuación, se describen algunos de los métodos.

Una "especie concreta" que se va a tratar mediante el presente método puede significar un animal humano o no humano, tal como ratones, animales de granja, primates y vertebrados.

Las enfermedades específicas que serían las enfermedades diana de un tratamiento usando secuencias de oligopéptidos de MMP y/o peptidomimético son enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades de las arterias coronarias, enfermedades cardiovasculares oclusivas, enfermedades degenerativas y enfermedades infecciosas. Algunos ejemplos de enfermedades neoplásicas pueden ser, pero sin limitación, cáncer, linfoma, leucemia y tumores cerebrales. Algunos ejemplos de enfermedades inflamatorias pueden ser, pero sin limitación, artritis, asma, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, lupus eritematoso, etc. Algunos ejemplos de enfermedades infecciosas pueden incluir, pero sin limitación, bacterianas, víricas, micóticas, micoplasmas, ciertas enfermedades genéticas y otras infecciones. En la presente solicitud, se identificaron los oligopéptidos señal de la proteína MMP selectiva que median en la función patológica clave de la proteína MMP, en concreto, en la digestión del tejido conjuntivo, que es una condición previa para que las células cancerosas migren y formen metástasis. Se sintetizaron los oligopéptidos, se inyectaron a los animales y se generaron anticuerpos. El tamaño del tumor se redujo significativamente con el uso de estas vacunas de elevación de oligopéptidos. El grado de eficacia se puede observar por el nivel de titulación causado por la vacuna de oligopéptido de MMP, que prueba que las vacunas eran muy eficaces.

Uno de los métodos convencionales de selección para aumentar la antigenicidad natural de la/s secuencia/s oligopeptídica/s de una proteína dada es una ligera alteración en la secuencia de aminoácidos del oligopéptido dado, es decir, mediante sustituciones, eliminaciones, inserciones, etc., de aminoácidos individuales. Se identificaron las SEC ID NO: 5-21 y se diseñaron de manera que coincidieran con la hidrofobicidad, hidrofilicidad y carga eléctrica de las secuencias oligopeptídicas de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-3 (MMP). También mantiene las características de la señal y la funcionalidad como un epítopo. Dado que estos oligopéptidos son muy similares a SEQ ID NO: 1-3 (MMP), se pueden usar como vacuna para la reducción del crecimiento tumoral. La presente solicitud presenta estas secuencias como un posible candidato para el desarrollo de vacunas para tratar el cáncer. Las SEQ ID NO: 5-21 pueden potenciar la eficacia terapéutica para la inmunización cruzada entre especies mediante la mejora de la antigenicidad natural independientemente de si se usan los adyuvantes.

Las formulaciones farmacológicas adecuadas para estas vías de administración se pueden producir mediante la adición de uno o más vehículos farmacológicamente aceptables al agente y, después, el tratamiento de la mezcla a través de un proceso habitual conocido por los expertos en la materia. El modo de administración incluye, pero sin limitación, la vía peroral no invasiva, tópica (por ejemplo, transdérmica), enteral, transmucosa, administración dirigida, administración de liberación sostenida, liberación retardada, liberación pulsada y métodos parenterales. La administración peroral puede administrarse tanto en estado líquido como seco.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base aromatizada, normalmente, sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o en forma de un elixir o jarabe, o en forma de pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga), cada una conteniendo una cantidad predeterminada de una composición en cuestión como principio activo. Las presentes composiciones también se pueden administrar en forma de un bolo, un electuario o una pasta.

Cuando se prepara un producto farmacológico sólido oral, se mezcla la secuencia oligopeptídica de MMP y/o un peptidomimético de las MMP con un excipiente (y, si es necesario, uno o más aditivos tales como un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un agente colorante, un agente edulcorante y un agente saborizante), y la mezcla resultante se procesa a través de un método de rutina, para producir con ello un producto farmacológico sólido oral, tal como comprimidos, comprimidos recubiertos, gránulos, polvos o cápsulas. Los aditivos pueden ser los empleados en general en la técnica Los ejemplos del excipiente incluyen lactato, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina y ácido silícico; los ejemplos del aglutinante incluyen agua, etanol, propanol, jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, gelatina licuada, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, almidón de hidroxipropilo, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfato de calcio y polivinilpirrolidona; los ejemplos del disgregantes incluyen almidón seco, arginato de sodio, agar en polvo, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de calcio, laurilsulfato de sodio, estearato de monoglicerilo y lactosa; los ejemplos del lubricante incluyen talco, sales de ácido esteárico, bórax y polietilenglicol purificado; y los ejemplos del agente edulcorante incluyen sacarosa, piel de naranja, ácido cítrico y ácido tartárico.

Cuando se prepara un producto farmacológico líquido para la administración oral, se mezcla la secuencia de oligopéptido de MMP y/o un peptidomimético de MMP con un aditivo tal como un agente edulcorante, un tampón, un estabilizador o un agente saborizante, y la mezcla resultante se procesa a través de un método de rutina para producir con ello un producto farmacológico líquido administrado por vía oral tal como una medicina de solución

interna, un jarabe o un elixir. Los ejemplos del agente edulcorante incluyen vainillina; los ejemplos del tampón incluyen citrato de sodio; y los ejemplos del estabilizador incluyen tragacanto, goma arábiga y gelatina.

Para los fines de la administración transdérmica (por ejemplo, tópica), se pueden preparar soluciones diluidas estériles, acuosas o parcialmente acuosas (normalmente, a una concentración del aproximadamente 0,1 % al 5 %), similares por lo demás a las soluciones parenterales anteriores.

Las formulaciones para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que se puede preparar mediante la mezcla de una composición en cuestión con uno o más vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólida a temperatura ambiente, pero líquida a la temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en la cavidad corporal adecuada y liberará el/los compuesto/s encapsulado/s y la/s composición/es. Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen vehículos tales como los conocidos en la técnica por su idoneidad.

Se puede añadir una parte liberada diana al sistema de liberación prolongada por medio de bien la aplicación de una capa de liberación inmediata en la parte superior del núcleo de liberación prolongada; usando procesos de recubrimiento o de compresión, o en un sistema de unidades múltiples tales como una cápsula que contiene perlas de liberación prolongada e inmediata.

Cuando se usa con respecto a una composición farmacéutica u otro material, la expresión "liberación sostenida" es reconocida en la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica que libera una sustancia con el tiempo puede presentar características de liberación sostenida, en contraste con una administración de tipo bolo, en la que se vuelve biológicamente disponible toda la cantidad de la sustancia a la vez. Por ejemplo, en realizaciones particulares, al entrar en contacto con fluidos corporales incluyendo sangre, líquido cefalorraquídeo, secreciones mucosas, linfa o similares, uno o más de los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden sufrir la degradación gradual o retardada (por ejemplo, a través de hidrólisis) con la liberación concomitante de cualquier material incorporado en el mismo, por ejemplo, una sal y/o composición terapéuticas y/o biológicamente activas, durante un período sostenido o prolongado (en comparación con la liberación de un bolo). Esta liberación puede dar lugar a la liberación prolongada de cantidades terapéuticamente eficaces de cualquiera de los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento.

Los esfuerzos actuales en el área de la administración de fármacos incluyen el desarrollo de la administración dirigida en la que el fármaco es activo solo en la zona diana del cuerpo (por ejemplo, en los tejidos cancerosos) y formulaciones de liberación sostenida en las que el fármaco se libera durante un período de tiempo de una manera controlada a partir de una formulación. Los tipos de formulaciones de liberación sostenida incluyen liposomas, microesferas biodegradables cargadas con fármaco y conjugados de polímero y fármaco.

Las formulaciones farmacéuticas de liberación retardada se crean mediante el recubrimiento de una forma farmacéutica sólida con una película de un polímero que es insoluble en el medio ácido del estómago, pero soluble en el ambiente neutro del intestino delgado. Las unidades farmacéuticas de liberación retardada se pueden preparar, por ejemplo, mediante el recubrimiento de un fármaco o de una composición que contiene fármaco con un material de recubrimiento seleccionado. La composición que contiene el fármaco puede ser un comprimido para la incorporación en una cápsula, un comprimido para su uso como un núcleo interior en una forma farmacéutica de "núcleo recubierto" o una pluralidad de perlas que contienen fármaco, partículas o gránulos, para la incorporación en bien un comprimido o una cápsula. Los materiales de recubrimiento preferidos incluyen polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables, gradualmente hidrosolubles y/o enzimáticamente degradables, y pueden ser polímeros “entéricos” convencionales. Los polímeros entéricos, como será apreciado por los expertos en la materia, se vuelven solubles en el ambiente de mayor pH del tracto gastrointestinal inferior o se erosionan lentamente cuando la forma farmacéutica pasa por el tracto gastrointestinal, mientras que los polímeros degradables enzimáticamente son degradados por enzimas bacterianas presentes en el tracto gastrointestinal inferior, en particular, en el colon. Como alternativa, un comprimido de liberación retardada puede formularse mediante la dispersión del fármaco con cubierta dentro de una matriz de un material adecuado, tal como un polímero hidrófilo o un compuesto graso. Los polímeros hidrófilos adecuados incluyen, pero sin limitación, polímeros o copolímeros de celulosa, éster de celulosa, ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo y vinilo, o polímeros o copolímeros enzimáticamente degradables como se ha descrito anteriormente. Estos polímeros hidrófilos son particularmente útiles para proporcionar una matriz de liberación retardada. Los compuestos grasos para su uso como un material de matriz incluyen, pero sin limitación, ceras (por ejemplo, cera de carnauba) y triestearato de glicerol. Una vez que el ingrediente activo se mezcla con el material de matriz, la mezcla se puede comprimir en comprimidos.

Una dosificación liberada por pulsos es aquella que imita un perfil de dosificación múltiple sin dosificación repetida y, normalmente, permite al menos una reducción doble en la frecuencia de dosificación en comparación con el fármaco presentado como una forma farmacéutica convencional (por ejemplo, como una solución o forma farmacéutica sólida convencional de liberación del fármaco inmediata). Un perfil de liberación por pulsos se caracteriza por un período de tiempo de no liberación (tiempo de retardo) o liberación reducida, seguido de una liberación rápida del fármaco.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usa en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, tales como inyecciones, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrapleural, intravascular, intrapericárdica, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradenal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Ciertas composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento adecuadas para la administración parenteral comprenden una o más composiciones en cuestión en combinación con una o más soluciones estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que vuelven la formulación isotónica en la sangre del receptor deseado, o agentes de suspensión o espesantes.

Cuando se prepara un producto de inyección, se mezcla la secuencia oligopeptídica de MMP y/o un peptidomimético de MMP con un aditivo tal como un regulador de pH, un tampón, un estabilizador, un agente de isotonicidad o un anestésico local, y la mezcla resultante se procesa a través de un método de rutina, para producir de este modo una inyección para inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intravenosa. Los ejemplos del regulador de pH o tampón incluyen citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio; los ejemplos del estabilizador incluyen pirosulfito de sodio, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico; los ejemplos de los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína y clorhidrato de lidocaína; y los ejemplos del agente de isotonicidad incluyen cloruro sódico y glucosa.

Los adyuvantes se usan para potenciar la respuesta inmune. Se dispone de varios tipos de adyuvantes. En La presente divulgación, se usan los haptenos como adyuvantes. También se pueden usar adyuvantes de Freund para producir emulsiones de agua en aceite de inmunógenos. Los antígenos en emulsiones de agua en aceite estimulan respuestas de anticuerpos altas y de larga duración que pueden atribuirse a la lenta liberación del antígeno. Los antígenos (preferentemente, en solución salina) normalmente se mezclan con un volumen igual del adyuvante para formar una emulsión.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" es reconocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la expresión incluye composiciones, polímeros y otros materiales y/o formas farmacéuticas que están dentro del alcance del juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de los mamíferos, seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" es reconocida en la técnica, e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como una carga líquida o sólida, diluyente, disolvente o material de encapsulación implicada en llevar o transportar cualquier composición en cuestión, desde un órgano o parte del cuerpo a otro órgano u otra parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de una composición en cuestión y no perjudicial para el paciente. En ciertas realizaciones, un vehículo farmacéuticamente aceptable es no pirogénico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se formulan de manera que dichas composiciones se administrarán a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz, como parte de un tratamiento profiláctico, preventivo o terapéutico.

En ciertas realizaciones, la dosificación de las composiciones de oligopéptidos, que se pueden denominar composición terapéutica proporcionada en el presente documento se puede determinar por referencia a las concentraciones plasmáticas de la composición terapéutica o de otros materiales encapsulados. Por ejemplo, las muestras de sangre se pueden ensayar para determinar su respuesta inmune a sus correspondientes oligopéptidos.

Las composiciones terapéuticas proporcionadas por la presente solicitud se pueden administrar a un sujeto que necesita tratamiento por varias vías de administración convencionales, incluyendo por vía oral, tópica, parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramedular. Además, las composiciones terapéuticas se pueden administrar por vía intranasal, como un supositorio rectal o usando una formulación "instantánea", es decir, permitiendo que el medicamento se disuelva en la boca sin la necesidad de usar agua. Además, las composiciones

se pueden administrar a un sujeto que necesita tratamiento mediante formas farmacéuticas de liberación controlada, administración de fármacos específica del sitio, administración transdérmica de fármacos, administración de fármacos mediada por parche (activo/pasivo), por inyección estereotáctica o en nanopartículas.

Expresado en términos de concentración, un principio activo puede estar presente en las composiciones terapéuticas de la presente invención para un uso localizado sobre el cutis, intranasal, faringolaríngea, bronquial, intravaginal, rectal u ocular.

Para su uso como aerosoles, los principios activos pueden envasarse en un recipiente de aerosol presurizado junto con un propulsor gaseoso o licuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, dióxido de carbono, nitrógeno, propano y similares, con los coadyuvantes habituales tales como codisolventes y agentes humectantes cuando sea necesario o deseable.

Las vías más comunes de administración también incluyen las vías transmucosa preferidas (nasal, bucal/sublingual, vaginal, ocular y rectal) y la vía de inhalación.

Además, en ciertas realizaciones, las composiciones en cuestión de la presente solicitud pueden estar liofilizadas o sometidas a otra técnica de secado apropiada tal como secado por pulverización. Las presentes composiciones se pueden administrar una vez, o pueden dividirse en un número de dosis más pequeñas para su administración a intervalos variables de tiempo, dependiendo, en parte, de la velocidad de liberación de las composiciones y la dosis deseada.

Las formulaciones útiles en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, aerosol y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. La cantidad de una composición en cuestión que se puede combinar con un material vehículo para producir una sola dosis puede variar dependiendo del sujeto tratado y del modo particular de administración.

La cantidad terapéuticamente aceptable descrita en el presente documento se puede administrar en formulaciones de inhalación o en aerosol. Las formulaciones para inhalación o en aerosol pueden comprender uno o más agentes, tales como adyuvantes, agentes de diagnóstico, agentes de formación de imágenes o agentes terapéuticos útiles en la terapia de inhalación. La formulación de aerosol final puede contener, por ejemplo, del 0,005 al 90 % p/p, por ejemplo, del 0,005 al 50 %, del 0,005 al 5 % p/p o del 0,01 al 1,0 % p/p de medicamento con relación al peso total de la formulación.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

La dosis terapéutica aceptable se puede combinar con otros fármacos y se puede tratar como una combinación de fármacos.

En la Figura 2, los anticuerpos producidos 241 se comprueban mediante ELISA. La inoculación de los ratones (228) se realizó usando células cancerosas 246 por inyección. Se observó el bloqueo de las MMP 230 por el antígeno 248. La ECM intacta 234, mostrada como 250 mediante la inhibición de la destrucción de la ECM 232 se demostró mediante estudios *in vivo* e *in vitro* como se ha descrito anteriormente y se describa a continuación.

Líneas de células cancerosas y cultivo

Se mantuvieron células humanas de cáncer de cuello uterino (HeLa) y células murinas de melanoma B16FO obtenidas a partir de la ATCC (colección americana de cultivos tipo, Rockville, MD) en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10 % y antibióticos. Los medios y los sueros usados se obtuvieron de la ATCC, y los antibióticos (penicilina y estreptomicina) eran de Gibco BRL, Long Island, NY.

Invasión en Matrigel

Se realizaron estudios de invasión usando inserciones de Matrigel (Becton Dickinson) en placas de 24 pocillos. Suspendidas en medio que contenía antisueros de los ratones experimentales inmunizados, en dilución 1:100, se sembraron células HeLa de cáncer de cuello uterino humanas sobre la inserción en el pocillo. El pocillo tiene medio cebado con fibroblastos dérmicos humanos como *tastant* químico. A continuación, se incubaron las placas con las inserciones en un incubador de cultivo equilibrado con aire al 95 % y CO_2 al 5 % durante 24 horas. Después de la incubación, se retiraron los medios de los pocillos. Se lavaron las células de la superficie superior de la inserción

suavemente con hisopos de algodón. Las células que habían penetrado en la membrana de Matrigel se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) y se contaron visualmente con el microscopio.

Se comparó la inhibición con el control. Las Figuras 3A-3D muestran varios oligopéptidos de metaloproteinasas de la matriz y su eficacia. Hay muchas células que invaden el Matrigel en comparación con las células expuestas a MMP-9A1-3 y MMP-2 A4. Por ejemplo, en la Figura 3A, las células numeradas como 1001A-1003A son más en número en comparación con las células tratadas con MMP-9 A1 1004 A-1005A. Se encontraron resultados similares para MMP-9 2-3 y MMP-2 A4 en figuras subsiguientes.

Los estudios *in vivo* descritos anteriormente presentan algunos resultados interesantes en forma de peso de los ratones, peso del tumor, estudios de la carga tumoral y la eficacia de diversos oligopéptidos usados en una cantidad terapéuticamente eficaz para inhibir la digestión o destrucción de la ECM.

Tras la dosificación de los ratones, el día 45, se sangraron los ratones por punción orbital y se recogió la sangre en tubo microcentrifugado de 2 ml. Tras un ensayo de la respuesta inmune contra péptidos individuales, los ratones de cada grupo se inocularon por vía subcutánea con 0,5 x 10^6 en 0,2 ml de PBS. Después de la inyección, se devolvieron los ratones a las jaulas y se alimentaron con dieta regular de comida para ratones Purina. Tras veintiuna semanas, los ratones se sacrificaron y se extirparon sus tumores. Se midieron las dimensiones (longitud y anchura) de los tumores usando un calibrador digital, y se calculó la carga tumoral usando la siguiente fórmula: 0,5 x longitud x anchura.

El peso de los animales no cambió significativamente antes y después del tratamiento como se muestra en la Figura 4. La Figura 5 muestra el efecto terapéutico del efecto de inmunización de todos los oligopéptidos de metaloproteinasas de la matriz en el peso del tumor. La Figura 6 muestra el efecto significativo del volumen del tumor en comparación con los tumores de control, lo que demuestra la eficacia del método de tratamiento. La Figura 7A-E muestra visualmente algunos de los tumores extirpados y mostrados. La reducción significativa en el tamaño es muy evidente. En una de las MMP-9 A 3, uno de los tumores ha desaparecido por completo. La Figura 8 muestra una estructura tridimensional de la molécula de MMP. La figura también desvela la región de la molécula que permite MMP-9 A1, MMP-9 A2 y MMP-9 A3 como una estructura tridimensional. El peptidomimético de estas MMP se puede diseñar basándose en la estructura para inhibir la expresión de MMP y prevenir la metástasis.

Además, se apreciará que las diversas secuencias, procesos de inmunización y métodos de tratamiento desvelados en el presente documento pueden realizarse usando medios para la obtención de las diversas combinaciones de métodos de dosificación y administración terapéuticas para el tratamiento de una enfermedad específica. Por consiguiente, la memoria descriptiva y las figuras han de considerarse en sentido ilustrativo más que restrictivo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Matthias W. Rath RATH, Matthias W Niedzwiecki, Aleksandra ROOMI, WAHEED M

<120> OLIGOPÉPTIDOS DE METALOPROTEINASAS Y SU USO TERAPÉUTICO

<130> RIPLLC018.003PCT1

<140> 13175937
<141> 04-07-2011

<150> 13012769
<151> 24-01-2011

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 1

Cys Pro Arg Lys Pro Lys Trp Asp Lys Cys
1 5 10

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 2

Cys His Phe Pro Phe Ile Phe Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Ala Cys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 3

Asp Thr Asp Asp Arg Phe Gly Phe
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 4

Asp Arg Asp Lys Leu Phe Gly Phe Cys Pro Thr Arg Ala Asp Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 5

Asp Lys Asp Gly Lys Phe Gly Phe
1 5

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

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 6

Asp Ala Asp Arg Gln Phe Gly Phe
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 7

Asp Thr Asp Arg Lys Tyr Gly Phe
1 5

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

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 8

Asp Lys Asp Lys Ile Phe Gly Phe
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 9

Asp Lys Asp Lys Lys Tyr Gly Phe
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 10

Asp Thr Asp Arg Arg Phe Gly Phe
1 5

<210> 11
<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 11

Asp Lys Asp Gly Lys Phe Gly Phe
1 5

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 12

Cys His Phe Pro Phe Thr Phe Glu Gly Arg Ser Tyr Leu Ser Cys
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 13

Cys His Phe Pro Phe Ile Phe Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Arg Cys
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintéticas

<400> 14

Cys His Phe Pro Phe Leu Phe Glu Gly Thr Ser Tyr Ser Ser Cys
1 5 10 15

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

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintéticas

<400> 15

Cys His Phe Pro Phe Arg Phe Gln Asn Lys Pro Tyr Lys His Cys
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintéticas

<400> 16

Cys His Phe Pro Phe Thr Phe Glu Gly Lys Ser Tyr Thr Ser Cys
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 17

Asp Gln Asp Lys Leu Tyr Gly Phe Cys Pro Thr Arg Val Asp Ala
1 5 10 15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintéticas

<400> 18

Asp Lys Ala Asp Gly Phe Cys Pro Thr Arg Ala Asp Val Thr Val
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintéticas

<400> 19

Asp Gln Asp Lys Leu Tyr Gly Phe Cys Pro Thr Arg Val Asp Ala
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 20

Asp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Pro Asn Arg Asp Thr Ala Val Ile
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligopeptídica sintética

<400> 21

Asp Lys Asp Lys Leu Tyr Gly Phe Cys Pro Thr Arg Ala Asp Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

identificar una secuencia oligopeptídica para una metaloproteinasa de la matriz expresada en una enfermedad específica,
sintetizar la secuencia oligopeptídica para la metaloproteinasa de la matriz,
formular una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de tratamiento usando la secuencia oligopeptídica de la metaloproteinasa de la matriz,
preparar una composición farmacéutica usando la composición de tratamiento para tratar a un mamífero que tiene la enfermedad específica que muestra una sobreexpresión de la metaloproteinasa de la matriz,

en el que la secuencia oligopeptídica de la metaloproteinasa de la matriz es al menos una de las SEQ ID NO: 2 a 21 o una combinación de las mismas.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia oligopeptídica de la metaloproteinasa de la matriz es al menos una de las SEQ ID NO: 2 a 4.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición farmacéutica es una vacuna.

4. El método de una de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad específica es al menos una de entre enfermedad neoplásica, en especial, cáncer, enfermedad inflamatoria, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cardiovascular oclusiva, enfermedad degenerativa y enfermedad infecciosa.

5. El método de una de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se va a administrar usando al menos uno de entre un método no invasivo peroral, tópico, enteral, transmucoso, de administración dirigida, de administración de liberación sostenida y parenteral.

6. El método de una de las reivindicaciones anteriores que comprende además:

medir *ex vivo* el nivel de expresión de una metaloproteinasa de la matriz en una especie específica que tiene una enfermedad específica, en especial, cáncer,
formular una composición de tratamiento para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de la secuencia oligopeptídica de la metaloproteinasa de la matriz y
preparar el preparado farmacéutico usando la composición de tratamiento para inyectar la composición de tratamiento como una vacuna a la especie específica para tratar la enfermedad específica que tiene una sobreexpresión de una metaloproteinasa de la matriz.

7. El método de la reivindicación 6, en el que la especie específica es un mamífero o un no mamífero.

8. El método de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que el preparado farmacéutico se va a inyectar directamente en un tumor.

9. El método de una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además:

acoplar la secuencia de la metaloproteinasa de la matriz con un hapteno para potenciar la respuesta inmune como vacuna.

10. El método de una de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además:

formular la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de tratamiento usando una secuencia peptidomimética de la metaloproteinasa de la matriz.

11. Una composición farmacéutica que comprende:

un oligopéptido de metaloproteinasa de la matriz, siendo el oligopéptido de metaloproteinasa de la matriz al menos uno de las SEQ ID NO: 2 a 21 o una combinación de las mismas, preferentemente al menos uno de las SEQ ID NO: 2 a 4, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, que comprende además

un adyuvante,
un aditivo para potenciar la estabilidad química,
una solución salina de tampón fosfato y
un hapteno para aumentar la inmunogenicidad de la composición.

13. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 11 o 12, en la que el oligopéptido de metaloproteinasa de la matriz es de forma lineal o circular.

14. Un oligopéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 2 a 21.

15. El oligopéptido de la reivindicación 14, en el que la secuencia de aminoácidos es una de las SEQ ID NO: 2 a 4.

16. El oligopéptido de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el oligopéptido está biotinilado y/o unido covalentemente a hemocianina de lapa californiana.

17. Uso de un oligopéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 16 para la preparación de una vacuna para inducir una respuesta inmune contra la metaloproteinasa 2 de la matriz humana o la metaloproteinasa 9 de la matriz humana en un mamífero.

18. Uso de un oligopéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 16 para la preparación de una vacuna para tratar el cáncer.

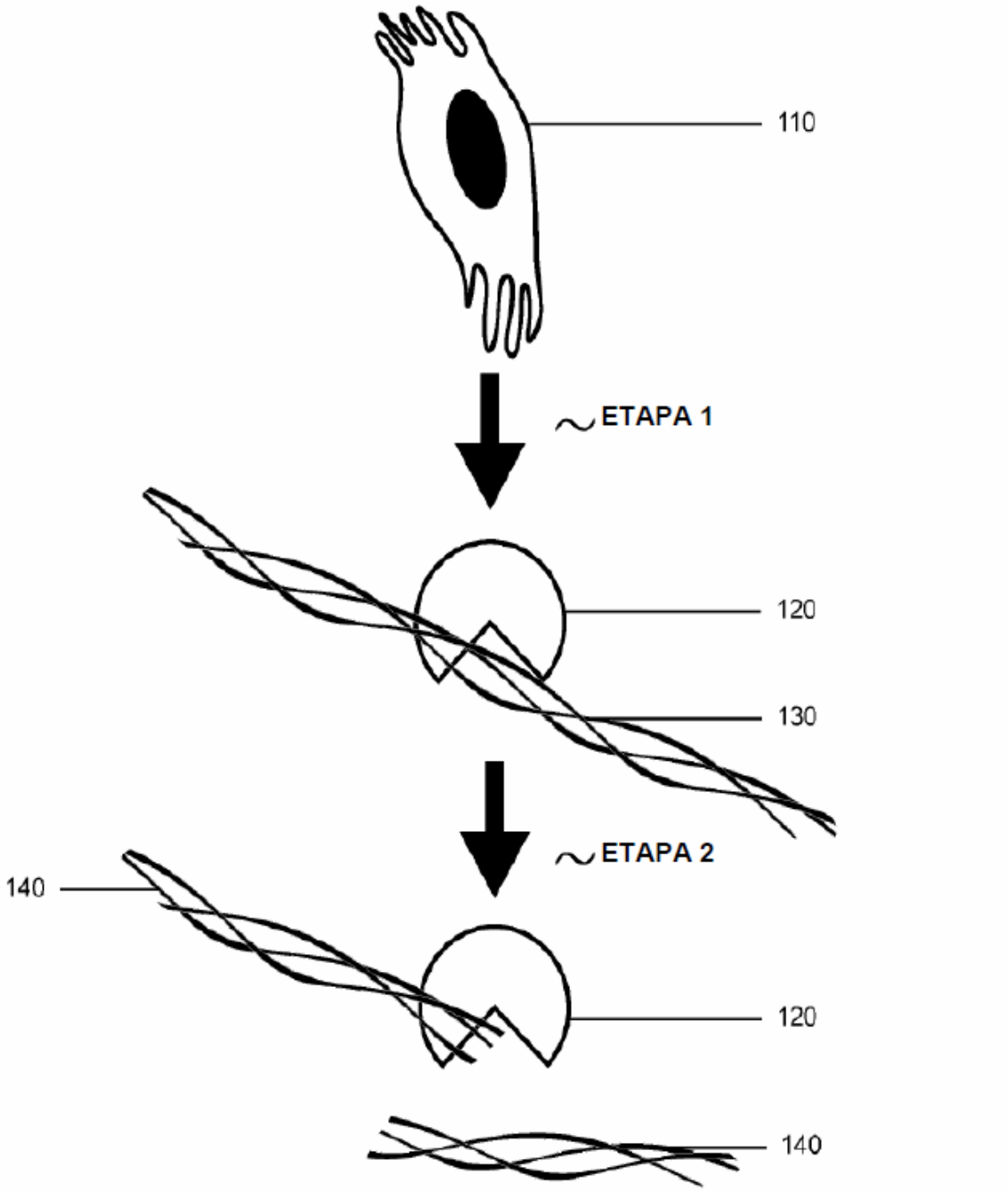

110
ETAPA 1
120
130
ETAPA 2
140
120
140
CÉLULA CANCEROSA
Y FUNCIÓN DE MMP 100

FIG. 1

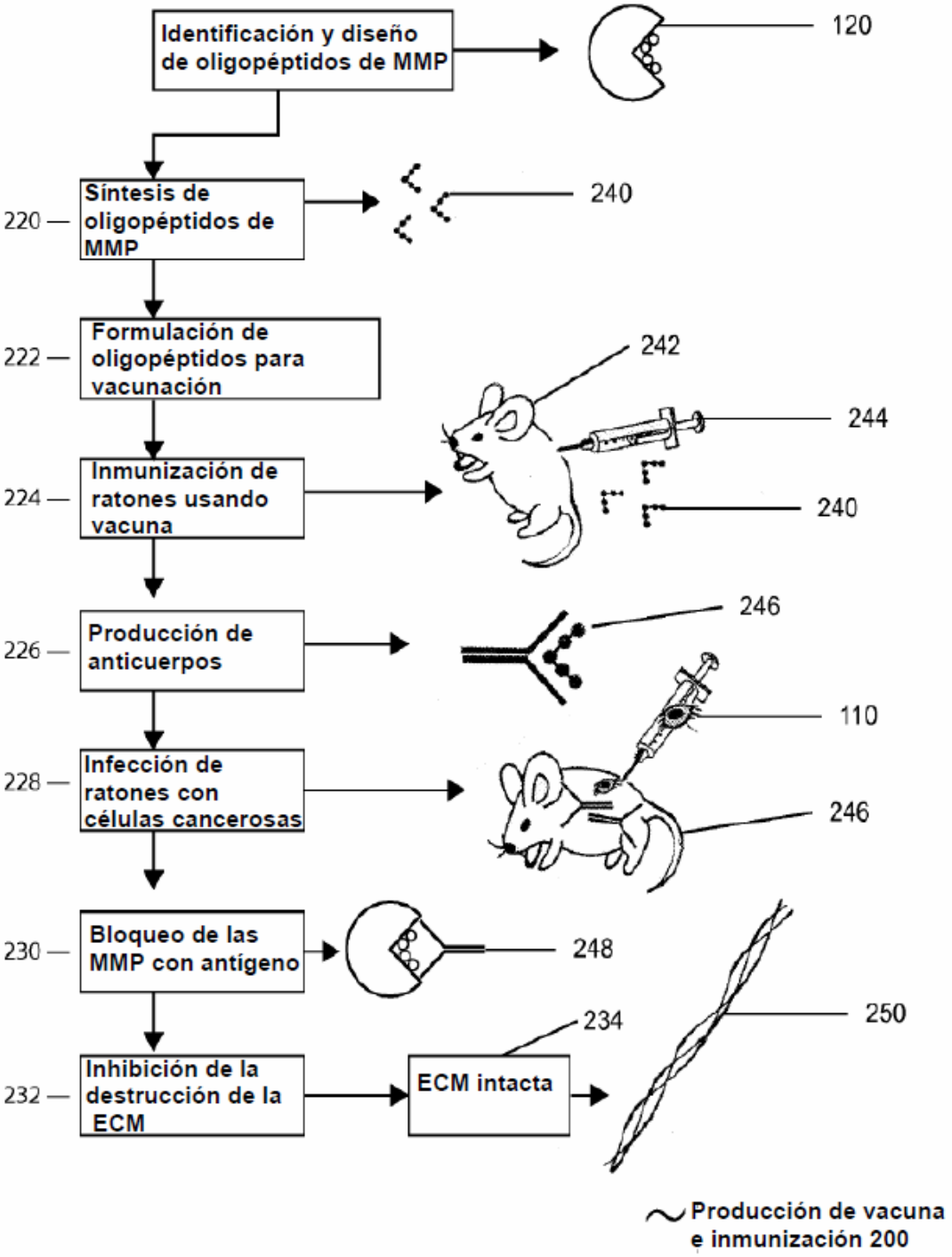
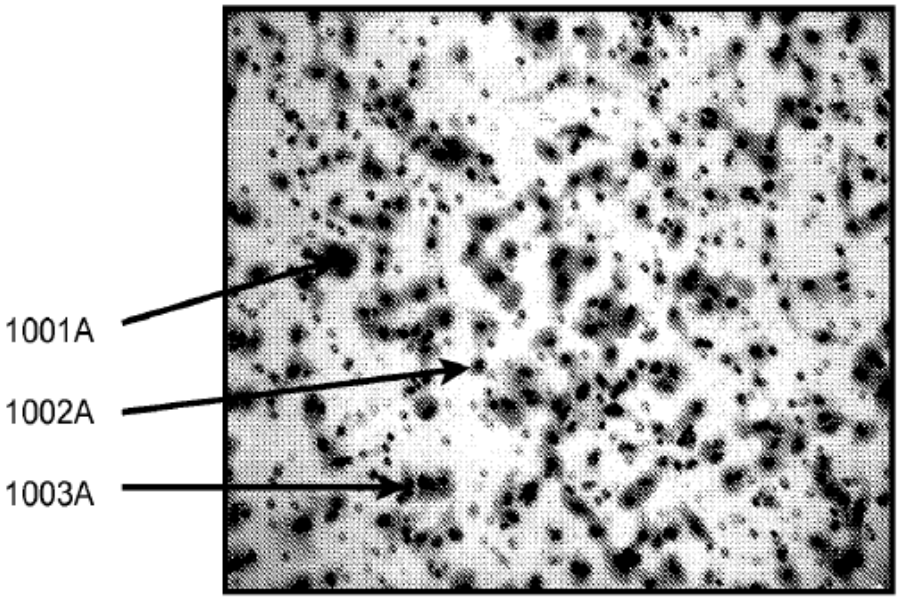
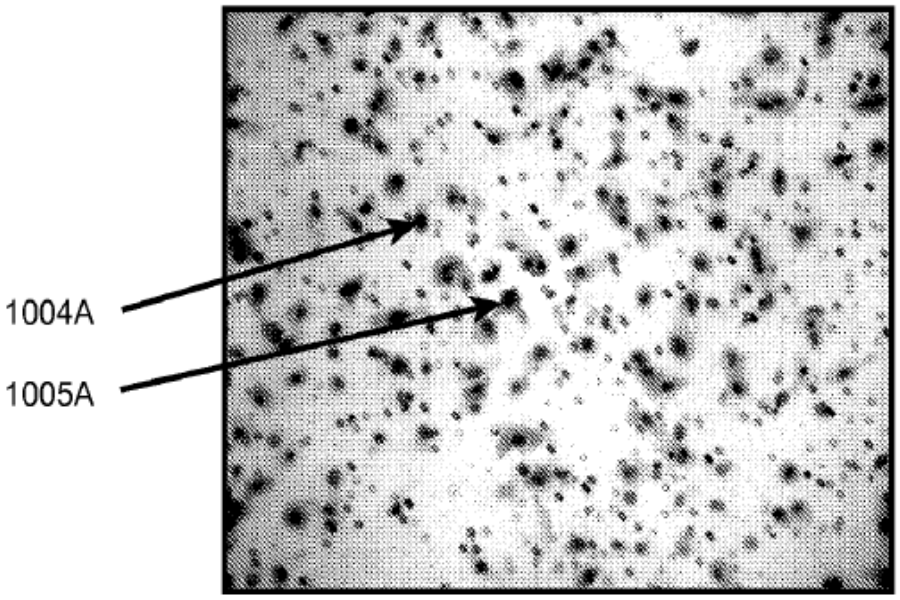

Identificación y diseño de oligopéptidos de MMP
120
220
Síntesis de oligopéptidos de MMP
240
222
Formulación de oligopéptidos para vacunación
242
244
224
Inmunización de ratones usando vacuna
240
226
Producción de anticuerpos
246
110
228
Infección de ratones con células cancerosas
246
230
Bloqueo de las MMP con antígeno
248
234
232
Inhibición de la destrucción de la ECM
ECM intacta
250
Producción de vacuna e inmunización 200

FIG. 2

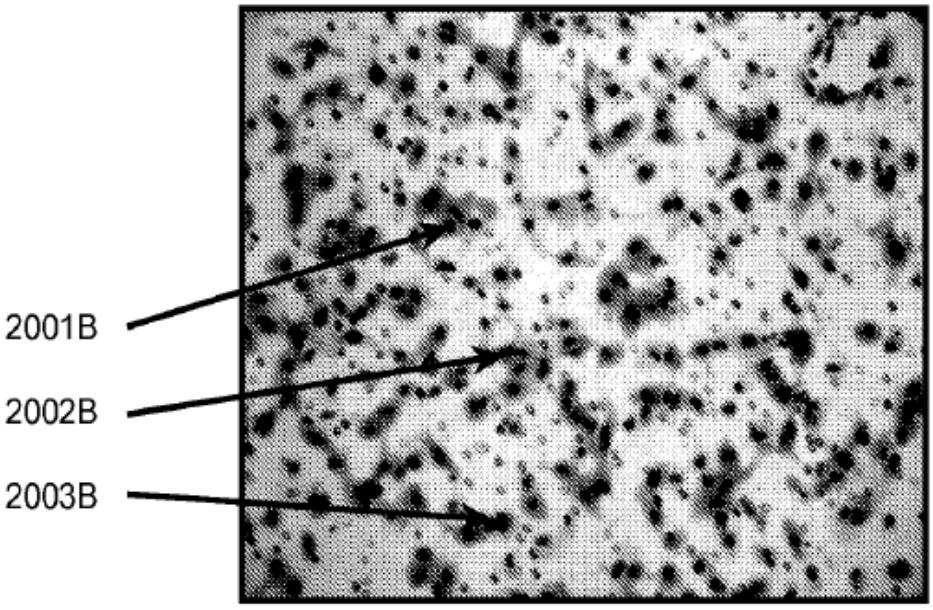


HELA: CONTROL

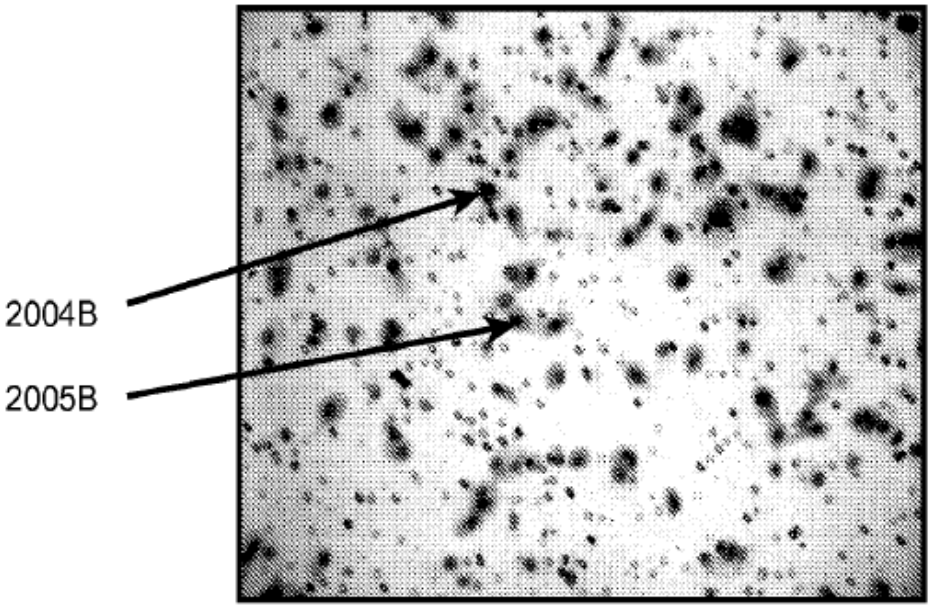


HELA: MMP-9, A 1 1:100

FIG. 3A

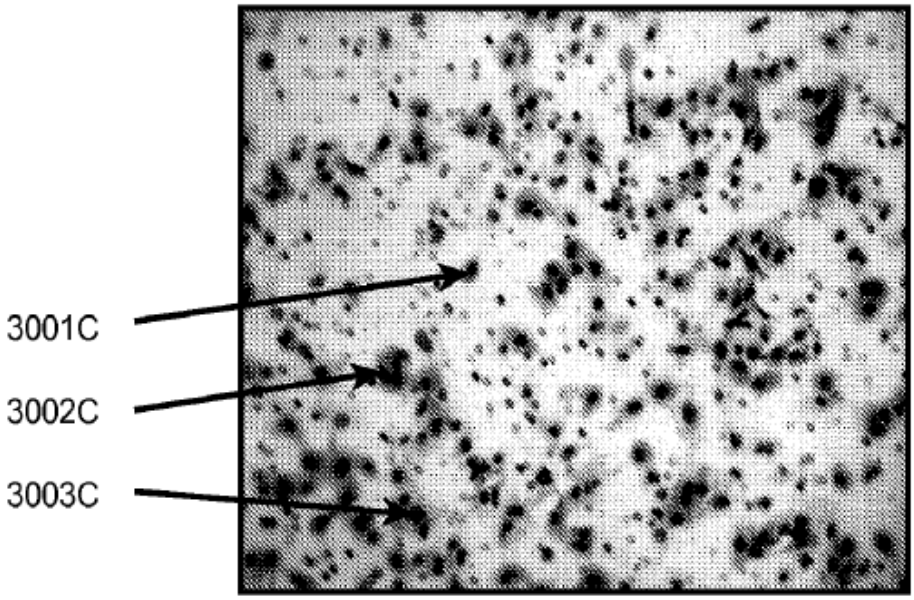


HELA: CONTROL

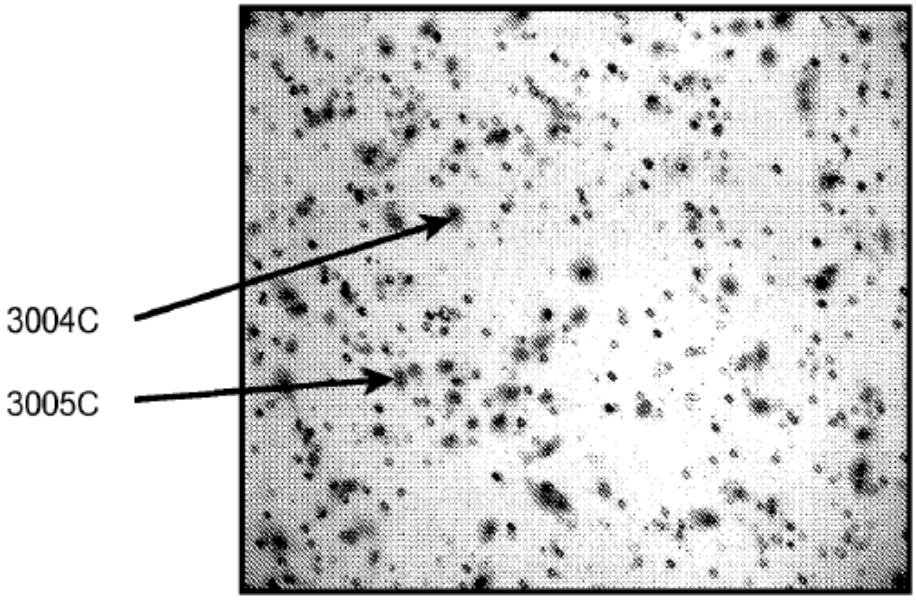


HELA: MMP-9, A 2 1:100

FIG. 3B

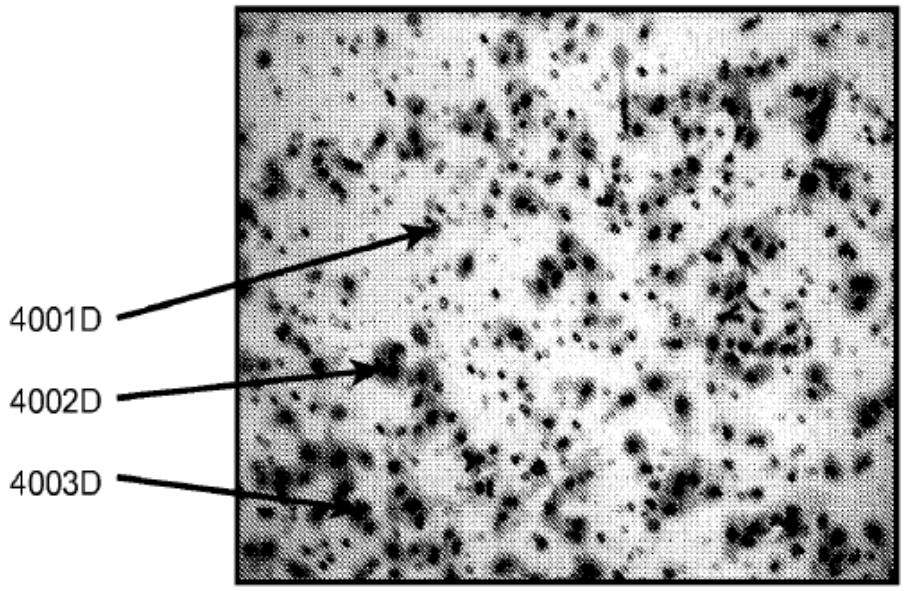


HELA: CONTROL

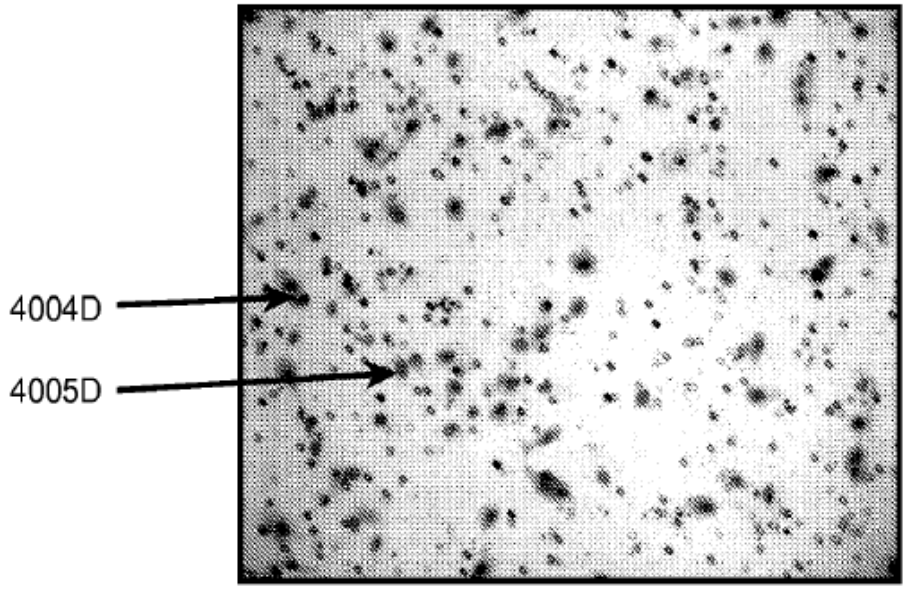


HELA: MMP-9, A 3 1:100

FIG. 3C

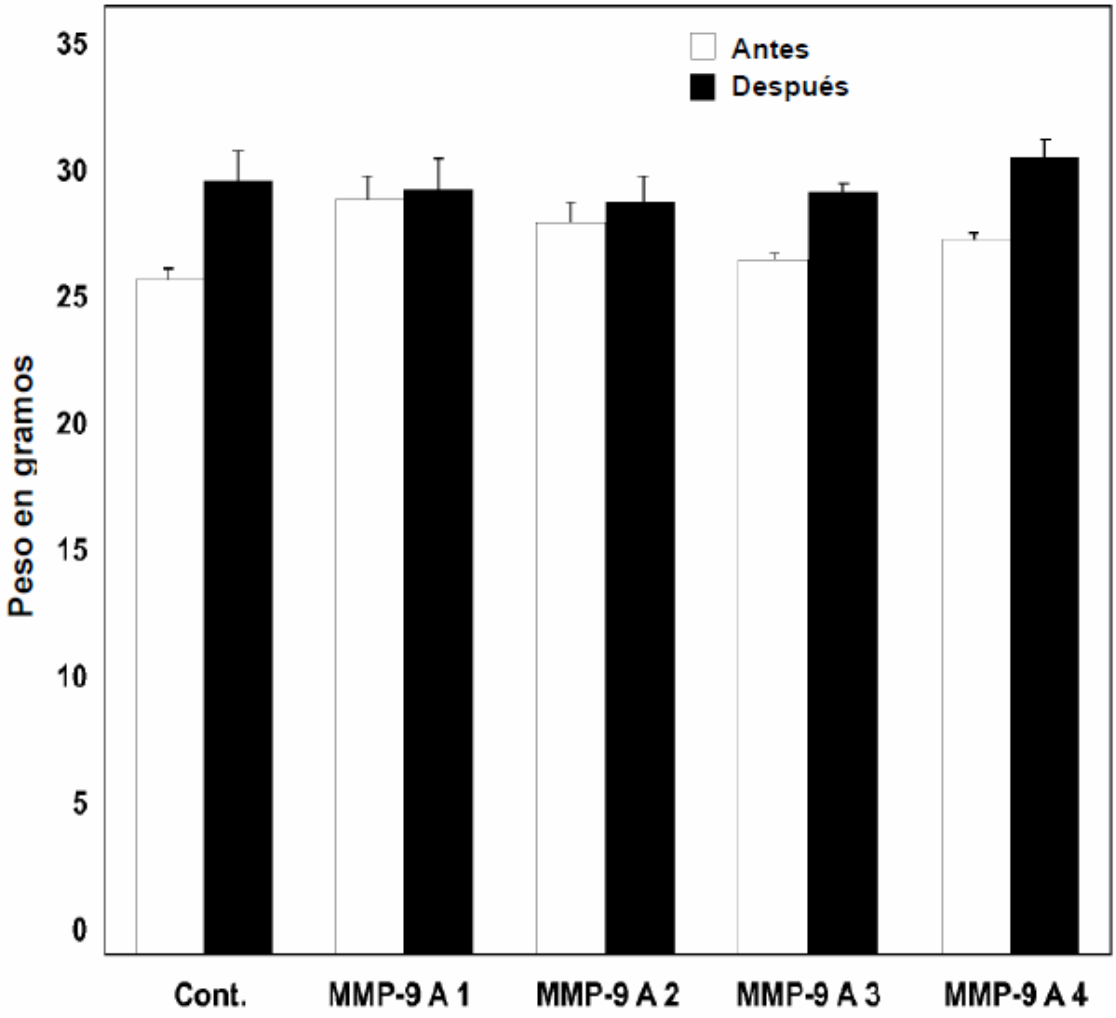


HELA: CONTROL



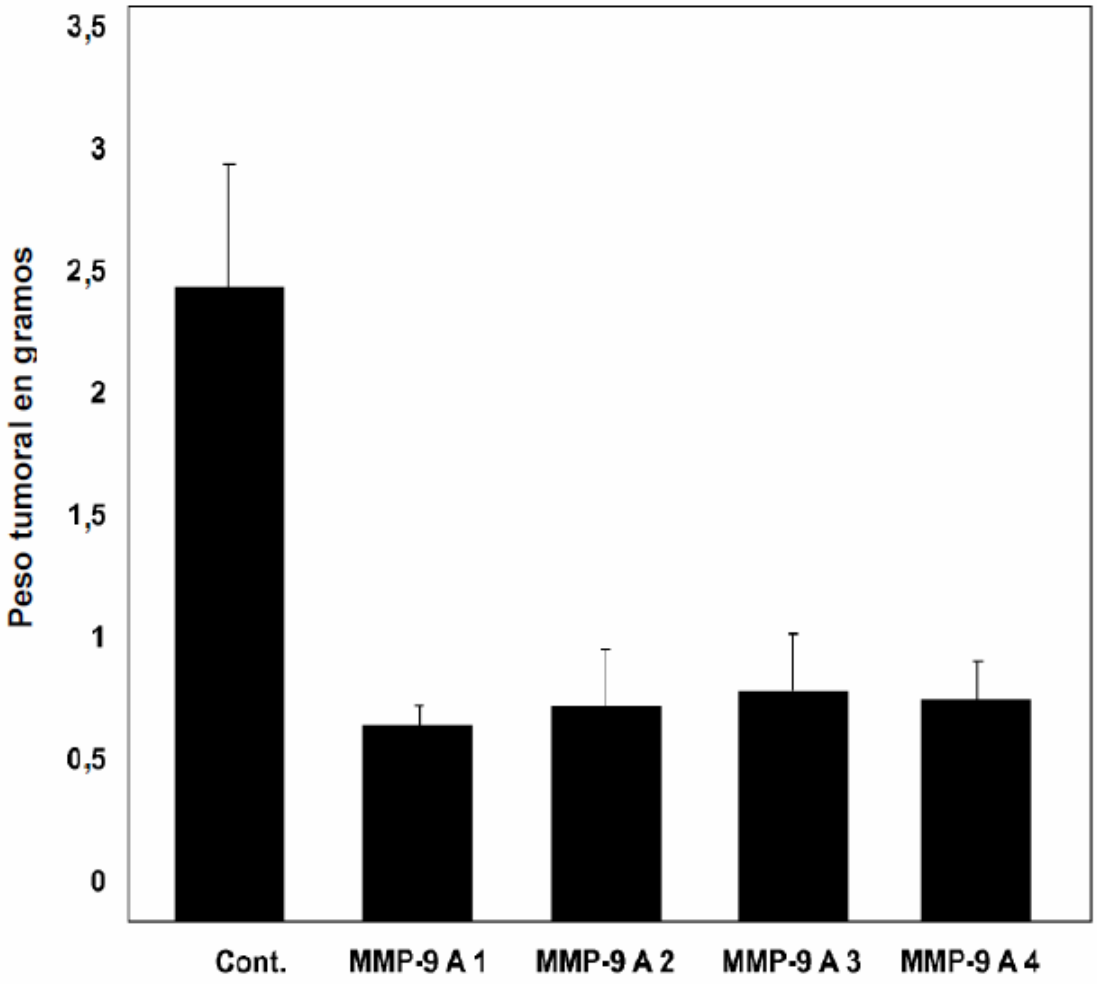
HELA: MMP-9, A 4 1:100

FIG. 3D



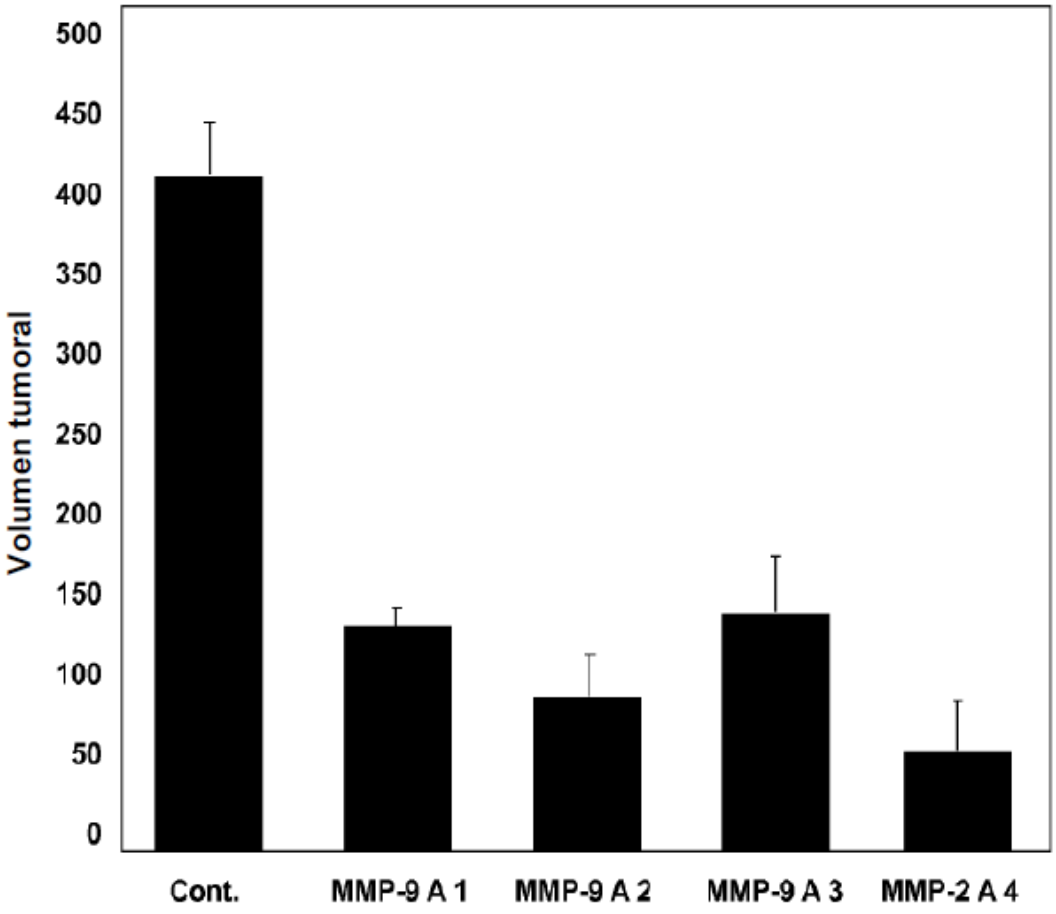
Peso de ratones C57BL/6 macho inmunizados antes y después de los xenoinjertos de melanoma B16FO

FIG. 4



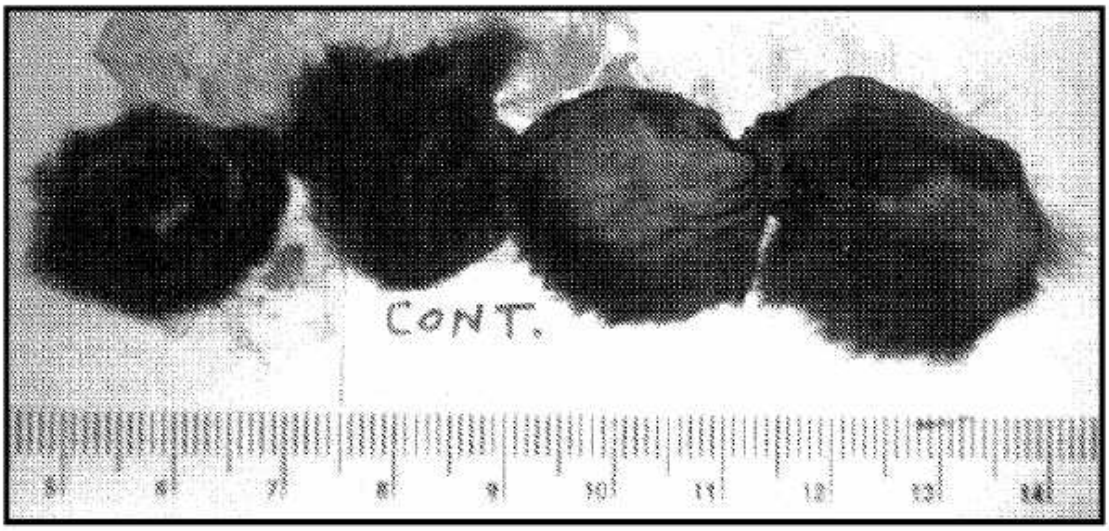
Inhibición del peso tumoral en los ratones inmunizados con los oligopéptidos ensayados

FIG. 5



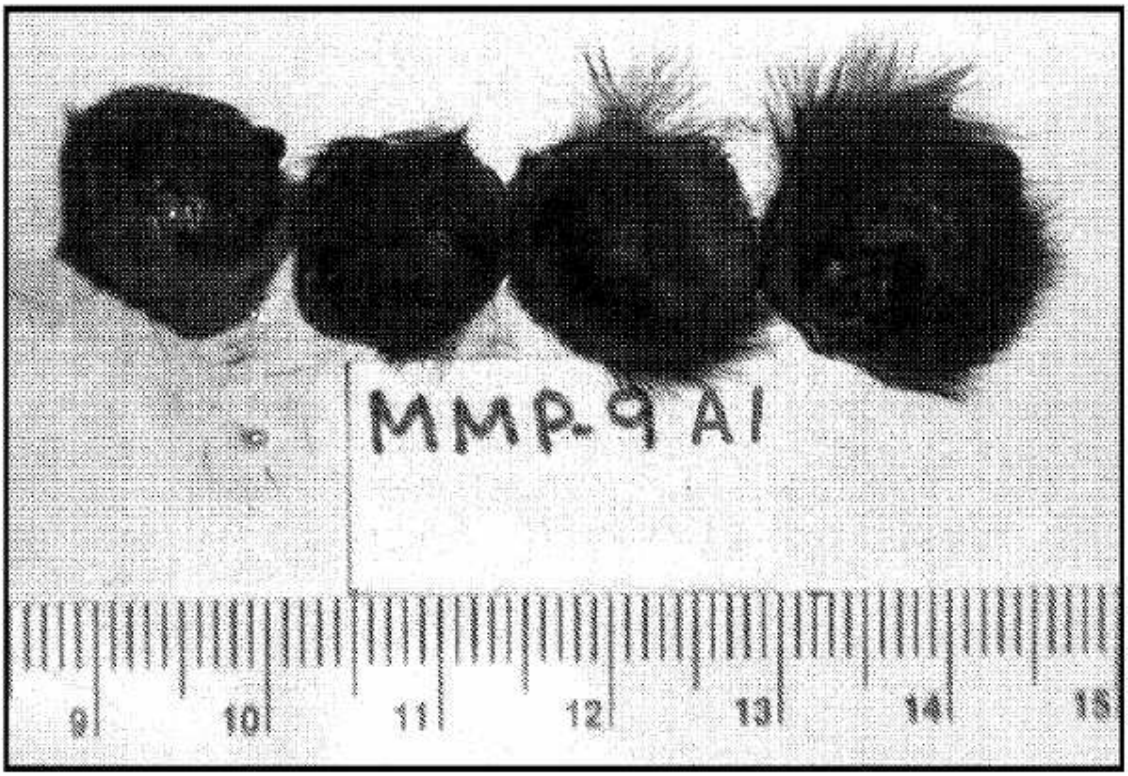
Inhibición de la carga tumoral en los ratones inmunizados con los oligopéptidos ensayados

FIG. 6



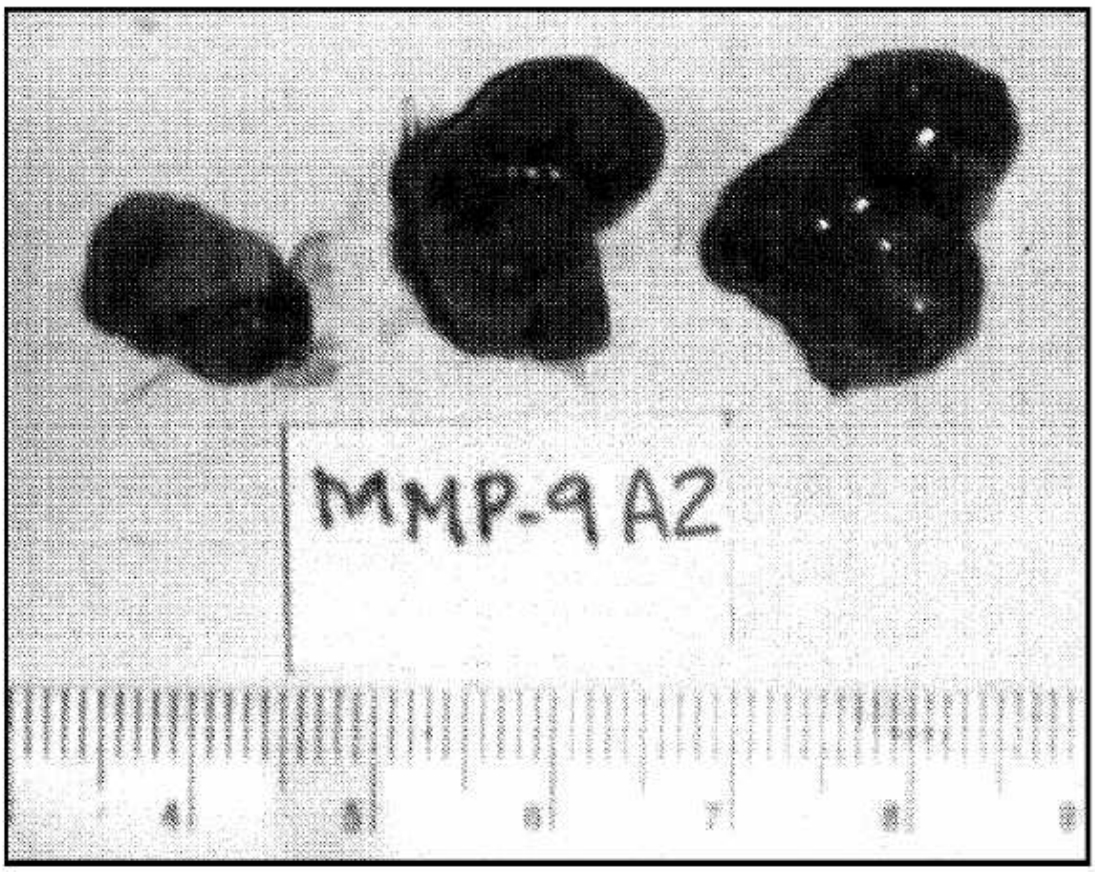
TUMOR DE CONTROL

FIG. 7A



TUMOR TRATADO MMP-9 A1

FIG. 7B

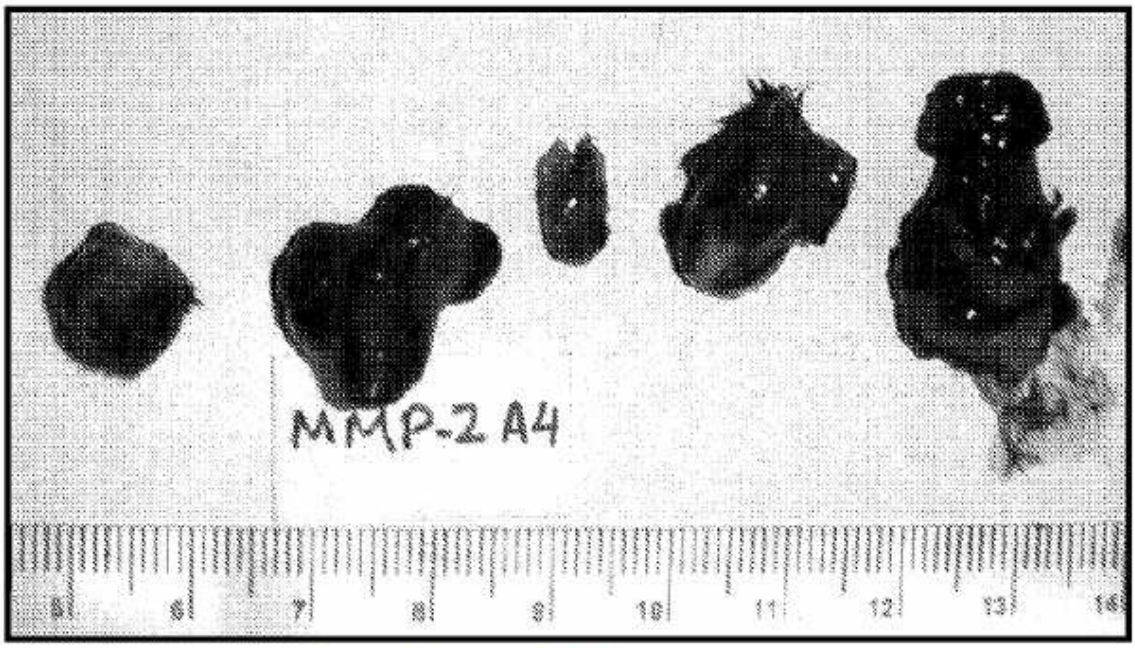


TUMOR TRATADO MMP-9 A2

FIG. 7C

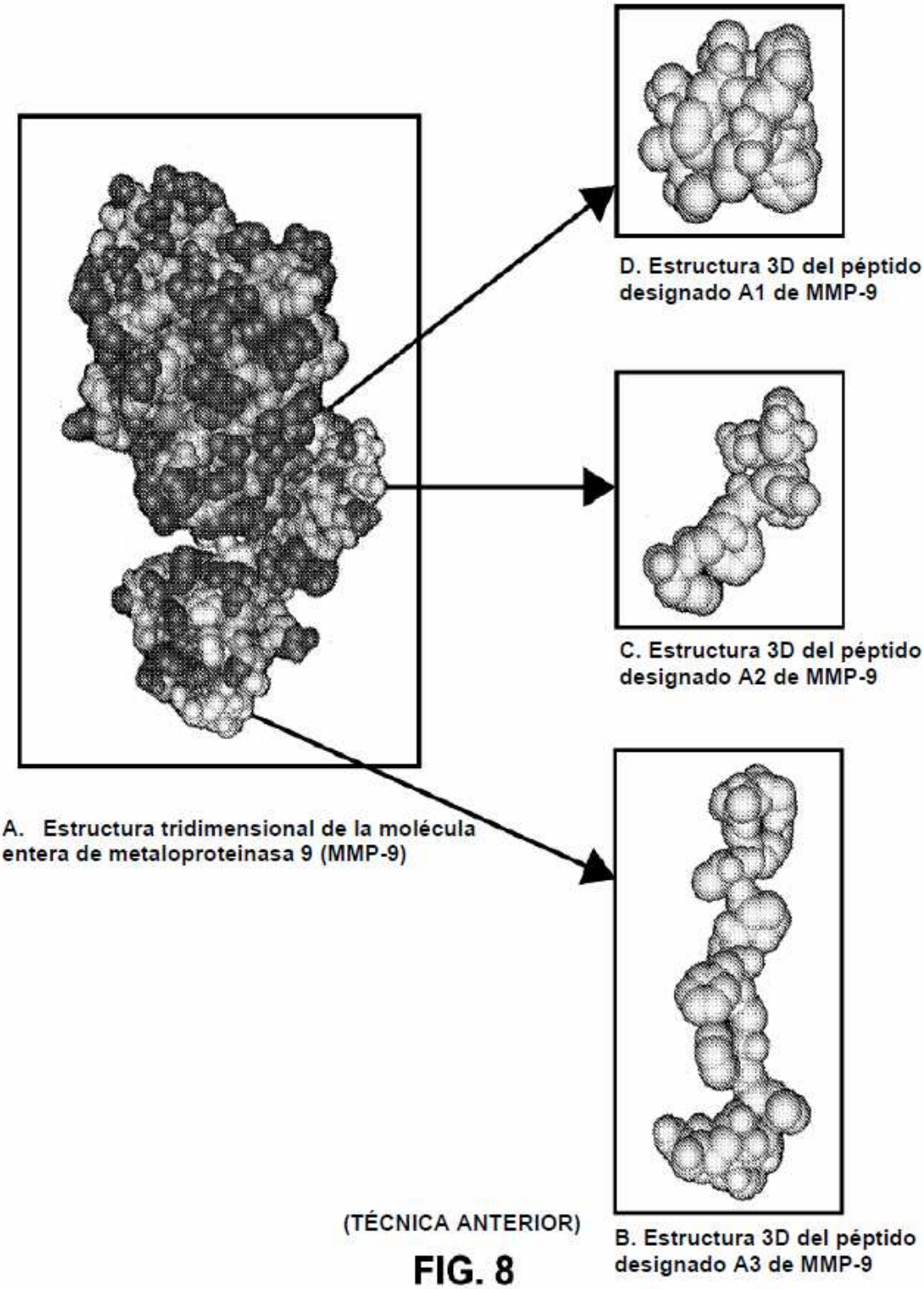
TUMOR TRATADO MMP-9 A3

FIG. 7D



TUMOR TRATADO MMP-2 A4

FIG. 7E



(TÉCNICA ANTERIOR)

FIG. 8