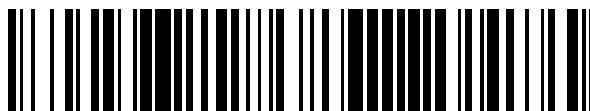


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 037**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2013** **PCT/EP2013/074404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014** **WO14079943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2013** **E 13798617 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019** **EP 2922563**

54 Título: **Péptidos derivados de CD44V6 para tratar cánceres metastásicos**

30 Prioridad:

21.11.2012 GB 201220889

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2020

73 Titular/es:

AMCURE GMBH (100.0%)
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1
76344 Eggenstein-Leopoldshafen , DE

72 Inventor/es:

ORIAN-ROUSSEAU, VÉRONIQUE;
MATZKE, ALEXANDRA y
PONTA, HELMUT

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 765 037 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de CD44V6 para tratar cánceres metastásicos

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano, en el que el cáncer metastásico muestra expresión de CD44v6, comprendiendo el compuesto un péptido de secuencia de aminoácidos X₁-R-W-H-X₅ en la que X₁ es K, R, N o Q y X₅ es E o D, y en el que el tratamiento provoca la regresión de las metástasis que ya se han formado y diseminado por el cuerpo.

Antecedentes de la invención

Se ha mostrado que diferentes tipos de cáncer implican al menos en parte la sobreactivación de tirosina cinasas receptoras tales como cMET y VEGFR. Los cánceres incluyen por ejemplo cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer pancreático.

Se ha comentado que CD44 tiene un papel en por ejemplo la activación dependiente de HGF de tirosina cinasas receptoras tales como cMET, ERK y VEGFR (véanse, entre otros, Ponta *et al.*, Nature Reviews (2003), 4, 33-45 y Tremmel *et al.*, Blood (2009), 25, 5236-5244). Además, la expresión de una forma cortada y empalmada de manera alternativa de CD44, concretamente CD44v6, se ha mostrado que se produce en algunos de los cánceres que están caracterizándose por la sobreactivación de tirosina cinasas receptoras. Se ha comentado que péptidos que son capaces de bloquear la activación mediada por CD44v6 de tirosina cinasas receptoras es potencialmente útil en el tratamiento de tales cánceres.

El documento EP 1 647 556 A1 comenta péptidos inhibidores de CD44v6 y su uso para el tratamiento de cáncer.

El documento EP 2 266 593 A1 comenta el uso de péptidos inhibidores de CD44v6 para aplicaciones oftálmicas.

Matzke *et al.* (2005) Cancer Research, 65: 6105-6110 comentan la acción de CD44v6 para la función de correceptores.

Orian-Rousseau (2010) European Journal of Cancer, 46: 1271-1277 comenta CD44v6 como diana terapéutica.

Los documentos EP1 258 255 A1 y EP 1 417 974 A1 dan a conocer anticuerpos que se unen a CD44v6 y fragmentos de los mismos.

Sin embargo, existe un interés continuo en agentes farmacéuticamente activos que permitan el tratamiento de tales cánceres, tales como por ejemplo cáncer pancreático.

En los Estados Unidos, el cáncer pancreático es el segundo cáncer maligno más común del tracto gastrointestinal y la cuarta causa principal de muerte relacionada con cáncer en adultos (Cancer Stating Manual, 7ª edición, 2010, American Joint Committee on Cancer, Springer). Es una neoplasia maligna que se origina a partir de células transformadas que surgen en tejidos que forman el páncreas. El tipo más común de cáncer pancreático es el adenocarcinoma o cáncer pancreático exocrino, que son tumores que presentan arquitectura glandular al microscopio óptico que surgen del componente exocrino del páncreas. Un tipo minoritario surge de las células del conducto pancreático y se clasifican como tumores neuroendocrinos.

Tratamiento del cáncer pancreático depende normalmente del estadio del cáncer. Aunque sólo el cáncer localizado se considera adecuado para cirugía con intención curativa en la actualidad, sólo aproximadamente el 20% de los casos están diagnosticados con enfermedad localizada. La cirugía también puede realizarse con fines paliativos, si el tumor maligno está invadiendo o comprimiendo el duodeno o el colon. Opciones de adicionales incluyen radiación y quimioterapia paliativa. En la actualidad la quimioterapia incluye tratamiento con gemcitabina o terapias de combinación con gemcitabina tales como gemcitabina/oxaliplatino o gemcitabina/cisplatino. A pesar de los esfuerzos de investigación intensivos, actualmente no está disponible ningún tratamiento que pudiera considerarse que proporciona una supervivencia libre de progresión a largo plazo. El cáncer pancreático es por tanto hasta la fecha uno de los tumores malignos con los peores pronósticos de todas las neoplasias. Particularmente si las metástasis se han diseminado por el cuerpo tal como al hígado, la cavidad peritoneal y los pulmones, no está disponible ningún tratamiento eficaz, que permitiera la regresión eficaz de las metástasis existentes.

Existen problemas similares para otros cánceres, que ya han formado metástasis. Para muchos de estos cánceres, la quimioterapia paliativa puede ser la única opción terapéutica.

Por tanto, existe la necesidad de nuevos compuestos y métodos que puedan usarse para tratar cánceres tales como cánceres pancreáticos, cuando se ha producido la diseminación metastásica.

Objetivo y sumario de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano, en el que dicho compuesto comprende un péptido de la secuencia de aminoácidos X1-R-W-H-X5, en la que X1 se selecciona de K, R, N o Q y en la que X5 se selecciona de E o D, en el que dicho cáncer metastásico muestra expresión de CD44v6, y en el que dicho tratamiento provoca la regresión de las metástasis que ya se han formado y diseminado por el cuerpo.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos, y composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos, que pueden usarse para el tratamiento de cáncer en un ser humano cuando se ha producido la diseminación metastásica.

Otro objetivo es proporcionar nuevos usos médicos para tratar el cáncer en un ser humano cuando se ha producido la diseminación metastásica.

Estos y otros objetivos tal como resultarán evidentes a partir de la descripción que sigue se logran mediante la materia de las reivindicaciones independientes. Algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención se mencionan en las reivindicaciones dependientes.

La presente invención, en algún grado, se basa en los datos experimentales descritos a continuación en el presente documento que en partes tienen como objetivo dilucidar la función molecular de la molécula correceptora CD44v6. Las glicoproteínas transmembrana CD44 forman parte de una familia grande de moléculas de adhesión celular (CAM). Se ha reconocido que CD44 comprende variantes cortadas y empalmadas de manera alternativa, algunas de las cuales están implicadas en el proceso de metástasis a través de su activación de la tirosina cinasa receptora Met y VEGFR (véase Matzke *et al.*, Cancer Res (2005), 65(14) 6105-6109).

El experimento descrito a continuación en el presente documento muestra una versión cortada y empalmada de manera alternativa de CD44 que comprende el exón v6 (CD44v6) es responsable de inducir la metástasis, por ejemplo en modelos animales de cáncer pancreático humano. Se ha implicado también a CD44v6 en otros cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico y cáncer de mama, probablemente debido a su papel en la activación dependiente de HGF de tirosina cinasas receptoras tales como cMET, ERK y VEGFR.

Los experimentos descritos a continuación en el presente documento muestran además que un péptido que tiene como requisito mínimo la secuencia de tripéptido R-W-H que está incrustada en una estructura principal peptídica de 5 aminoácidos tal como N-R-W-H-E es capaz de bloquear la formación de metástasis en un modelo animal de cáncer pancreático humano. Además, los datos descritos en el presente documento muestran que en un modelo ortópico de un cáncer pancreático humano en ratones, estos péptidos permiten también la regresión eficaz de las metástasis que ya se han diseminado y formado por el cuerpo. Ante estos antecedentes parece razonable concluir que estos péptidos permitirán la regresión de las metástasis que se han formado y diseminado por el cuerpo, no sólo para cáncer pancreático, sino también para otros cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico y cáncer de mama, para los que se ha mostrado la expresión de CD44v6.

Tal como ya se ha mencionado anteriormente, se ha encontrado que los péptidos descritos en el presente documento son eficaces no sólo para inhibir metástasis sino también para eliminar realmente las metástasis ya formadas su la secuencia de tripéptido R-W-H está incrustada en una estructura principal peptídica de 5 aminoácidos. Esto se encontró cambiando los aminoácidos N y E del pentapéptido N-R-W-H-E a respectivamente. Aun cuando estas eran sustituciones de aminoácidos no conservativas, el péptido es todavía activo en la inhibición de la activación de Met mediada por CD44v6. Por tanto, parece justificado concluir que la N en la primera posición del pentapéptido N-R-W-H-E puede sustituirse de manera conservativa por aminoácidos tales como K, R o Q. La presente divulgación describe además el reemplazo por cualquier otro aminoácido o aminoácido con cadenas laterales no polares que son comparables a A tales como V, L o I. Las mismas consideraciones se aplican por supuesto a la quinta posición en el pentapéptido de manera que el aminoácido E se reemplaza por una sustitución conservativa, tal como por K. La presente divulgación describe además el reemplazo por cualquier otro aminoácido o particularmente aminoácidos que se asemejan a las propiedades de la alanina tales como V, L o I.

Además, se ha mostrado también que el pentapéptido N-R-W-H-E es eficaz para inhibir la activación mediada por CD44v6 de la señalización de Met cuando está incrustado en un péptido más grande, cuyo límite superior es razonable suponer que es de 14 meros. Dados los hallazgos de la posibilidad de sustituir la primera y última posición en el pentapéptido no solo por sustituciones de aminoácidos conservativas, sino también por sustituciones de aminoácidos no conservativas, la presente divulgación también describe el reemplazo por cualquier aminoácido fuera del motivo esencial de R-W-H.

Por tanto, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano cuando el cáncer ya ha formado metástasis,

en el que dicho compuesto comprende:

- un péptido de la secuencia de aminoácidos X_1 -R-W-H- X_5 , en la que X_1 se selecciona de K, R, N o Q y en la que X_5 se selecciona de E o D, en el que dicho cáncer metastásico muestra expresión de CD44v6, y en el que dicho tratamiento provoca la regresión de las metástasis que ya se han formado y diseminado por el cuerpo.

Se describen además:

- un péptido que comprende al menos la secuencia de aminoácidos X_1 -R-W-H- X_5 seleccionándose X_1 del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y y seleccionándose X_5 del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y (SEQ ID No.: 1), o un peptidomimético del mismo, o
- un péptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 -X7-R-W-H- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} , en la que X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X7, X_{11} , X_{12} , X_{13} , o X_{14} se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y (SEQ ID No.: 7), y en el que el péptido comprende al menos X7-R-W-H- X_{11} de SEQ ID No.: 7, en el que X7 y X_{11} se seleccionan del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, o un peptidomimético del mismo.

Tales cánceres pueden ser formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer de mama, ya que para estos cánceres se ha mostrado una expresión de CD44v6.

Dadas las observaciones anteriormente descritas, concretamente que el aminoácido N y aminoácido E en el pentapéptido N-R-W-H-E pueden reemplazarse por alanina, la presente divulgación también describe que péptidos que comprenden en estas posiciones o bien sustituciones de aminoácidos conservativas o bien sustituciones de aminoácidos que en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas son comparables a la alanina, tal como V, L o I, también proporcionarán la misma actividad que N-R-W-H-E.

Se describen además:

- un péptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 -X7-R-W-H- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} , en la que X_1 se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH_2 tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_2 se selecciona de grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_3 se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH_2 tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_4 se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_5 se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_6 se selecciona del grupo que comprende G o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X7 se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH_2 tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_{11} se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_{12} se selecciona del grupo que comprende G o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X_{13} se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, y en la que X_{14} se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH_2 tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I (SEQ ID No. 8), y en el que el péptido comprende al menos X7-R-W-H- X_{11} de SEQ ID No.: 8, en la que X7 se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH_2 grupo tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I y en la que X_{11} se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, o un peptidomimético del mismo.

Tales cánceres pueden ser formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello

uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama, ya que para estos cánceres se ha mostrado una expresión de CD44v6.

Aun cuando los pentapéptidos o cualquier péptido más largo derivado de los 14 meros tal como se describe a continuación en el presente documento debe ser eficaz no solo en la prevención de la metástasis sino también en la eliminación real de metástasis ya formadas en cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama, una realización preferida de la presente invención se refiere a las secuencias de pentapéptido descritas a continuación en el presente documento, centrándose una realización particular preferida en la secuencia de aminoácidos N-R-W-H-E (SEQ ID NO:2).

Un experto en la técnica entenderá que cualquier compuesto que proporcione los mismos aminoácidos o al menos la misma configuración global del péptido que los péptidos descritos en el presente documento tal como el pentapéptido de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 será también eficaz no solo en la prevención de la formación de metástasis, sino también la eliminación de metástasis ya formadas en cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama.

En el presente documento se describe el uso de peptidomiméticos de cualquiera de los péptidos descritos a continuación en el presente documento, particularmente peptidomiméticos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 4 o 5. Estos peptidomiméticos tendrán preferiblemente los mismos aminoácidos pero una estructura principal alterada que proporciona la misma configuración global del peptidomimético que el propio péptido, pero que es por ejemplo más resistente a la escisión por proteasas. Peptidomiméticos preferidos son por ejemplo peptoides isostéricos, que comprenden glicinas poli-N-sustituidas en los enlaces peptídicos de la estructura principal.

El compuesto puede ser una forma pegilada, hesilada, pasilada, glicosilada, miristoilada y/o cíclica del péptido de la invención. También se describen formas modificadas adicionalmente de los péptidos descritos en el presente documento. Tales péptidos modificados pueden comprender por ejemplo modificaciones unidas química o enzimáticamente que hacen que los péptidos sean más estables, por ejemplo frente a la degradación por proteasas, lo que permite proporcionar los péptidos o peptidomiméticos como sales farmacéuticamente aceptables, o que por ejemplo mejoran las propiedades biológicas de los péptidos o peptidomiméticos tales como la semivida. Tales formas modificadas preferidas de tales péptidos se refieren a formas pegiladas, hesiladas, pasiladas, miristoiladas y glicosiladas, y/o cíclicas de estos péptidos y peptidomiméticos, y en particular péptidos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 o peptidomiméticos de estas secuencias.

Los compuestos dados a conocer en el presente documento pueden formularse para administración oral, por ejemplo mediante inhalación, para administración nasal o administración mediante inyección tal como administración subcutánea.

En una realización la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de cánceres cuando ya se han formado metástasis tales como formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama en un ser humano en las que estas composiciones farmacéuticas comprenden los compuestos/compuestos peptídicos descritos anteriormente. Estas composiciones farmacéuticas pueden comprender excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden formularse para administración oral tal como mediante inhalación, administración nasal o administración mediante inyección subcutánea.

Además, la invención se refiere al compuesto para su uso en el tratamiento de cánceres cuando ya se han formado metástasis tal como formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama en un ser humano que lo necesita administrando los compuestos o composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos a un ser humano que lo necesita.

Los compuestos se consideran para su uso en el tratamiento de cánceres cuando ya se han formado metástasis y pueden haberse diseminado incluso por el cuerpo. Estos cánceres también se designan como cánceres metastásicos.

Los cánceres metastásicos según la invención incluyen formas metastásicas de cánceres para los que se ha observado la expresión de CD44v6 en tejidos cancerosos o puede observarse tras pruebas correspondientes por ejemplo con anticuerpos frente a CD44v6. Los cánceres metastásicos según la invención incluyen formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de mama.

Tales formas metastásicas de cáncer de los diversos cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer

colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama pueden identificarse según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer). Los cánceres metastásicos según la invención se clasificarán normalmente como cáncer en estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM, particularmente si M se fija como 1. El Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer) describe el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM y en qué condiciones a cáncer se considera que es de por ejemplo estadio I, II, III y IV para los diversos cánceres mencionados en el presente documento y se incluye por tanto como referencia por lo que respecta.

Por ejemplo, en una realización particularmente preferida la presente invención considera los compuestos de la presente invención y las composiciones farmacéuticas descritas a continuación en el presente documento que comprenden estos compuestos para su uso en el tratamiento de cáncer de mama o cáncer colorrectal en un sujeto humano, para el que el cáncer de mama o colorrectal puede clasificarse como estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer, véanse las páginas 145 a 166 para cáncer colorrectal y las páginas 347 a 378 para cáncer de mama).

Ha de entenderse que para todos los aspectos y realizaciones de la presente invención, es decir los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los métodos descritos a continuación en el presente documento, se prefiere siempre usar los pentapéptidos descritos en el presente documento, tales como los definidos en las reivindicaciones para tratar cánceres metastásicos en un ser humano, y en particular para tratar cánceres metastásicos que pueden clasificarse como estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer).

Leyendas de las figuras

Figura 1: La función de correceptor de CD44v6 para Met se requiere para la metástasis tumoral. A: BSp73AS y sus transfectantes se indujeron con HGF cuando se indicó y la activación de Met y ERK se determinó tal como se describe en Materiales y métodos. Los números indican la inducción en veces calculada mediante el programa informático ImageJ. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces y dieron resultados similares. B: Las células utilizadas en A se inyectaron por vía subcutánea en el costado posterior derecho de ratas singénicas (Materiales y métodos). Cuatro semanas después, se prepararon los ganglios linfáticos y los pulmones para el análisis inmunohistoquímico. Los ganglios linfáticos representados son los ganglios linfáticos auxiliares. Se muestran dos imágenes de los pulmones, las flechas indican metástasis. C: Análisis inmunohistoquímico de secciones en parafina de tumores ASs6 infectados con lentivirus que expresan ctrl-ARNhp o Met-ARNhp. Los cortes se tiñeron con anticuerpo anti-GFP para monitorizar las áreas transducidas con ARNhp o con un anticuerpo frente a fosfo-Met. Aumentos 20x.

Figura 2: Un péptido específico de CD44v6 bloquea la diseminación metastásica de las células tumorales. A: Se indujeron células BSp73ASs6 con HGF en presencia del péptido de rata específico de CD44v6, un anticuerpo específico de CD44v6 o un péptido de control (ratón) tal como se indica. La activación de Met y Erk se determinó usando anticuerpos fosfo-específicos. Los números se refieren a la inducción en veces. B: Se inyectaron células BSp73ASs6 por vía subcutánea en el costado posterior derecho de ratas BD10. Después de una semana de crecimiento tumoral, se trataron los animales con el péptido de CD44v6 (por vía i.t. o i.v.), el péptido de control, el anticuerpo frente a CD44v6 o PBS (Materiales y métodos). Se analizaron los ganglios linfáticos axilares (lado izquierdo) y los pulmones (lado derecho) para detectar metástasis tal como se describe en la figura 1. C: Las secciones de pulmones de animales tratados con el péptido de CD44v6 o con el péptido de control se tiñeron con H&E y PAS. H & E - hematoxilina y eosina; PAS: reacción periódica de ácido-Schiff. Aumentos 1,5x. D: Curva de crecimiento de tumores BSp73ASs6 en animales tras el tratamiento durante 28 días tal como se indica. El volumen tumoral medio de las ratas tratadas con PBS, anticuerpo CD44v6, péptido de CD44v6 o péptido de control (ratón) se midió semanalmente después del inicio del tratamiento y continuó durante 28 días usando un calibre.

Figura 3: Unión específica del péptido de CD44v6 a tumores primarios y metástasis *in vivo*. A: lado izquierdo: Se fijaron células BSp73ASs6 y se tiñeron con la rata CD44v6 marcada con DY681 o el péptido de ratón (control) durante una hora. Se tomaron imágenes usando un microscopio confocal de barrido láser (Leica TCS2 SP2) con un objetivo de 20x. Lado derecho: Se indujeron células BSp73ASs6 con HGF en presencia del péptido v6 de rata DY681, respectivamente péptido de ratón, y se determinó la activación de Erk. Los números indican la inducción en veces. B: Se les inyectó a ratas que portaban un tumor subcutáneo de células BSp73ASs6 (hechas crecer durante tres semanas) por vía i.v. 200 µg de péptido v6 de rata DY681 o péptido v6 de ratón DY681 (control) y se analizaron mediante obtención de imágenes de NIRF usando un instrumento Optix MX2 (ART, Montreal, Canadá). Las intensidades de fluorescencia se presentan en NC (correlación normalizada). La serie de conjuntos de datos fluorescentes obtenidos a diversos puntos de tiempo después de la inyección del péptido indicado muestra señales fluorescentes después de 24 y 48 horas que indican la unión del péptido v6 de rata pero no del

péptido v6 de ratón en el intervalo de dos días al tumor. C: Las exploraciones *ex vivo* de tumores y pulmones de ratas en las que se inyectó el péptido v6 de rata DY681 mostraron señales fluorescentes específicas no solo sobre el área del tumor sino también en áreas específicas del pulmón indicando la unión del péptido de rata a las metástasis.

Figura 4: Un péptido de CD44v6 previene la metástasis de las células tumorales humanas en un modelo ortotópico de cáncer pancreático. A: Se trataron células L3.6pl con el péptido v6 humano o el péptido v6 de rata como control antes de la inducción con HGF 10 ng/ml. Se determinó la activación de Erk en inmunotransferencia de tipo Western. Los números se refieren a la inducción en veces. B: Se inyectaron células L3.6pl de manea ortotópica en la cabeza del páncreas de ratones desnudos machos (Materiales y métodos). 7 días después, se les inyectó a los animales el péptido de CD44v6 humano o el péptido de control (rata) (20 µg cada uno). La inyección de péptidos se repitió 3 veces por semana. Los animales se sacrificaron 23 días después del primer tratamiento con péptidos. Se aislaron los tumores y se tiñeron para determinar la expresión de CD44v6 (BIWA) o anticuerpo secundario como control. Se tiñeron los núcleos con hematoxilina. C: Tinción de inmunofluorescencia de tumores L3.6pl a partir de los animales tratados con péptido v6 o péptido de control usando los anticuerpos frente a fosfo-Met y Met. Se tiñen los núcleos con DAPI. D parte superior: Se determinó el volumen tumoral de animales tratados con péptido v6 o de control al final del experimento usando la fórmula volumen = (anchura)² x longitud/2. Las barras representan el volumen tumoral promedio al final del experimento. D parte inferior: cada grupo de animales tratados con uno de los péptidos consistió en 15 animales. Las barras muestran el porcentaje de animales que portan metástasis. E: Tinción de tumores L3.6pl tratados con péptido de control o v6 con un anticuerpo específico de CD31. Los aumentos son de 50x. Los gráficos muestran los números de vasos promedio, respectivamente, el tamaño de vasos promedio calculado a partir de cinco tumores independientes. F: Niveles de VEGF humano producidos por células L3.6pl en presencia y ausencia del péptido v6 (200 ng/ml en el medio de cultivo). Las barras reflejan los niveles promedio de VEGF de triplicados obtenidos en 3 experimentos independientes. G: Lado izquierdo: Se examinaron hígados de animales tratados con péptido v6 o péptido de control para detectar metástasis macroscópicas. Lado derecho: Las barras muestran el número promedio de metástasis. Cada grupo de animales tratados con uno de los péptidos consistió en 15 animales. En todos los gráficos, la se calculó la significación mediante la prueba de la t de Student: *** p <0,001.

Figura 5: Acumulación específica del péptido de CD44v6 en tumores primarios y metástasis del modelo de cáncer de pancreático humano. A: Lado izquierdo: Se tiñeron células L3.6pl con o bien péptido humano o bien de rata CD44v6 marcado con DY681. Se tomaron imágenes con el microscopio confocal de barrido láser (Leica TCS2 SP2). Lado derecho: Se indujeron células L3.6pl con HGF en presencia del péptido v6 humano DY681, respectivamente, péptido v6 de rata y se determinó la activación de Erk. Los números se refieren a la inducción en veces. B: Se indujeron de manera ortotópica tumores L3.6pl durante 3 semanas tal como se describió en la figura 4 seguido por una inyección intravenosa de péptido v6 humano DY681 o péptido v6 de rata DY681 (cada una de 20 µg). Se analizó la unión del péptido 24 h después de la inyección en ratones anestesiados usando el sistema de obtención de imágenes de animales pequeños Pearl® Impulse (Li-Cor). Como control se usaron animales libres de tumor y que portan tumor que no recibieron tratamiento con péptidos. C: Se extirparon tumores primarios, hígados y bazo de los animales mostrados en B y se monitorizó la fluorescencia de los péptidos marcados *ex vivo*. Las escalas a los lados indican la intensidad de señal sincronizada.

Figura 6: Reversión de metástasis preexistentes por los péptidos de CD44v6. A: Representación esquemática del procedimiento experimental. Se inyectaron células BSp73ASs6 o células L3.6pl en ratas, respectivamente, ratones desnudos. Durante las siguientes 3 semanas, se desarrollaron tumores y se detectaron metástasis después de 3 semanas de tiempo. En los grupos tratados con péptido v6 o péptido de control (200 µg en ratas, 20 µg en ratones desnudos), el tratamiento comenzó después de tres semanas. Después de 21 días adicionales, se sacrificaron los animales y se analizaron para detectar metástasis pulmonares, respectivamente hepáticas. B: Se muestran pulmones de ratas que portan un tumor subcutáneo BSp73ASs6 y tratado con el péptido v6 (rata) o el péptido de control (ratón). Parte inferior izquierda: La cuantificación representa el número promedio de metástasis. La cantidad de animales usados en cada grupo se muestra en la tabla 3. Parte inferior derecha: Se presenta una evaluación gráfica del número de animales que portan metástasis. C: Se muestran hígados de ratones con tumores pancreáticos L3.6pl y tratados con el péptido v6 (ser humano) o el péptido de control (rata). Parte inferior izquierda: Se muestra un gráfico que evalúa el número de metástasis hepáticas en animales tratados con péptido control y animales tratados con péptido de CD44v6. Parte inferior derecha: Se presenta una evaluación gráfica del número de animales que portan metástasis.

Figura 7: El péptido de CD44v6 induce apoptosis en metástasis ya establecidas. Animales que portan metástasis pulmonares tres semanas después de la inyección de células tumorales recibieron una inyección de péptido de CD44v6 o péptido de control cada dos días. En los días indicados se sacrificó un animal de cada grupo. La apoptosis en la metástasis pulmonar se monitorizó en secciones de parafina usando un anticuerpo contra caspasa-3 escindida y caspasa-8 escindida (Materiales y métodos). El área de la metástasis está marcada (M). Los aumentos son de 4,5x. El experimento se realizó 2 veces con un resultado similar.

Figura 8: Representa las tablas 1 a 3.

Figura 9: Representa los efectos de péptidos de CD44v6 de rata pegilados sobre la activación de ERK en células pancreáticas de rata.

Figura 10: Representa los efectos de péptidos de CD44v6 de rata pegilados sobre la activación de ERK y Met en células pancreáticas de rata.

Figura 11: Representa los efectos de péptidos de CD44v6 de rata pegilada sobre la agrupación inducida por HGF en células de cáncer de colon.

Figura 12: Se requiere CD44v6 para la activación de la señalización Met y aguas abajo en varias EC. Se privó de suero a las diferentes EC (HUVEC, HAOEC y HCMEC) y se incubaron con varios reactivos (αCD44v6, v6 de 14 meros y los controles IgG y pép. de ctrl). Se añadió el factor de crecimiento HGF y se lisaron las células. Las proteínas en los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western. La activación de Met y de su diana aguas abajo Erk se detectó por medio de anticuerpos fosfo-específicos que detectan formas fosforiladas de Met y Erk. Con el fin de comprobar la carga igual de las diferentes muestras, se incubó la membrana con una disolución de separación y volvió a estudiarse con sonda con anticuerpos que reconocen todas las proteínas Met y Erk. Los números indican la inducción en veces calculada con el programa informático ImageJ.

Figura 13: La activación de VEGFR-2 y la transducción de señales inducida por VEGF-A165 dependen de CD44v6. Se privó de suero a diferentes EC (HUVEC, HAOEC y HCMEC) y se incubaron con varios reactivos (αCD44v6, v6 de 14 meros y los controles IgG y pép. de ctrl). Luego se indujeron las células con VEGF-A165 y se lisaron. Los lisados celulares se cargaron sobre SDS-PAGE y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western. La activación de la tirosina cinasa receptora VEGFR-2 y de su diana aguas abajo Erk se detectó por medio de anticuerpos que detectan formas fosforiladas de VEGFR-2 y Erk. El control de carga se realizó con anticuerpos que reconocen los niveles totales de VEGFR-2 y Erk. Los números indican la inducción en veces calculada con el programa informático ImageJ.

Figura 14: A: La activación de Met y la transducción de señal inducida por HGF depende de CD44v6 en células L3.6pl. Se trataron células L3.6pl con el péptido v6 humano (v6 de 14 meros humano) o el péptido v6 de rata como control antes de la inducción con HGF 10 ng/ml. La activación de Met y ERK se determinó en inmunotransferencia de tipo Western. Los números se refieren a la inducción en veces. El experimento se repitió al menos 5 veces. B: La activación de c-Met y la transducción de señales inducida por HGF dependen de células CD44v6 HeLa. Las células HeLa, respectivamente, HT29 sometidas a privación se incubaron con el péptido v6 (v6 de 14 meros humano) o un péptido de control durante 10 minutos a 37°C y luego se indujeron con 25 ng/ml de HGF durante los puntos de tiempo indicados. Las células se lisaron entonces y los lisados se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western para fosfo-Met y Met. C: La activación de c-Met y transducción de señales inducida por HGF dependen de CD44v6 en células HT29. La fosforilación de c-Met y Erk inducida por HGF en HT29 se determinó tal como se describió anteriormente usando anticuerpos fosfo-específicos. Cuando se indicó, las células se pretrataron con el péptido de CD44v6 (v6 de 14 meros humano) o el péptido de control (véase Materiales y métodos en el ejemplo 3). Se desarrollaron controles de carga con anticuerpos de frente a c-Met, respectivamente tubulina.

Figura 15: A diferencia de EGF y ER, la inducción de los receptores ErbB a través de TGF-α, BC, Her, HB-EGF o AR es completamente independiente de CD44v6. Se preincubaron células HT29 privadas de suero durante 5 minutos con 100 ng/ml de un péptido específico de CD44v6 (v6 de 14 meros humano) o un péptido de control. Posteriormente, se indujeron las células con 20 ng/ml de diversos ligandos de ErbB tal como se indica. Los lisados celulares se resolvieron por SDS-PAGE. Se usó inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosforilación de Erk-cinasa inducida por ligandos de ErbB.

Figura 16: La inducción dependiente de EGF de los receptores ErbB puede bloquearse mediante un péptido específico de CD44v6 en células HT29. Se preincubaron células HT29 privadas de suero durante 5 minutos con 100 ng/ml de péptido específico de CD44v6 (pép. 1 = 14 meros, pép. 2 = 5 meros) o un péptido de control. Posteriormente, se indujeron las células con 20 ng/ml de EGF o TGFα y se lisaron. Los lisados celulares se resolvieron por SDS-PAGE. Se usó inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosforilación de Erk-cinasa inducida por EGF y TGFα.

Figura 17: Los péptidos específicos de CD44 v6 humano bloquean la dispersión e invasión celular inducida por HGF en matrigel. Se determinó la dispersión de células HT29 en placas de 24 pocillos. En primer lugar, se sembraron 4,5 x 10⁴ células a 37°C; después de 24 h, las células se privaron de suero durante 24 h adicionales. Las células o bien se dejaron sin tratar (control) o bien se trataron posteriormente con HGF (50 ng/ml) durante 24 h. Cuando se indicó, se trataron las células con el péptido específico de v6 (v6 humano 5 de meros, 10 meros, 14 meros) o péptido de control antes de la inducción con HGF durante 30 min. Se tomaron imágenes usando microscopía de contraste de fase. Aumentos de 40x.

Figura 18: Se requiere CD44v6 para la migración de EC. Se cultivaron HUVEC y HAOEC hasta la confluencia y

se hizo una herida en la monocapa celular con una punta de pipeta estéril. Después de lavar, se incubaron las células con el anticuerpo contra CD44v6, el péptido de CD44v6 (v6 de 14 meros humano) o el péptido de control tal como se indica. Se añadieron los ligandos HGF, VEGF-A165 o VEGF-A121 y se analizó la migración de las EC después de 24 horas. Los números indican el porcentaje de área libre en el área de rascado cuantificada por el programa informático ImageJ.

Figura 19: Se generaron esferoides de HUVEC (750 células) en gotas colgantes. Se suspendieron en medio de crecimiento de células endoteliales que contenía colágeno I de cola de rata 1 mg/ml y metilcelulosa al 0,6% (p/vol.) y se distribuyeron en placas de 48 pocillos (30 esferoides/pocillo). Después de la solidificación a 37°C, la mezcla se recubrió con medio de crecimiento de células endoteliales que contenía péptido v6 100 ng/ml (v6 de 14 meros humano) o péptido de control y VEGF (40 ng/ml). Se tomaron fotografías 48 horas después y se cuantificó la formación de brotes con el programa informático ImageJ.

Figura 20: La respuesta de HUVEC a una mezcla de factores angiogénicos producidos por islotes de Langerhans angiogénicos puede reducirse mediante inhibidores específicos de CD44v6. Se mezclaron células HUVEC con anticuerpo frente a CD44v6, péptido de CD44v6 o péptido control y luego se suspendieron en un gel de colágeno. Se colocaron islotes de Langerhans angiogénicos hiperplásicos aislados del páncreas de ratones RIP1Tag2 de 8-9 semanas de edad encima de la mezcla de HUVEC/colágeno y se recubrieron con medio. Cada tercer día se añadió nuevo anticuerpo o péptido y se tomaron imágenes después de 5 a 7 días. El número de islotes que indujeron una respuesta angiogénica de las CE se facilita como porcentaje de todos los islotes analizados. Para la cuantificación se analizaron 60 islotes por condición. Tanto el anticuerpo frente CD44v6 como el péptido de CD44v6 (v6 de 14 meros humano) redujeron la respuesta angiogénica, y la reducción obtenida con el anticuerpo es significativa ($p < 0,05$).

Figura 21: Inhibición de la metástasis y el crecimiento tumoral primario usando el péptido v6 humano y derivados PEGilados del mismo (PEG840 y PEG2000) a diferentes concentraciones (2 μ g, 20 μ g y 200 μ g por inyección). A: Se implantaron de manera ortotópica tumores L3.6pl en ratones desnudos durante una semana, seguido por inyección i.p. de los péptidos indicados tres veces por semana durante tres semanas. Al final del experimento, se sacrificaron los animales y se examinaron. Las flechas rojas indican metástasis. Se calculó la significación mediante la prueba de la t de Student: *** $p < 0,001$. Cada grupo consistió en 3 animales. B: Cuantificación del volumen tumoral primario. C: Visión general del número promedio de macrometástasis por animal.

Figura 22: Inhibición de la metástasis y el crecimiento tumoral primario usando el péptido de CD44v6 (de 14 meros lineal) y uno de 8 meros cíclico humano a diferentes concentraciones (0, 2 μ g, 2 μ g, 10 μ g y 20 μ g por inyección). A: Se implantaron de manera ortotópica tumores L3.6pl en ratones desnudos durante una semana, seguido por inyección i.p. de los péptidos indicados tres veces por semana durante tres semanas. Al final del experimento, se sacrificaron los animales y se examinaron. Las flechas rojas indican metástasis. Se calculó la significación usando la prueba de la t de Student: * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Cada grupo consistió en 5 animales. B: Visión general del número promedio de metástasis macroscópicas en cada animal. C mostró una disminución en la diseminación metastásica a partir de una dosificación de 2 μ g e inhibición total a 20 μ g. C: El v6 de 14 meros y el de 8 meros cíclico reducen el crecimiento del tumor primario.

Figura 23: Comparación lado a lado del v6 de 14 meros con derivados del mismo (14 meros-PEG840, 14 meros-PEG2000, 14 meros miristoilado, derivados de D-aminoácidos DOTA CD44v6-14 [daa7] y DOTA CD44v6-14 [r14], 8 meros cíclico, 5 meros cíclico y 8 meros cíclico miristoilado) para el crecimiento tumoral primario. Se implantaron de manera ortotópica tumores L3.6pl en ratones desnudos durante una semana, seguido por inyección i.p. de los péptidos indicados tres veces por semana durante tres semanas. Al final del experimento, se sacrificaron los animales y se examinaron. A: Se muestra el tamaño tumoral promedio de los animales tratados con los compuestos indicados ($n = 5$). Se calculó la significación usando la prueba de la t de Student: *** $p < 0,001$. Cada grupo consistió en 5 animales. B: Tamaño tumoral individual de los animales en cada grupo.

Figura 24: Comparación lado a lado del v6 de 14 meros con derivados del mismo (14 meros-PEG840, 14 meros-PEG2000, 14 meros miristoilado, derivados de D-aminoácidos DOTA CD44v6-14 [daa7] y DOTA CD44v6-14 [r14], 8 meros cíclico, 5 meros cíclico y 8 meros cíclico miristoilado) para la inhibición de la metástasis. A: Ejemplos representativos de tumor primario y metástasis hepática para los compuestos indicados. Las flechas rojas apuntan hacia una metástasis. Círculo rojo: Obsérvese la vascularización muy fuerte del tumor primario en el grupo de control. B: Resumen del número de animales con metástasis y el número promedio de metástasis por animal.

Figura 25: El péptido de CD44v6 reduce la cantidad de tumores en el duodeno. Se trataron ratones APC/Min/+ de 18 semanas de edad con el v6 de 14 meros durante 6 semanas (inyección por vía i.p.) y se sacrificaron para estimar el número total de tumores en el duodeno. A: Análisis macroscópico del número de tumores. B: Evaluación estadística del número total de tumores según el tamaño del tumor.

Figura 26: El tratamiento con v6 de 14 meros reduce el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis macroscópicas en el pulmón. Se diluyeron 1×10^6 células 4T1 murinas por ratón en 50 μ l de RPMI

más 50 µl de Matrigel y se inyectaron en la sexta almohadilla de grasa mamaria de 10 ratones BALB/c hembras. Una semana después de la inyección, a los ratones o bien se les inyectó por vía intraperitoneal 20 µg del v6 de 14 meros murino disuelto en 100 µl de PBS o bien 20 µg de péptido de control (v6 de 14 meros de rata) disuelto en 100 µl de PBS. La inyección se realizó 3 veces por semana durante dos semanas. Después de 2 semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores primarios y los pulmones. A: Reducción global del volumen tumoral en el grupo tratado con péptido v6. B: Tinción inmunofluorescente para el marcador endotelial CD34 para monitorizar la vascularización del tumor primario. Representación gráfica de la reducción del área total de vasos. C: Los péptidos v6 condujeron a una reducción en la metástasis pulmonar macroscópica. Las flechas negras marcan ejemplos de metástasis. La barra de escala corresponde a un tamaño de 1 cm. Evaluación estadística del número promedio de metástasis pulmonares. Se calculó la significación usando la prueba de la t de Student: $p < 0,01$; $** p < 0,005$. Cada grupo consistió en 5 animales.

Figura 27: A: Espectro de MALDI-TOF de v6-PEG3000-amida palmítica y V6-PEG2000. B: Imágenes de SEM de PEG-QD, v6-PEG-QD al 10% y v6-PEG-QD al 30%

Figura 28: Puntos cuánticos acoplados al péptido de CD44v6 se unen específicamente a células tumorales que expresan CD44v6 A: Panel 1-3: Células AS10 o ASs6 incubadas con puntos cuánticos PEGilados 100 µg/ml (control), péptido de CD44v6-PEG-QD al 10% o péptido de CD44v6-PEG-QD al 30% se tiñeron con DAPI y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Panel 4: Células AS10 transfectadas con mCherry (rojo) y células ASs6 transfectadas con CFP (cian) se cultivaron conjuntamente y se tiñeron con v6-pep-QD al 30%. Aumentos, 40x. B: Se cuantificaron los porcentajes de células teñidas con puntos cuánticos. C: Se incubaron células AS10 o ASs6 con PBS o PEG-QD 100 µg/ml, péptido de CD44v6-PEG-QD al 10% o péptido de CD44v6-PEG-QD al 30% durante 10 minutos y se analizaron para determinar la unión de QD por medio de medición de FACS.

Descripción detallada de la invención

Antes de que la invención se describa en detalle con respecto a algunas de sus realizaciones preferidas, se proporcionan las siguientes definiciones generales.

La presente invención tal como se describe de manera ilustrativa a continuación puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente dados a conocer en el presente documento.

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinadas figuras pero la invención no está limitada por las mismas sino solo por las reivindicaciones.

Cuando se usa el término “que comprende” en la presente descripción y las reivindicaciones, no excluye otros elementos. Para los fines de la presente invención, el término “que consiste en” se considera que es una realización preferida del término “compuesto por”. Si a continuación en el presente documento se define que un grupo comprende al menos un determinado número de realizaciones, también ha de entenderse que da a conocer un grupo, que consiste preferiblemente sólo en estas realizaciones.

Para los fines de la presente invención, el término “obtenido” se considera que es una realización preferida del término “obtenible”. Si a continuación en el presente documento por ejemplo se define que un anticuerpo es obtenible a partir de una fuente específica, también ha de entenderse que da a conocer un anticuerpo, que se obtiene a partir de esta fuente.

Cuando se usa un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un sustantivo singular, por ejemplo “un”, “una” o “el/la”, esto incluye un plural de ese sustantivo a menos que se establezca específicamente algo más. Los términos “aproximadamente” o “de manera aproximada” en el contexto de la presente invención indican un intervalo de precisión que el experto en la técnica comprenderá que garantiza todavía el efecto técnico de la característica en cuestión. El término indica normalmente una desviación del valor numérico indicado de $\pm 20\%$, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$ e incluso más preferiblemente $\pm 5\%$.

Además, los términos “primero”, “segundo”, “tercero” o “(a)”, “(b)”, “(c)”, “(d)” o “(i)”, “(ii)”, “(iii)”, “(iv)”, etc. y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así utilizados son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden funcionar en secuencias distintas de las descritas o ilustradas en el presente documento.

En caso de que los términos “primero”, “segundo”, “tercero” o “(a)”, “(b)”, “(c)”, “(d)” o “(i)”, “(ii)”, “(iii)”, “(iv)”, etc. se refieran a etapas de un método o uso o ensayo, no existe coherencia de tiempo o intervalo de tiempo entre las etapas a menos que se indique lo contrario, es decir, las etapas pueden llevarse a cabo simultáneamente o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años entre tales

etapas, a menos que se indique lo contrario en la solicitud tal como se expone en el presente documento anteriormente o a continuación.

Los términos técnicos se usan por su sentido común. Si se transmite un significado específico a determinados términos, las definiciones de los términos se facilitarán a continuación en el contexto en el que se usan los términos.

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a péptidos o compuestos peptídicos para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano.

La presente invención se basa en cierta medida en los hallazgos experimentales descritos a continuación en el presente documento de que un péptido de secuencia de aminoácidos N-R-W-H-E (SEQ ID No. 2) o de secuencia de aminoácidos K-E-Q-W-F-G-N-R-W-H-E-G-Y-R (SEQ ID No.: 6) no solo es capaz de inhibir la metástasis en células de cáncer pancreático humano sino también de eliminar las metástasis ya establecidas en un modelo animal ortotópico de cáncer pancreático humano. Por tanto, parece razonable suponer que puede observarse la misma eficacia en diferentes cánceres metastásicos, particularmente cuando estos cánceres muestran expresión de CD44v6. Se mostró además que tras la mutación de N a A y E a A, un péptido de secuencia de aminoácidos A-R-W-H-A (SEQ ID No. 3) es capaz de suprimir la activación de Met (véase Matzke *et al.*, Cancer Res. (2005), 65 (14), 6105-6110). Dado que los efectos sobre la activación de Met por N-R-W-H-E (SEQ ID No. 2) se mantienen a pesar de las sustituciones de aminoácidos no conservativas de K a A y de F a A (Matzke *et al.*, véase anteriormente), parece razonable suponer que un péptido de secuencia de aminoácidos X₁-R-W-H-X₅ (SEQ ID No. 1), en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y y en la que X₅ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y puede usarse no sólo para el tratamiento de cáncer pancreático, sino también para cánceres metastásicos en general.

En el presente documento se describe un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano, en el que dicho compuesto comprende un péptido que comprende al menos la secuencia de aminoácidos X₁-R-W-H-X₅, en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y y en la que X₅ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y (SEQ ID No. 1) o un peptidomimético del mismo.

Se describe además un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano, en el que dicho compuesto comprende un péptido que comprende al menos la secuencia de aminoácidos X₁-R-W-H-X₅, en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I y en la que X₅ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I (SEQ ID No. 4) o un peptidomimético del mismo. Un ejemplo es un péptido de secuencia de aminoácidos A-R-W-HA (SEQ ID No. 3) o un peptidomimético del mismo.

La presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano, en el que dicho compuesto comprende un péptido que comprende al menos la secuencia de aminoácidos X₁-R-W-H-X₅, en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende K, R, N o Q y en la que X₅ se selecciona del grupo que comprende E o D (SEQ ID No. 5). Como ejemplo de una de las realizaciones más preferidas, el péptido puede comprender y preferiblemente consistir en la secuencia de aminoácidos N-R-W-H-E (SEQ ID No. 2).

El término "péptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que comprende al menos los cinco aminoácidos mencionados anteriormente y un máximo de catorce aminoácidos.

Si los péptidos tienen más que los cinco aminoácidos mencionados anteriormente, estos aminoácidos pueden ser por ejemplo los encontrados en un péptido de secuencia de aminoácidos K-E-Q-W-F-G-N-R-W-H-E-G-Y-R (SEQ ID No.: 6) o variaciones del mismo. Se indica que los aminoácidos 7 a 11 de SEQ ID No.: 6 corresponden a SEQ ID No.: 2. Como para un péptido de SEQ ID No. 2, se ha encontrado en un análisis de examen de ligador con sustituciones de alanina que los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 o 14 pueden sustituirse por alanina sin tener efectos perjudiciales sobre la activación de Met. Tales péptidos pueden ser por tanto cualquier péptido que comprende los aminoácidos 6 a 12, 5 a 13, 4 a 14, etc. de X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-R-W-H-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄, en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, en la que X₂ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₃ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₄ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₅ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₆ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₇ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₁₁ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₁₂ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₁₃ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y, X₁₄ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y.

P, Q, R, S, T, V, W o Y y en la que X₁₄ se selecciona del grupo que comprende A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y (SEQ ID No. 7). Preferiblemente la selección se hace según los principios expuestos anteriormente. Por tanto, X₁ o bien puede ser un aminoácido similar a K o bien puede ser un aminoácido con una cadena lateral no polar tal como A, V, L o I. Se aplican consideraciones similares a X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₁₁, X₁₂, X₁₃ o X₁₄. Tal péptido más largo puede comprender los aminoácidos 6 a 12, 5 a 13, 4 a 14, etc. de X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-R-W-H-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄, en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₂ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₃ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₄ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₅ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₆ se selecciona del grupo que comprende G o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₇ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₁₁ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₁₂ se selecciona del grupo que comprende G o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₁₃ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, y en la que X₁₄ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I (SEQ ID No. 8). Tal péptido más largo puede comprender los aminoácidos 6 a 12, 5 a 13, 4 a 14, etc. de X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-R-W-H-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄, en la que X₁ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, en la que X₂ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, en la que X₃ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q, en la que X₄ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, en la que X₅ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, en la que X₆ se selecciona del grupo que comprende G o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₇ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tal como K, R, N o Q, X₁₁ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como E o D, en la que X₁₂ se selecciona del grupo que comprende G o aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como A, V, L o I, en la que X₁₃ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con cadenas laterales no polares o no cargadas y estructuras de anillos aromáticos tales como F, W o Y, y en la que X₁₄ se selecciona del grupo que comprende aminoácidos con un grupo NH₂ tales como K, R, N o Q (SEQ ID No. 9).

Los péptidos pueden ser lineales, ramificados y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los péptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales postraduccionales o pueden prepararse por métodos sintéticos.

Los péptidos pueden comprender o consistir en cinco o 14 aminoácidos tal como se mencionó anteriormente e incluyen péptidos de SEQ ID No.: 1, 2, 3, 4, 5 o 6 a 10. La realización más preferida de la presente invención se refiere a un péptido de SEQ ID No.: 2.

El término "compuesto que comprende un péptido" se refiere a compuestos que comprenden un péptido por ejemplo en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. El término se refiere igualmente a péptidos que se han modificado química o enzimáticamente de manera que por ejemplo un péptido de SEQ ID No. 1, 2, 3, 4 o 5 comprende modificaciones adicionales tal como se describen a continuación en el presente documento. Se prefieren particularmente formas modificadas de un péptido de SEQ ID No. 2.

El término "compuesto que comprende un péptido" y su variación gramatical tal como "compuesto peptídico" por tanto incluye sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos descritos en el presente documento. Las sales abarcadas dentro del término "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos peptídicos de esta invención. Las sales y ésteres representativos incluyen los siguientes: acetato, ascorbato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, camsilato, carbonato, citrato, diclorhidrato, metanosulfonato, etanosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato, quinato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluconato, glutamato, glicerofosfatos, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, mucato, napsilato, nitrato, n-metilglucamina, oleato, oxalato, palmoatos, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, percloratos, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilatos, estearato, succinatos, sulfato, sulfamato, subacetato, succinato, tannato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato y valerato. Otras sales incluyen sales de Ca, Li, Mg, Na y K;

sales de aminoácidos tales como lisina o arginina; guanidina, dietanolamina o colina; sales de amonio, amonio sustituido o aluminio. Las sales se preparan por métodos convencionales.

Sin embargo, el componente peptídico del "compuesto que comprende un péptido" puede comprender, además de la secuencia peptídica de cualquiera de SEQ ID No.: 1 a 9, secuencias de aminoácidos derivadas de otras proteínas. Por tanto, el compuesto peptídico de la invención incluye péptidos de fusión heterólogos que consisten esencialmente en SEQ ID No.: 1 a 9 fusionados a una secuencia de aminoácidos heteróloga. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede comprender o consistir en 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede comprender o consistir en por ejemplo al menos 5 o al menos 10 o al menos 20 aminoácidos heterólogos. Los aminoácidos heterólogos pueden fusionarse al extremo N- y/o C-terminal de las secuencias derivadas de CD44 SEQ ID No.: 1 a 9 para proporcionar otras funcionalidades tales como translocación mejorada a través de membranas celulares.

Se prefiere que el componente peptídico de la invención sea un péptido aislado. El término "aislado" significa alterado "por la mano del hombre" con respecto al estado natural. Si una composición o sustancia "aislada" se produce en la naturaleza, se ha cambiado o eliminado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de manera natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", tal como se emplea el término en el presente documento.

También se prefiere que el péptido de la invención esté en estado puro. Preferiblemente, el péptido es $\geq 80\%$ puro, preferiblemente $\geq 90\%$ puro, más preferiblemente $\geq 95\%$ puro, incluso más preferiblemente $\geq 99\%$ puro y particularmente preferido es un estado farmacéuticamente puro que es superior al 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otros péptidos. Se prefiere que el péptido esté libre de agentes infecciosos y pirogénicos.

Preferiblemente, un péptido purificado está sustancialmente libre de otros péptidos. Cuando se usa en este contexto, el término "puro" no excluye la presencia del mismo péptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros.

Los péptidos de la invención pueden prepararse por síntesis química o por expresión recombinante en células huésped. Se prefiere la preparación por síntesis química. Como productos proteicos, compuestos de por ejemplo SEQ ID NO: 2 o cualquiera de los otros péptidos de la presente invención son susceptibles de producción por la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida o en disolución. El enfoque de síntesis de péptidos sintéticos generalmente implica el uso de sintetizadores automatizados y resina apropiada como fase sólida, a la que se une el aminoácido C-terminal del péptido deseado. La extensión del péptido en la dirección N-terminal se logra acoplando sucesivamente una forma adecuadamente protegida del siguiente aminoácido deseado, usando protocolos químicos basados en FMOC o BOC normalmente, hasta que se completa la síntesis. Luego se escinden los grupos protectores del péptido, habitualmente de manera simultánea con la escisión del péptido de la resina, y entonces el péptido se aísla y se purifica usando técnicas convencionales, tales como HPLC de fase inversa usando acetonitrilo como disolvente y ácido trifluoroacético como agente de apareamiento iónico. Tales procedimientos se describen generalmente en numerosas publicaciones y puede hacerse referencia, por ejemplo, a Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. (1984).

El término "peptidomimético" se refiere a una cadena de tipo proteico pequeña diseñada para imitar a un péptido correspondiente. Los peptidomiméticos pueden surgir generalmente de la modificación de un péptido existente o del diseño de sistemas similares que imitan a péptidos, tales como peptoides y péptidos β . Independientemente del enfoque, la estructura química alterada está diseñada para ajustar ventajosamente las propiedades moleculares, tales como la estabilidad metabólica y la biodisponibilidad, sin afectar negativamente a la actividad biológica.

Normalmente, un peptidomimético tendrá una estructura principal alterada tal como un grupo amida metilado en lugar del grupo amida de un enlace peptídico para aumentar la estabilidad del peptidomimético frente a la degradación por proteasas. Alternativamente o además, el peptidomimético puede comprender aminoácidos no naturales o enantiómeros D. Un tema común de los peptidomiméticos es que los cambios moleculares en la estructura de principal y/o en los aminoácidos no deben tener un efecto sustancial sobre la conformación global del peptidomimético en comparación con el péptido correspondiente con el fin de no afectar negativamente a la actividad biológica del peptidomimético. Así, un peptidomimético es un isómero del péptido correspondiente. Peptidomiméticos preferidos son, por ejemplo, peptoides isostéricos, que comprenden glicinas poli-N-sustituidas en los enlaces peptídicos de la estructura principal. Por tanto, un peptidomimético tendrá la misma actividad en los experimentos descritos a continuación en el presente documento que los péptidos que se describieron anteriormente en el presente documento, tal como por ejemplo un péptido de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4 o 5. Los peptidomiméticos pueden ser aquellos que tienen cinco aminoácidos, tales como un peptidomimético de un péptido de SEQ ID No. 2, 8 aminoácidos (tal como un peptidomimético de SEQ ID NO: 16, 17 o 18) o 14 aminoácidos (véase SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 o 10). Tales peptidomiméticos pueden ser peptoides isostéricos, que

comprenden glicinas poli-N-sustituídas en los enlaces peptídicos de la estructura principal.

La presente invención también contempla el uso de formas modificadas de péptidos, por ejemplo como composiciones farmacéuticas para tratar cáncer metastásico en un ser humano. Tales formas modificadas se refieren, por ejemplo, a péptidos que se han modificado químicamente en sus respectivos extremos N- y/o C-terminales mediante grupos bloqueantes tales como FMOC o BOC o alquilación tal como metilación para reducir la degradación de los péptidos, por ejemplo por proteasas y para aumentar la estabilidad de los mismos. Otras modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, es decir, un péptido cíclico, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, incluyendo un péptido cíclico miristoilado, tal como uno de 5 meros, 6 meros, 8 meros o 14 meros cíclico miristoilado (basado en SEQ ID No: 2), oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación, ubiquitinación y sumoilación. En la tabla 4 se facilitan ejemplos de tales peptidomiméticos. El péptido puede ser uno de 14 meros pegilado con PEG que tiene un peso molecular de 2000 Da o un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de 200 a 20000 Da, uno de 14 meros, uno de 8 meros cíclico o uno de 5 meros cíclico. Un peptidomimético típico puede tener una o más modificaciones, es decir, puede ser cíclico y adicionalmente puede estar miristoilado, pegilado y/o modificado de cualquier otra forma descrita en el presente documento, tal como mediante el uso de D-aminoácidos. Los ejemplos típicos de peptidomiméticos incluyen aquellos que tienen SEQ ID Nos: 1 a 18 con L y/o D-aminoácidos.

La ciclación de péptidos se realiza mediante métodos generalmente conocidos por un experto en la técnica, tal como se describe en Zitzmann *et al.* (2005, Journal of Nuclear Medicine, 46 (5):782).

Los compuestos de la invención pueden administrarse también en combinación con compuestos citotóxicos y/o agentes quimioterápicos. Es posible administrar los compuestos de la invención junto con uno o más compuestos citotóxicos y/o agentes quimioterápicos o es posible conjugar covalentemente el compuesto citotóxico con el péptido o compuesto de la invención. Los compuestos citotóxicos preferidos son maitansinoides y compuestos quimioterápicos preferidos son taxanos.

Además o alternativamente, las formas modificadas preferidas de péptidos según la invención incluyen por ejemplo formas modificadas química o enzimáticamente de los mismos que tienen propiedades biológicas mejoradas tales como solubilidad, absorción, semivida biológica mejoradas, etc. Las modificaciones pueden disminuir alternativamente la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la molécula, etc. Las modificaciones que aumentan por ejemplo la semivida biológica incluyen pegilación, hesilación, pasilación, glicosilación con estructura de glicosilo que tiene residuos de ácido siálico en su extremo, etc.

Los términos "pegilado" y sus variaciones gramaticales tales como "pegilación" describen todos que el péptido o peptidomiméticos del mismo en sus diferentes formas (por ejemplo en forma aislada, como sales farmacéuticamente aceptable, etc.) comprenden un resto de PEG, es decir una cadena de polietilenglicol, que se está covalentemente unida a los péptidos o peptidomiméticos tal como se describe en el presente documento.

Tal como se describe a continuación en el presente documento, un pentapéptido de CD44v6 de rata de secuencia NEWQG (SEQ ID No.: 11), que es el homólogo del pentapéptido de CD44v6 humano de SEQ ID No. 2 y que se ha modificado con PEG750 o PEG3000 es capaz de inhibir la activación de Met y Erk estimulada por HGF y mediada por CD44 aun cuando al menos el resto de PEG3000 tenga un peso molecular, es decir 3000 Da, que es significativamente mayor que el peso molecular calculado de la secuencia de SEQ ID No.: 11, que es de aproximadamente 620 Da. Además, se sabe que PEG de un peso molecular de este tipo tienen una estructura en zigzag extendida. Por tanto, por tanto es sorprendente que la modificación de un péptido comparativamente pequeño tal como el pentapéptido de SEQ ID No.: 11 no conduzca a pérdida de actividad. Parece justificado concluir que lo mismo debe aplicarse a los homólogos humanos tales como un pentapéptido de SEQ ID No.: 2, peptidomiméticos del mismo o incluso péptidos más largos tales como los de SEQ ID No.: 6. Además es sorprendente que la inhibición de la señalización de ERK sea incluso más eficaz con péptidos pegilados que con péptidos no pegilados.

El término "resto de PEG" o "resto de polietilenglicol" tal como se usa a continuación en el presente documento se refiere a PEG de un peso molecular promedio de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 35.000.000 Da. Se prefiere usar PEG que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 400 Da a aproximadamente 20.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 600 a aproximadamente 10.000 Da, incluso más preferiblemente de aproximadamente 700 Da a aproximadamente 10.000 Da. Los PEG más preferidos tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 8.000 Da, de aproximadamente 900 Da a aproximadamente 7.000 Da, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 6.000 Da tal como de aproximadamente 2.000 Da, de aproximadamente 3.000 Da, de aproximadamente 4.000

Da o de aproximadamente 5.000 Da. En una realización preferida, el PEG tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 200 a 20000 Da.

5 Los PEG se nombran normalmente por su peso molecular promedio. Por tanto, un PEG con nueve unidades de repetición tiene un peso molecular promedio de 400 Da y se etiquetaría como PEG 400. Los PEG contemplados para la presente invención pueden ser por tanto PEG tales como PEG 400, PEG 600, PEG 50, PEG 840, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000, PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 4600, PEG 8000, PEG 10000, PEG 12000 tal como están disponibles comercialmente por ejemplo de Sigma-Aldrich.

10 Los PEG pueden venir como PEG rectos, ramificados, en estrella o en peine. Los PEG ramificados tienen de tres a diez cadenas de PEG que surgen de un grupo de núcleo central. Los PEG en estrella tienen de 10 a 100 cadenas de PEG que surgen de un grupo de núcleo central. Los PEG en estrella tienen múltiples cadenas de PEG normalmente injertadas sobre una estructura principal de polímero.

15 Para los fines de la invención se prefiere generalmente usar PEG rectos y se prefiere particularmente usar PEG rectos con un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 1.000 a 6.000 Da, tal como un PEG 2000, PEG 3000, PEG 4000 o PEG 5000 o un PEG de peso molecular superior.

20 Los restos de PEG pueden modificarse adicionalmente. Por ejemplo, los restos de PEG pueden modificarse covalentemente con alcohol graso y ácidos grasos. Tales modificaciones adicionales pueden permitir que los péptidos y peptidomiméticos pegilados se acumulen o se incorporen al menos en estructuras de tipo micela o liposoma.

25 La presente invención también se refiere a tales estructuras de tipo micela o liposoma. Los péptidos pegilados y las composiciones farmacéuticas que comprenden tales péptidos pegilados pueden proporcionar por ejemplo solubilidad mejorada del fármaco, frecuencia de dosificación reducida, semivida de circulación prolongada, estabilidad del fármaco aumentada, protección potenciada frente a la degradación proteolítica, etc. Las estructuras de tipo micela o liposoma pueden permitir adicionalmente administrar los péptidos pegilados más eficazmente ya que la modificación adicional tal como cadenas de alcohol graso o ácido graso pueden permitir
30 una interacción mejorada con las membranas celulares. Además, las estructuras de tipo micela o liposoma pueden comprender agentes farmacéuticamente activos adicionales tales como agentes quimioterápicos. En caso de cáncer pancreático, estos agentes pueden incluir por ejemplo gemcitabina. En caso de cáncer de mama, estos agentes pueden incluir Herceptin.

35 La presente invención también se refiere a tales estructuras de tipo micela o liposoma que comprenden agentes farmacéuticamente activos adicionales. Tales estructuras de tipo micela o liposoma permitirán el direccionamiento de tales agentes quimioterápicos a través de los péptidos pegilados a, por ejemplo, los tumores que expresan CD44v6 y, por tanto, permiten una terapia dirigida y mejorada.

40 El experto en la técnica sabe cómo modificar péptidos o peptidomiméticos con restos de PEG. La unión covalente de un resto de PEG puede hacerse química o enzimáticamente.

45 El primer paso en la modificación química es normalmente funcionalizar uno o ambos extremos del polímero de PEG. Dependiendo de la funcionalización, puede diferenciarse entre PEG monofuncionales, bihomofuncionales o biheterofuncionales.

50 El proceso de pegilación química generalmente puede clasificarse en dos tipos, concretamente, un proceso discontinuo en fase de solución o un proceso de alimentación discontinua en columna. El proceso discontinuo comúnmente adoptado implica el mezclado de reactivos en una disolución tampón adecuada, preferiblemente a una temperatura de 4 a 6°C, seguido por la separación y purificación del producto deseado usando técnicas tales como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de interacción hidrófoba.

55 La elección del grupo funcional adecuado para el derivado de PEG se basa en el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG. Para proteínas y péptidos, los aminoácidos reactivos típicos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina. El grupo amino N-terminal y el ácido carboxílico C-terminal también pueden usarse como sitio específico de sitio mediante conjugación con polímeros funcionales de aldehído. Si se prefiere no hacer reaccionar un aminoácido con un PEG, sino solo por ejemplo el extremo N-terminal de un péptido, pueden bloquearse los grupos funcionales en
60 aminoácidos, por ejemplo con FMOC, pegar el péptido y luego desbloquear los aminoácidos.

65 Las técnicas usadas para formar derivados de PEG tales como péptidos pegilados generalmente hacen reaccionar el polímero de PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, normalmente anhídridos, cloruros de ácido, cloroformatos y carbonatos. En la química de pegilación de segunda generación, grupos funcionales más eficaces, tales como aldehído, ésteres, amidas, etc., están disponibles para la conjugación.

Los PEG heterobifuncionales son muy útiles para unir dos entidades, cuando se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Grupos de extremo preferidos para PEG heterobifuncionales son maleimida, vinilsulfonas, disulfuro de piridilo, amina, ácidos carboxílicos y ésteres de NHS.

- 5 Los péptidos pegilados según la invención pueden proporcionarse en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables.

A continuación se expone cómo los compuestos según la presente invención, es decir, los péptidos y formas modificadas de los mismos, las composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y métodos que
10 hacen uso de estos compuestos pueden usarse para el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano. Debe entenderse que, siempre que se haga referencia a continuación al tratamiento de cáncer metastásico, esta referencia siempre contempla el uso de los pentapéptidos tal como se describen a continuación en el presente documento, concretamente los de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y en particular los de SEQ ID NO: 2, peptidomiméticos de los mismos, o formas modificadas de los mismos, tal
15 como sus formas pegiladas.

Tal como puede deducirse de los experimentos descritos a continuación en el presente documento, los péptidos usados en los experimentos fueron capaces de inhibir la formación de metástasis en modelos de cáncer pancreático, así como de inducir la regresión de metástasis ya formadas. Tal como se mencionó, la invención se
20 refiere al uso de compuestos, composiciones farmacéuticas y la aplicación de métodos tal como se describe en el presente documento para el tratamiento de cánceres metastásicos.

Los cánceres metastásicos según la invención incluyen formas metastásicas de cánceres para los que se ha observado expresión de CD44v6 en tejidos cancerosos o puede observarse tras pruebas correspondientes por
25 ejemplo con anticuerpos frente a CD44v6. Por tanto, con el fin de observar si un paciente es eligible para su tratamiento con compuestos y composiciones farmacéuticas tal como se describen en el presente documento, puede tomarse una biopsia de tejido tumoral y someterlo a prueba para detectar la expresión de CD44v6. Si el tumor puede mostrar que expresa CD44v6 y si han comenzado a formarse metástasis o ya se han formado y quizá incluso diseminado por el cuerpo, este tumor se considera como cáncer metastásico según la invención.
30 Los cánceres metastásicos según la invención incluyen formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de piel tal como cáncer de células escamosas o carcinoma de células basales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de mama, y otros.

Tales formas de cáncer metastásico de los diversos cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de piel tal como cáncer de células escamosas o carcinoma de células basales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama pueden identificarse según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of
35 the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer).

Los cánceres metastásicos según la invención pueden clasificarse como cánceres en estadio III o estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer). El sistema de estadificación de TNM (metástasis de
45 ganglios tumorales, *tumor node metastasis*) del American Joint Committee on Cancer permite estadificar, es decir, la clasificación de los cánceres por el tamaño y extensión del tumor primario (T), la cuestión de si se ven afectados ganglios linfáticos regionales (N) y si ya pueden detectarse metástasis distantes (M). Esta indicación se toma entonces normalmente como una indicación de las diferentes vías a tomar en el tratamiento del paciente y también permite un pronóstico fiable de las enfermedades. Esto es por lo que el sistema de TNM se ha convertido en una herramienta indispensable para los oncólogos. El parámetro M recibe un valor de 0, es decir
50 M0 si no pueden detectarse clínicamente metástasis distantes aunque pueden haber comenzado a desarrollarse. Si M se fija a M0, un paciente dependiendo de los valores de T y N puede clasificarse como estadio III. Por tanto, para por ejemplo cualquier T, N3 y M0, un paciente puede clasificarse como estadio III, o estadio IIIc en caso de por ejemplo cáncer de mama (véase la página 362, Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer). Si un paciente en estadio III de este tipo o un paciente que tiene la subclase más alta de estadio III (tal como estadio IIIC para cáncer de mama) presenta adicionalmente células tumorales
55 circulantes y micrometástasis en la médula ósea, esto empeorará el pronóstico. Por tanto, para los fines de la presente invención un cáncer metastásico puede clasificarse como estadio III según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer).

Preferiblemente, para un cáncer metastásico según la invención M es M1, es decir que la metástasis distante puede detectarse clínicamente de modo que un tumor metastásico de este tipo puede clasificarse como estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer).

65 Ha de entenderse que siempre que la presente invención haga referencia a un cáncer metastásico, esto lo más

preferiblemente se refiere a un cáncer tal como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de piel tal como cáncer de células escamosas o carcinoma de células basales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama, que se clasifica como estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/estadio anatómico de TNM del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer). Los requisitos específicos para clasificar cada cáncer según este sistema pueden encontrarse en los respectivos capítulos del Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (7ª edición, 2010, Springer), véanse por ejemplo las páginas 143 a 146 para cáncer colorrectal, páginas 241 a 250 para cáncer pancreático, páginas 301 a 314 para cáncer de células escamosas, páginas 347 a 376, etc.).

Se describe en el presente documento el uso de los pentapéptidos descritos a continuación en el presente documento, por ejemplo de SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 o 5 y lo más preferiblemente de SEQ ID NO:2, peptidomiméticos de los mismos o formas modificadas de los mismos, y composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos para el tratamiento de cánceres metastásicos tales como linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de piel tal como cáncer de células escamosas o carcinoma de células basales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama, que pueden clasificarse como estadio IV según el Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer.

Los compuestos y sales de los mismos pueden formularse tal como se mencionó anteriormente como composiciones farmacéuticas (por ejemplo líquidos, suspensiones, emulsiones, pastillas para chupar, sobres, ampollas, aerosoles, polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones, disoluciones etc.) que comprenden al menos un compuesto de este tipo solo u opcionalmente en una mezcla con portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos/sales de los mismos y las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración oral, por ejemplo mediante inhalación, para administración nasal o para administración mediante inyección tal como inyección subcutánea.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Materiales y métodos

1.1 Líneas celulares

La línea celular de carcinoma pancreático de rata BSp73AS (también designada AS) y sus transfectantes se han descrito (Orian-Rousseau *et al.*, Genes & Development (2002), 16:3074-3086) y se hicieron crecer en RPMI (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) más FCS al 10% (PAA, Cölbe, Alemania). Las células de cáncer pancreático humano L3.6pl (Bruns *et al.*, Neoplasia (1999), 1, 50-62) se mantuvieron en DMEM (bajo contenido en glucosa; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con FCS al 10% (PAA, Cölbe, Alemania), piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, L-glutamina y disolución de vitaminas de MEM (Pan Biotech, Aidenbach Alemania).

1.2 Anticuerpos y otros reactivos

El anticuerpo monoclonal humano contra CD44v6 (VFF18) fue un regalo de Bender (eBioscience, Campus Vienna Biocenter 2, A-1030, Viena, Austria), los anticuerpos anti-ERK 1 (K-23), c-Met (C-28) y GFP (sc-101525) eran de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania), el anticuerpo frente a caspasa-8 escindida anticuerpo (IMG-5703) de Imgenex (San Diego, CA, EE.UU.), el anticuerpo frente a CD31 (MEC13.3) de BD Biosciences, Heidelberg, Alemania, y los anticuerpos frente a caspasa-3 escindida (Asp175), Fosfo-Met (Tyr1234/1235) (D26), Met (25H2) y la fosfo-ERK fosfo-p44/42 de Cell Signaling Technology (Beverly, Inglaterra). El anticuerpo específico de exón v6 de rata 1.1ASML se ha descrito (Gunthert *et al.*, Cell (1991), 65, 13-24). Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa del rábano eran de Dako (Glostrup, Alemania). El anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Alexa Fluor R 546 se adquirió de Life Technologies (Darmstadt, Alemania). Se adquirió HGF de Peprotech (Hamburgo, Alemania). Los péptidos humano y de rata de CD44v6 (14 meros y 5 meros) se han descrito (Matzke *et al.* Cancer Res. (2005), 65(14), 6105-6110). La secuencia del 14 meros de rata es KEKWFENEWQGKNP (SEQ ID No. 10), el 5 meros de rata corresponde a NEWQG (SEQ ID No. 11). El 14 meros humano corresponde a KEQWFGNRWHEGYR (SEQ ID No.: 6) y el 5 meros humano tiene la siguiente secuencia: NRWHE (SEQ ID No.: 2). Para experimentos de obtención de imágenes *in vivo* el 11 meros de rata WFENEWQGKNP (SEQ ID No.:12), el 11 meros de ratón WFQNGWQGKNP (SEQ ID No.: 13) y el 11 meros humano WFGNRWHEGYR (SEQ ID No.: 14) se marcaron con el colorante fluorescente DY681. Como péptido de control, en el caso de células de rata o modelos singénicos de rata, el péptido v6 humano tiene una longitud idéntica que el péptido v6 de rata específico que se usó. En el caso de células tumorales humanas o modelo de tumor ortotópico humano, se usó el péptido v6 de rata como control. Todos los péptidos los produjo Bachem (Bubendorf, Suiza) o Intavis (Colonia, Alemania). Se resuspendieron los péptidos liofilizados en PBS que

contenía BSA al 1% hasta una concentración madre de 1 mg/ml. Se obtuvieron diluciones finales mediante dilución en PBS.

1.3 Transfección lentiviral de ARNhp

El sistema de lentivirus usado para silenciar Met ya se ha descrito (Corso *et al.*, Oncogene (2008), 27(5):684-93). Se produjeron lentivirus tal como se describió en otra parte (Vigna *et al.*, J. Gene Med. (2000), 2(5):308-16). En resumen, se sembraron 4×10^6 células 293T (p12-15) en una placa de 10 cm. 24 h después se mezclaron los vectores de empaquetamiento VSV-G, PMDL y Rev, el TetR y el constructo de lentivirus (o bien constructo de Met-ARNhp o bien de control-ARNhp) y se llevaron hasta un volumen final de 450 μ l mediante la adición de TE. Se añadieron 450 μ l de una disolución de CaCl_2 2,5 M a esta mezcla. Tras agitar con vórtex y 5 minutos de incubación, se añadieron gota a gota 500 μ l de disolución de 2x HBS a la mezcla de ADN-TE- CaCl_2 al tiempo que se agitaba con vórtex a velocidad completa. Se añadió el precipitado a las células 293T. Después de 16 h, se reemplazó el medio y se añadió medio nuevo que contenía butirato de sodio 5 mM. Se recogió el medio tras 24 y 48 horas. Entonces se añadió medio que contenía virus a las células diana BSp73ASs6 (confluencia del 70%) en presencia de polibreno 8 μ g/ml. 24 horas después de la infección, se reemplazó el medio y se indujo la producción de ARNhp mediante la adición de doxiciclina hasta una concentración final de 1 μ g/ml. Se trataron células BSp73ASs6 transducidas con TetR y control-ARNhp o Met-ARNhp con doxiciclina durante 72 horas antes de comenzar un ensayo o la inyección en el animal.

1.4 Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se indujeron células privadas de suero (24 horas) con el factor de crecimiento HGF (10 ng/ml) a 37°C durante 5 minutos. Cuando se indicó, se trataron las células con péptidos (100 ng/ml) antes de la inducción a 37°C durante 10 minutos (péptido de control o péptido de CD44v6 100 ng/ml). Tras la inducción con HGF, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo. Para detectar Met y Erk activados, se lisaron las células en tampón de muestra de dodecilsulfato de sodio (SDS) que contenía ditiotreitól (DTT) 100 mM, se sometieron a ebullición y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos contra fosfo-Met y ERK. Se realizaron controles de carga en la misma inmunotransferencia tras la separación (Tris 62,5 mM, pH 6,8, SDS al 2%, DTT al 0,8%) estudiando con sonda con el anticuerpo frente a Met, respectivamente frente a ERK. Se tiñeron las inmunotransferencias usando el sistema de quimioluminiscencia potenciada (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania). Se cuantificaron las bandas en la inmunotransferencia de tipo Western con el programa Image J (National Institutes of Health).

1.5 Determinación cuantitativa de HGF y VEGF en sobrenadante de cultivo celular

La determinación de los niveles de HGF y VEGF humanos en medio de cultivo celular de células L3.6pl se realizó usando el inmunoensayo de HGF humano Quantikine y el inmunoensayo de VEGF humano Quantikine de Roche (Mannheim, GER) y R&D Systems (Wiesbaden, Alemania). Para este fin, se cultivaron 3×10^6 células durante 5 días en una placa de 15 cm en presencia de los respectivos péptidos tal como se indicó. Se centrifugó el sobrenadante (20 ml) (1200 rpm) y se realizó el ensayo según las instrucciones del fabricante.

1.6 Experimentos con animales

Se adquirieron ratones desnudos atímicos (NCI-nu) macho de Harlan (Roßdorf, Alemania). Se criaron ratas BD10 y BDX internamente. Los animales se alojaron y mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos en instalaciones aprobadas por el Regierungspräsidium Karlsruhe. Todos los animales se manipularon según las regulaciones alemanas para la experimentación con animales. Los experimentos con animales fueron aprobados por el Regierungspräsidium Karlsruhe (35-9185.817G-192/10). Se realizaron experimentos de obtención de imágenes (figura 3) en Gotinga y fueron autorizados por el Regierungspräsidium (35-9185.817G-106/09).

En el caso del modelo singénico de rata, se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células pancreáticas (BSp73AS y sus transfectantes) en el costado posterior derecho de los animales. Se desarrollaron tumores durante cuatro semanas. Durante este periodo de tiempo, a los animales se les inyectaron células BSp73ASs6 que expresaban Met-ARNhp o control-ARNhp y recibieron doxiciclina en el agua potable. Al final del experimento, se aislaron tumores primarios. Se analizaron los pulmones y ganglios linfáticos axilares. Se incubaron los tejidos durante 24 h en un fijador de zinc (0,5 g de acetato de calcio, 5,0 g de acetato de zinc, 5,0 g de cloruro de zinc, en 1 l de Tris 0,1 M pH 7,4) y se incrustaron en parafina para su análisis adicional. En el caso de tratamiento con péptido o anticuerpo, se desarrollaron tumores durante una semana antes del primer tratamiento. Cuando se indicó, los animales recibieron 200 μ g de péptido o anticuerpo por inyección tres veces a la semana durante cuatro semanas. Se monitorizó el crecimiento tumoral semanalmente usando un calibre. Se sacrificaron los animales el día 28 o 30 después del inicio del tratamiento.

En el caso del modelo ortotópico humano, se suspendieron células de carcinoma pancreático L3.6pl (pase

24-26) en disolución de sal equilibrada de Hank (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) tras la tripsinización. Se inyectaron las células de manera ortotópica en el páncreas de ratones desnudos macho tal como se describe (Bruns CJ *et al.* (1999) Neoplasia 1(1):50-62). A dos grupos de 15 ratones cada uno se les inyectaron por vía i.p. 7 días después o bien el péptido v6 humano, respectivamente péptido de control de rata (20 µg). Para todos los experimentos descritos y representados en el presente documento, se usaron o bien el péptido de control de 14 meros de rata o bien el péptido de 14 meros humano. Todos los experimentos se repitieron entonces con el péptido de control de 5 meros de rata o el péptido de 5 meros humano (N-R-W-H-E). Se observaron los mismos resultados que para los péptidos de 14 meros. Se repitió la inyección tres veces a la semana durante 21 días. Dos días después del último tratamiento, se sacrificaron los animales.

Con el fin de examinar la regresión de las metástasis se implantaron (o bien BSp73ASs6 o bien L3.6pl) tal como se describió anteriormente. Se permitió el crecimiento tumoral durante tres semanas. En ese momento todos los animales habían desarrollado metástasis en el grupo de control. Se les inyectó a los animales por vía i.p. 20 µg (modelo de ratón ortotópico de L3.6pl: péptido v6 humano o péptido de control de rata) o por vía i.v. 200 µg (modelo singénico de rata: péptido v6 de rata o ratón control péptido) de péptidos tres veces por semana. Se sacrificaron los animales 23 días después del inicio del tratamiento con los péptidos.

1.7 Obtención de imágenes *in vivo* usando Optix MX2

La obtención de imágenes *in vivo* de los tumores BSp73ASs6 hechos crecer de manera subcutánea en ratas BD10 o BDX se realizó usando el sistema de obtención de imágenes de fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF) Optix MX2 (ART, Montreal, Canadá) tal como se describió anteriormente (Napp *et al.*, Int J Cancer (2010), 127:1958-1974). Para evitar la autofluorescencia del pelaje, se afeitaron las ratas alrededor del tumor antes de la obtención de imágenes. Posteriormente, se anestesiaron los animales usando isoflurano al 2% y se fijaron suavemente sobre la placa calentada de los dispositivos durante todo el tiempo de la adquisición de datos. Para reducir el fondo de fluorescencia, se alimentó a las ratas con comida con contenido en clorofila reducido (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Suiza) durante una semana antes de la obtención de imágenes de NIRF. Todos los análisis *in vivo* estuvieron precedidos por exploraciones nativas de animales sin ninguna inyección de la sonda fluorescente. Para el análisis *in vivo*, se les inyectaron a las ratas 200 µg de péptido v6 de 11 meros de rata etiquetado con DY681 o el péptido v6 de 11 meros humano por medio de la vena de la cola. A los controles se les inyectó la cantidad igual de péptido v6 de 11 meros de ratón etiquetado con DY681. El 11 meros de rata tenía la secuencia WFENEWQGKNP (SEQ ID No.: 12), el 11 meros de ratón tenía la secuencia WFGNGWQGKNP (SEQ ID No.: 13) y el 11 meros humano tenía la secuencia WFGNRWHEGYR (SEQ ID No.: 14). Todos los péptidos se etiquetaron con el colorante fluorescente DY681. Se adquirieron los datos en el momento indicado tras la inyección de los péptidos. Para la monitorización *ex vivo*, se sacrificaron los animales después de 24 h tras la inyección de los péptidos y se exploraron el tumor y los órganos de interés *ex vivo* usando Optix MX2.

Se midió la fluorescencia de DY681 usando excitación a 670 nm en combinación con un filtro de emisión de paso largo de 700 nm. Se realizaron las exploraciones con trama de 1,5 mm, tiempo de recogida de fotones de 0,5-1 s por punto de exploración y potencia de láser variable. Se analizaron los conjuntos de datos con OptiView (ART). Los datos de intensidad de fluorescencia se presentan en cuentas normalizadas (NC) donde la intensidad de fluorescencia medida (cuentas) se normalizó para potencia de láser y tiempo de integración variables, permitiendo la comparación de las mediciones con diferentes parámetros.

1.8 Obtención de imágenes *in vivo* usando el instrumento de obtención de imágenes Pearl

La obtención de imágenes *in vivo* de los ratones con los tumores L3.6pl se realizó usando el instrumento de obtención de imágenes Pearl™ (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Alemania). El sistema usa dos láseres (685 y 785 nm) para la excitación y un detector de dispositivo de carga acoplada para la detección de señales. La excitación por láser permite una penetración profunda en el tejido. Con la detección de infrarrojo cercano, se logra una alta sensibilidad debido a la autofluorescencia reducida del tejido. Con el fin de normalizar las imágenes, se hizo uso del software Pearl Cam. Se alimentó a los animales con alimento reducido en clorofila para reducir el fondo de fluorescencia una semana antes de la obtención de imágenes (Regime 210, safe-diets, Augy, Francia). Antes de la obtención de imágenes, se anestesiaron los ratones con isoflurano al 2,0%. Se colocaron los animales en la placa calentada del instrumento de obtención de imágenes y se logró el suministro continuo de isoflurano a través de un cono nasal en el cajón de obtención de imágenes. Se capturaron imágenes con luz blanca, 700 y 800 nm. Se obtuvieron imágenes de los animales antes de la inyección de péptido por vía i.v. y 24 h tras la inyección con o bien péptido v6 humano marcado con DY681 o bien péptido v6 de rata marcado con DY681 como control. Inmediatamente después de cada sesión de obtención de imágenes se sacrificaron los animales, se aislaron el tumor, el hígado y el bazo y se exploraron *ex vivo* con luz blanca, 700 y 800 nm.

1.9 Inmunofluorescencia

Se sembraron células ASs6 o L3.6pl a 5.000 células/pocillo de un instrumento Lab-TekR Chamber Slide™ (Nunc, Napierville, IL, EE.UU.). El día siguiente se lavaron las células con PBS frío y se fijaron con formalina al 4% durante 30 min a TA. Se bloqueó la unión inespecífica con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a TA. Se

incubaron las células durante 1 hora con los péptidos marcados con DY681. Después de tres etapas de lavado con PBS, se montaron los cubreobjetos con medio de montaje de fluorescencia (Dako, Glostrup, Dinamarca) y se midió la inmunofluorescencia mediante un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS2 SP2 (Exton, PA, EE.UU.) y se procesó usando el software confocal de Leica. Se usó un objetivo de 20X para la obtención de imágenes.

1.10 Histología

Para el análisis histomorfológico se tiñeron secciones incrustadas en parafina de pulmones con hematoxilina y eosina y ácido peryódico-Schiff (H&E o PAS). Se examinaron secciones en serie de los bloques de tejido completos analizando cortes cada 20 µm; en cada corte, se evaluó la presencia y la extensión del depósito metastásico, según el procedimiento usado rutinariamente por los patólogos para evaluar la presencia de micrometástasis.

1.11 Análisis inmunohistológico y de inmunofluorescencia

Se desparafinaron secciones de parafina gruesas de 7 µm y se rehidrataron. Para la tinción de P-Met, se logró el desenmascaramiento de antígenos sometiendo a ebullición los cortes en EDTA 1 mM pH 8,0 seguido por incubación durante 15 minutos a una temperatura por debajo de la ebullición, para la tinción de CD31 se trataron las secciones con proteinasa K (8 µg/ml) durante 10 min a 37°C. Para la tinción de inmunofluorescencia de P-Met, se bloqueó la unión inespecífica con suero de cabra al 5% (DAKO, Glostrup, Dinamarca) (diluido en 1x PBS/Triton X-100 al 0,3%) durante 60 minutos. En el caso de inmunohistoquímica, en primer lugar se bloquearon peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3% en PBS seguido por incubación con sistema de bloqueo de biotina (Dako, Glostrup, Dinamarca) y entonces se inhibió la unión inespecífica mediante incubación con FCS al 5% en PBS. Se incubaron las secciones con el anticuerpo frente a P-Met (D26, dilución 1:50 en PBS 1 x/BSA al 1%/Triton X-100 al 0,3%), anticuerpo frente a Met (C-28, dilución 1:50), anticuerpo frente a GFP (sc-101525, dilución 1:50) o anticuerpo frente a CD31 (5 µg/ml) durante la noche o VFF18 (5 µg/ml) durante la noche a 4°C. Tras lavar en PBS, se incubaron las secciones con anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa Fluor R 546 (en el caso de tinción de P-Met y Met de inmunofluorescencia, dilución 1:500) o un anticuerpo secundario biotinilado (para tinciones inmunohistoquímicas, anticuerpo de conejo anti-rata para VFF18 y CD31, anticuerpo de cabra anti-conejo para P-Met, caspasa-3 escindida y caspasa-8 escindida y anticuerpo de conejo anti-ratón para GFP, dilución 1:500) durante 45 minutos. Para la tinción de DAB (3,3'-diaminobencidina), se trataron las secciones con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako, Glostrup, Dinamarca) y se revelaron con el sistema de sustrato de DAB (3,3'-diaminobencidina; Biozol, Eching, Alemania). Para la inmunofluorescencia, se usó DAPI para la tinción nuclear.

2. Resultados

2.1 La función de correceptor de CD44v6 para Met es la etapa decisiva para la diseminación metastásica de células de tumor pancreático de rata

Para investigar si la función de correceptor de CD44v6 para el receptor de Met es la etapa decisiva para la diseminación metastásica de células tumorales, se examinó en primer lugar si una isoforma de CD44 que contiene exclusivamente el exón v6 o todas las exones variantes v1-10 incluidos en la isoforma de CD44v1-10 conferían potencial metastásico a las células BSp73AS de rata. En estas células, no puede inducirse Met por HGF a menos que se transfecte una isoforma que contenga CD44v6 (figura1A). La eliminación del exón v6 por ejemplo en CD44v1-10Δv6 alteró la activación de Met por HGF (figura1A).

Las células BSp73AS parentales y células transfectadas de manera estable con los constructos mencionados anteriormente (CD44v6, CD44v1-10 y CD44v1-10Δv6) se inyectaron por vía subcutánea en ratas isogénicas. En todos los animales eran palpables tumores primarios ya después de una semana. En el caso de células transfectadas con CD44v6 o CD44v1-10, los ganglios linfáticos axilares de los correspondientes animales ya estaban agrandados dos semanas después de la inyección y se sacrificaron los animales después de seis semanas. El examen histomorfológico de los pulmones y ganglios linfáticos reveló que todas las ratas que portan tumores que expresan CD44v6 o CD44v1-10 desarrollaron metástasis ganglionares e intrapulmonares. En cambio, las células parentales o las células transfectadas con CD44v1-10Δv6 dieron lugar a tumores primarios pero no a metástasis, ni en ganglios linfáticos ni en los pulmones (figura1B y tabla 1). No se detectó ninguna micrometástasis en los pulmones de estos animales (tabla 1). Por tanto, isoformas de CD44 tales como CD44v6, que permiten la activación de Met, también confieren propensión metastásica a células BSp73AS.

A continuación, se transfectaron de manera estable células BSp73ASs6 (células BSp73AS que expresan la isoforma de CD44v6 además de CD44s) con lentivirus que expresan secuencias de ARNhp de Met. Se confirmó que las células no expresan Met (figura 1A, últimos dos carriles). Entonces, se inyectaron estas células (o células infectadas con lentivirus que expresan secuencias de ARNhp de control) en animales singénicos. Se examinaron los animales seis semanas tras la inyección. Todos los animales desarrollaron tumores primarios (tabla 1). Sin

embargo, solo se observó activación de Met en los tumores primarios de células infectadas con lentivirus que expresan ARNhp de control, pero no en tumores primarios que expresan ARNhp de Met (figura 1C). Además, cuando se suprimió la expresión de Met, no se detectaron metástasis ni micrometástasis ni en el pulmón ni en los ganglios linfáticos axilares (figura 1B, tabla 1) demostrando la importancia de Met para el proceso metastásico. A partir de estos datos, puede concluirse que se requieren tanto CD44v6 como Met para la diseminación metastásica de células BSp73AS.

A continuación se examinó si los homólogos de rata para un péptido de SEQ ID No.: 2 (péptidos de 5 meros de CD44v6 humano) o SEQ ID No.: 6 (péptido de 14 meros de CD44v6 humano) que interfiere con la función de correceptor también inhiben la formación de metástasis. Los péptidos de rata tenían las secuencias KEKWFENEWQGKNP (SEQ ID No.: 10) y NEWQG (SEQ ID No.: 11). Se inyectaron células BSp73ASs6 por vía subcutánea en ratas singénicas y se inyectaron péptidos de CD44v6 de rata de SEQ ID No.: 10 o SEQ ID No. 11 (o péptidos de control de ratón) o el anticuerpo frente a CD44v6 (o IgGs como control) por vía intratumoral o intravenosa tres veces a la semana. Tanto el tratamiento con el anticuerpo específico de v6 como con el péptido específico de v6 inhibieron las metástasis (figura 2B, tabla 2). En secciones de pulmón de animales tratados con el péptido de CD44v6, no pudieron detectarse ni metástasis ni micrometástasis tras el análisis histológico usando tinción de PAS y H&E (figura 2C y tabla 2). Esto está en claro contraste con los resultados obtenidos a partir de animales tratados con el péptido de control (o IgG de control) donde se detectaron numerosas metástasis en los pulmones (figura 2B, C). De manera interesante, la excrecencia de tumores primarios no se vio influida por ningún tratamiento (figura 2D). Esto es compatible con el hecho de que también células BSp73AS o células BSp73ASv1-10Δv6 pueden inducir la formación de tumores primarios de manera similar a los transfectantes de v6. Tomados conjuntamente, los experimentos sugieren que la función de correceptor de CD44v6 para Met es la etapa decisiva para la diseminación metastásica en el sistema de células de tumor pancreático de rata y que no explica la excrecencia del tumor primario.

2.2 Unión específica de un péptido de CD44v6 a células tumorales *in vivo*

Con el fin de someter a prueba la especificidad de la unión de péptidos de CD44v6 al sitio tumoral y a las metástasis y estimar la cinética de unión *in vivo*, se realizó obtención de imágenes de infrarrojo cercano (NIRF) con el instrumento Optix MX2. Para este fin, se marcaron dos péptidos de CD44v6 con el fluoróforo DY681: uno específico de rata, rv6 pep Dy681 y uno específico de ratón, mv6 pep Dy681, como control. Las pruebas *in vitro* mostraron que, de hecho, sólo el péptido de rata marcado pero no el péptido de ratón inhibía la activación de Met tal como se demostró en el lado derecho de la figura 3A. Además, el péptido v6 de rata marcado con DY681, pero no el péptido v6 de ratón marcado con DY681 se unía a células BSp73ASs6 en cultivo tisular (lado izquierdo de la figura 3A).

Para experimentos *in vivo*, se inyectaron células BSp73ASs6 por vía subcutánea en ratas singénicas. Tres semanas después, recibieron cualquiera de los péptidos v6 marcados mediante inyección en la vena de la cola. Se midió la acumulación de la fluorescencia en la región tumoral mediante Optix MX2 a los puntos de tiempo indicados. Antes de la inyección intravenosa (i.v.) de péptidos marcados con Dy681, se exploraron de manera nativa ratones con el fin de medir los niveles de fondo de autofluorescencia. Entonces, se determinó la cinética de unión *in vivo* de los péptidos v6 marcados con Dy681 a los tumores subcutáneos. Tal como se muestra en una serie de imágenes de NIRF representativas tomadas 1, 2, 3 y 7 días después de la inyección de péptidos, se detectó una alta intensidad de fluorescencia a lo largo del área tumoral durante al menos 2 días *in vivo*, con un máximo el día 1. La inyección del péptido de control m6 pep Dy681 no dio como resultado ninguna señal de fluorescencia a lo largo del área tumoral (figura 3D).

Para examinar específicamente la distribución de los péptidos v6 en el tumor y también en los pulmones, se extirparon ambos tejidos 24 h después de la inyección de péptidos y se examinaron *ex vivo* mediante Optix MX2 (figura 3C). Solo pudieron detectarse intensidades de fluorescencia en tumores y en áreas específicas de los pulmones explorados *ex vivo* y extirpados de los ratones que recibieron rv6 pep Dy681, pero no en tumores y pulmones de todas las ratas de control en las que se inyectó previamente mv6 pep Dy681 (figura 3C). Estos resultados confirmaron la observación *in vivo* de que el péptido de rata se une específicamente al tumor pancreático de rata subcutáneo y además incluso sugieren unión *in vivo* a las metástasis. De hecho, el análisis histológico reveló la presencia de metástasis en los pulmones de todos los animales.

2.3 La formación de metástasis de células tumorales pancreáticas humanas se inhibe mediante un péptido de CD44v6 humano de SEQ ID No.: 2 o SEQ ID No.: 6

Para expandir los estudios a tumores pancreáticos humanos, se investigaron las células de carcinoma pancreático humano altamente metastásicas L3.6pl (Bruns, *et al.* Neoplasia (1999), 1(1):50-62). Estas células se originan a partir de las células COLO 375 que se han sometido a pasajes varias veces en el hígado y el páncreas, una etapa que las hizo más y más metastásicas. Se confirmó que Met depende de CD44v6 para su activación y señalización en estas células (figura 4A). Las células L3.6pl se trataron con HGF en presencia o ausencia de un péptido v6 humano de SEQ ID No.: 2 o SEQ ID No.:6 y se midió la activación de Met y señalización posterior a

ERK. Se inhibió la fosforilación de tanto Met como ERK mediante el péptido v6 humano. El tratamiento con un péptido v6 de rata correspondiente (péptido de ctrl., SEQ ID No.: 10 o 11) no tuvo influencia sobre la activación del receptor y la transducción de señales (figura 4A).

5 Para someter a prueba el efecto del péptido sobre el crecimiento tumoral y la formación de metástasis, se
inyectaron por vía ortotópica las células L3.6pl en el páncreas de ratones inmunosuprimidos (NCI-nu). Estos
ratones desarrollaron tumores primarios y mostraban numerosas metástasis en el hígado después de cuatro
semanas. El tumor primario expresa una alta cantidad de CD44v6 (figura 4B). La inyección intraperitoneal (i.p.)
10 del péptido específico humano tres veces por semana durante tres semanas reprimió completamente la
activación de Met tal como se muestra mediante la tinción de inmunofluorescencia para fosfo-Met y Met en el
tumor (figura 4C). Estos datos demuestran que el péptido interfiere con la función de correceptor de CD44v6 para
Met y suprime la fosforilación de Met *in vivo*. Puesto que la activación de Met es específica de especie y el
receptor de Met humano solo puede activarse mediante HGF humano, este resultado sugiere que las células
15 L3.6pl producen su propio HGF. De manera interesante, en contraposición al sistema de rata la excrecencia del
tumor primario en el páncreas se reprimió fuertemente mediante el péptido v6 humano (figura 4D, parte superior).
La excrecencia del tumor primario en el páncreas también se reprimió fuertemente (figura 4D, parte inferior). El
péptido específico de rata (péptido de ctrl.) no tuvo ninguna influencia sobre la formación de metástasis ni sobre
el crecimiento del tumor primario (figura 4D). Este resultado sugiere que las células L3.6pl producen su propio
HGF. De hecho, se detectó HGF humano en una concentración de 3375 pg/ml en el sobrenadante (véase
20 Materiales y métodos) después de 5 días de cultivo (datos no mostrados).

Se observó que la excrecencia del tumor primario se retrasó tras la inhibición de la angiogénesis tumoral con un
péptido v6 específico murino. En el presente documento se muestra que el tratamiento con el péptido humano
también disminuyó la angiogénesis tal como se ejemplifica mediante un número de vasos y tamaño de vasos
25 reducidos en los tumores tratados con péptido v6. La angiogénesis disminuida explica el volumen tumoral
reducido (figura 4D, E). Puesto que los péptidos v6 actúan de una manera específica de especie, la inhibición de
la angiogénesis no puede deberse a un efecto sobre las células endoteliales murina sino más bien a una
inhibición de la producción de VEGF por células de carcinoma pancreático humanas. De hecho, las células
L3.6pl humanas producen hVEGF, una secreción que puede bloquearse mediante el tratamiento con el péptido
30 v6 humano (figura 4F). La observación más sorprendente fue que el péptido específico humano inhibía
completamente la formación de metástasis dentro del hígado (figura 4G). El péptido específico de rata (péptido
de ctrl.) no tuvo influencia sobre la formación de metástasis o sobre el crecimiento del tumor primario (figuras 4C-
G).

35 Entonces, se examinó la especificidad de la unión del péptido de CD44v6 humano al tumor *in vivo* usando el
sistema de obtención de imágenes de animales pequeños Pearl Impulse. El péptido marcado humano pero no el
péptido de rata inhibió la activación de Met en células L3.6pl (figura 5a, lado derecho) y se unió a estas células
en cultivo celular (figura 5a, lado izquierdo). *In vivo*, el péptido humano marcado de manera fluorescente (DY
681) se acumulaba específicamente en el tumor inducido por células L3.6pl inyectadas por vía ortotópica (figura
40 5B). No se detectó fluorescencia en animales que se trataron con un péptido de control. Además, no se
observaron señales en animales que no recibieron péptido hubieran desarrollado o no un tumor (figura 5B). El
análisis *ex vivo* de órganos aislados de animales tratados con el péptido v6 humano marcado permitió la
detección de la unión no sólo a los tumores primarios sino también a áreas del hígado lo más probablemente
correspondientes a metástasis (figura 5C). Por tanto, estos experimentos revelaron que los péptidos de CD44v6
45 no sólo seleccionan como diana los tumores primarios sino también metástasis distantes.

2.4 Las metástasis ya establecidas se eliminan mediante péptidos de CD44v6

La unión específica de los péptidos de CD44v6 a áreas específicas de los pulmones en el sistema de rata y del
hígado en el modelo humano plantea la cuestión de si estos péptidos podrían tener un efecto sobre las
50 metástasis ya establecidas. En los experimentos descritos en las figuras 2 y 4, se aplicaron los péptidos de
manera temprana tras la inyección de las células tumorales y reprimieron completamente el establecimiento de
metástasis. Con el fin de medir el efecto del péptido de CD44v6 sobre las metástasis ya establecidas, se usaron
otros parámetros experimentales. Se inyectaron células BSp73ASs6 por vía subcutánea en ratas singénicas y
55 células L3.6pl por vía ortotópica en ratones desnudos macho y se permitió que crecieran durante 3 semanas. En
ese momento, todos los animales del grupo de control habían desarrollado metástasis (tabla 3) lo que sugiere
que este era también el caso en los grupos usados para el tratamiento con el péptido. Entonces se trataron los
animales o bien con el péptido de CD44v6 específico de especie o bien con el péptido de control (ratón para el
sistema de rata y rata para el sistema humano) dos veces por semana durante otras tres semanas (esquema en
60 la figura 6A) y luego se sometieron a prueba para detectar la presencia de metástasis. Al final de los
experimentos, pudieron detectarse metástasis en todos los animales tratados con el péptido de control (tabla 3,
figura 6B para las células BSp73ASs6, tabla 3, figura 6C para células L3.6pl) mientras que los animales tratados
con los péptidos de CD44v6 específicos de especie estaban libres de metástasis. Por tanto, las metástasis ya
establecidas se eliminan mediante el tratamiento con los péptidos de CD44v6.

65 Una hipótesis para la desaparición de las metástasis es que los péptidos inducen apoptosis de células

metastásicas que expresan CD44v6 en los órganos secundarios. Con el fin de someter a prueba esta hipótesis, se repitió el experimento descrito anteriormente usando las células BSp73ASs6. Se inyectaron las células por vía subcutánea en ratas singénicas y se permitió que el tumor se desarrollara durante tres semanas. Después de ese tiempo, se separaron los animales en dos grupos de 10 animales a los que se les inyectó o bien el péptido de CD44v6 de rata específico o el péptido de control (ratón) cada segundo día. Un día después de cada inyección del péptido, se extrajeron los pulmones de un animal y se midió la apoptosis usando un anticuerpo que detecta la forma escindida de caspasa 3. Se detectaron células apoptóticas tan pronto como tres días después de la primera inyección de los péptidos en las áreas tumorales de animales tratados con el péptido de CD44v6. No se detectó apoptosis en absoluto en los animales en los que se inyectó el péptido de control (figura 7). Se midió un máximo de apoptosis ocho días después de la primera inyección de los péptidos de CD44v6. Doce días después de la inyección del péptido de CD44v6, se observó menos apoptosis. El día veintidós, ya no pudo detectarse metástasis en animales tratados con el péptido de CD44v6 mientras que era evidente la diseminación metastásica en los pulmones de animales de control (figura 7). A partir de estos experimentos, se concluye que el péptido de CD44v6 induce apoptosis de células metastásicas.

Para discriminar si la ruta intrínseca caracterizada por la liberación de proteínas mitocondriales o la ruta extrínseca activada por receptores de muerte unidos a ligando para la apoptosis se indujo mediante el péptido v6, se investigó la expresión de caspasa-8 escindida en las metástasis tratadas con el péptido v6. Se observó una cinética de activación de caspasa-8 similar a la obtenida para caspasa-3 en los pulmones de los animales tratados con péptido v6. A partir de estos experimentos, se concluye que el péptido de CD44v6 induce apoptosis de células metastásicas por medio de la ruta apoptótica extrínseca.

Ejemplo 2 - Péptidos de CD44v6 pegilados inhiben la señalización mediada por CD44v6 dependiente de HGF

1. Materiales y métodos

1.1 Síntesis de péptidos pegilados

Se realizó la síntesis de péptidos en un sintetizador de péptidos automatizado de Applied Biosystems (modelo 433A) y se purificaron los péptidos mediante HPLC preparativos. Se sintetizaron péptidos de secuencias NEWQG (SEQ ID No.: 11) y un péptido de control NAAAG (SEQ ID No.: 15). Se caracterizaron productos en bruto y purificados mediante CL acoplada a un espectrómetro de masas (μ TOF CLEM de Bruker Daltonics-Bremen, Alemania).

Se realizó la síntesis de péptidos usando protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida de Fmoc convencionales (véanse por ejemplo Campos *et al.*, Int JPept Protein Res. (1990), 35, 161-214, Maisch *et al.*, JAm Chem Soc. (2009), 131, 15596-15597, Strandberg *et al.*, Biophys J. (2006), 90, 1676-1686 y Wadhwani *et al.*, J Org Chem. (2006), 71, 55-61). La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 20-22% en NMP. Se realizó el acoplamiento con una mezcla de Fmoc-aminoácido:HOBt:HBTU:DIEA (4:4:3,9:8) en DMF. Se escindieron los péptidos del soporte sólido usando una mezcla de TFA:H₂O:TIS (93,5:2,5:4). Los reactivos de escisión se eliminaron bajo flujo de N₂, y los péptidos marcados se precipitaron usando dietil éter.

Se realizó HPLC preparativa en una columna C18 de fase inversa (4,6 mm x 240 mm) a 35°C usando un sistema Jasco-HPLC (Tokyo, Japón) equipado con un detector de matriz de diodos. Se separaron péptidos epiméricos usando gradientes de acetonitrilo/agua con TFA al 0,1%.

Todos los aminoácidos se adquirieron de Novabiochem (Schwalbach, Alemania). El MeO-PEG-COOH (peso molecular 750 Da y 2000 Da) y los reactivos de acoplamiento (HBTU, HCTU) y DIEA eran de Iris Biotech (Marktredwitz, Alemania), y los disolventes y otros reactivos eran de VWR-Merck (Bruchsal, Alemania).

Se sintetizaron los siguientes compuestos:

PEG-péptido de control: PEG-NAAAG,

PEG-péptido de CD44v6 de rata: PEG-NEWQG

Palmítico-NH-PEG-CONH-péptido de control

Palmítico-NH-PEG-CONH-péptido de CD44V6 de rata

Se sintetizaron palmítico-NH-PEG-CONH-péptido de control y palmítico-NH-PEG-CONH-péptido de CD44V6 de rata acoplando en primer lugar Fmoc-NH-PEG-COOH de peso molecular 3000 Da a o bien SEQ ID No.: 11 o bien SEQ ID No.: 15. Entonces se hicieron reaccionar los péptidos pegilados con ácido palmítico.

1.2 Ensayos de activación

El PEG-péptido de control y PEG-péptido de CD44v6 de rata se compararon para determinar su capacidad para bloquear la activación inducida por HGF de la tirosina cinasa receptora Met y ERK.

Se incubaron células cáncer pancreático de rata BSp73ASs6 (también designadas Ass6) durante 10 min a 37°C con o bien péptidos de ctrl. (SEQ ID No.: 15), péptidos v6 no pegilados (SEQ ID No.: 11) y concentraciones crecientes de los péptidos pegilados, concretamente PEG-péptido de control de rata y PEG-péptido de CD44v6 de rata, antes de la inducción con HGF (10 ng/ml; 5 min a 37°C).

La activación de ERK y Met se determinó mediante técnicas de SDS e inmunotransferencia de tipo Western convencionales usando un anticuerpo específico de fosfo-Met y fosfo-Erk (señalización celular del clon D16 de fosfo-Met, señalización celular de fosfo-Erk p42/44).

1.3 Ensayos celulares

Se realizó adicionalmente un ensayo de dispersión. Se hicieron crecer células de cáncer de colon HT29 en medio que contenía FCS al 10%. Un día después de la siembra, se sometieron a privación las células. El tercer día, se indujeron las células con HGF (10 ng/ml) y se preincubaron o bien sin péptido, péptidos de ctrl. (SEQ ID No.: 15), péptidos v6 no pegilados (SEQ ID No.: 11) o los péptidos pegilados, concretamente PEG-péptido de control de rata y PEG-péptido de CD44v6 de rata.

2. Resultados

Las figuras 9 y 10 muestran que los péptidos pegilados son eficaces en la inhibición de la activación de Met y ERK dependiente de HGF. La inhibición de ERK es incluso más eficaz con péptidos pegilados frente a no pegilados.

La figura 11 muestra que los péptidos pegilados así como no pegilados, pero no los péptidos de control, conducen a disociación y migración de células lejos de estas agrupaciones celulares.

Ejemplo 3 - Resultados *in vitro*

Péptidos de CD44v6 lineales descritos en el presente documento

Rata: KEKWFENEWQGKNP de 14 meros, NEWQG de 5 meros, WFENEWQGKNP de 11 meros marcado con DY681

Ser humano: KEQWFGNRWHEGYR de 14 meros, NRWHE de 5 meros, WFGNRWHEGYR de 11 meros marcado con DY681

Ratón: WFQNGWQGKNP de 11 meros marcado con DY681

*1. Inhibición *in vitro* de RTK usando los péptidos v6 humanos*

Péptido lineal (human, KEQWFGNRWHEGYR de 14 meros, NRWHE de 5 meros)

Líneas celulares usadas

HT29 (cáncer colorrectal)

HeLa (cáncer de cuello uterino)

HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humanas)

HCMEC (EC microvasculares cardíacas humanas)

HAOEC (EC aórticas humanas)

L3.6pl (célula de carcinoma pancreático humano)

MCF7 (cáncer de mama humano)

1.1 Células endoteliales

Con el fin de analizar si CD44v6 actúa como correceptor para Met en la angiogénesis, se usaron varias EC primarias aisladas de diferentes tipos de vasos sanguíneos humanos.

Las EC pueden diferir en la forma, función y en el tipo de uniones célula-célula dependiendo del vaso sanguíneo en el que se localizan. Las EC en arterias (HAOEC (células endoteliales aórticas humanas)) están sometidas a alta presión en comparación con las EC en las venas (HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humanas)). En los capilares, tiene lugar el intercambio principal de gases y nutrientes. Allí las EC (por ejemplo HCMEC (células endoteliales microvasculares cardíacas humanas)) son la única barrera para controlar este intercambio. Cuando se trataron estas EC con HGF, la tirosina cinasa receptora Met se fosforiló y se promovió la señalización a Erk, una diana posterior de Met (figura 12). La contribución de CD44v6 a la señalización de Met en estas células se analizó usando diferentes herramientas. Tanto un anticuerpo que reconoce la secuencia codificada por el exón v6 (denominada α CD44v6) como un péptido compuesto por 14 aminoácidos que se origina a partir de la región de v6 (denominado péptido v6) (Matzke *et al.* 2005) fueron capaces de impedir la activación de Met y de su diana posterior Erk cuando se añadieron a las células antes de la inducción con HGF (véase la figura 12). Puesto que la incubación con un anticuerpo de control y un péptido de control no interfirieron con la activación y señalización de Met, estos resultados muestran que se requiere CD44v6 para la activación de Met en todos los tipos de EC que se usaron.

Con el fin de investigar si una isoforma de CD44 es necesaria para la activación de VEGFR-2, se usaron las tres herramientas que inhiben la actividad de CD44v6 en un experimento en el que se activó VEGFR-2 mediante VEGF-A165. Tal como se esperaba, todas las EC respondieron al tratamiento con VEGF-A165 con la fosforilación de VEGFR-2 y la transducción de señales a Erk. El anticuerpo que reconoce CD44v6 así como el CD44v6 de 14 meros bloquearon la activación de VEGFR-2 y la señalización posterior a Erk inducidas por VEGF-A165 (figura 13). Por tanto, CD44v6 es también necesario para un sistema de VEGF-A165/VEGFR-2 funcional en estas células.

1.2 Células epiteliales

La contribución de CD44v6 a la señalización de Met en las células de cáncer pancreático epitelial humano L3.6pl (derivadas de Colo 357), las células de carcinoma de cuello uterino HeLa y las células de cáncer de colon HT29 se analizó usando el péptido de CD44v6 (v6 de 14 meros; v6 de 5 meros sometido a prueba también, datos no mostrados). Fue capaz de impedir la activación de Met y de su diana posterior Erk cuando se añadió a las células antes de la inducción con HGF (figuras 14A, B y C). Puesto que la incubación con un péptido de control no interfirió con la activación y señalización de Met, estos resultados muestran que se requiere CD44v6 para la activación de Met en todas estas líneas celulares.

Además de VEGFR y Met, se investigó la dependencia de ErbB 1 de CD44v6. EGF así como otros cinco ligandos, concretamente, AR, BC, ER, HB-EGF y TGF- α , pueden activar el receptor ErbB1. EGF, AR y TGF- α se unen a o bien un homodímero de ErbB1 o bien un heterodímero de ErbB1/2. Además de estos dímeros, BC, ER y HB-EGF también pueden unirse a un homodímero de ErbB4/4 o heterodímero de ErbB2/4. En el presente documento se investigó si la activación de los receptores ErbB por los ligandos indicados también depende de CD44v6.

Para este propósito, se privaron de suero células HT29 durante 24 horas y se pretrataron con el péptido específico v6 o uno de control. Luego se indujeron con los ligandos de ErbB indicados. Se usó la fosforilación de Erk cinasa como lectura para la activación del receptor. Todos los ligandos pudieron activar la Erk cinasa. La fosforilación de Erk dependiente de EGF así como de ER se inhibió mediante la incubación previa de células HT29 con el péptido de CD44v6 (v6 de 14 meros humano) mientras que un péptido de control no mostró ningún efecto (figura 15). Esto muestra que, además de EGF, ER es otro ligando de ErbB1 que depende de CD44v6 como correceptor. En cambio, la activación inducida por AR, BC, HB-EGF y TGF- α de los receptores ErbB no pudo inhibirse bloqueando CD44v6 (figura 15). Estos ligandos son independientes de CD44v6 para su inducción de los receptores ErbB. Esto es especialmente sorprendente, ya que EGF y TGF- α se dirigen a los mismos pares de receptores (ErbB1/1 o ErbB1/2). Estos datos sugieren que la isoforma específica de CD44 usada como correceptor para la activación de ErbB está determinada por el ligando que activa los receptores de ErbB y no por las propias proteínas receptoras.

En MCF7, los péptidos específicos de CD44v6 condujeron al bloqueo de la fosforilación de Erk tras el tratamiento con EGF pero no tras la inducción con TGF α . Ambos péptidos, el de 5 meros y el de 14 meros, mostraron efectos similares. Los péptidos de control no tuvieron efecto sobre la fosforilación de Erk (figura 16).

2. Ensayos celulares

2.1 Ensayo de dispersión

Las tirosina cinasas receptoras Met y Ron inducen la migración y dispersión celulares tras el tratamiento con sus ligandos. Se investigó el efecto de los péptidos bloqueantes de v6 sobre la dispersión y la migración. Los péptidos de CD44v6 (un v6 humano de 5 meros, 10 meros y 14 meros) impidieron completamente la dispersión o invasión a través de la matriz extracelular (figura 17).

2.2 Ensayo de escarificación

En este ensayo se sometió a prueba el requisito de CD44v6 para la migración celular. En un ensayo de cierre de escarificación, se sometió a prueba la migración de EC de o bien venas o bien arterias. Estas células se hicieron crecer hasta confluencia y se hizo una escarificación en la monocapa confluyente usando una punta de pipeta estéril. Las células que revisten el borde de la escarificación comenzaron a migrar a este espacio vacío con el fin de cerrar la brecha. En presencia de o bien HGF, VEGF-A165 o bien VEGF-A121, las células migraron más rápido que en ausencia de los ligandos y la escarificación se cerró en el plazo de un día. La migración de las EC se redujo hasta niveles basales cuando el anticuerpo frente a CD44v6 o el péptido de CD44v6 (v6 humano de 14 meros) interfirieron con la activación del receptor (figura 18).

2.3 Ensayos de angiogénesis

2.3.1 Ensayo de brote

Se generaron agrupaciones de células HUVEC, los denominados esferoides, en gotas colgantes y se incrustaron en una matriz de colágeno tridimensional. Se recubrieron con medio que contenía las sustancias bloqueantes y los factores de crecimiento. Activados por los factores de crecimiento VEGF-A165 y VEGF-A121, las CE comenzaron a crecer a partir de los esferoides (figura 19). Esta capacidad de brotar en respuesta al tratamiento con VEGF-A se bloqueó por completo cuando las células se trataron con el péptido v6 (v6 humano de 14 meros). El péptido de control no influyó en el brote inducido por VEGF-A. El brote de las CE se cuantificó analizando la longitud total de todos los brotes que se originan a partir de un esferoide.

2.3.2 Tapones de Matrigel/fibrina

Los islotes de Langerhans son capaces de estimular una respuesta angiogénica cuando se cultivan conjuntamente con células HUVEC en una matriz de colágeno. Tales islotes hiperplásicos angiogénicos de Langerhans se aislaron por perfusión de colagenasa. Producen una mezcla de factores angiogénicos y, de ese modo, atraen a las EC para organizarse en estructuras capilares. La respuesta angiogénica de las EC se redujo cuando el CD44v6 humano de las EC se bloqueó por medio del anticuerpo frente a CD44v6 o el péptido bloqueante específico de v6 (v6 humano de 14 meros), mientras que el péptido de control no interfirió con la respuesta angiogénica. De acuerdo con los datos publicados, alrededor del 60% de los islotes estimularon una respuesta angiogénica en el experimento de control (figura 20).

Ejemplo 4

1. Reducción de la dosis y aumento por péptidos lineales y v6 de 5 meros pegilado

La pegilación, el proceso de unión covalente de cadenas de polímero de polietilenglicol, se sabe que reduce la inmunogenicidad y la antigenicidad. La pegilación aumenta el tamaño hidrodinámico del compuesto y prolonga el tiempo de circulación en animales al reducir el aclaramiento renal.

Los tres compuestos específicos de CD44v6 (v6 de 5 meros, PEG840-v6 de 5 meros y PEG2000-v6 de 5 meros de origen humano) y un péptido de control se aplicaron en tres concentraciones (2 µg, 20 µg, 200 µg por inyección) tres veces por semana por vía i.p. durante 4 semanas. Una semana antes del comienzo del tratamiento, se implantaron por vía ortotópica las células tumorales L3.6pl en ratones desnudos. Los resultados mostraron que la pegilación no tiene impacto sobre el efecto de los péptidos. Todos los compuestos específicos de v6 impidieron la diseminación metastásica de las células tumorales y condujeron a una reducción del crecimiento de tumores primarios. Se observó un bloqueo completo de la metástasis para 20 µg por inyección, sin embargo, ya se observaron efectos inhibidores usando una concentración diez veces menor (figura 21). Además, un aumento de la dosis de tratamiento hasta 200 µg por inyección no condujo a efectos secundarios en los animales.

2. Resultados para reducir la dosis del v6 lineal de 14 meros y un v6 cíclico de 8 meros

En este experimento se investigó una reducción de la dosis de péptidos. Se mantuvo el ciclo de tratamiento de tres inyecciones por semana. Además, se sometió a prueba un v6 cíclico de 8 meros basado en la secuencia lineal que contiene los tres aminoácidos importantes que se requieren para la función de correceptor *in vivo* para lograr su efecto inhibidor. Los datos *in vitro* mostraron ya bloqueo de la activación de Met y Erk en ensayos de fosforilación y celulares por todos los péptidos.

La modificación de péptidos lineales por ciclación se logra uniendo los extremos amino y carboxilo terminales con un enlace peptídico que forma un anillo. La ciclación es una forma eficaz de aumentar la estabilidad de los péptidos y mejorar la permeabilidad.

A los animales se les implantaron por vía ortotópica células L3.6pl. Se permitió el crecimiento tumoral durante una semana antes del tratamiento con el v6 lineal de 14 meros, el v6 cíclico de 8 meros, así como el péptido de control (v6 de rata de 14 meros). Todos los péptidos se inyectaron tres veces por semana a una concentración de 0,2, 2 y 10 µg por inyección durante 3 semanas. Al final del tratamiento los animales se sacrificaron.

Todos los animales del grupo de control mostraron metástasis macroscópicas. Los animales a los que se les inyectaron 0,2 y 2 µg de v6 de 14 meros mostraron metástasis hepáticas, pero el número promedio de metástasis por animal se redujo. Una dosis de 10 µg por inyección condujo a una inhibición completa de la diseminación metastásica (figuras 22A, B). Además, el tratamiento con el v6 de 14 meros condujo a una disminución significativa del tamaño del tumor primario en comparación con los grupos de control (figura 22C).

El v6 cíclico de 8 meros bloqueó la diseminación metastásica a 2 y 20 µg por inyección de manera muy eficaz, lo que indica que el cambio estructural por ciclación no condujo a pérdida de la función del péptido (figuras 22A, B). El v6 cíclico de 8 meros también mostró un efecto drástico sobre el crecimiento del tumor primario (figura 22C).

3. Comparación lado a lado de diferentes derivados de péptido de CD44v6 en el modelo de xenoinjerto ortotópico de L3.6pl

Se realizó una comparación de diferentes derivados de péptido de CD44v6 en animales que portaban un tumor ortotópico L3.6pl. 10 grupos de 5 animales recibieron cada uno una dosis de 20 µg de péptido por inyección tres veces por semana durante 3 semanas con los compuestos enumerados en la tabla 4. Tres semanas después de comenzar el tratamiento, se sacrificaron los animales y se analizaron para detectar metástasis macroscópicas y el volumen tumoral.

El análisis histológico para detectar micrometástasis (tinción de H&E) y el análisis inmunohistoquímico para determinar la vascularización tumoral (tinción anti-CD31) y la activación de diferentes RTK en el tumor aún están en curso.

Tabla 4: Visión general de los derivados peptídicos sometidos a prueba

péptido	secuencia
control (14 meros de rata)	H-KEKWFENEWQGANP-OH
PEG840 de 14 meros	PEG840-KEQWFGNRWHEGYR-OH
PEG2000 de 14 meros	PEG2000-KEQWFGNRWHEGYR-OH
Miristoil-14 meros	Myr-KEQWFGNRWHEGYR
14 meros (humano)	H-KEQWFGNRWHEGYR-OH
DOTA CD44v6-14 [daa7]	DOTA-keqwfGNRWHEGyr
DOTA CD44v6-14 [r ¹⁴]	DOTA-KEQWFGNRWHEGYR
8 meros cíclico	cy[KGNRWHEG]
5 meros cíclico	DOTA-cy[KRWHE]
Myr-Y-8 meros cíclico	Myr-Y-cy[KGNRWHEG]

Los animales tratados con el CD44v6 de 14 meros, el 14 meros pegilado (PEG 840 y PEG 2000), 14 meros que contiene modificaciones de D-aminoácidos, así como péptidos cíclicos (incluyendo un péptido cíclico miristoilado) mostraron una reducción significativa en el crecimiento tumoral en comparación con el péptido de control. El 14 meros lineal miristoilado no mostró ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral. La reducción más fuerte del tamaño tumoral se logró con el PEG2000 de 14 meros, el v6 de 14 meros, el 8 meros cíclico y el 5 meros cíclico (figura 23A) en comparación con los animales de control (obsérvese en este caso la fuerte vascularización visible del tumor primario (figura 24A)). Estos cuatro compuestos también mostraron una baja variabilidad en el tamaño tumoral individual dentro del grupo (figura 23B).

El análisis del hígado mostró una disminución de la diseminación metastásica para PEG840 de 14 meros, PEG2000 de 14 meros v6-14 [daa7] y el 8 meros cíclico miristoilado. Se observó una inhibición completa de la metástasis cuando los animales se trataron con el v6 de 14 meros, el v6-14 [r¹⁴], el 8 meros cíclico y el 5 meros cíclico (figura 24A, B).

Esta comparación lado a lado confirmó la eficacia del v6 de 14 meros pero reveló el v6-14 [r¹⁴], el 8 meros cíclico y el 5 meros cíclico como modificaciones prometedoras de la secuencia peptídica lineal que podrían mostrar una estabilidad *in vivo* aumentada.

4. Evaluación para otros tipos de cáncer.

4.1 Cáncer de colon

4.1.1 Antecedentes

Mutación e inactivación del gen supresor de tumores de poliposis adenomatosa coli (*Apc*) es un evento temprano en el desarrollo de cáncer colorrectal. La inactivación de *Apc* ocurre en aproximadamente el 80% de los pólipos adenomatosos y también es responsable del trastorno genético de poliposis adenomatosa familiar (FAP), que conduce a la formación de pólipos adenomatosos en el intestino delgado y grueso que da como resultado cáncer de colon. Con el fin de estudiar esta enfermedad hereditaria se generó el modelo de ratón APC/Min/+.

Estos ratones manipulados genéticamente pueden desarrollar hasta 100 pólipos en el intestino delgado además de los tumores de colon. Los cruces de estos ratones con ratones deficientes en CD44 redujeron drásticamente el número de adenomas, lo que sugiere un papel de CD44 en la carcinogénesis colorrectal. Esto podría confirmarse adicionalmente mediante la eliminación de CD44v6 específicamente en el intestino de ratones APC/Min/+ por ARNhp que también dio como resultado una reducción de adenomas.

4.1.2 Datos preliminares

El efecto del v6 de 14 meros se sometió a prueba en el modelo APC/Min/+ usando ratones de 18 semanas de edad. Los animales recibieron una inyección i.p. de 20 µg de v6 de 14 meros (14 meros de ratón) o péptido de control (14 meros de rata) tres veces por semana durante 6 semanas. Se sacrificaron los animales (tres por grupo) al final del experimento y se analizó el duodeno para determinar el número total de tumores (figura 25).

El tratamiento con el v6 de 14 meros condujo a una fuerte disminución del tamaño tumoral en el duodeno. Es de destacar que esta disminución es más pronunciada en el caso de tumores pequeños (0-1 mm > 1-2 mm > 2-5 mm). El número de tumores para tumores mayores de 5 mm es mayor para el v6 de 14 meros.

Estos datos revelan una contribución de CD44 en la iniciación tumoral.

4.2 Cáncer de mama

4.2.1 Antecedentes

Diferentes miembros de la familia de ErbB de RTK o bien están sobreexpresados o bien mutados en una amplia variedad de cánceres. Por ejemplo, se encontró una alta expresión de ErbB1 en la mayoría de los carcinomas incluyendo carcinomas mamarios y puede encontrarse la amplificación del gen de ErbB2 en el 20-30% de las lesiones de cáncer de mama metastásicas. La tumorigenicidad de estos tipos de cáncer de mama depende de la activación constitutiva de los receptores ErbB.

Se mostró que CD44v6 permite la activación de los receptores ErbB a través de EGF en varias líneas celulares de cáncer de mama. CD44v6 podría por tanto desempeñar un papel en tipos de cáncer de mama que dependen de la activación de ErbB basada en EGF para su tumorigenicidad. Y de hecho, la evaluación de 100 tumores de mama invasivos primarios y 18 metástasis en ganglios linfáticos conectó la expresión de CD44v6 con la tumorigenicidad. La presencia de estas variantes de CD44 se correlaciona con una escasa supervivencia. Dos estudios más recientes llegaron a resultados similares.

Sin embargo, existen datos conflictivos con respecto al papel de CD44v6 en el cáncer de mama. Un estudio que evaluó 109 pacientes con neoplasia de mama en estadio II por ejemplo no asoció la expresión de CD44v6 con supervivencia libre de enfermedad o supervivencia global en absoluto. Una explicación de los estudios conflictivos podría ser que CD44v6 no actúa como correceptor para todos los tipos de cáncer de mama. En tipos de cáncer en los que la activación de los receptores ErbB está mediada por TGF-α por ejemplo, CD44v6 no sería necesario como correceptor ya que pudo mostrarse que la activación por medio de TGF-α es independiente de CD44v6.

4.2.2 Efecto del CD44v6 de 14 meros

El efecto del CD44v6 de 14 meros se sometió a prueba en un modelo de ratón singénico mediante inyección ortotópica de las células de carcinoma mamario murino 4T1. Las células 4T1 se derivaban originalmente de un tumor mamario de BALB/c que surgió espontáneamente. Cuando se introdujeron por vía ortotópica, las células 4T1 crecieron rápidamente en el sitio primario y formaron metástasis en el pulmón y los ganglios linfáticos en el plazo de un periodo de 3-6 semanas. El crecimiento tumoral y la diseminación metastásica de células 4T1 en ratones BALB/c imitan muy estrechamente al cáncer de mama humano en estadio IV.

Las células 4T1 se inyectaron por vía orotópica en la 6ª almohadilla de grasa mamaria. Se usaron entonces

dos grupos de 5 animales cada uno con las células tumorales implantadas para el experimento. Se trató un grupo con el péptido v6 de 14 meros, uno con un péptido de control (rata). La inyección del péptido se realizó 3 veces por semana y se planeó durante de tres a cuatro semanas pero tuvo que detenerse tras dos semanas ya que el grupo de control padeció grandes tumores.

El análisis de los tumores primarios reveló una disminución significativa del tamaño tumoral en el grupo tratado con v6 de 14 meros (figura 26A). El análisis inmunofluorescente (tinción anti-CD34) para monitorizar la vascularización tumoral mostró que en el grupo tratado con v6 de 14 meros el número total de vasos sanguíneos se redujo significativamente (figura 26B).

También pudo observarse una diferencia entre los animales tratados con v6 de 14 meros y el péptido de control en el caso de diseminación metastásica. El análisis macroscópico de los pulmones reveló que todos los ratones tratados con el péptido de control desarrollaron metástasis. El número promedio de metástasis fue de 6 metástasis por pulmón. En el grupo tratado con péptido v6 tres animales no mostraron metástasis macroscópicas en absoluto, mientras que dos animales tenían solo una metástasis. Por tanto, el tratamiento con el péptido v6 reduce drásticamente la formación de metástasis en el pulmón (figura 26C).

En conclusión, los datos preliminares para cáncer de colon y para cáncer de mama revelaron que el v6 de 14 meros es también una herramienta prometedora para otras indicaciones distintas de cáncer pancreático.

Ejemplo 5 - Nanopartículas funcionalizadas con péptido de CD44v6 se unen selectivamente sobre las células tumorales

Materiales y métodos

La línea celular de adenocarcinoma humano HT29, un regalo de A. Zweibaum (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Francia) se hizo crecer en DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con FCS al 10% (PAA, Cölbe, Alemania). Las células de carcinoma pancreático de rata BSp73AS10 (AS10) y su transfectante BSp73ASs6 (ASs6) (papel vero) se hicieron crecer en RPMI (Invitrogen) más FCS al 10%. Se obtuvieron puntos cuánticos de CdTe hidrófobos con emisión a 550 nm (el peso molar de las partículas es de 32000 g/mol) de PlasmaChem GmbH (Alemania). Se obtuvieron alfa-(9-fluorenilmetiloxycarbonil)amino-omega-carboxilo poli(etilenglicol) (PEG-PM 3.000 Dalton) y alfa-metoxi-omega-ácido carboxílico poli(etilenglicol) (PEG-PM 2.000 Dalton) de IRIS Biotech GmbH (Alemania). Se obtuvieron ácido palmítico (99%) y éster metílico de poli(etilenglicol) (PM 2000 g/mol) de Sigma-Aldrich (Alemania).

Instrumentación

Se realizó dispersión dinámica de la luz en un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Alemania). Se diluyeron nanopartículas de puntos cuánticos se diluyeron con agua Milli Q hasta la concentración de puntos cuánticos a 0,1 mg/ml. Se añadieron 750 µl de disolución de nanopartículas en la cubeta y se midió el tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico) y la carga superficial (potencial zeta).

Se caracterizaron las nanopartículas de puntos cuánticos por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando el microscopio electrónico de barrido LEO 1530 Gemini (Zeiss, Alemania). Las muestras para SEM se prepararon resuspendiendo las partículas en agua Milli Q a una concentración de 0,1 mg/ml. La dispersión resultante se hizo gotear sobre una oblea de silicio y se secó al aire. Entonces, se recubrieron las partículas por pulverización catódica con oro durante 20 s usando un recubridor automático por pulverización catódica Cressington 108 antes de la medición de SEM.

Se realizó espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF) en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, EE.UU.). Se generaron listas de picos usando el software Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems). Se usó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB, 10 mg en 1 ml de tetrahidrofurano que contenía ácido trifluoroacético al 0,1%) como matriz para péptidos pegilados y amida de péptido-PEG-palmítico. Se mezclaron 10 µl de péptidos pegilados y amida de péptido-PEG-palmítico (1 mg en 1 ml de Milli Q) con 10 µl de matriz, y se dispuso en manchas 1 µl de disolución mixta sobre un portador de MALDI de acero inoxidable.

Preparación de nanopartículas

Se prepararon diferentes densidades de nanopartículas de puntos cuánticos funcionalizados con péptido de CD44v6 tal como sigue: (a) Se prepararon PEG-QD mezclando 300 µl de éster palmítico de PEG2000 (4 mg/ml en cloroformo) y 30 µl de QD (10 mg/ml en cloroformo) en viales de 4 ml. Después de agitar con vórtex durante 20 s, la disolución mezclada se mantuvo en el vial abierto durante la noche para garantizar que el cloroformo se evaporara. Se añadieron 300 µl de tampón PBS (pH 7,4) al vial de 4 ml y se agitó con vórtex durante 30 s para formar nanopartículas. (b) Se prepararon v6-PEG-QD al 10% mezclando 270 µl de éster palmítico de PEG2000

(4 mg/ml en cloroformo), 120 μ l de amida de v6-PEG-palmitico (0,5 mg/ml en cloroformo) y 30 μ l de QD (10 mg/ml en cloroformo) en viales de 4 ml. Después de agitar con vórtex durante 20 s, la solución mezclada se mantuvo en el vial abierto durante la noche para garantizar que el cloroformo se evaporara. Se añadieron 300 μ l de tampón PBS (pH 7,4) al vial de 4 ml y se agitó con vórtex durante 30 horas para formar nanopartículas. (c) Se prepararon v6-PEG-QD al 30% mezclando 210 μ l de éster palmitico de PEG2000 (4 mg/ml en cloroformo), 360 μ l de amida v6-PEG-palmitico (0,5 mg/ml en cloroformo) y 30 μ l de QD (10 mg/ml en cloroformo) en viales de 4 ml. Después de agitar con vórtex durante 20 s, la disolución mezclada se mantuvo en el vial abierto durante la noche para garantizar que el cloroformo se evaporara. Se añadieron 300 μ l de tampón PBS (pH 7,4) al vial de 4 ml y se agitó con vórtex durante 30 para formar nanopartículas.

Inmunotransferencia de tipo Western y activación de Met y Erk

Las células ASs6, privadas de suero durante 24 h, se indujeron con HGF (10 ng/ml) a 37°C durante 5 min. Cuando se indicó, se trataron las células con péptidos pegilados o no pegilados antes de la inducción a 37°C durante 10 min (150 nM). Se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron en tampón de muestra de dodecilsulfato de sodio (SDS) en ebullición que contenía ditioneitol (DTT) 100 mM. Posteriormente, los lisados se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos contra Mek y Erk fosforilados (Cell signaling). El control de carga de Mek y Erk se realizó en la misma inmunotransferencia, se separó (Tris 62,5 mM, pH 6,8, SDS al 2%, DTT al 0,8%) y se estudió con sonda con los anticuerpos frente a Mek y Erk. Las manchas se tiñeron usando el sistema de quimioluminiscencia potenciada (Thermo Fisher Scientific).

Ensayo de dispersión

Se determinó la dispersión de células HT29 se determinó en placas de 24 pocillos. En primer lugar, se sembraron 4×10^5 células a 37°C; las células se dejaron sin tratar o 48 h después se trataron con HGF (50 ng/ml) durante 24 h o con péptidos pegilados o no pegilados (100 ng/ml) antes de la inducción de HGF durante 30 minutos.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se sembraron 1×10^4 células AS10 y ASs6 por pocillo en portaobjetos de cámara de microscopio de 8 pocillos durante 24 h a 37°C. Se lavaron las células con PBS enfriado con hielo, se fijaron con metanol durante 15 minutos a -20°C y se lavaron nuevamente tres veces con PBS. Después de eso, se incubaron las células con los puntos cuánticos modificados indicados durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, se tiñeron las células con diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se incrustaron con medio de montaje. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia usando un microscopio de fluorescencia confocal Leica SPE, objetivo 63x.

Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

Se recogieron células ASs6 y AS 10 cultivadas en placas de Petri de 10 cm al 80% de confluencia, con EDTA/PBS 5 mM. Se lavaron las células tres veces con FCS al 3% en PBS. Después de eso, se incubaron las células con puntos cuánticos de 100 ng/ml en FCS/PBS al 3% durante 10 minutos. Luego, se lavaron las células 3 veces con FCS al 3% en PBS, se resuspendieron en PBS sin FCS y se sometieron a medición de FACS.

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de péptidos de CD44v6 y péptidos pegilados

Tal como se describió anteriormente, pueden usarse péptidos de CD44v6 (CD44v6-pep) para bloquear la activación inducida por HGF de la señalización de c-Met en una variedad de líneas celulares de cáncer. Además, estos péptidos pueden bloquear eficazmente la dispersión celular inducida por HGF, un término que describe la disociación y la migración de células individuales lejos de agrupaciones celulares, en células de adenocarcinoma HT29. Estos péptidos pueden inhibir eficazmente el crecimiento tumoral y la metástasis; y además eliminar metástasis ya desarrolladas. En conjunto, esto hace que estos péptidos sean posibles candidatos a fármacos muy prometedores para la terapia contra el cáncer. Puesto que los péptidos de CD44v6 se unen específicamente a células que expresan CD44v6, estos péptidos se funcionalizaron adicionalmente sobre superficies de puntos cuánticos (QD) y mostraron la unión selectiva de estos péptidos a células tumorales.

La pegilación es una técnica comúnmente usada para aumentar la estabilidad de péptidos, proteínas y nanopartículas *in vivo*. En el presente documento, el péptido de CD44v6 se pegiló específicamente en el extremo N-terminal. Los péptidos de CD44v6 y los péptidos pegilados se sintetizaron secuencialmente sobre resina Wang y se purificaron por HPLC preparativa. La pureza de los péptidos de CD44v6 y los péptidos pegilados se analizó y caracterizó adicionalmente mediante HPLC analítica y MALDI-TOF (figura 27).

Ensayo de bloqueo de péptidos de CD44v6 y péptidos pegilados

También se sometió a prueba la capacidad de bloqueo de los péptidos después de la unión de una cadena de PEG de 2000 dalton. La línea celular de carcinoma pancreático de rata BSp73ASs6, que expresa altamente CD44v6, se trató con péptidos de CD44v6 pegilados y se sometió a prueba si este tratamiento puede bloquear la activación inducida por HGF de la RTK Met y su señalización posterior por medio de la ruta de Erk. Como control positivo, se usaron péptidos de CD44v6 no pegilados (A = producidos por los investigadores B = producidos por Bachem), como controles negativos, se usaron péptidos de control no pegilados o pegilados donde los 3 aa esenciales se reemplazaron por alaninas. De hecho, la pegilación no afectó a la funcionalidad de los péptidos de CD44v6. Tras el tratamiento de las células ASs6 con péptidos de CD44v6 pegilados, HGF no pudo inducir en absoluto la fosforilación de Met ni activar la señalización de Erk, mientras que los péptidos de control pegilados no mostraron ningún efecto (figura 10). También la dispersión inducida por HGF de células HT29 se vio fuertemente inhibida por el pretratamiento con péptidos de CD44v6 pegilados, pero no con péptidos de control pegilados (figura 11). Estos resultados muestran claramente que la pegilación no afecta a la funcionalidad de los péptidos de CD44v6.

Preparación y caracterización de nanopartículas funcionalizadas con péptido de CD44v6

Para funcionalizar el péptido de CD44v6 en QD, se sintetizó la amida de v6-PEG3000-palmitico secuencialmente usando síntesis en fase sólida. La amida de v6-PEG3000-palmitico anfífila se purificó adicionalmente por HPLC preparativa y se caracterizó por MALDI-TOF.

Ensayo de unión de nanopartículas funcionalizadas con péptido de CD44v6

La expresión de CD44v6 a menudo se correlaciona con estadios avanzados de cáncer y va de la mano con un mal pronóstico en una gran variedad de tipos de cáncer. Por tanto, muchas células cancerosas malignas expresan una gran cantidad de CD44v6 en su superficie, designando CD44v6 como marcador importante para seleccionar como diana estas células. Por tanto, pueden usarse péptidos de CD44v6 pegilados para crear nanopartículas compuestas multivalentes que pueden usarse para seleccionar como diana y visualizar la expresión de CD44v6 en las células. Con este objetivo, se conjugaron péptidos de CD44v6 pegilados con puntos cuánticos (QD), pequeñas nanopartículas semiconductoras, que pueden usarse como sondas fluorescentes brillantes y muy estables. Una gran ventaja de los QD es su multivalencia que permite acoplar péptidos de CD44v6 pegilados en diferentes concentraciones a la superficie de los puntos cuánticos. Se crearon 3 tipos diferentes de nanopartículas, una con solo cadenas de PEG unidas a los puntos cuánticos (PEG-QD) y nanopartículas donde el 10% y el 30% de las cadenas de PEG que rodean a los puntos cuánticos se acoplaron a péptidos de CD44v6 (designado como v6pep-QD al 10% y v6pep-PEG al 30%, respectivamente). Se sometió a prueba si estos puntos cuánticos pueden unirse y teñir específicamente células que expresan CD44v6 y si la concentración de péptido de CD44v6 influye en la capacidad de unión.

Se incubaron células BSp73ASs6 que expresan CD44v6 (ASs6) o células BSp73AS10 negativas para CD44v6 (AS10) con los diferentes puntos cuánticos y se visualizó la tinción mediante microscopía de inmunofluorescencia. Los QD rodeados solo por cadenas de PEG no tiñeron ni las células ASs6 ni las AS 10, excluyendo la unión inespecífica de QD pegilados a las células (figura 28 A) panel 1). Los QD que contienen el 10% de las cadenas de PEG acopladas a los péptidos de CD44v6 tampoco tiñeron ninguno de los tipos de células (figura 28 A) panel 2). Sin embargo, si el 30% de las cadenas de PEG en la superficie QD están unidas a péptidos de CD44v6, solo pudieron detectarse en la membrana de células ASs6 positivas para CD44v6 pero no en células AS10 negativas para CD44v6, mostrando una tinción específica de células que expresan CD44v6 (figura 28 A) panel 3). En contraposición a esto, pudieron detectarse v6pep-QD al 50% en la superficie de ambos tipos de células, independientemente de su expresión de CD44v6 (datos no mostrados).

Estos resultados se analizaron adicionalmente y se cuantificó el porcentaje de células teñidas con puntos cuánticos de varios experimentos independientes (n = 5). Los PEG-QD no tiñeron las células AS10 o ASs6. Se encontraron v6-QD al 10% en la superficie de solo el 10% de las células AS10 o ASs6. Sin embargo, el 90% de las ASs6 pero solo el 15% de las células AS 10 se tiñeron con v6-QD al 30%, lo que muestra una unión altamente específica de estos a las células que expresan CD44v6. Para demostrar adicionalmente la especificidad de los v6pep-QD al 30%, se transfectaron células AS 10 con vectores de expresión mCherry y células ASs6 con vectores de expresión que contienen CFP y se cultivaron conjuntamente ambas líneas celulares. Estas células cultivadas conjuntamente se trataron con v6pep-QD al 30% y la tinción se visualizó por microscopía de inmunofluorescencia. De hecho, v6pep-QD al 30% solo se unen a las células ASs6 positivas para CFP y que expresan CD44v6. Las células AS 10 positivas para mCherry permanecieron sin teñir (figura 28 A) panel 4).

Además de la microscopía de inmunofluorescencia, se analizó la unión de los diferentes puntos cuánticos acoplados a péptidos de CD44v6 mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (análisis de FACS). Según los resultados de la microscopía, pudo detectarse la unión de v6pep-QD al 30% solo

en células ASs6 que expresan CD44v6 (figura 28 C). En resumen, los datos muestran claramente que la pegilación no afecta a la funcionalidad de los péptidos de CD44v6 con respecto a sus efectos de bloqueo sobre la señalización Met inducida por HGF y la dispersión celular. Estos péptidos pegilados pueden acoplarse a puntos cuánticos, que proporcionan nanopartículas multifuncionales que pueden usarse fácilmente como biomarcadores específicos para seleccionar como diana y teñir las células cancerosas que expresan CD44v6.

Conclusiones

La expresión de CD44v6 a menudo se correlaciona con estadios avanzados de cáncer y mal pronóstico. Además, la expresión de CD44v6 puede conferir potencial metastásico a las células cancerosas no metastásicas, lo más probablemente debido a su función como correceptor para tirosinas cinasas receptoras c-MET y VEGFR. 3 aminoácidos son esenciales para la función de CD44v6, concretamente, R-W-H, y pueden usarse péptidos pequeños de al menos 5 aminoácidos de longitud, que comprenden estos 3 aminoácidos, para bloquear eficazmente la función de CD44v6. El bloqueo de CD44v6 da como resultado la inhibición completa de la señalización de c-Met inducida por HGF o la señalización de VEGFR-2 inducida por VEGF-A y, a su vez, el bloqueo de la angiogénesis y la metástasis en modelos de ratones y ratas *in vivo* para el cáncer pancreático. Además, los péptidos de CD44v6 se unen a células que expresan CD44v6, lo que hace posible usar estos péptidos como marcador para células o tejidos tumorales malignos que expresan CD44v6.

En este ejemplo, los péptidos de CD44v6 se pegaron, se confirmó la funcionalidad de los péptidos pegilados a nivel molecular y los péptidos pegilados se acoplaron a puntos cuánticos. Estas nanopartículas de CD44v6-QD se unen específicamente a células que expresan CD44v6 y las tiñen, lo que se confirmó mediante microscopía de inmunofluorescencia y análisis de FACS.

El acoplamiento de los péptidos a los puntos cuánticos tiene varias ventajas: por un lado, se creó un biomarcador brillante y muy estable para células que expresan CD44v6, que puede usarse para la detección y una mejor caracterización de células o tejidos tumorales que expresan CD44v6, o incluso adicionalmente para detectar metástasis que expresan CD44v6 en el paciente. Por otro lado, debido a la multivalencia, existe la posibilidad de acoplar otros compuestos, tales como fármacos anticancerígenos convencionales, a los CD44v6-QD para crear fármacos multifuncionales que seleccionan como diana específicamente células tumorales que expresan CD44v6.

Lista de secuencias

<110> KARLSRUHER INST. FÜR TECHNOLOGIE, amcure GmbH

<120> Péptidos derivados de CD44v6 para tratar cánceres metastásicos

<130> A 13689-WO

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe" /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val" /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Phe" /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"

```

/reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<400> 1
  Asn Arg Trp His Glu
  1           5
5
  <210> 2
  <211> 5
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial
10
  <220>
  <223> péptido

  <400> 2
  Asn Arg Trp His Glu
15  1           5

  <210> 3
  <211> 5
  <212> PRT
20  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> péptido

25  <400> 3
  Ala Arg Trp His Ala
  1           5

  <210> 4
  <211> 5
30  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> péptido
35
  <220>
  <221> VARIANTE
  <222> (1)..(1)
  <223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val"
40  /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"

  <220>
  <221> VARIANTE
  <222> (5)..(5)
45  <223> /reemplazar="Asp" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"

  <400> 4
  Asn Arg Trp His Glu
  1           5
50
  <210> 5
  <211> 5
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

55  <220>
  <223> péptido

  <220>
  <221> VARIANTE
60  <222> (1)..(1)
  <223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Gln"

```

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Asp"
 5
 <400> 5
 Asn Arg Trp His Glu
 1 5
 <210> 6
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> péptido
 <400> 6
 Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg
 1 5 10
 20 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> péptido
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
 /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Phe" /reemplazar="Gly"
 40 /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"
 <220>
 45 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
 /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
 /reemplazar="Asn" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 50 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 55 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
 /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
 /reemplazar="Asn" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr"
 /reemplazar="Val" /reemplazar="Tyr"
 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Gly"
 /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"

/reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
/reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<220>
5 <221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
/reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
/reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
10 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
15 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
/reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
/reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
/reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Phe" /reemplazar="Gly"
/reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
25 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
/reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
30 <222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
/reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
/reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
/reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
40 /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
/reemplazar="Asn" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr"
/reemplazar="Val" /reemplazar="Trp"

<220>
45 <221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
/reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
/reemplazar="Asn" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
50 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<400> 7
Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg
1 5 10

55 <210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> péptido

<220>
<221> VARIANTE
65 <222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Arg" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar="Asp" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar="Phe" /reemplazar="Tyr" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu"
 /reemplazar="Ile"
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu"
 25 /reemplazar="Ile"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 30 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 35 <223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 40 <223> /reemplazar="Asp" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 45 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 50 <223> /reemplazar="Phe" /reemplazar="Trp" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu"
 /reemplazar="Ile"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 55 <223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"
 60 <400> 8
 Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 14
 65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Arg" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Gln"

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Asp"

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Asn"

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Phe" /reemplazar="Tyr"

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Gln"

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Asp"

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ile"

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="Phe" /reemplazar="Trp"

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> /reemplazar="Lys" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Gln"

60 <400> 9
Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg
1 5 10

65 <210> 10
<211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> péptido

 <400> 10
 Lys Glu Lys Trp Phe Glu Asn Glu Trp Gln Gly Lys Asn Pro
 1 5 10

 10 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> péptido

 <400> 11
 Asn Glu Trp Gln Gly
 1 5

 20 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> péptido

 <400> 12
 Trp Phe Glu Asn Glu Trp Gln Gly Lys Asn Pro
 30 1 5 10

 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido

 40 <400> 13
 Trp Phe Gln Asn Gly Trp Gln Gly Lys Asn Pro
 1 5 10

 <210> 14
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido

 50 <400> 14
 Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg
 1 5 10

 <210> 15
 55 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> péptido

<400> 15
 Asn Ala Ala Ala Gly
 1 5

5 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 16
 Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly
 1 5

15 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido

<220>
 <221> VARIANTE

25 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Gly"
 /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

30 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
 35 /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

40 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
 /reemplazar="Gly" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 45 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (7)..(7)
 50 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Phe" /reemplazar="Gly"
 /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

55 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar="Ala" /reemplazar="Cys" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Phe"
 /reemplazar="His" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn"
 60 /reemplazar="Pro" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Arg" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Trp" /reemplazar="Tyr"

<400> 17

Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly
1 5

<210> 18

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 18

Lys Gly Asn Arg Trp His Glu Gly
1 5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer metastásico en un ser humano, en el que dicho compuesto comprende un péptido de la secuencia de aminoácidos X_1 -R-W-H- X_5 , en la que X_1 se selecciona de K, R, N o Q y en la que X_5 se selecciona de E o D, en el que dicho cáncer metastásico muestra expresión de CD44v6, y en el que dicho tratamiento provoca la regresión de las metástasis que ya se han formado y diseminado por el cuerpo.
5
2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1,
10 en el que dicho compuesto es una forma pegilada, hesilada, pasilada, glicosilada, miristoilada y/o cíclica de dicho péptido.
3. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2,
15 en el que el compuesto se formula para administración oral, nasal o subcutánea.
4. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3,
20 en el que dicho cáncer metastásico puede clasificarse como estadio III o estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/anatómico de TNM del sistema de estadificación del cáncer del American Joint Committee on Cancer.
5. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4,
25 en el que dicho cáncer metastásico se selecciona del grupo que comprende formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de piel tal como cáncer de células escamosas o carcinoma de células basales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, o cáncer de mama.
30
6. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 o 5,
35 en el que dicho cáncer metastásico se selecciona del grupo que comprende formas metastásicas de linfoma de Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de piel tal como cáncer de células escamosas o carcinoma de células basales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama, en el que dicho cáncer metastásico puede clasificarse como estadio III o estadio IV según el sistema de grupo de pronóstico/anatómico de TNM del sistema de estadificación del cáncer del American Joint Committee on Cancer.

Figura 1

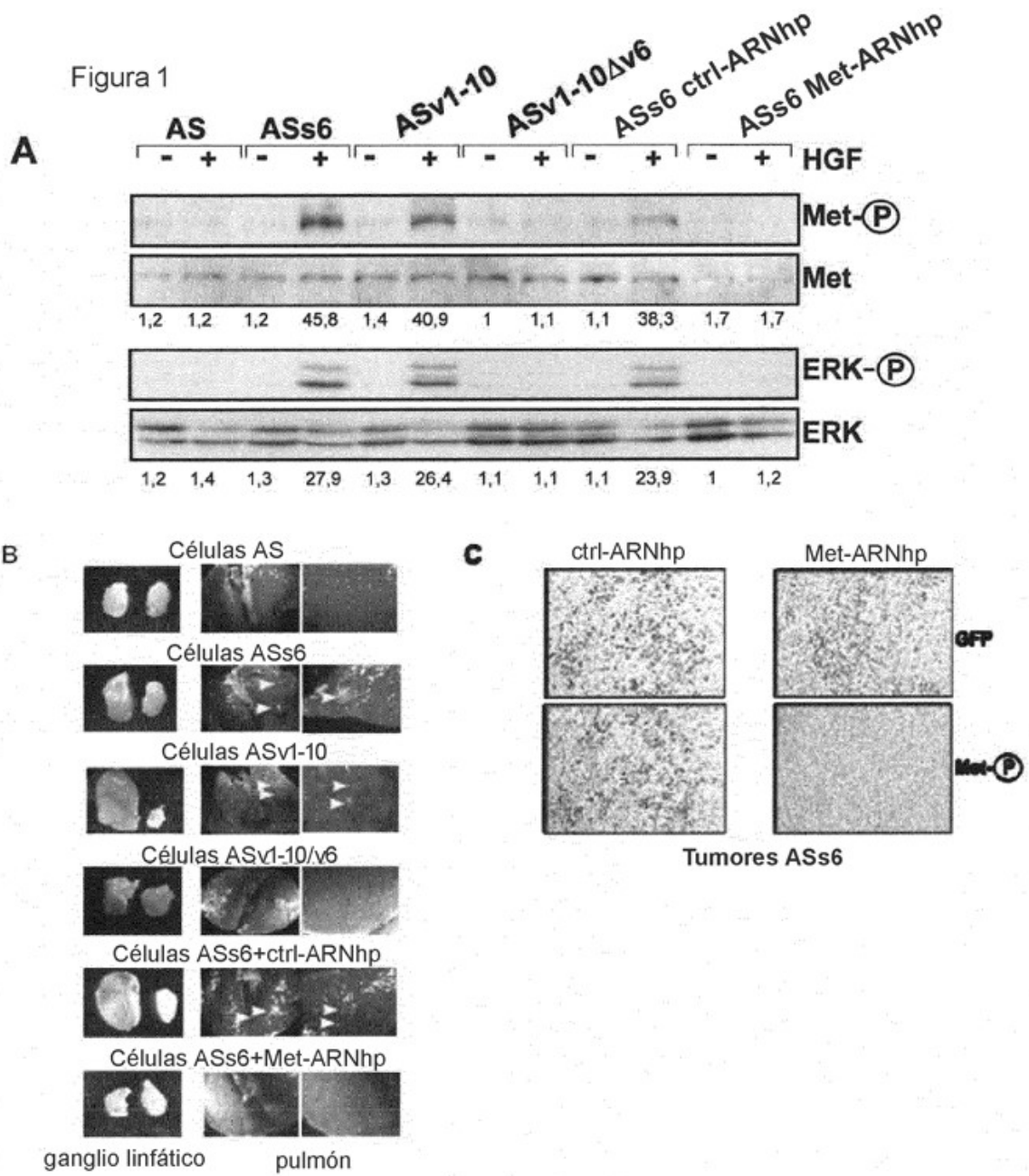


Figura 2

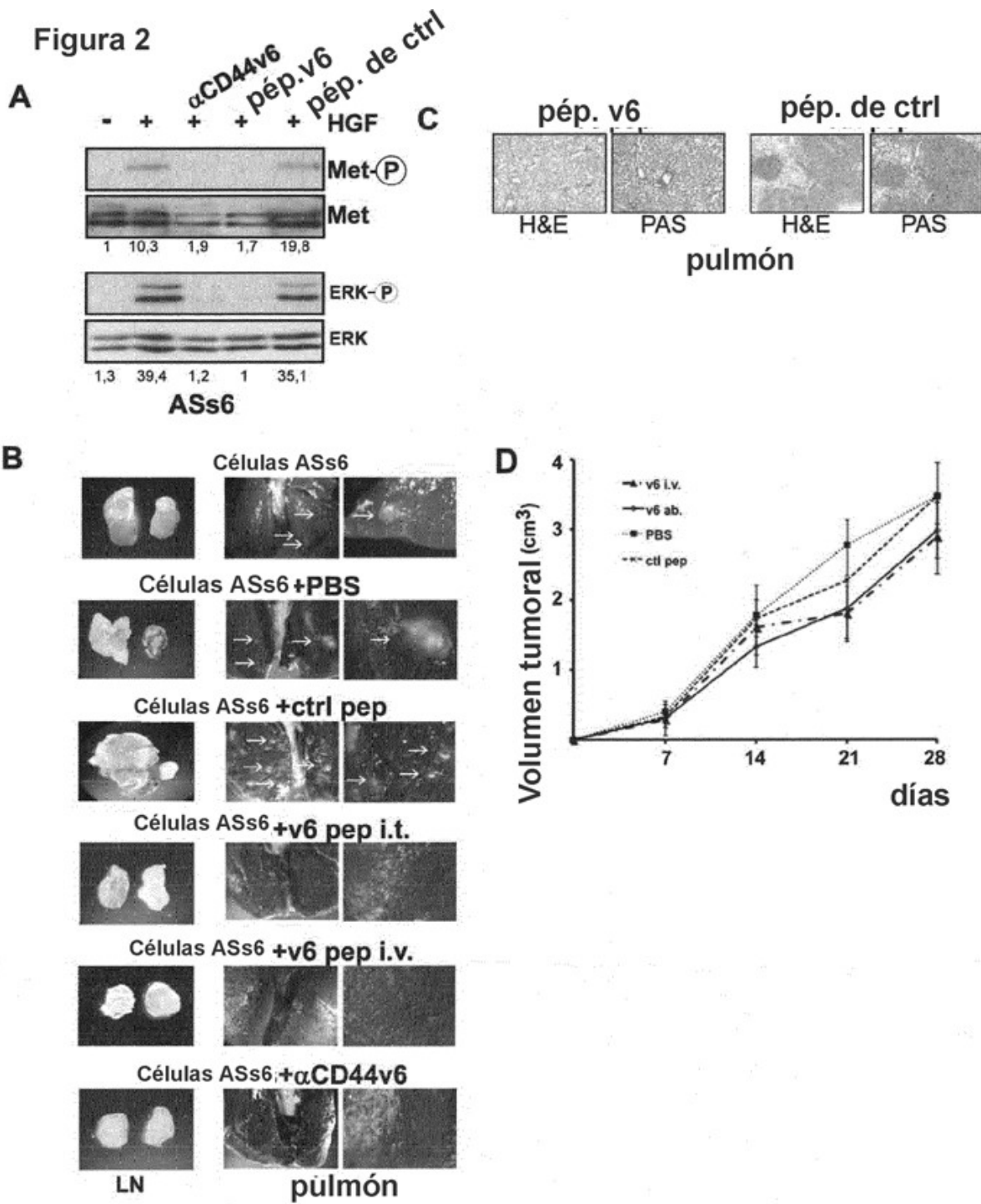


Figura 3

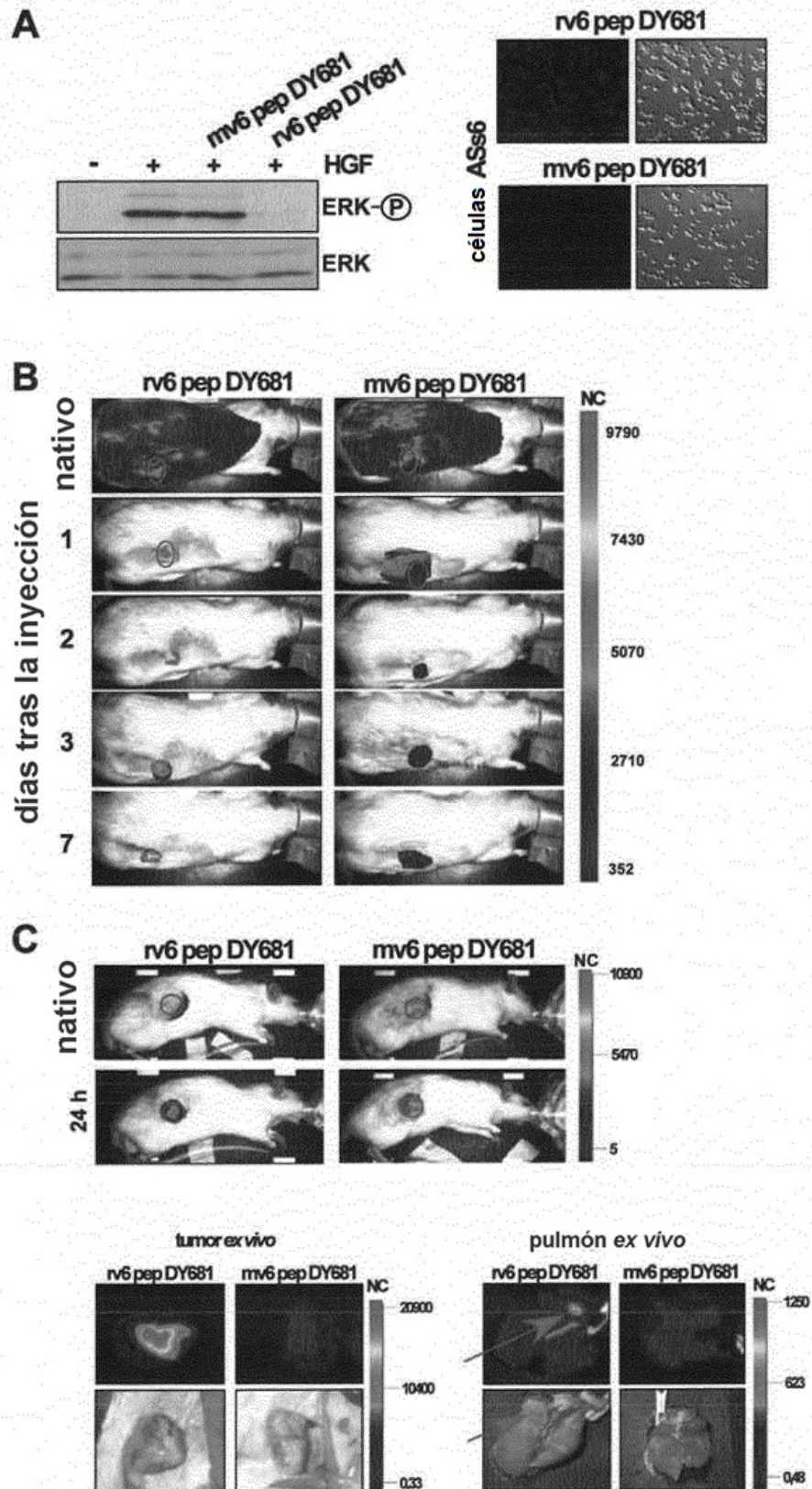


Figura 4

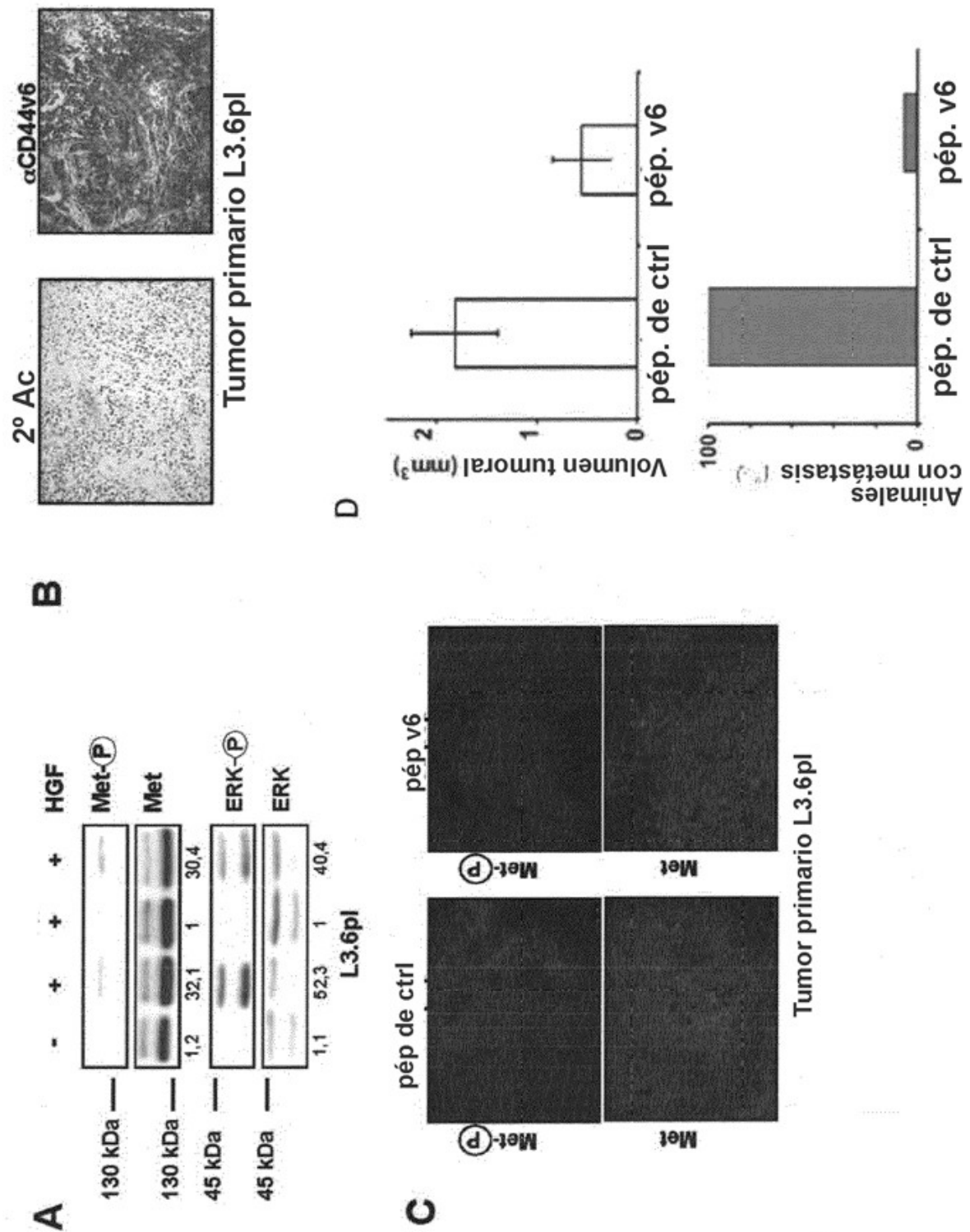


Figura 4 (continuación)

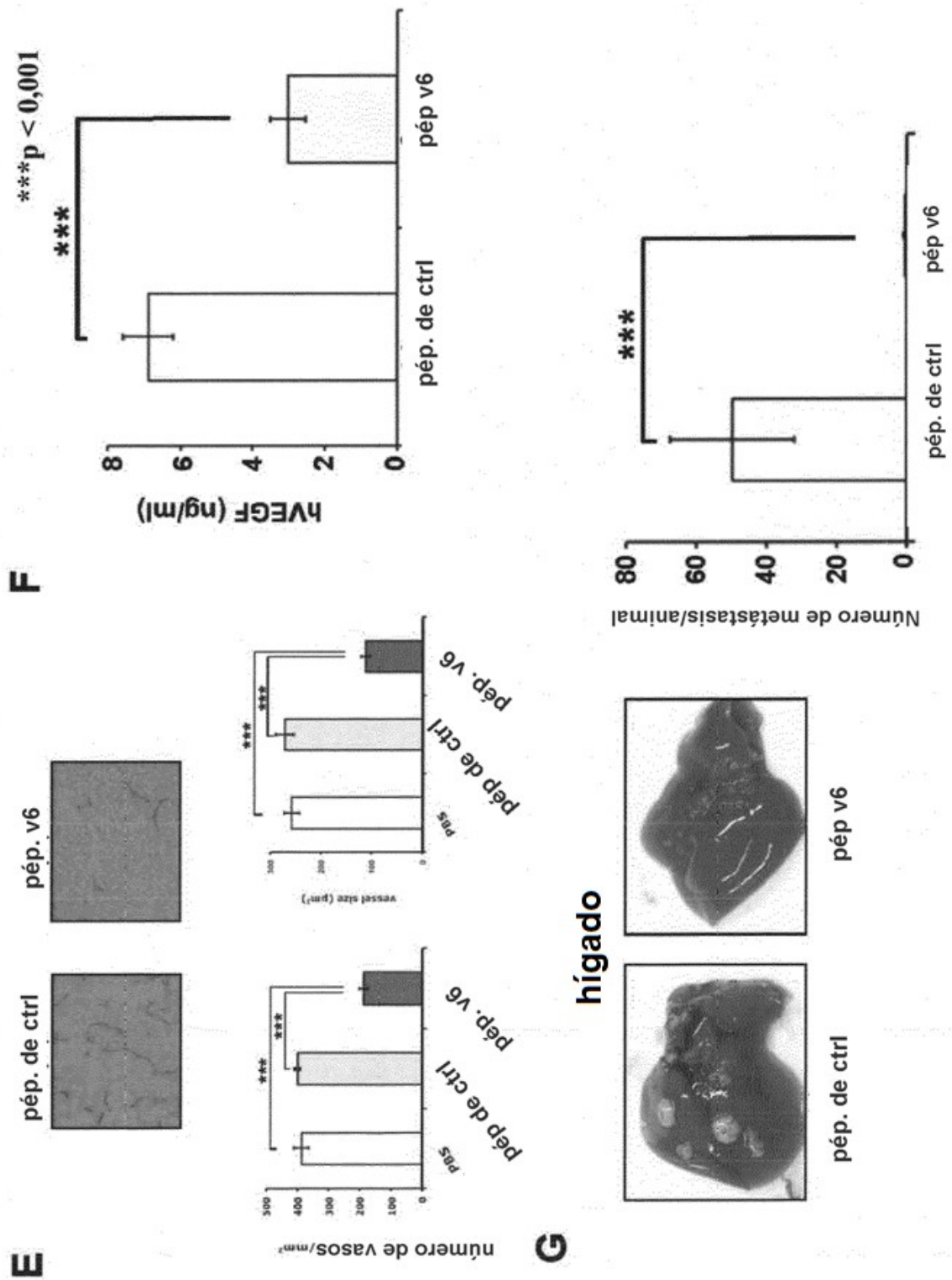
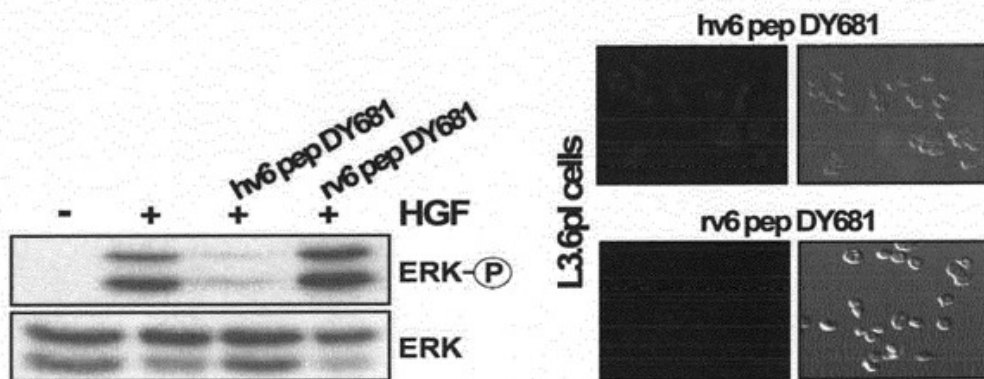


Figura 5

A



B

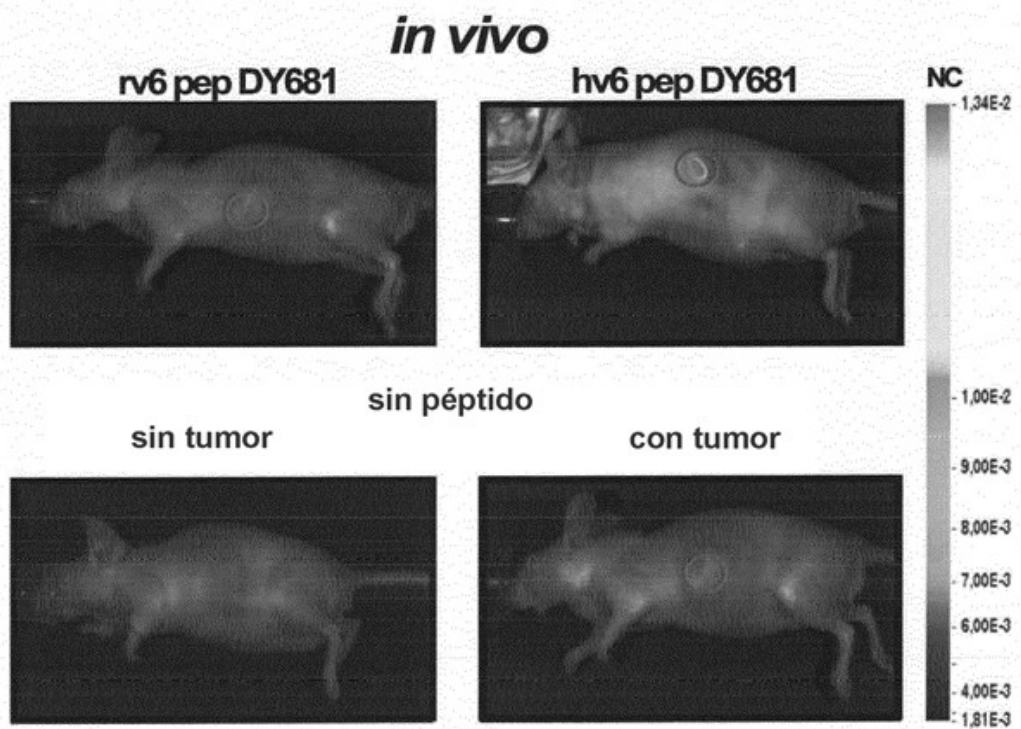


Figura 5 (continuación)

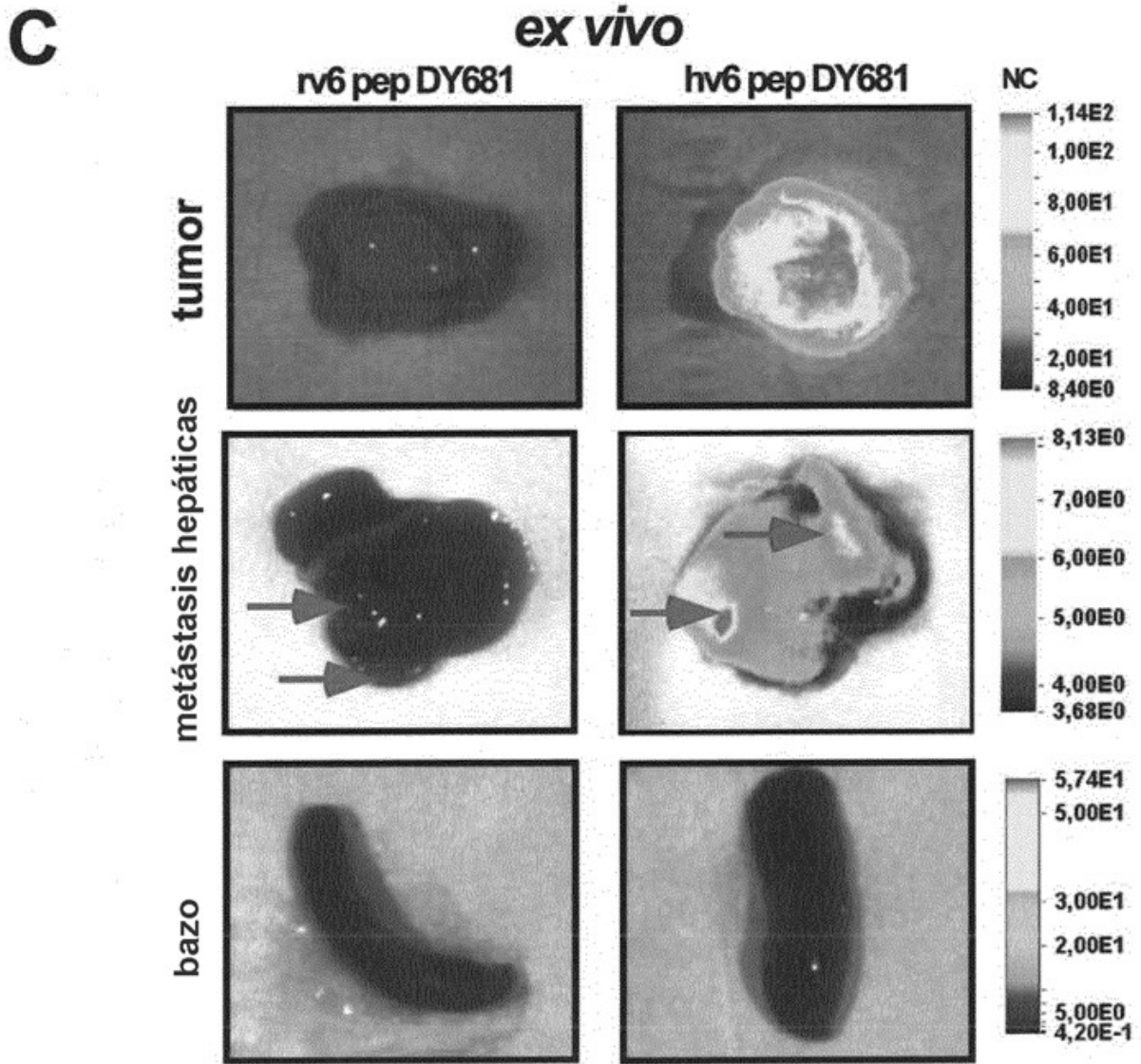


Figura 6

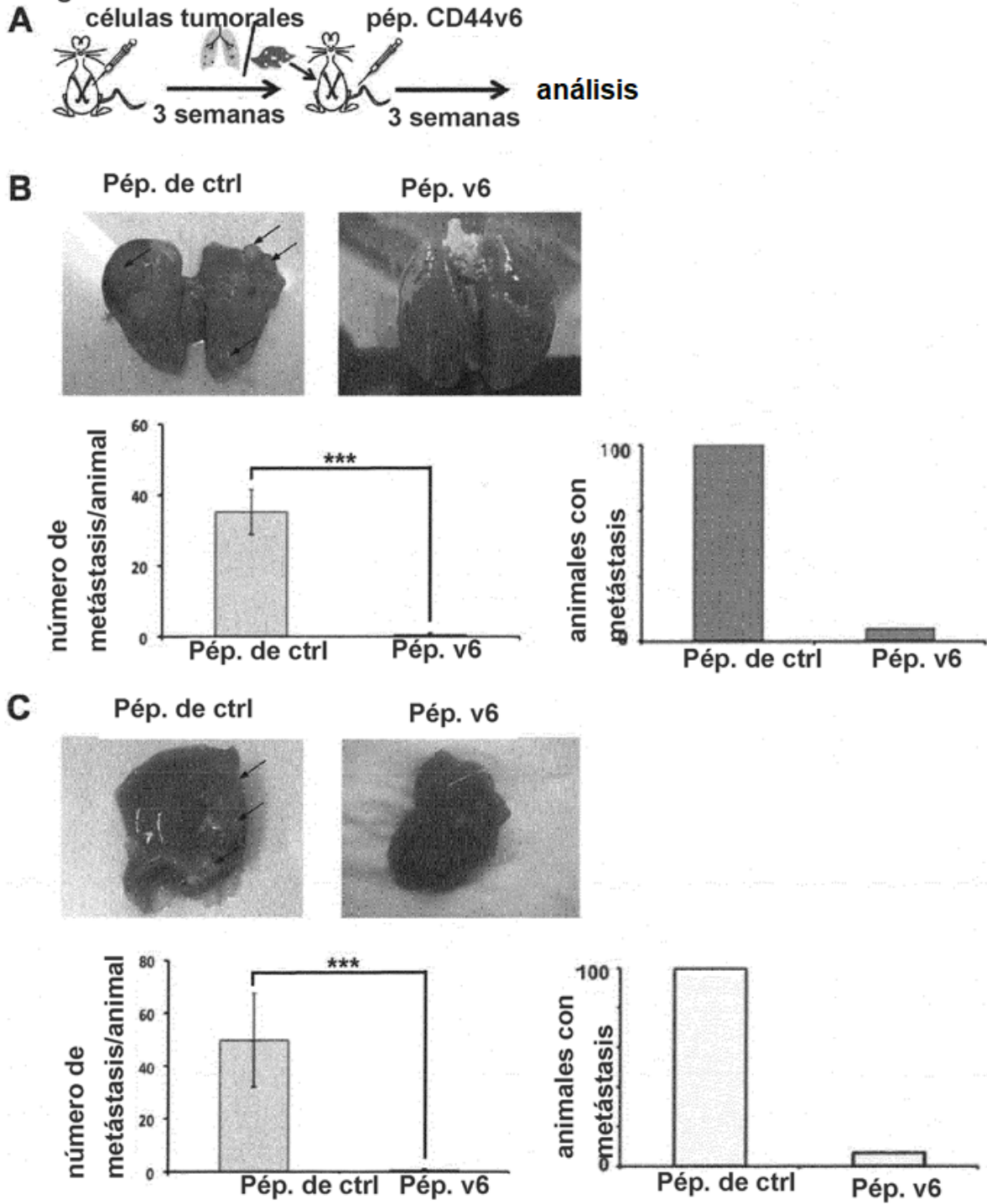


Figura 7

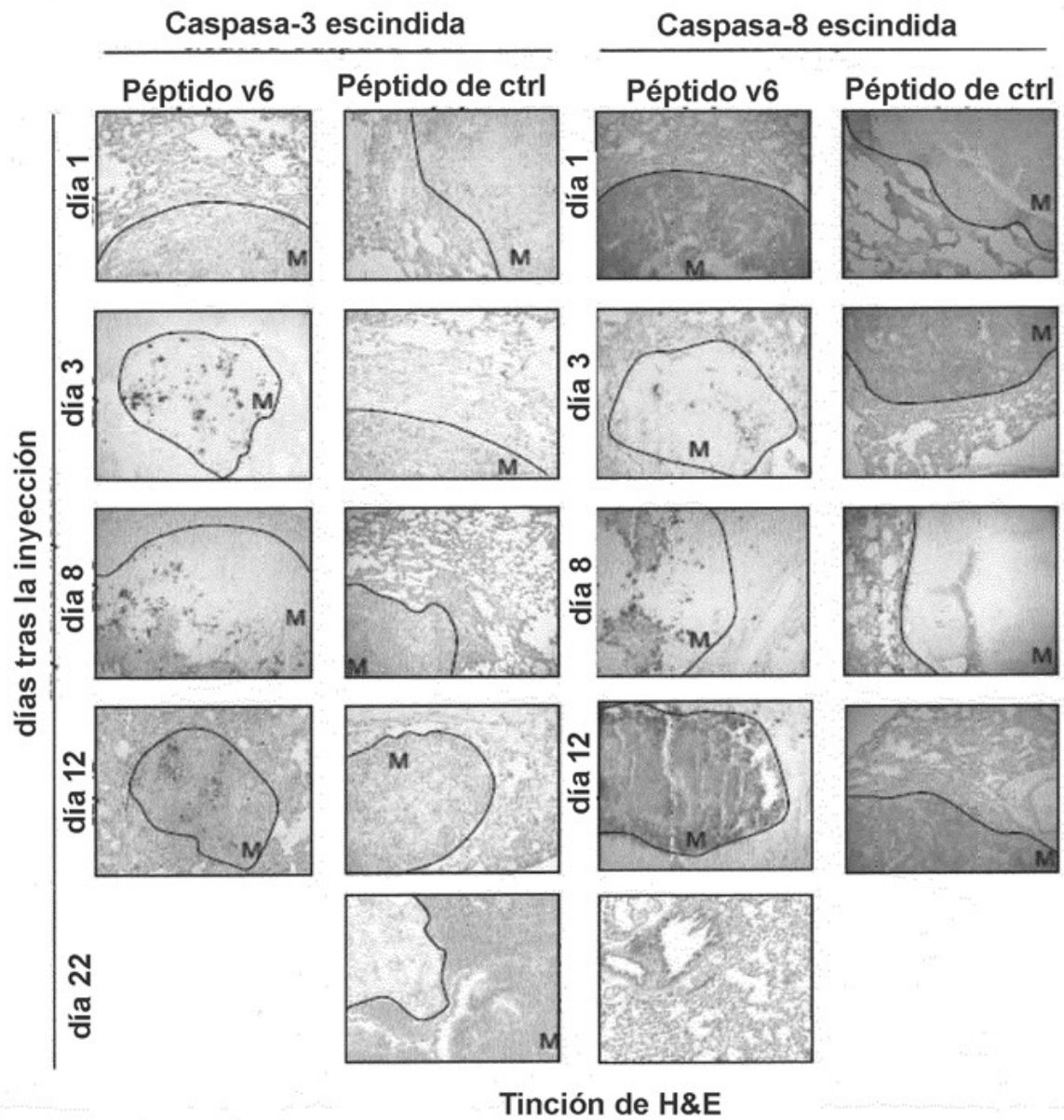


Figura 8

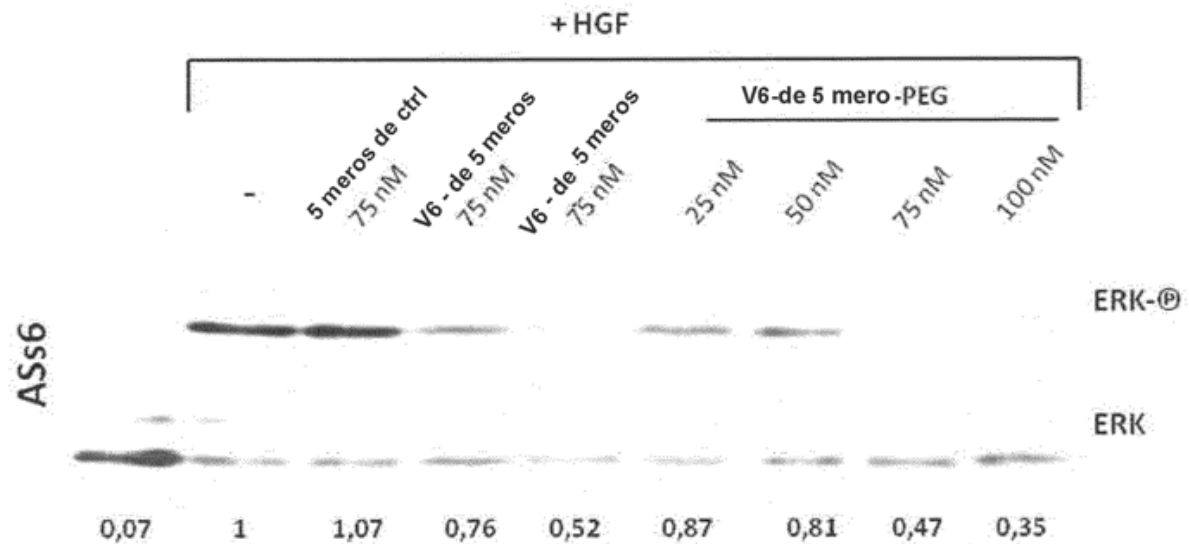
Tabla 1				
línea celular	tumor primario	pulmón con metástasis	LN con metástasis	micrometástasis
AS	5/5	0/5	0/5	0/5
ASs6	15/15	15/15	15/15	
ASv1-v10 Δ v6	10/10	0/10	0/10	0/10
ASv1-v10	10/10	10/10	10/10	
ASs6 ctrl -ARNhp	10/10	10/10	10/10	
ASs6 Met-ARNhp	10/10	0/10	0/10	0/10

Tabla 2				
ASs6 + tratamiento	tumor primario	pulmón con metástasis	LN con metástasis	micrometástasis
CD44v6 Ab	14/14	1/14	1/14	1/14
CD44v6 pep i.t	14/14	0/14	0/14	0/14
CD44v6 pep i.v	15/15	0/15	0/15	0/15
Pép. de ctrl	15/15	15/15	15/15	
PBS	10/10	10/10	10/10	

Tabla 3				
	BSp73ASs6		L3.6pl	
	tumor primario	pulmón con metástasis	tumor primario	metástasis hepática
control (3 semanas tras la inyección de células tumorales)	10/10	10/10	10/10	10/10
tratamiento con péptido de ctrl (3 semanas más)	15/15	15/15	15/15	15/15
tratamiento con péptido v6(3 semanas más)	15/15	1/15	15/15	1/15

Figura 9

A



B

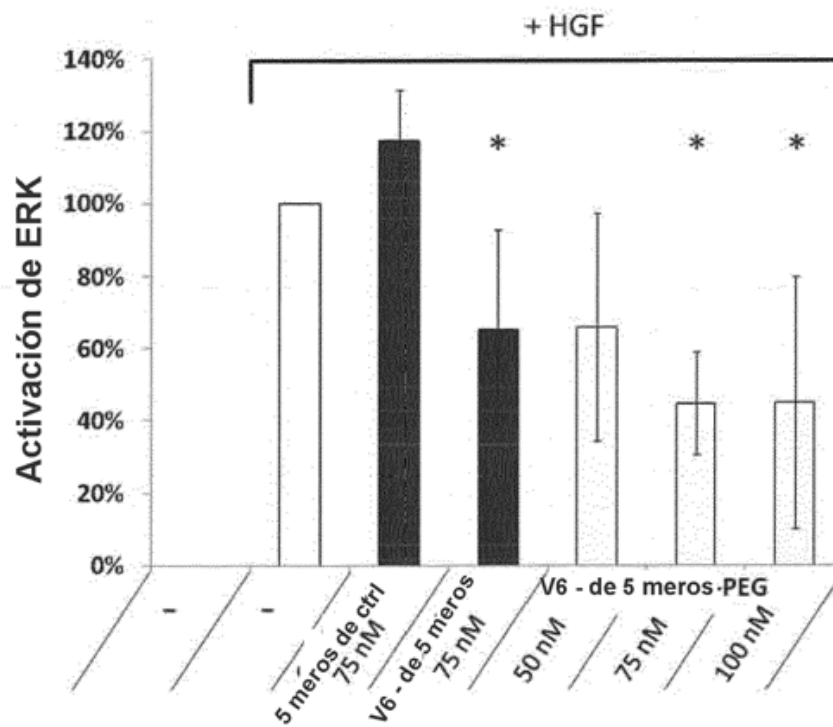


Figura 10

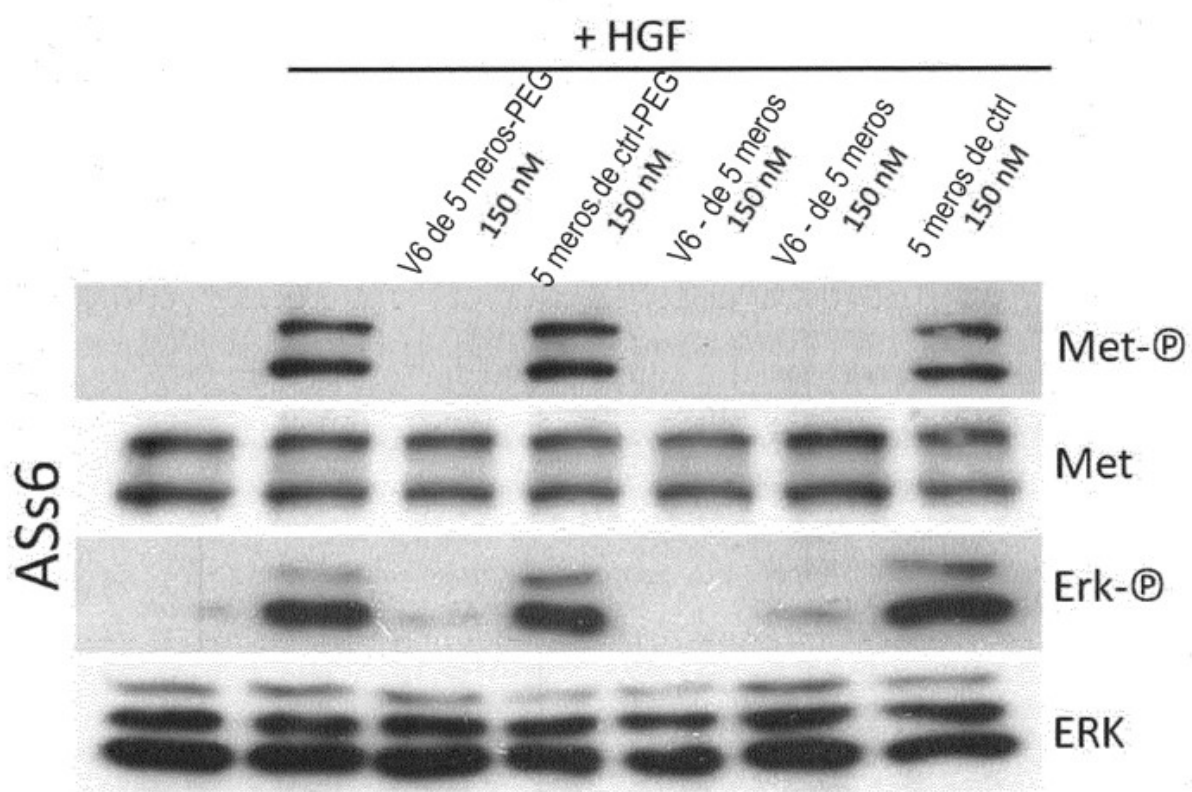


Figura 11

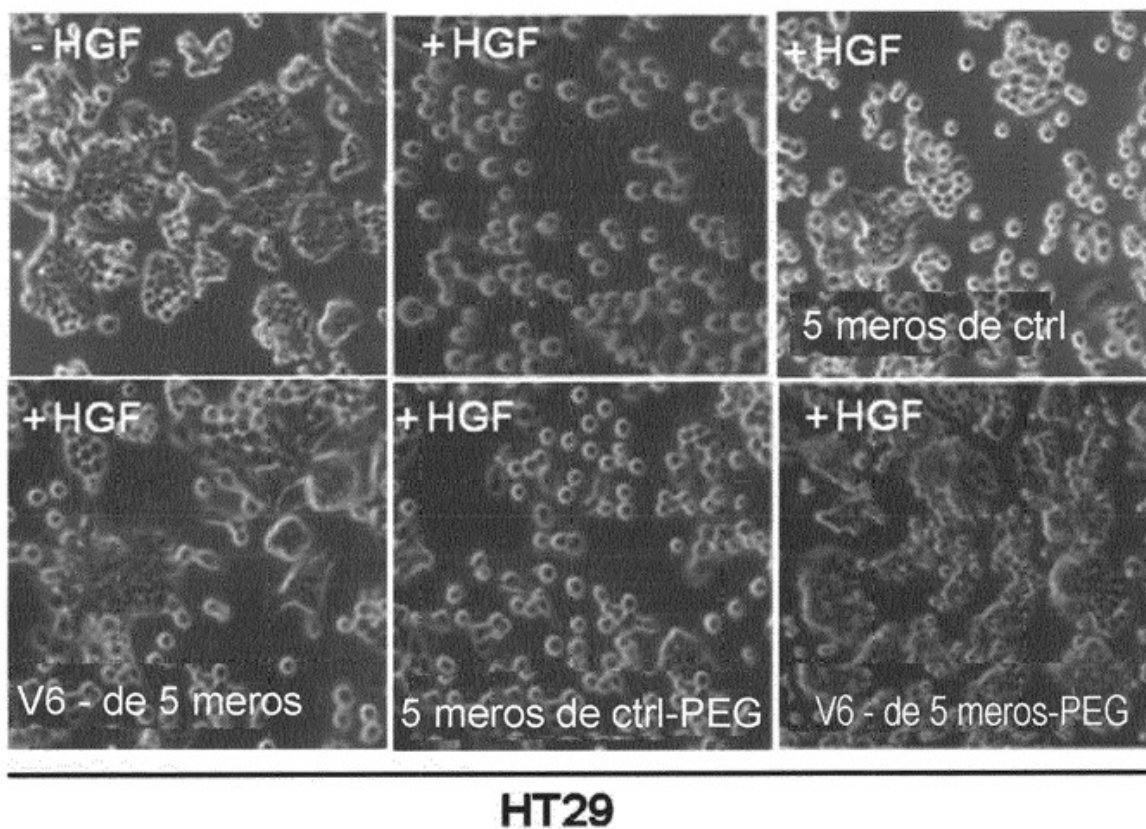


Figura 12

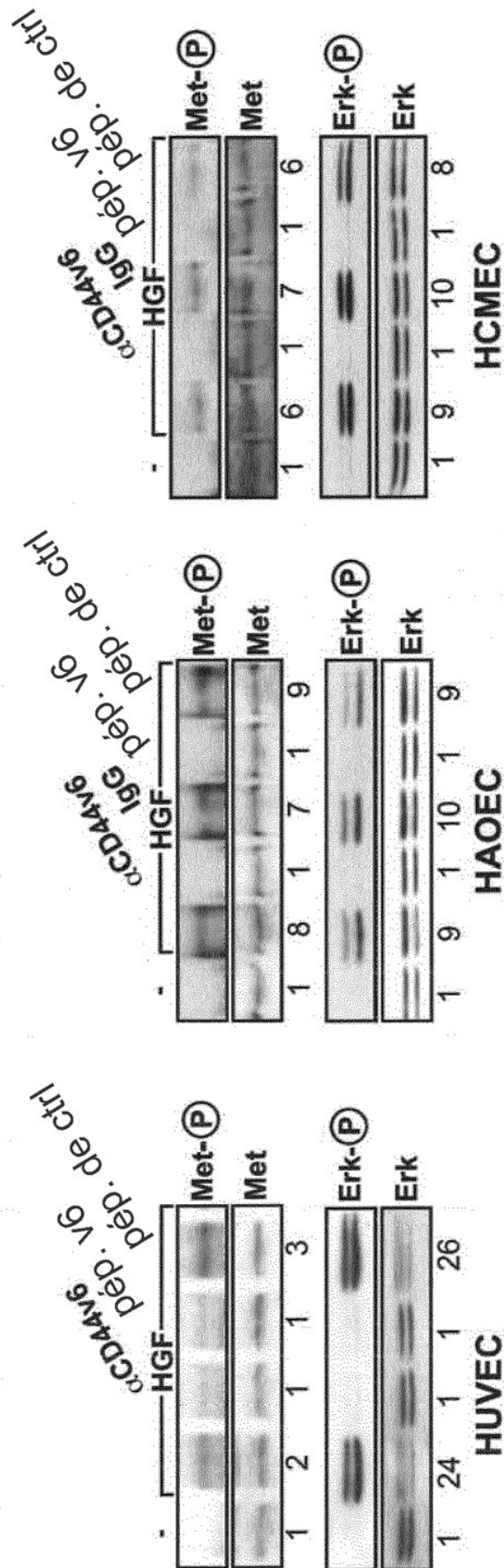


Figura 13

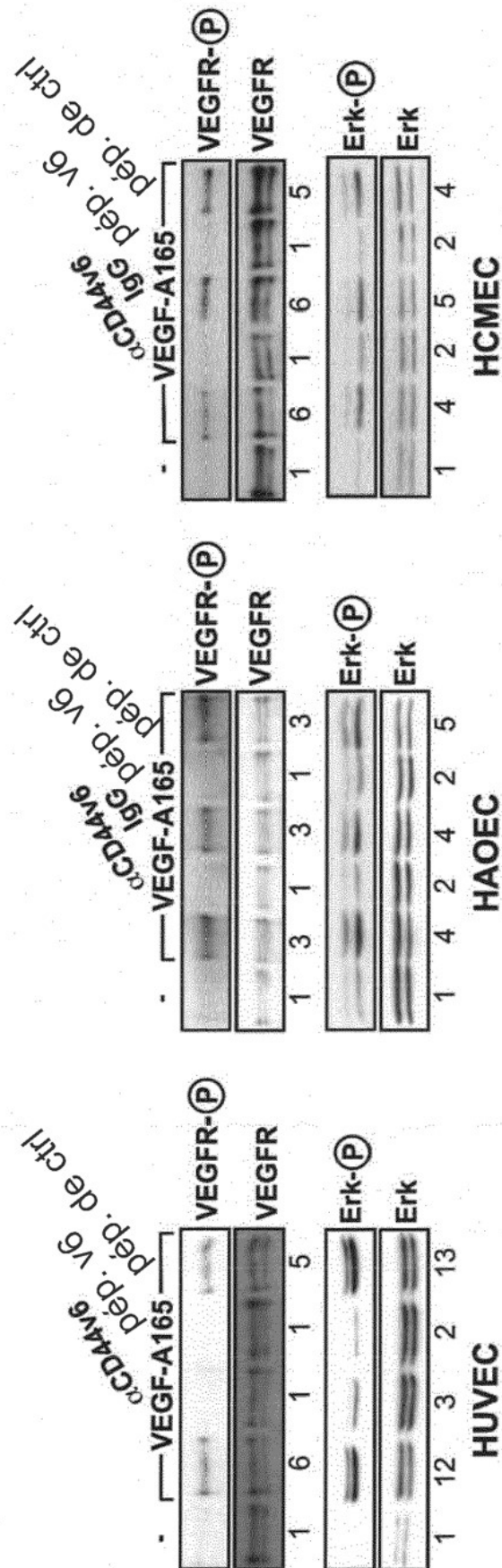
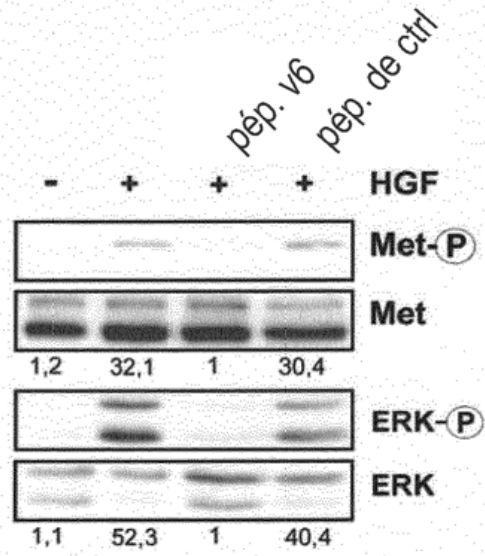
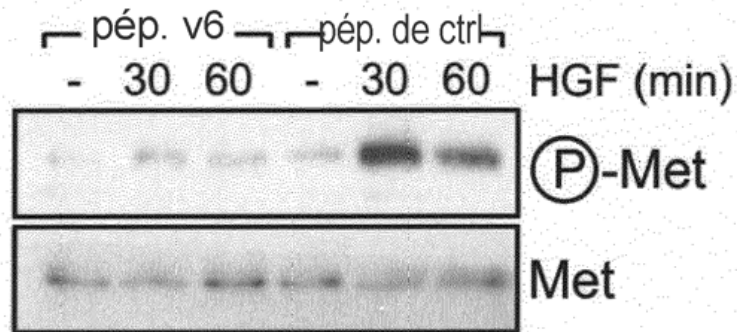


Figura 14

A



B



C

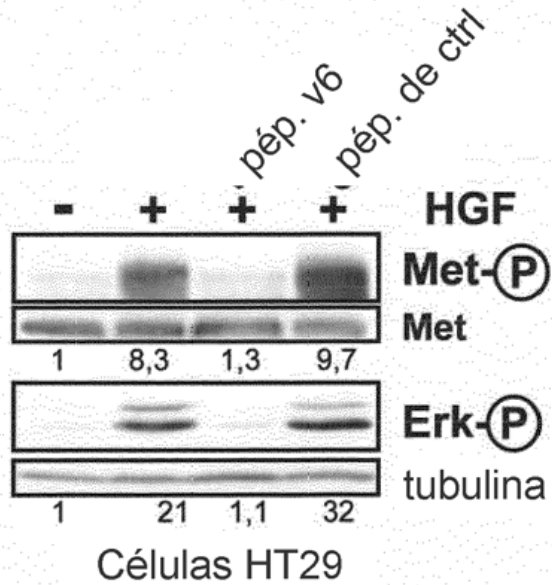


Figura 15

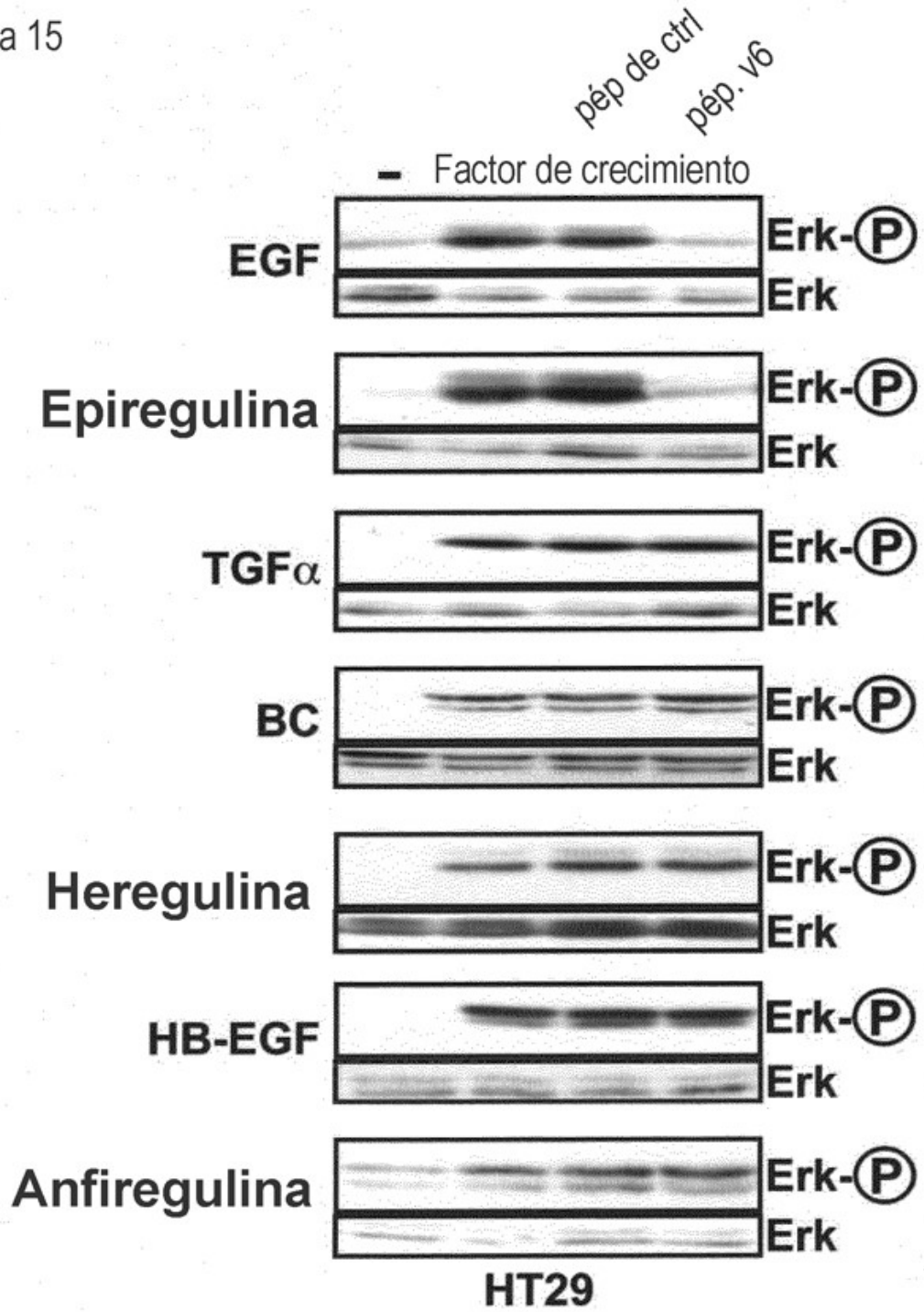


Figura 16

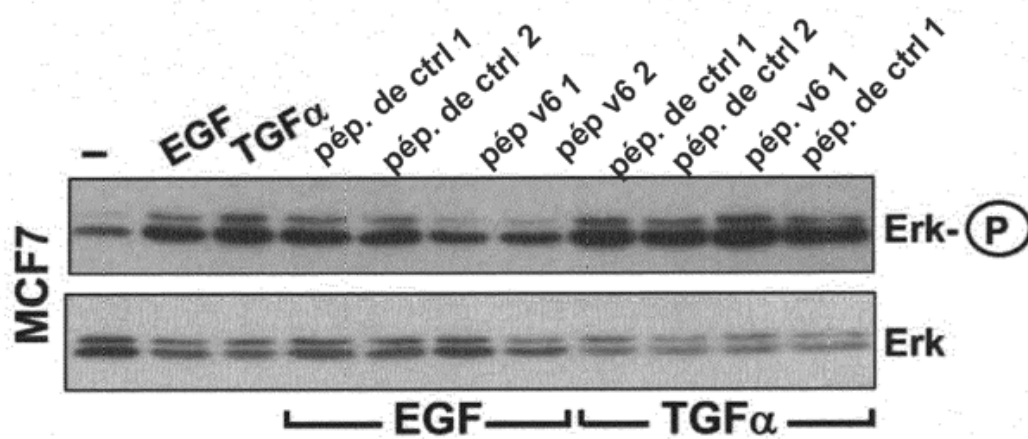


Figura 17

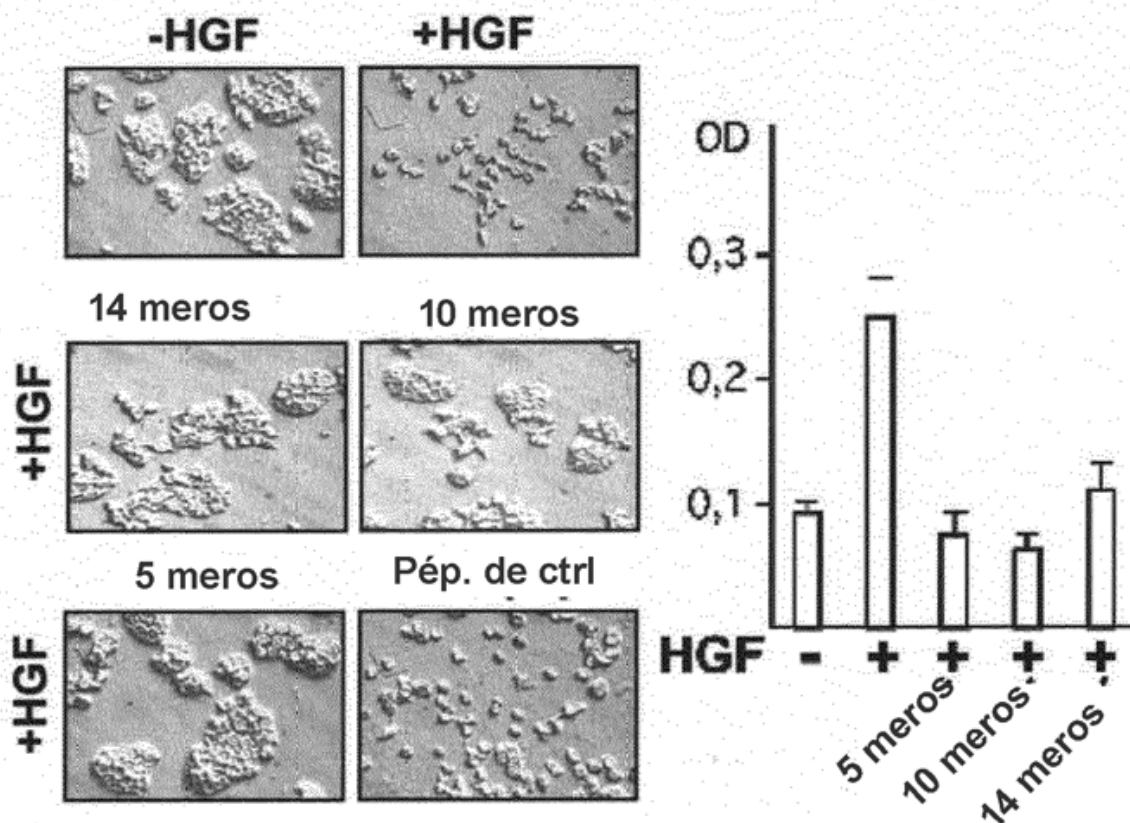


Figura 18

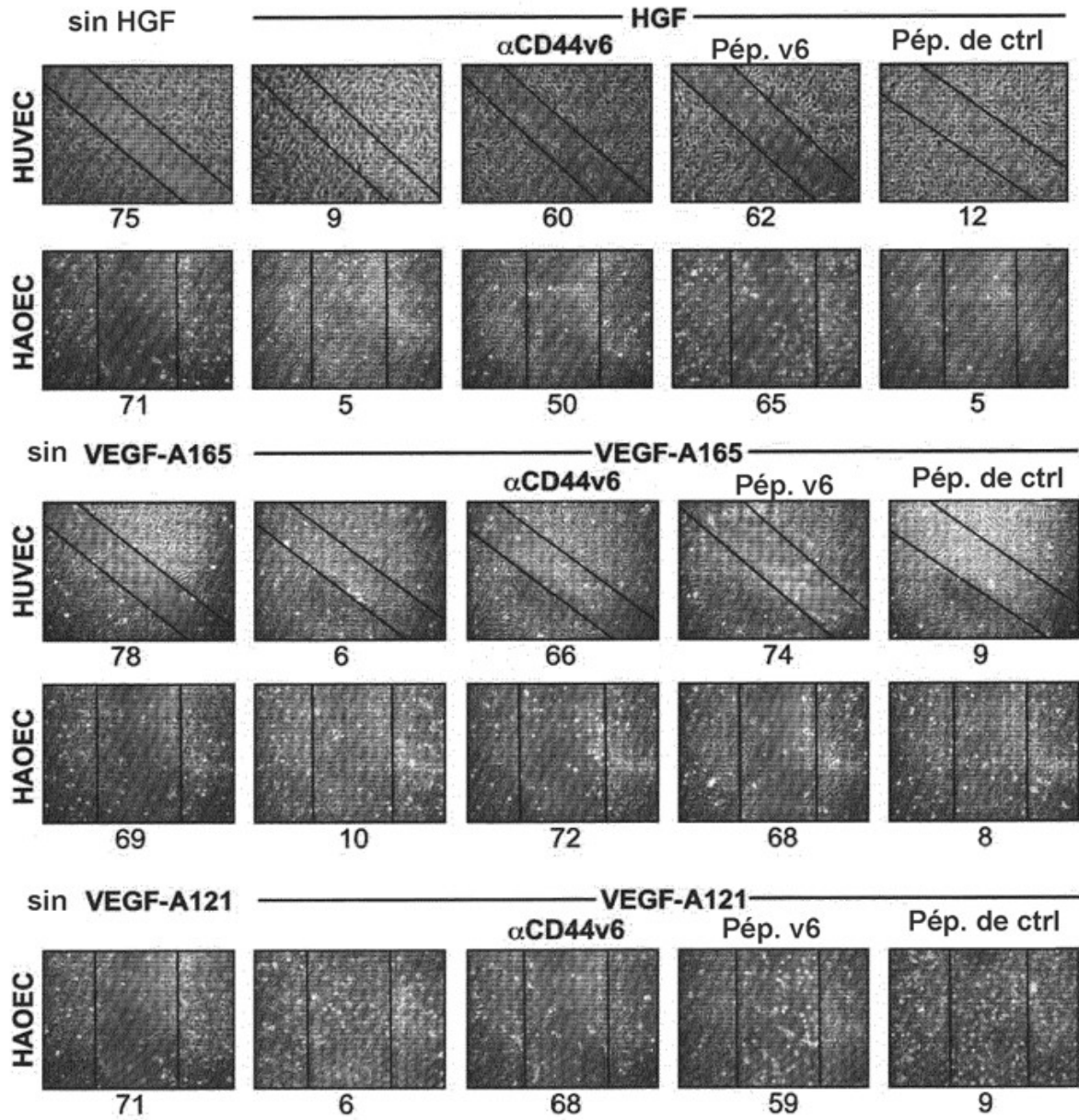


Figura 19

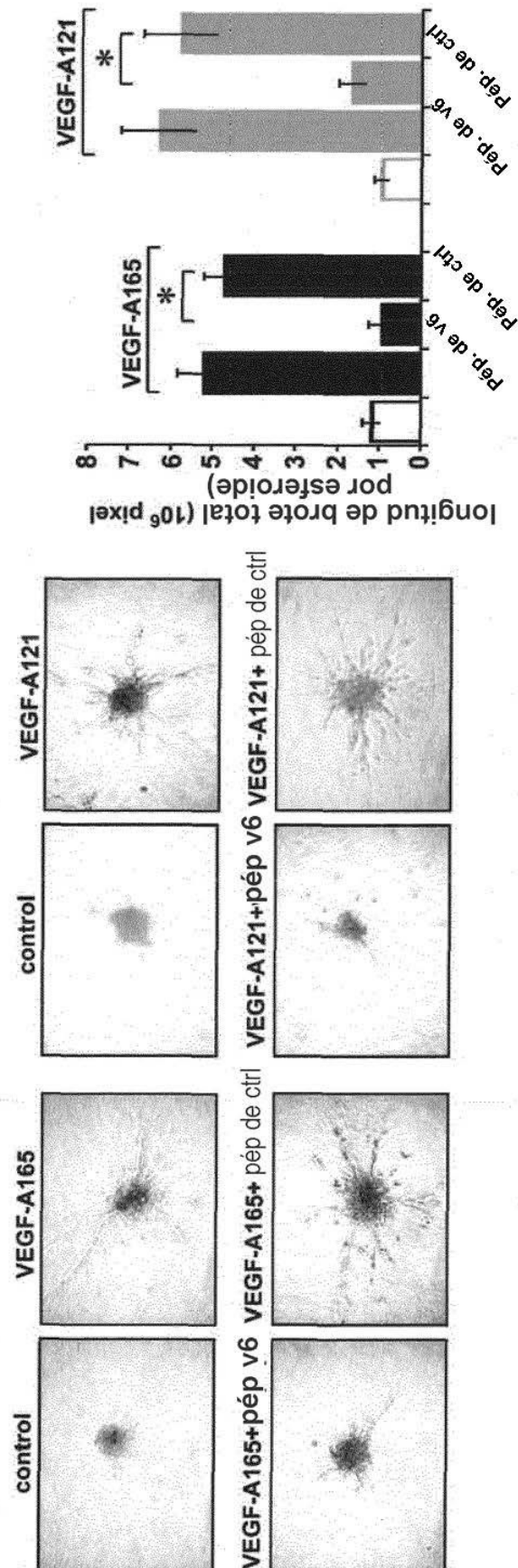


Figura 20

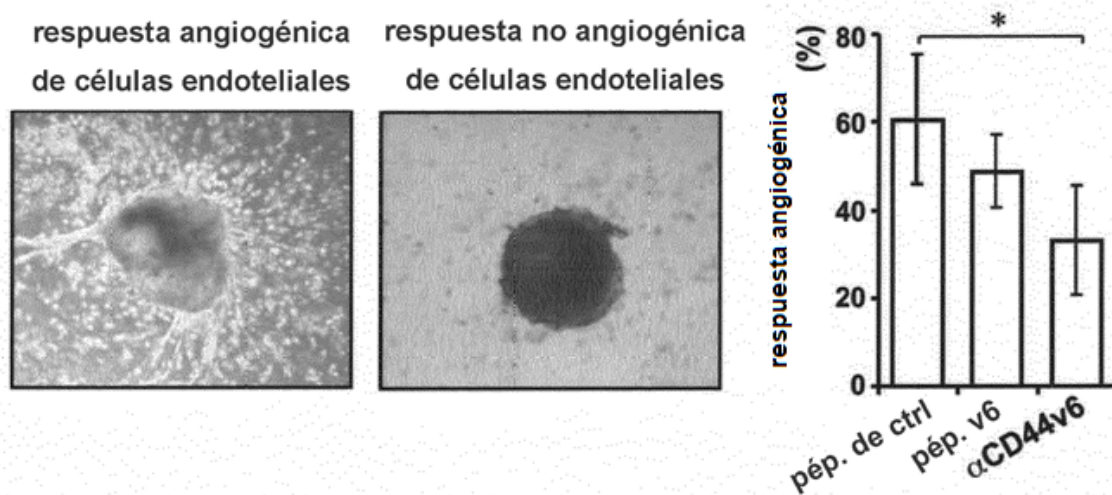


Figura 21

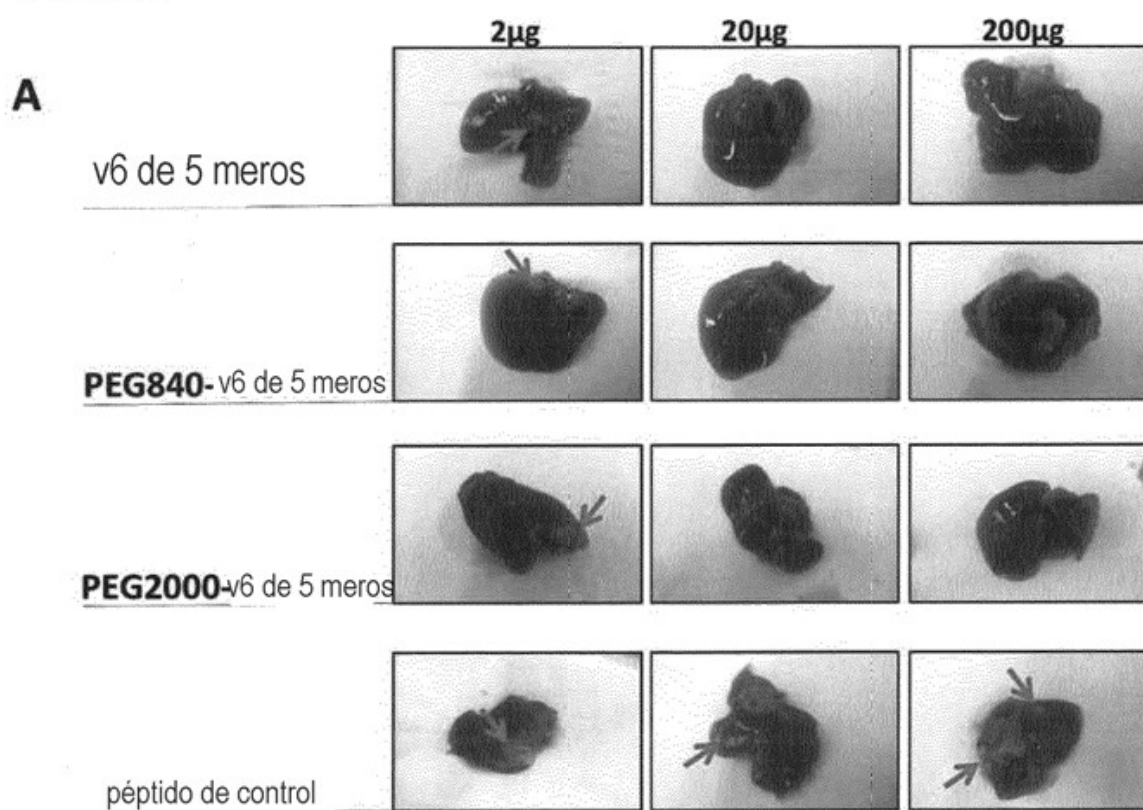
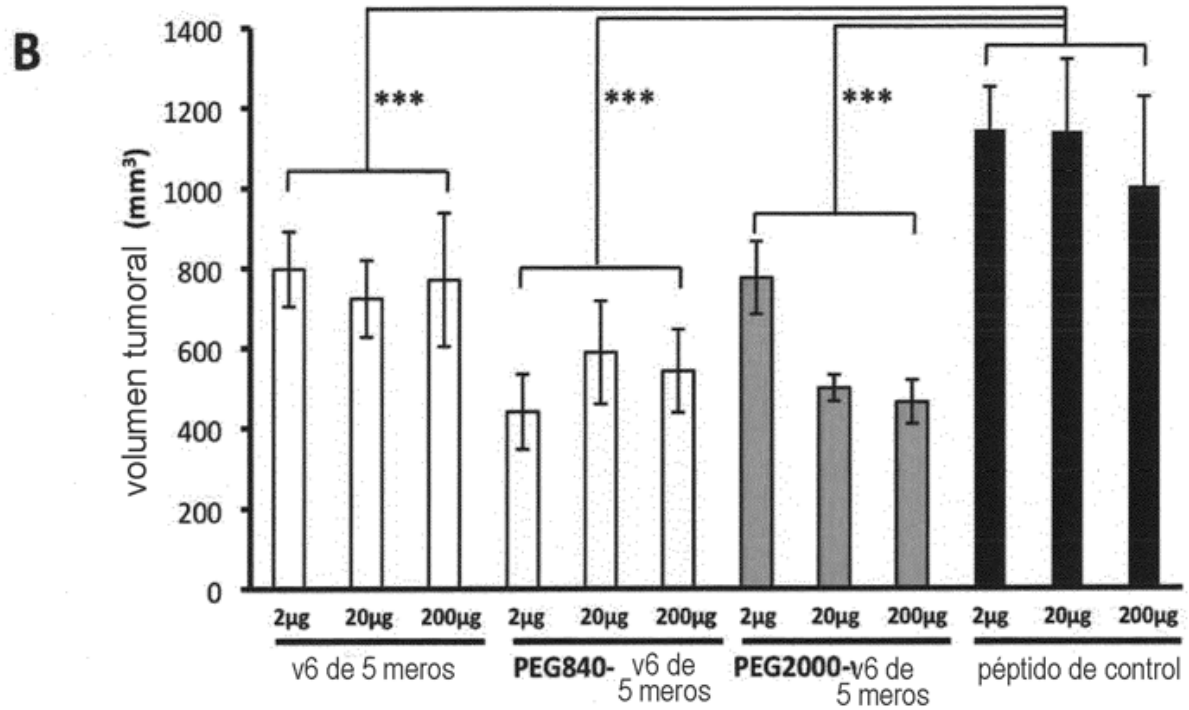


Figura 21 (continuación)



C

cantidad/inyección	2µg	20µg	200µg
v6 de 5 meros	3	0	0
PEG840-v6 de 5 meros	5	0	0
PEG2000- v6 de 5 meros	3	0	0
péptido de control	10	11	11

Figura 22

A

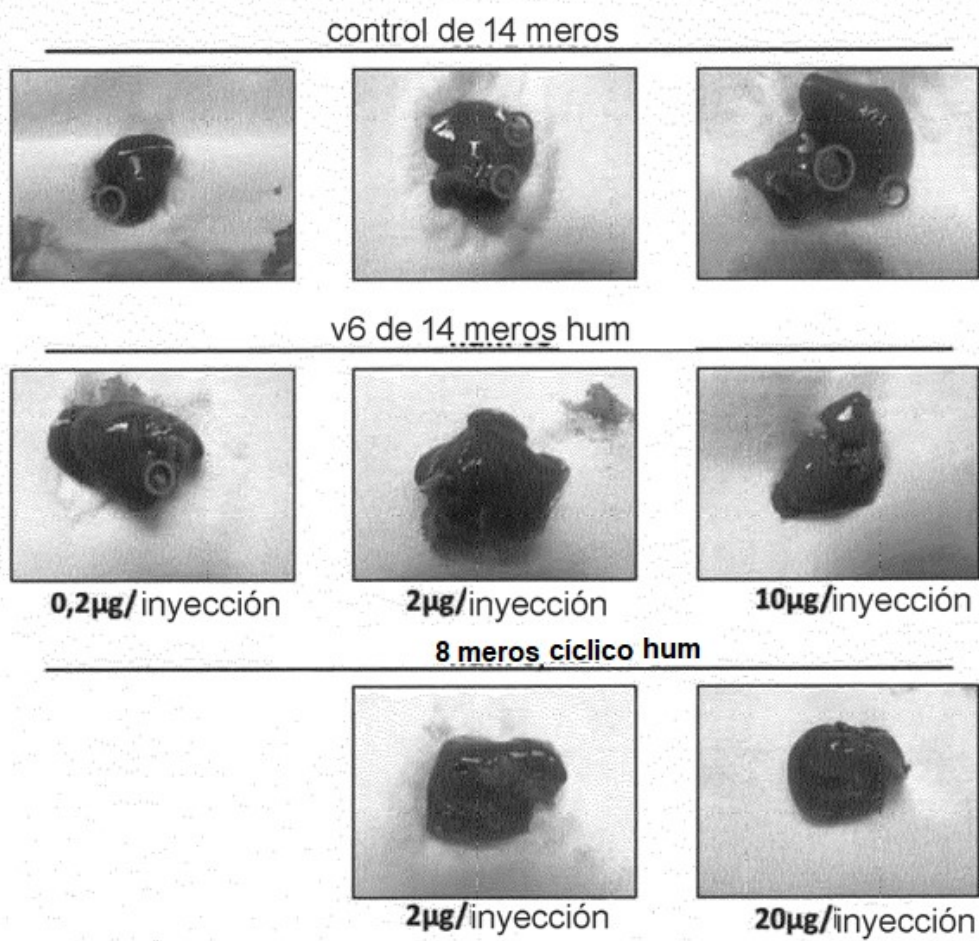


Figura 22 (continuación)

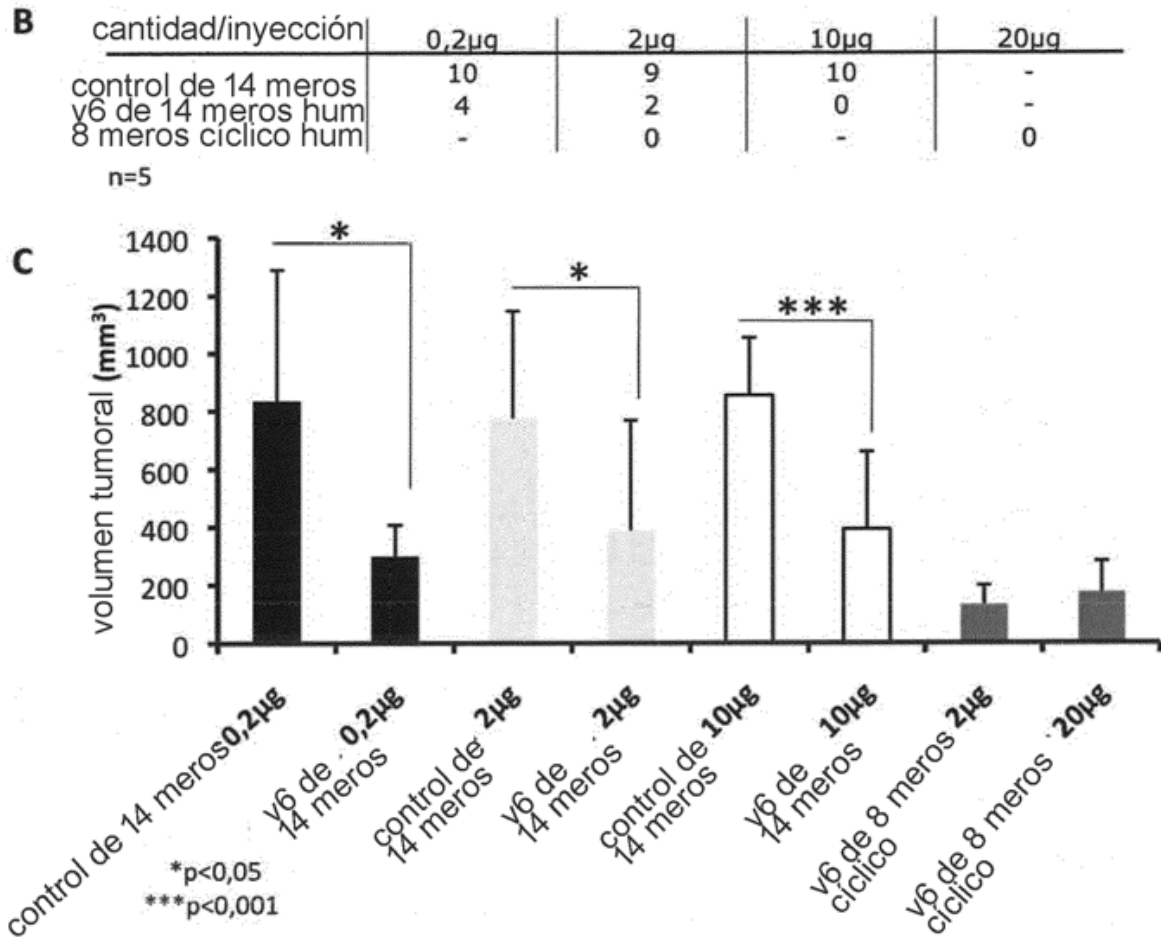


Figura 23

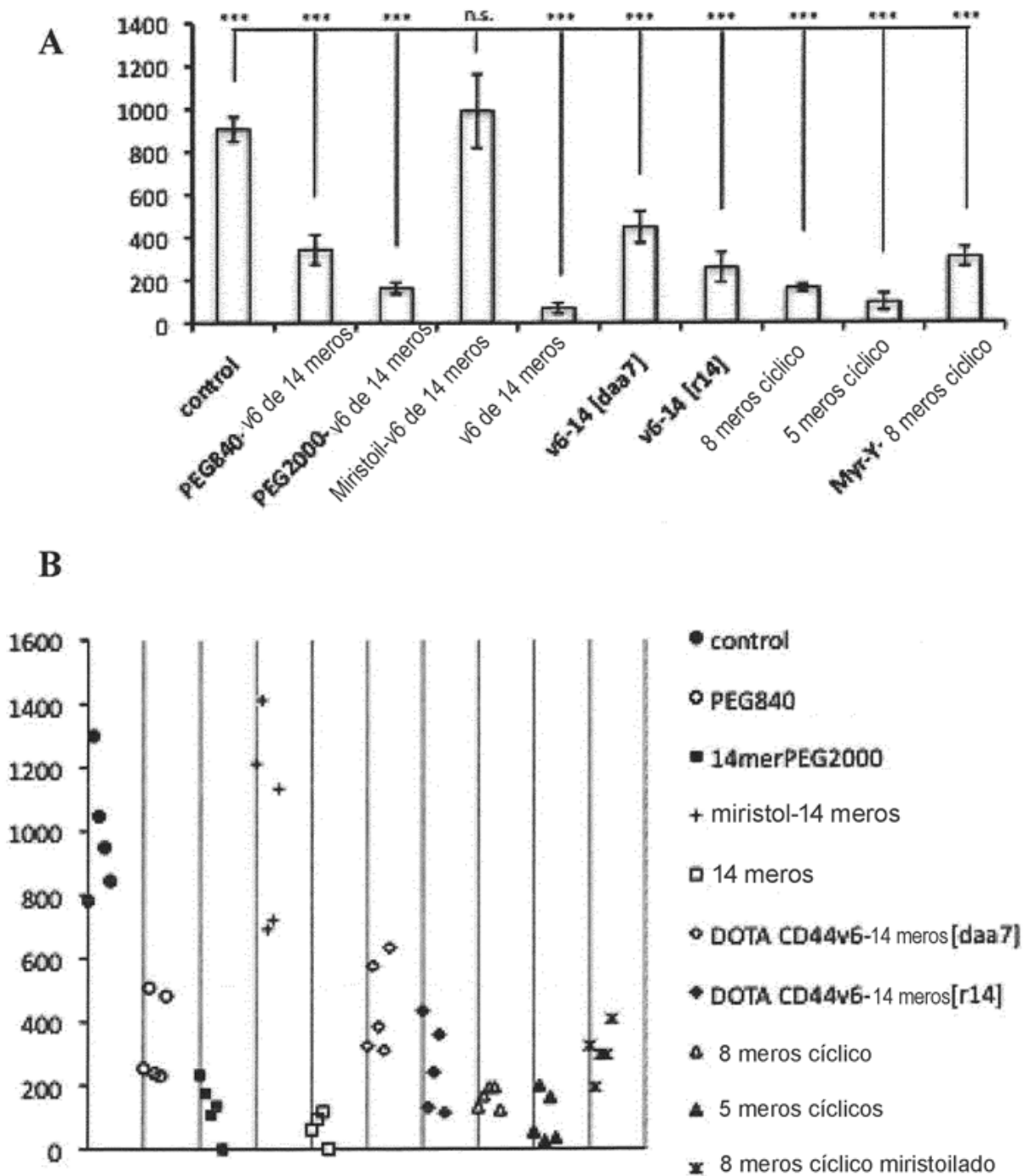
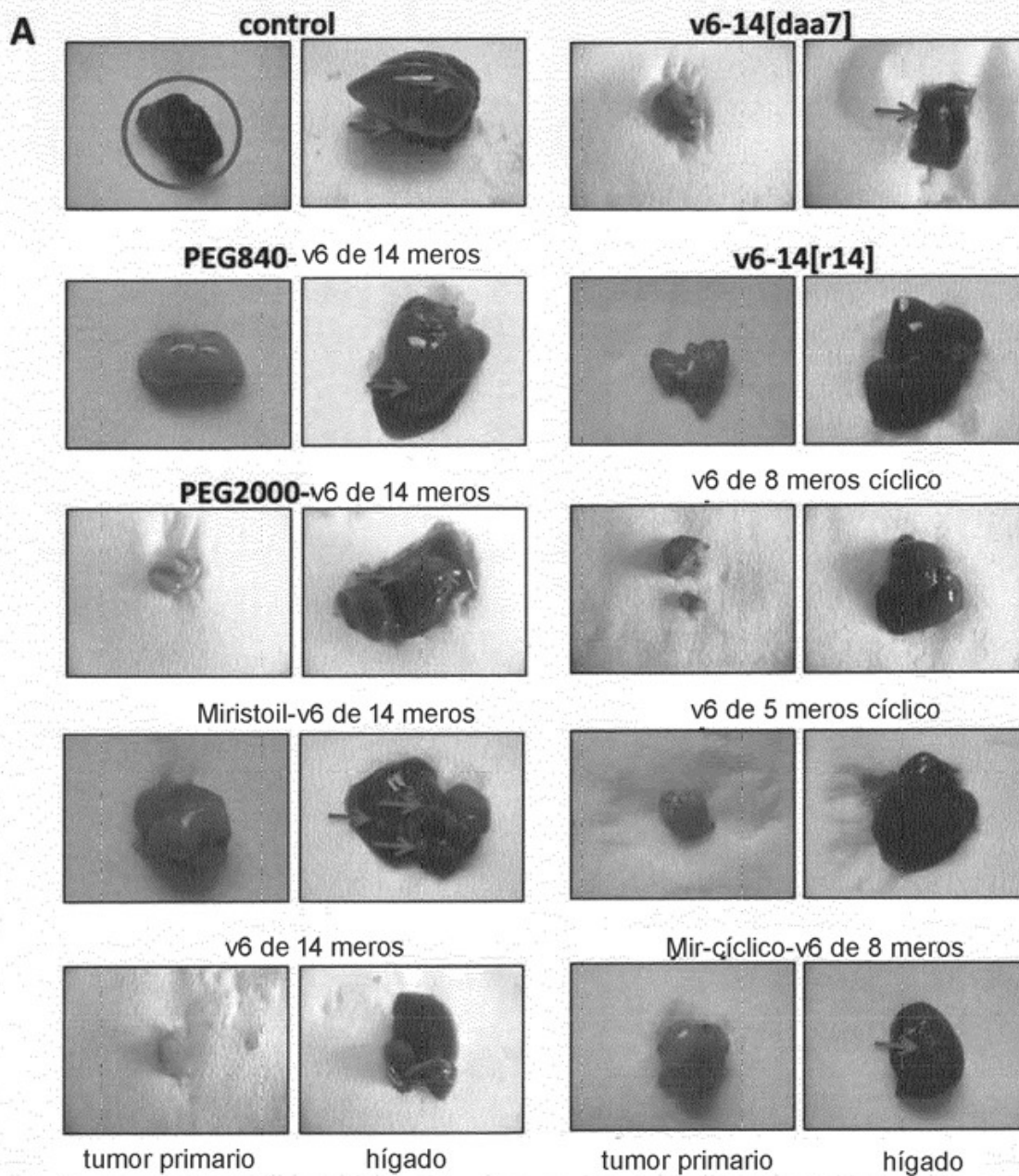


Figura 24



B

grupo n.º	tratamiento	animales con metástasis	n.º promedio de metástasis
1	control	5/5	13
2	PEG840- v6 de 14 meros	2/5	5
3	PEG2000- v6 de 14 meros	1/5	2
4	Miristoil-v6 de 14 meros	5/5	12
5	v6 de 14 meros	0/5	0
6	v6-14 [daa ₇]	1/5	2
7	v6-14 [r ¹⁴]	0/5	0
8	8 meros cíclico	0/5	0
9	5 meros cíclico	0/5	0
10	Mir-Y-cíclico de 8 meros	3/5	12

Figura 25

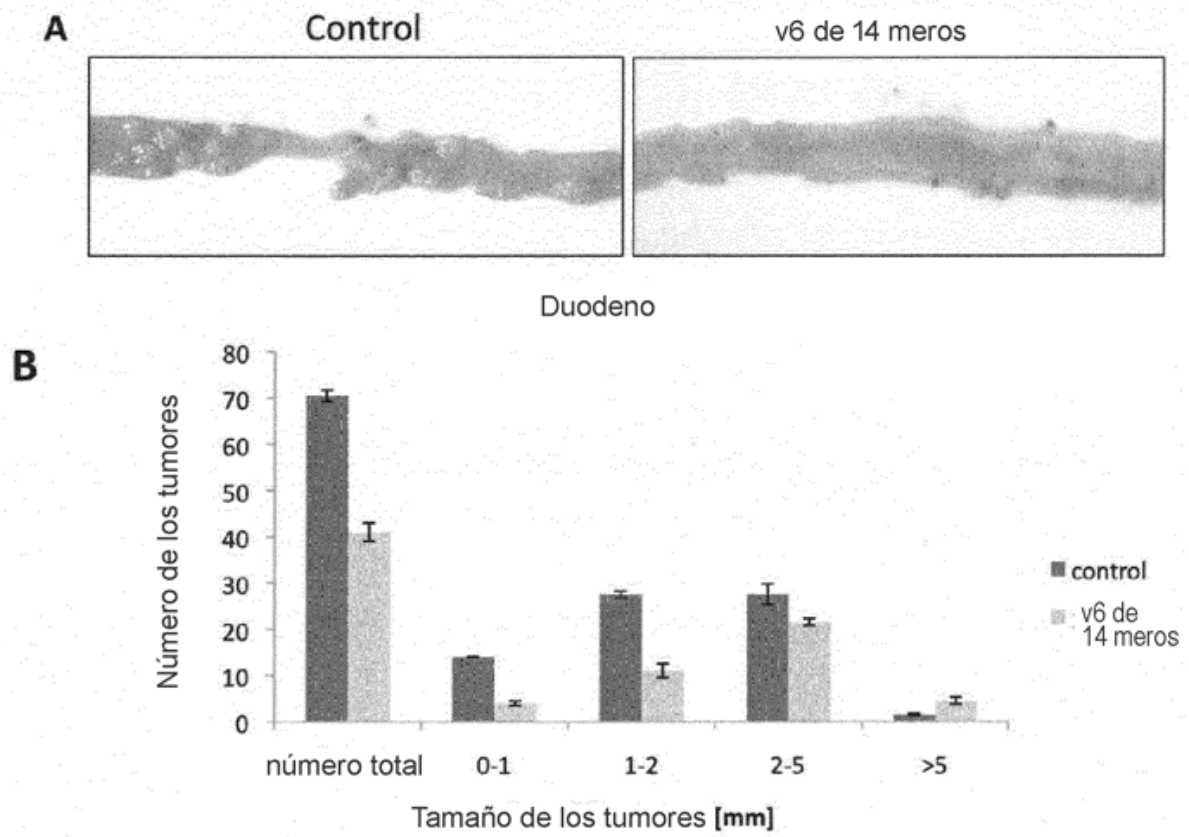
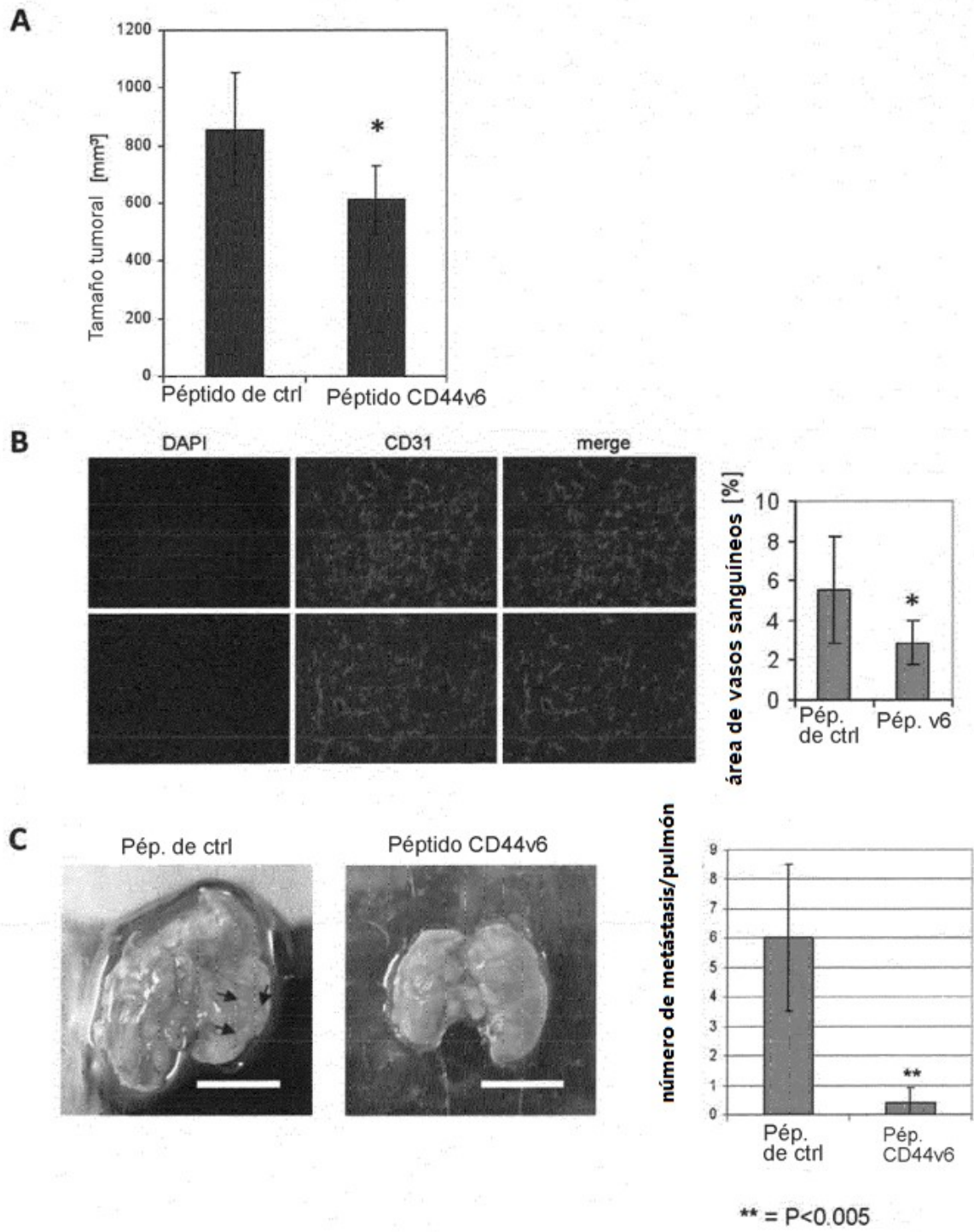


Figura 26



A

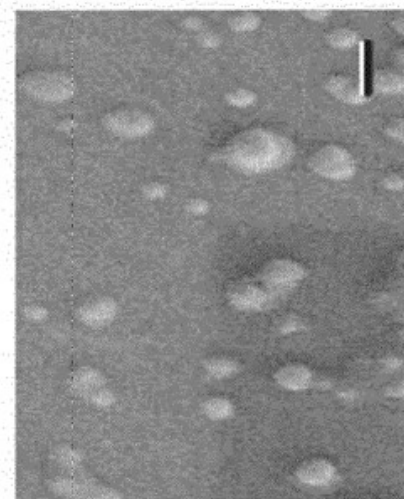
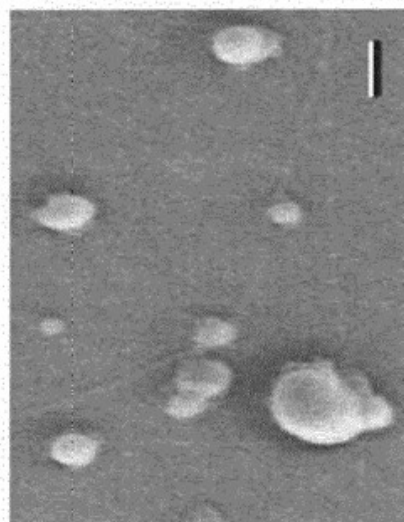


Figura 28

(A)

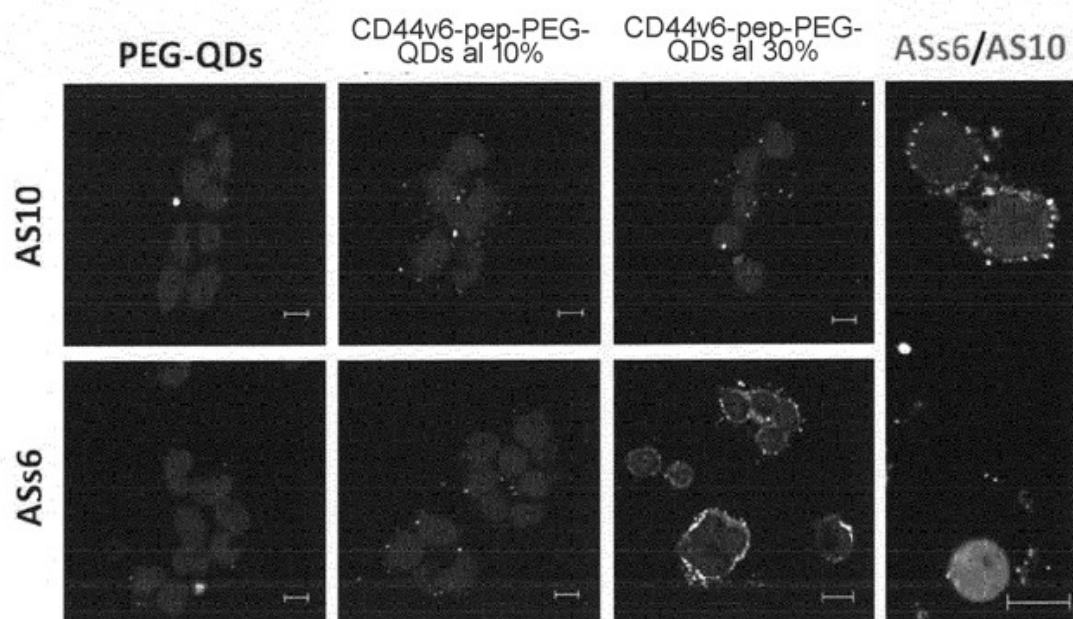
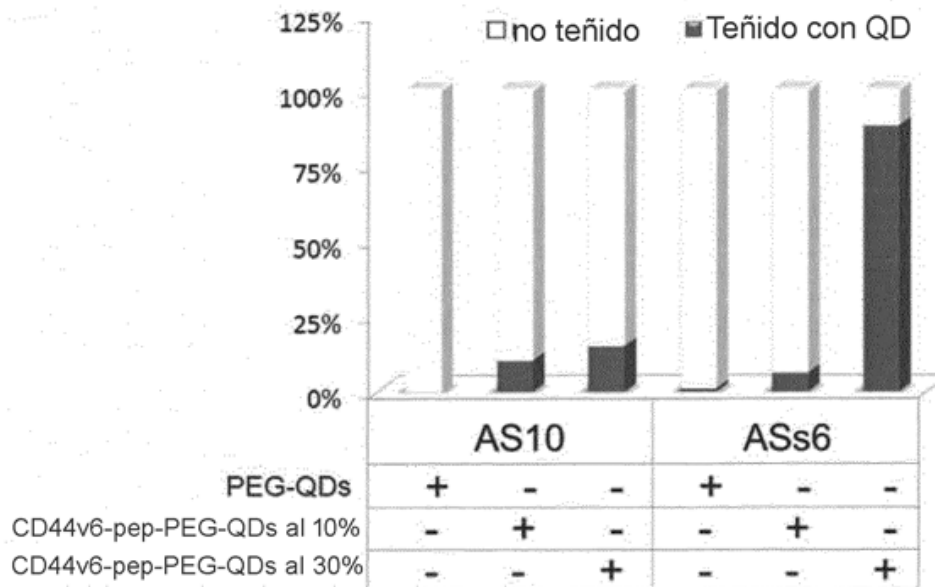


Figura 28 (continuación)

(B)



C

