

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 476**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011** **PCT/IB2011/003053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO12080822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011** **E 11849571 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 2654769**

54 Título: **Péptido antitumoral derivado de una región determinante de complementariedad de un anticuerpo monoclonal humanizado contra el transportador NaPi2B**

30 Prioridad:

14.12.2010 US 422856 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2021

73 Titular/es:

RECEPTA BIOPHARMA S.A. (100.0%)
Rua Tabapua 1123 cj. 36
04533-014 Sao Paulo - SP, BR

72 Inventor/es:

TRAVASSOS, LUIZ, RODOLPHO, RAJA,
GABAGLIA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 804 476 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

Péptido antitumoral derivado de una región determinante de complementariedad de un anticuerpo monoclonal humanizado contra el transportador NaPi2B

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. Ser. N.º 61/422,856, presentada el 14 de diciembre de 2010.

CAMPO

[0002] El presente objeto se refiere a péptidos biológicamente activos. En particular, el presente objeto proporciona nuevos péptidos antitumorales derivados de una región determinante de complementariedad de un anticuerpo monoclonal humanizado contra el transportador NaPi2B, y a composiciones farmacéuticas y métodos para inhibir o tratar un tumor o cáncer.

ANTECEDENTES

[0003] A nivel mundial, varios carcinomas (cánceres) se destacan como los principales asesinos, con millones de personas que mueren de cáncer cada año.

[0004] Esta enfermedad está caracterizada por la proliferación de células anormales o neoplásicas derivadas de un tejido normal, que forma una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células anormales y la generación de células malignas que se extienden finalmente a través de la sangre o el sistema linfático a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes (metástasis). Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica a partir de un carcinoma es fatal.

[0005] Debido a las tasas de recurrencia y a los efectos secundarios del tratamiento actual contra el cáncer, existe una gran necesidad de nuevos agentes terapéuticos capaces de inhibir el crecimiento celular neoplásico. En este escenario, las moléculas de inmunoglobulina (Ig) (tanto IgM como IgG) se han ido proporcionando recientemente como fuentes de péptidos bioactivos que pueden mostrar actividades antimicrobianas, antivirales y antitumorales diferenciales *in vitro* e *in vivo* (Polonelli et al. *PLoS One*. 3(6):e2371,2008; Magliani et al., *Curr Med Chem*. 6(18):2305-23,2009). Dicha distribución interna de secuencias de aminoácidos bioactivos es paralela a la de otras secuencias peptídicas expresadas en receptores de inmunidad nativa (Litman et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 866-879,2005). Sin embargo, no hay ninguna similitud estructural entre ellas. Los péptidos bioactivos con tamaños que van desde 10aa hasta 20aa se obtuvieron a partir de los dominios hipervariables de la región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), a partir de las secuencias que incluyen aminoácidos marco y CDR, e incluso a partir de las regiones constantes de Ig. Para evaluarse, se usaron preparaciones sintéticas de péptidos que generalmente estaban amidadas en el aminoácido C-terminal. Mientras que la bioactividad es generalmente independiente de la especificidad del anticuerpo, CDR3 de V_H puede compartir las propiedades aglutinantes al antígeno del anticuerpo original. Esto es especialmente cierto cuando el antígeno es una secuencia peptídica y menos cuando es un carbohidrato. Los péptidos CDR3 de cadena pesada que actúan como el anticuerpo original se denominan "microanticuerpos (=microAbs)".

[0006] La conformación de los péptidos V_H CDR3 (H3) fue revisada por Morea et al. (*J. Mol. Biol.*, 275: 269-294,1998). A diferencia de las estructuras canónicas de los otros cinco CDRs (H1, H2, L1, L2, L3), los bucles H3 tienen varios tamaños flanqueados por C⁹² y G¹⁰⁴ según la enumeración de Kabat et al. (*Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª edición, Public Health Service, N.I.H., Washington, DC., 1991) en secuencias extendidas de 10 a 22 aminoácidos.

[0007] A continuación se describe un ejemplo de un V_H CDR3 bioactivo identificado en un anticuerpo monoclonal (mAb). Usando el melanoma anti-B16F10 mAb A4 (Dobroff et al., *Hybrid. Hibridomics* 21: 321-331,2002), todos los seis CDRs se evaluaron en forma de péptidos sintéticos para determinar la citotoxicidad. Los péptidos H3 extendidos lineales y cíclicos, unidos a células tumorales, compitieron con mAb A4 para la unión y estos fueron citotóxicos en las células que expresan protocadherina β-13, pero no en las células de leucemia HL-60 que no la expresan (Dobroff et al., *Translat.Onc.*, 3: 204-217,2010). La ventaja de usar microAbs es su pequeño tamaño, lo que facilita la realización del análisis de la estructura-función y su accesibilidad a sitios de reacción complejos.

[0008] Las secuencias peptídicas internas en inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) pertenecen a regiones constantes y variables. Los CDRs, o las secuencias de reconocimiento de antígenos, aunque se consideran dominios hipervariables, pueden ser compartidos individualmente por diferentes inmunoglobulinas o anticuerpos. Dicha similitud entre los anticuerpos puede involucrar a todos los CDRs (cada uno en una familia de moléculas de Ig) con la excepción de CDR V_H 3. Este CDR tiende a ser único para un anticuerpo dado en su secuencia C⁹²-G¹⁰⁴ original.

[0009] Mates et al obtuvieron, en 1987, una murina monoclonal IgG1 llamada MAb MX35 al inmunizar ratones con una mezcla de cuatro muestras de carcinoma de ovario fresco. Esto mostró reactividad con aproximadamente el 90 % de los cánceres epiteliales de ovarios humanos y un número limitado de tejidos normales según lo determinado por la inmunohistoquímica (Mattes et al., *Cancer Res.* 47: 6741-6750,1987). Se ha demostrado que la MX35 MAb también reacciona con las líneas celulares de carcinoma de pulmón y renal, pero no con la mayoría de las otras líneas celulares de carcinoma, así como con las líneas celulares derivadas de melanomas, astrocitomas, sarcomas, teratocarcinomas, choriocarcinomas y tumores hematopoyéticos. Esta reaccionó con 5/5 muestras de células ascíticas de carcinoma de ovario fresco por inmunofluorescencia, con 3/6 quistes benignos y 18/18 carcinomas de tejido sólido por tinción con inmunoperoxidasa de secciones congeladas (Mattes et al., *Cancer Res.* 47: 6741-6750,1987).

[0010] Posteriormente, se estudió la localización y la biodistribución de anticuerpos murinos madiomarcados en pacientes con carcinoma de ovario en ensayos clínicos de fase I. Se ha demostrado que F(ab') de MAb MX35 se localiza en depósitos de carcinoma de ovario micrometastásico en la cavidad peritoneal (Finstad et al., *Clin Cancer Res.* 3(8):1433-1442,1997). La MAb MX35 y sus fragmentos marcados con el nucleído que emite partículas alfa ²¹¹astatina (At-a) mostraron una alta eficacia en el tratamiento del crecimiento tumoral micrometastásico en un modelo de ratón desnudo de cáncer de ovario humano (Elgqvist et al., *J Nucl Med.* 46 (11): 1907-15,2005). Además, la MX35 MAb ha mostrado una localización tumoral selectiva eficiente *in vivo* como lo indicado por la formación de imágenes PET y la histología. También se dirigió a tumores en pacientes con cáncer de ovario sin eventos adversos graves informados (Hultborn et al., *Cancer Biother Radiopharm* 21: 373-381,2006).

[0011] Más recientemente, se obtuvo una versión humanizada de MX35 (denominada huMX35 o RebMab200) y está descrita en una solicitud de patente internacional presentada el 9 de enero de 2009 (PCT/US2009/000576).

[0012] A lo largo de esta especificación, se hace referencia a varias publicaciones científicas y patentes o solicitudes de patente publicadas.

RESUMEN

[0013] Un objetivo del presente objeto es identificar y proporcionar péptidos capaces de inhibir el crecimiento de células neoplásicas, tales como las células cancerosas. Se ha descubierto que los péptidos derivados del anticuerpo monoclonal humanizado RebMab200 (huMX35) afectan al crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares tumorales humanas y también inhiben el crecimiento metastásico *in vivo* en un modelo singénico. Se ha descubierto que los péptidos se dirigen a las células cancerosas que imprimen respuestas significativas dependientes de la dosis, que van desde la hiperadherencia hasta la inhibición de la migración de células, traducidas además en la inhibición de la invasión de células y la metástasis.

[0014] Por consiguiente, un aspecto del presente objeto es proporcionar un péptido antitumoral aislado o sintético que comprende una secuencia de aminoácidos derivados de la región determinante de complementariedad de un anticuerpo monoclonal humanizado RebMab200, como se identifica por la SEQ ID N° 3, o un derivado del mismo. El derivado de SEQ ID N° 3 puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos: 8, 9 y 14-33. Los presentes péptidos muestran actividad antitumoral incluso contra células tumorales que no reaccionarían con mAb MX35, tales como el melanoma, y se pueden usar como un activo en una composición farmacéutica o un método para inhibir el crecimiento tumoral o tratar un tumor o cáncer.

[0015] Por consiguiente, otro aspecto del presente objeto es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda uno o más de los péptidos antitumorales y un portador farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto más del presente objeto es proporcionar péptidos para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral o tratar un cáncer, que comprende administrar a un sujeto necesitado una cantidad efectiva de los péptidos antitumorales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016]

La figura 1A es una representación gráfica del efecto de RB9 de la adhesión celular en el murino B16F10-Nex2.1.

La figura 1B es una representación gráfica del efecto de RB10 de la adhesión celular en el murino B16F10-Nex2.1.

La figura 1C es una representación gráfica del efecto de RB9 de la adhesión celular en el glioblastoma U87MG humano.

La figura 1D es una representación gráfica del efecto de RB10 de la adhesión celular en el glioblastoma U87MG humano.

La figura 2A es una representación gráfica del efecto de RB9 de la adhesión celular en el cáncer de mama SKBR3 humano.

La figura 2B es una representación gráfica del efecto de RB10 de la adhesión celular en el cáncer de mama SKBR3 humano.

La figura 2C es una representación gráfica del efecto de RB9 de la adhesión celular en el melanoma A2058 humano.

La figura 2D es una representación gráfica del efecto de RB10 de la adhesión celular en el melanoma A2058 humano.

La figura 3A es una representación gráfica del efecto de RB9 de la adhesión celular en células tumorales cervicales SiHa humanas.

La figura 3B es una representación gráfica del efecto de RB10 de la adhesión celular en células tumorales cervicales SiHa humanas.

La figura 4A es una representación gráfica del efecto de RB9 de la adhesión celular en células tumorales de colon HCT humanas.

La figura 4B es una representación gráfica del efecto de RB10 de la adhesión celular en células tumorales de colon HCT humanas.

La figura 5 muestra los efectos antitumorales *in vivo* de RB9 y RB10 en células de melanoma B16F10-Nex2, que se trataron con control, un microanticuerpo real de un antimelanoma citotóxico mAb (A4 H3), RB9 y RB10.

La figura 6 es una representación gráfica de nódulos de melanoma pulmonar reducidos por el tratamiento de RB9 y RB10 en comparación con el control y A4 H3.

La figura 7A es una representación gráfica de una citotoxicidad leve de RB9 a las células HL-60 de leucemia humanas medidas por azul de tripán.

La figura 7B es una representación gráfica de una citotoxicidad leve de RB9 a células HL-60 de leucemia humana medidas mediante el ensayo MTT.

La figura 8A es una representación gráfica de la falta de citotoxicidad de RB9 a células tumorales ováricas OVCAR-3 humanas medidas por azul de tripán.

La figura 8B es una representación gráfica de la falta de citotoxicidad de RB9 a células tumorales ováricas OVCAR-3 humanas medidas mediante el ensayo MTT.

La figura 9 es una representación gráfica de efectos adherentes celulares por los derivados de RB10 para las series de escaneo de alanina: RB10a, RB10 A1, RB10 A3, RB10 A4, RB10 A5, RB10 A6 y RB10 A8, cada uno a una concentración de 1 mM, en comparación con el control y RB10.

La figura 10A es una representación fotográfica de la producción *in vitro* de superóxido de anión en células tumorales B16F10-NEx2 no tratadas (control).

La figura 10B es una representación fotográfica de la producción *in vitro* de superóxido de anión en células tumorales B16F10-NEx2 tratadas con H₂O₂ (positivo).

La figura 10C es una representación fotográfica de la producción *in vitro* de superóxido de anión en células tumorales B16F10-NEx2 tratadas con RB10.

Las figuras 11A-11C son representaciones gráficas de la espectrometría de masas por HPLC para la vida media de RB9.

La figura 11A es una representación gráfica de la espectrometría de masas por HPLC de plasma humano no tratado.

La figura 11B es una representación gráfica de la espectrometría de masas por HPLC de plasma humano tratado con RB9, a las 0 horas.

La figura 11C es una representación gráfica de la espectrometría de masas por HPLC de plasma humano tratado con RB9, a las 24 horas.

La figura 12 es una representación gráfica del 50 % de la degradación del péptido RB9 en el plasma humano después de 2 horas.

La figura 13A es una representación fotográfica de la migración de células de melanoma B16F10-Nex2 en control, a las 0 horas (izquierda) de hora y a las 24 horas (derecha).

La figura 13B es una representación fotográfica de la migración de células de melanoma B16F10-Nex2 inhibidas por el tratamiento con RB10 500 µM, a las 0 horas y a las 24 horas.

La figura 14 es una representación gráfica de la inhibición de la migración dependiente de la dosis de RB10 en células de melanoma B16F10-Nex2 murinas.

La figura 15 es una representación fotográfica de la inhibición parcial de RB10 del crecimiento de células de melanoma B16F10-Nex2 murinas, después de 12 horas de incubación.

La figura 16A es una representación gráfica de la inhibición completa de la migración de células B16F10-Nex2 por RB9 y la inhibición parcial por RB9 codificado, RB9M1, RB9 M2, RB9 M3 y RB9 M4.

La figura 16B es una representación gráfica de la inhibición completa de la migración de células B16F10-Nex2 por RB9 y la inhibición parcial por RB9 M5.

La figura 16C es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células B16F10-Nex2 por RB9 Sc2 y Rb9 Sc3.

La figura 16D es una representación gráfica de la inhibición completa de la migración de células B16F10-Nex2 por RB10 y RB10 M3 y la inhibición parcial por RB10 codificado y RB10 M4.

La figura 16E es una representación gráfica de la no inhibición de la migración de células B16F10-Nex2 por RB10 A1.

La figura 16F es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células B16F10-Nex2 por RB10 M1, RB10 A3, RB10 A4, RB10 A6 y RB10 A8.

La figura 17A es una representación gráfica de la inhibición completa de la migración de células A2058 de melanoma humano por RB9.

La figura 17B es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células U87 de glioblastoma humano por RB9.

La figura 17C es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células HCT de cáncer de colon humano por RB9.

La figura 17D es una representación gráfica de la no inhibición de la migración de células SiHa de cáncer de cuello de útero humano por RB9.

La figura 17E es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células OVCAR-3 de cáncer de ovario humano por RB9.

La figura 17F es una representación gráfica de la inhibición completa de la migración de células SKBr-3 de cáncer de mama humano por RB9.

La figura 18A es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células U87 de glioblastoma humano por RB10.

La figura 18B es una representación gráfica de la inhibición parcial de la migración de células U87 de glioblastoma humano por RB10 M3.

La figura 18C es una representación gráfica de la inhibición casi completa de la migración de células SiHa de cáncer de cuello de útero humano por RB10 M3.

La figura 18D es una representación gráfica de la inhibición casi completa de la migración de células HeLa de cáncer de cuello de útero humano por RB10 M3.

La figura 19A es una representación gráfica de la no inhibición de fibroblastos murinos 3T3 por RB9.

La figura 19B es una representación gráfica de la no inhibición de la migración de fibroblastos humanos primarios de FibroRP por RB9.

La figura 19C es una representación gráfica de la no inhibición de la migración de fibroblastos humanos primarios T75 por RB9.

La figura 20 es una representación gráfica de la inhibición dependiente de la dosis de RB9 de la invasión de células de melanoma B16F10-Nex2 murinas a través de Matrigel.

La figura 21 es una representación gráfica del efecto no hemolítico de RB10 M3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0017] Las siguientes definiciones sirven para proporcionar una comprensión clara y consistente de la especificación y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que hay que dar a dichos términos.

[0018] Mediante la frase "citotoxicidad de células tumorales" se hace referencia a diferentes efectos, que incluyen la inhibición del crecimiento, la detención del ciclo celular, la inhibición de la motilidad celular, el aumento de la adherencia celular, la inhibición de la invasión de células a través de un sustrato matricial, la muerte celular inducida por el receptor, la interferencia en el metabolismo celular y las vías de señalización que conducen a la senescencia o la muerte. Estos efectos se pueden estudiar *in vitro* o *in vivo*.

[0019] El término "péptido", como se usa en este caso, significa un compuesto que está formado por dos o más aminoácidos unidos por enlaces covalentes que se forman por la eliminación de una molécula de H₂O del grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo del siguiente aminoácido. Para los fines del presente objeto, un péptido puede estar en una matriz lineal o cíclica de residuos de aminoácidos, es decir, los extremos del péptido lineal o las cadenas laterales de aminoácidos dentro del péptido pueden estar unidos, por ejemplo, por un enlace químico.

[0020] El término "aislado", para los fines del presente objeto, se refiere a un estado de materiales biológicos (por ejemplo, ácido nucleico, péptido o proteína) que se han eliminado de su entorno original (el entorno en el que están presentes de manera natural), o el estado donde existen materiales por separado del entorno original. Por ejemplo, un péptido presente en estado natural en una planta o un animal no está aislado; sin embargo, el mismo péptido separado de los aminoácidos adyacentes en los que está presente de manera natural se considera "aislado". Los términos "péptidos aislados", para los fines del presente objeto, pueden incluir aquellos preparados o sintetizados por un método conocido que corresponde a los péptidos naturales.

[0021] La frase "péptido sintético", para los fines del presente objeto, se refiere a un péptido preparado por una reacción química conocida de aminoácidos o por aislamiento y purificación de un material biológico, como se ha descrito anteriormente.

[0022] La frase "correspondiente a" se utiliza, en este caso, para referirse a secuencias similares u homólogas, si la posición exacta es idéntica o diferente de la molécula con la que se mide la similitud u homología. Una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos puede incluir espacios. Por lo tanto, el término "correspondiente a" se refiere a la similitud de la secuencia, y no a la numeración de los residuos de aminoácidos o bases de nucleótidos.

[0023] El término "derivado(s)" de un péptido usado aquí se refiere a un péptido que incluye variaciones de, por ejemplo, modificación, sustitución, delección y/o adición en su secuencia de aminoácidos, hechas con respecto a un péptido de referencia, que retiene una relación identificable al péptido de referencia. La modificación puede incluir modificación química mediante, por ejemplo, glicosilación, PEGilación, alquilación de PEG, alquilación, acetilación, amidación, glicosilfosfadilinositalización, farnesilación, ribosilación de ADP, sulfación, fijación lipídica, hidroxilación, y/o fosforilación. Este término se entiende como intercambiable con el término "análogo funcional".

[0024] Como se utiliza en este caso, los términos "administrar", "administración," y términos similares, se refieren a cualquier método que, en la práctica médica adecuada, suministra la composición actualmente provista a un sujeto de tal manera que proporcione un efecto terapéutico. Un aspecto del presente objeto proporciona la administración intravenosa de una cantidad terapéuticamente efectiva de la presente composición a un paciente que lo necesite.

[0025] Como se usa en este caso, el término "tratar" incluye profilaxis de un tumor o cáncer en un paciente o un sujeto que tiene una tendencia a desarrollar dicho tumor o cáncer, y la mejora o eliminación del tumor o cáncer desarrollado una vez que se ha establecido, o el alivio de los síntomas característicos de dicho cáncer.

[0026] Como se usa en este caso, los términos "tumor" o "cáncer" se refieren a todos los tipos de tumor o cáncer. En algunas formas de realización, el término "tumor" se refiere a carcinomas de ovario, de pulmón, renal o de colon, glioblastomas, melanomas, astrocitomas, sarcomas, teratocarcinomas, coriocarcinomas o tumores hematopoyéticos. Asimismo, el término "cáncer" se refiere a cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer intestinal, cáncer de esófago y de estómago, cáncer de cabeza y de cuello, o leucemia. Los términos "tumor" y "cáncer" pueden ser intercambiables entre sí.

[0027] Como se usa en este caso, el término "sujeto" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea el diagnóstico, el pronóstico o la terapia, por ejemplo, un humano. El término se puede usar para referirse a un "paciente".

[0028] Como se usa en este caso, los términos "portador", "excipiente", o "diluyentes" se refieren a cualquier componente de una composición farmacéutica que no sea la sustancia farmacológica. Por consiguiente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un relleno líquido no tóxico, inerte, semisólido, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación de cualquier tipo, o sencillamente a un medio acuoso estéril, como una solución salina. Algunos ejemplos de los materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta, gelatina, talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol, polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato etílico y laurato etílico, agar; agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica, solución de Ringer; soluciones tampón de alcohol etílico y fosfato, así como otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas.

[0029] El agente activo se administra preferiblemente en una cantidad efectiva. Como se usa en este caso, la frase "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos excesivos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera actualmente descrita. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva," puede ser una cantidad suficiente del agente activo para provocar la regresión del tumor, o al menos detener parcialmente la tumorigénesis y la metástasis en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. La cantidad real administrada, y la tasa y el tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la condición que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, el tiempo, etc., es responsabilidad de los médicos generales o especialistas, y generalmente tiene en cuenta el trastorno que se va a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por médicos. Se pueden encontrar ejemplos de técnicas y protocolos en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

[0030] A lo largo de la solicitud, las descripciones de varias formas de realización usan el término "que comprende", que será entendido por un experto en la materia de manera que, en algunos casos específicos, una realización puede describirse alternativamente usando el lenguaje "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

[0031] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece el objeto actualmente descrito.

[0032] Con el fin de comprender mejor las instrucciones actuales y de ninguna manera limitar el alcance de las instrucciones, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones, y otros valores numéricos usados en la especificación y las reivindicaciones, se deben entender como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se deseen obtener. Como mínimo, cada parámetro numérico debería al menos ser interpretado a la luz del número de dígitos significativos proporcionados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias.

Preparación de péptidos

[0033] Los péptidos bioactivos descritos actualmente (SEQ ID NOs: 1-6) con tamaños menores de 30 o 25 aminoácidos se pueden aislar o separar de los dominios hipervariables de la región determinante de complementariedad (CDR) del RebMab 200 (huMX35), que está descrita en la PCT/US2009/000576, con un método conocido para aislar, separar y purificar péptidos bioactivos, y pueden modificarse aun más. Los péptidos actualmente descritos también se pueden preparar mediante síntesis química o fabricación usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, los péptidos se pueden obtener mediante métodos que usan azida, cloruro de ácido, anhídrido de ácido, anhídrido de ácido compuesto, DCC, éster activado, reactivo de Woodward K, carbonildiimidazol, desoxidación, DCC/HONB, reactivo de BOP, etc., como se conoce en la técnica. Además, se pueden preparar mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado.

[0034] Después de dicha reacción química, los péptidos se pueden separar y purificar mediante un método de purificación conocido. Un ejemplo de dichos métodos de purificación puede incluir una combinación de extracción por solvente, destilación, cromatografía en columna, cromatografía líquida, recristalización y similares.

[0035] Además, los sistemas de expresión recombinante en *E. Coli* se pueden usar para expresar los péptidos descritos actualmente como proteínas de fusión, con un sitio de escisión enzimática específico, por ejemplo, enterocinas. Posteriormente, las bacterias se rompen y se centrifugan y la sopa resultante contiene la proteína de fusión. La proteína de fusión se puede cargar luego en una columna de afinidad específica, por ejemplo, una columna de Ni^{2+} o glutatión, para ser eluida. Después de la elución, la proteína de fusión purificada se somete a una reacción de escisión enzimática específica. Luego, el péptido se purifica a partir de la mezcla resultante por HPLC o cromatografía de intercambio iónico. Los métodos que implican la química convencional y analítica, las técnicas de biología molecular y celular se describen en detalle en muchas referencias públicamente conocidas, incluidas las enumeradas aquí.

[0036] El presente objeto proporciona el uso de un péptido de menos de 30 o 25 aminoácidos para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que padece cáncer. Un tamaño preferido de los péptidos antitumorales para su inclusión en una composición farmacéutica según el presente sujeto es como máximo de 30 o 25 aminoácidos, preferiblemente como máximo de 20 aminoácidos, con moléculas menores de 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos de longitud que son particularmente efectivos.

Derivados, biodistribución y farmacocinética

[0037] Los derivados (o análogos funcionales) de péptidos se pueden preparar mediante, por ejemplo, la sustitución de un residuo de L-aminoácido por un residuo de D-aminoácido u otros residuos no naturales. Al generar muchos derivados posicionales de una secuencia de aminoácidos original y la detección de una actividad específica, un péptido mejorado, por ejemplo, que comprende D-aminoácidos, se puede identificar y usar según el presente objeto.

[0038] Los derivados o análogos funcionales pueden ser compuestos peptidomiméticos que se asemejan funcional o estructuralmente al péptido original tomado como punto de partida, pero que, por ejemplo, están compuestos por aminoácidos o poliamidas de origen no natural. Con la "sustitución conservadora de aminoácidos", un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, y/o carga), de manera que es probable que el funcionamiento general de una secuencia peptídica que tiene dicha sustitución no se vea afectado gravemente. En la "sustitución de aminoácidos no conservativa", un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo con propiedades generalmente diferentes (tamaño, hidrofobicidad, y/o carga), de manera que el funcionamiento general de una secuencia peptídica que tiene dicha sustitución podría

verse gravemente afectado. También se puede proporcionar un derivado alterando sistemáticamente al menos un aminoácido del péptido de referencia. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante un escaneo de alanina (Ala-scan) y/o un análisis neto de sustitución, en el que cada aminoácido se sustituye, a su vez, por uno de los otros 19 aminoácidos (o 21, si se incluyen selenocisteína y pirrolisina). Con estos métodos se pueden generar muchos péptidos diferentes, basados en una secuencia de aminoácidos original, pero que contienen cada uno una variación o sustitución de al menos un residuo de aminoácido. De esta manera, muchas variantes posicionales de la secuencia de aminoácidos original se sintetizan y/o preparan enzimáticamente.

[0039] Los peptidomiméticos incluyen además pseudopéptidos que tienen sustitutos para los enlaces peptídicos entre los aminoácidos originales (véase, por ejemplo, la US 6,689,753). Tales sustitutos para enlaces peptídicos incluyen, pero de forma no limitativa, CH_2 , CH_2CH_2 , $\text{CH}=\text{CH}$, $\text{C}\equiv\text{C}$, CH_2NH , COCH_2 , CH_2S , CH_2SO_2 y NHCO .

[0040] En el caso de péptidos dirigidos directamente a células tumorales, se necesita una circulación sanguínea prolongada y, por lo tanto, se sintetizan derivados y/o conjugados para una mayor estabilidad. En una forma de realización del presente objeto, los péptidos se pueden modificar o conjugar adicionalmente para obtener péptidos estabilizados. La introducción de D-aminoácidos, o pseudoaminoácidos, y la ciclación de péptidos son las estrategias más comunes para aumentar la estabilidad de los péptidos (Adessi y Soto, *Curr Med Chem.* 9(9):963-78, 2002). Una modificación común es la de los péptidos cíclicos C-C (como se lleva a cabo en RBIOa de SEQ ID N.º: 3, lo que da lugar a RB9 de SEQ ID N.º: 8) que también se expresan en determinadas bibliotecas de presentación de fagos. Los péptidos se pueden alterar de otras maneras para evitar la degradación por endopeptidasas y exopeptidasas. Estas incluyen modificaciones N-terminales (acetilación, glicosilación) o C-terminales (amidación) y el uso de aminoácidos no naturales (por ejemplo, aminoácidos β -amino y α -trifluorometilo) en sitios particularmente lábiles dentro de un péptido.

[0041] Arap et al. (*Science* 279: 377-380, 1998) han identificado tres motivos peptídicos principales que dirijan a los fagos hacia el desarrollo de tumores *in vivo*. El fago que transporta el motivo CDCRGDCFC a varios tipos de tumores, incluidos el carcinoma, el sarcoma, y el melanoma de una manera altamente selectiva, y el recorrido de referencia se inhibe específicamente por el péptido afín. Los péptidos capaces de mediar la localización selectiva de fagos en los vasos sanguíneos del cerebro y los riñones se han identificado y han mostrado una selectividad de hasta 13 veces para estos órganos. Uno de los péptidos mostrados por el fago de localización cerebral fue sintetizado y se demostró que inhibe específicamente la localización del fago homólogo en el cerebro (Pasqualini y Ruoslahti, *Nature* 380: 364-366, 1996; Pasqualini et al., *Nat. Biotechnol.* 15: 542-546, 1997). Estos experimentos, además de identificar objetivos específicos en tejidos tumorales para el reconocimiento de fagos, también han demostrado que los péptidos afines administrados sistémicamente reconocen los mismos objetivos, lo que implica también suficiente estabilidad *in vivo*. Prácticamente, cuando se cubrieron de glóbulos rojos fijados con glutaraldehído, el péptido causó la localización selectiva de células inyectadas por vía intravenosa en el tejido objetivo. En una forma de realización del presente objeto, se proporcionan derivados de péptido y/o conjugados para su uso en ensayos clínicos, que permiten una mayor estabilidad y una farmacocinética mejorada. Dichos derivados y/o conjugados se pueden sintetizar en base a las secuencias peptídicas establecidas en SEQ ID NOs: 1-6 según la divulgación, particularmente SEQ ID N.º 3 según la invención. Dichos derivados y/o conjugados se prueban para determinar la citotoxicidad de células tumorales y la inhibición de células tumorales de la migración y la metástasis. Una vez que se selecciona un derivado en función de la vida media aumentada *in vivo* y la actividad antitumoral, este se convierte en un candidato para ser probado en pacientes. En el caso de los péptidos antimetastásicos, se puede esperar que sea efectivo o útil en ensayos clínicos para pacientes a quienes se les extirpó su tumor primario, o están en la fase de compromiso de ganglios linfáticos o tienen un desarrollo tumoral limitado con metástasis regionales o están en proceso de quimioterapia. Los péptidos seleccionados con actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* deben ser evaluados, en paralelo, para determinar la biodistribución y la farmacocinética de péptidos *in vivo*.

[0042] En una forma de realización del presente objeto, los péptidos actualmente descritos se pueden evaluar para su biodistribución y su farmacocinética. Para estos estudios, los péptidos deberían ser marcados apropiadamente con biotina, radiactividad u otra etiqueta conveniente. Los péptidos biotinilados pueden ser reconocidos por estreptavidina en placas ELISA o por la unión a gotas de sefarosa-estreptavidina incubadas con fluidos corporales y homogenizados de tejido. La elución de péptidos biotinilados fuertemente unidos a placas multipocillos recubiertas con estreptavidina que se puede lograr por medio de acetonitrilo al 70 %, ácido fórmico al 0,5 %, 1 mM de solución acuosa de biotina, y los péptidos son identificados por LC-MS. Por ejemplo, en el caso de RebMab200 CDR H3, este se puede marcar fácilmente con ^{125}I , ya que tiene un residuo de tirosina (Y). Además, el residuo de cisteína N-terminal se puede usar para la biotinilación usando el reactivo de Pierce. También se pueden usar otras metodologías adecuadas dependiendo de la estructura del péptido bioactivo.

[0043] Otro método para la evaluación de la biodistribución y la unión específica de células tumorales es el uso del bacteriófago M13 como un vector de expresión. Por consiguiente, en una forma de realización del presente objeto, los péptidos actualmente descritos se pueden evaluar usando el bacteriófago M13 para su biodistribución y la unión específica de células tumorales objetivo. El plásmido que genera el fago tras la transfección en *Escherichia coli* se puede diseñar de manera que el oligonucleótido que codifica el péptido se fusione con esa proteína codificante.

También se puede construir una serie de péptidos análogos para ser expresados por fagos usando varios oligonucleótidos. La distribución de fagos *in vivo* puede ser seguida por la valoración viral.

[0044] La farmacocinética y la biodistribución de péptidos y la absorción resultante en el tumor y los tejidos normales se pueden alterar tanto por el tamaño molecular como por la especificidad del ligando, donde el tamaño molecular afecta a la farmacocinética y a la absorción de órganos de una manera predecible. Se puede lograr un mayor tamaño molecular mediante la conjugación del péptido con polietilenglicol (PEGilación) o albúmina sérica. En una forma de realización del presente objeto, los péptidos se pueden conjugar. Como las proteínas más grandes (>50 kDa) no son filtradas por los riñones, PEG pueden servir para aumentar el radio hidrodinámico de los conjugados peptídicos y evitar su depuración renal. En ambos casos, es importante probar la actividad del péptido conjugado. Usando aminoácidos nucleofílicos (por ejemplo, cisteína o aminoácidos no naturales), PEG también se puede unir dentro de una secuencia peptídica, y si no inhibe la función peptídica, entonces las endopeptidasas también podrían excluirse de la degradación de residuos internos particularmente lábiles. En una forma de realización, los péptidos actualmente descritos pueden formar una proteína de fusión.

[0045] Las interacciones no covalentes también son posibles. La fusión de una secuencia de 20 aminoácidos en el extremo C-terminal de un factor anti-tisular Fab permitió la asociación no covalente con la albúmina *in vivo* y aumentó la vida media del Fab 40 veces en conejos (McFarland et al., *Cancer Res.* 67(1):254-61,2007). Se podría probar una construcción similar usando la Ig-CDR fusionada en el C-terminal con el péptido QRLMEDICLPWGCWEDDF que se va a asociar con la albúmina para aumentar la vida media del péptido efector. La fusión genética de péptidos al dominio Fc de la inmunoglobulina gamma humana (IgG) es un método alternativo para aumentar el tamaño molecular del péptido. La fusión de fc aprovecha la función de protección de IgG del receptor Fc neonatal (FcRn). La albúmina sérica, además de escapar del aclaramiento renal, también se recicla a través de FcRn mediante la unión a una superficie del receptor diferente a la IgG. La conjugación química de péptidos a albúmina por enlace covalente a la cisteína libre en la posición de aminoácidos 34 de la albúmina también es efectiva para extender la vida media del péptido terapéutico. Se está desarrollando una gama de otras estrategias para extender el periodo de permanencia en el plasma.

[0046] Los péptidos seleccionados por citotoxicidad tumoral directa no deberían ser inmunogénicos, y, por lo tanto, no pueden provocar una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizante ni ser presentados por MHC para la reactividad inmune celular o mediar las reacciones de hipersensibilidad. La incorporación de D-aminoácidos en la estructura peptídica debería disminuir tanto la escisión proteolítica como la reactividad inmune de los péptidos. También se debería verificar la inmunogenicidad de otros tipos de derivatización.

Actividad biológica

[0047] La "actividad biológica", en el contexto del presente objeto, se utiliza para referirse a la capacidad de los péptidos de recurrir a uno o más de los efectos citotóxicos enumerados aquí en relación con la definición de una "cantidad terapéuticamente efectiva". En una forma de realización específica, la "actividad biológica" es la capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación de células neoplásicas. Una actividad biológica preferida es la inhibición, incluida la ralentización o la detención completa, del crecimiento de una célula tumoral objetivo (por ejemplo, cáncer). Otra actividad biológica preferida es la actividad citotóxica que se produce en la muerte de la célula tumoral objetivo (por ejemplo, cáncer). Otra actividad biológica preferida es el aumento de la adherencia celular de las células neoplásicas.

[0048] La presente descripción en un aspecto proporciona un método para identificar uno o más péptidos; y/o determinar la actividad biológica de uno o más péptidos, que comprende, por ejemplo, cribar un péptido para determinar la actividad del péptido; analizar el resultado; y/o identificar uno o más péptidos que tienen actividad antitumoral. La eficacia de los péptidos contra un tipo de tumor particular se puede determinar *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, al someter células derivadas del tumor a la presencia o ausencia del péptido *in vitro* o al tratar un ratón expuesto a un tumor y al monitorizar las horas extraordinarias del tumor, como se describe, por ejemplo, en Polonelli et al. (*PLoS One.* 3(6):e2371,2008) y Dobroff et al. (*Translat. Onc.*, 3: 204-217,2010). En algunas formas de realización, los péptidos antitumorales son los derivados de RebMab200, particularmente los derivados de RebMab200 CDRs, particularmente de CDR H3 (SEQ ID N° 3), como se establece en SEQ ID NOs: 8,9 y 14-33. Preferiblemente, los péptidos son los que se establecen en SEQ ID N° 3 (RB10a), SEQ ID N° 8 (RB9), SEQ ID N° 9 (RB10), SEQ ID N° 16 (RB9 M3), SEQ ID N° 24 (RB10A4), SEQ ID N° 26 (RB10 A6) y SEQ ID N° 31 (RB10 M3).

[0049] La inhibición del crecimiento celular se refiere a una reducción significativa de las células objetivo, especialmente las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, y antineoplástico drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13.

[0050] Se dice que la adherencia celular de una línea celular es "aumentada" por un tratamiento peptídico si se observa un aumento de la unión celular después del cultivo celular y la incubación con diferentes concentraciones del péptido, en comparación con un control negativo.

[0051] En una forma de realización, se observa un efecto dependiente de la dosis: es decir, en una dosis inferior del péptido las células se separarían con tripsina/EDTA a velocidades inversamente proporcionales a la concentración peptídica.

[0052] Además, o en vez de, probar la eficacia del péptido contra un tipo particular de células tumorales *in vitro*, el médico puede probar los efectos antitumorales del péptido *in vivo*. Para las pruebas *in vivo*, las células derivadas de un tipo de tumor se inyectan en animales de laboratorio, tales como los ratones. Entonces los animales se monitorean para determinar si los tumores surgen en el sitio de la inyección o en cualquier otra parte del animal. Los animales de laboratorio que son tratados con un péptido después de la inoculación de células tumorales típicamente no desarrollarán tumores o reducirán significativamente la formación de tumores.

Composiciones farmacéuticas

[0053] Una composición que contiene una cantidad efectiva de los péptidos descritos aquí se puede administrar a un sujeto que requiere tratamiento. La composición se puede administrar por vía parenteral, intravenosa, tópica, oral, bucal, nasal, rectal, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

[0054] La composición del tratamiento se puede formular para ser compatible con la vía de administración. La composición se puede formular como comprimido, cápsula, solución, polvo, inhalante, loción, tintura, tableta, supositorio o parche transdérmico.

[0055] Una solución para la administración parenteral, intradérmica o subcutánea puede comprender, por ejemplo: un diluyente estéril, tal como agua, solución salina, glicerina, aceites fijos, polietilenglicoles, propilenglicol u otros solventes sintéticos; un agente antibacteriano, tal como alcohol bencílico o parabenos de metilo; un antioxidante, tal como ácido ascórbico o bisulfito sódico; un agente quelante; un agente tampón, tal como acetato o fosfato. La solución se puede almacenar en ampollas, jeringas desechables o viales de plástico o de cristal.

[0056] Una formulación para la inyección o la administración intravenosa puede incluir un portador, que es un solvente o un medio de dispersión. Los portadores adecuados incluyen agua, solución salina fisiológica, agua bacterioestática, solución salina tamponada con fosfato (PBS) Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ), etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, glicol, propilenglicol y similares), y mezclas de los mismos. Estas composiciones deben ser estériles y fluidas para permitir la inyección. La fluidez se puede mantener con un recubrimiento, tal como lecitina o un tensioactivo. La contaminación microbiana se puede evitar mediante la inclusión de agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Los azúcares y los polialcoholes, tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico, se pueden usar para mantener la isotonicidad en la composición.

[0057] La esterilidad se puede asegurar mediante esterilización por filtración de la solución. Alternativamente, la solución se puede producir a partir de componentes que se esterilizaron por filtración individualmente. Un componente esterilizado por filtración puede secarse al vacío o liofilizarse para producir un polvo estéril. Dicho polvo se puede rehidratar antes de la inyección con una solución de portador estéril.

[0058] Las composiciones orales incluyen, por ejemplo: comprimidos; cápsulas; pastillas; suspensiones y soluciones. Las composiciones se pueden formar con un diluyente inerte o un portador comestible. Las cápsulas se pueden formular combinando un diluyente apropiado con un péptido o la formulación del mismo y llenando la cápsula con la mezcla. Los diluyentes comunes son almidones, tales como celulosa en polvo, o azúcares, tales como sacarosa, fructosa o manitol. Los comprimidos pueden ser elaborados por granulación húmeda o seca, por compresión o mediante otros métodos conocidos. Además del péptido/compuesto deseado, las composiciones para comprimidos pueden incluir, por ejemplo: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina o gelatina; un excipiente, tal como un almidón; un azúcar (por ejemplo, lactosa, fructosa, glucosa, metilcelulosa, etilcelulosa); una goma (por ejemplo, goma de tragacanto, acacia); un agente desintegrante (por ejemplo, ácido algínico, Primogel o almidón de maíz); un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio o Sterotes); un agente deslizante (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal); un agente edulcorante (por ejemplo, sacarosa o sacarina); un agente aromatizante (por ejemplo, menta, metilsalicilato o aroma de naranja); o cualquier compuesto de una naturaleza similar. Los polímeros biodegradables, tales como polid-D,L-lactida-co-glicólido o poliglicolato, se pueden usar como una matriz para retrasar la liberación de la composición.

[0059] Para la administración por inhalación, los compuestos pueden administrarse, por ejemplo, en forma de aerosol desde un dispensador de recipientes a presión, que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, o mediante otros métodos conocidos. Por ejemplo, la administración también puede ser transmucosa, por ejemplo, con un spray nasal o supositorio, o por medios transdérmicos, por ejemplo, como un ungüento, una pomada, un gel o una crema. Tales modos de administración pueden usar formulaciones que comprenden, por ejemplo, sales biliares y derivados de ácido fusídico.

[0060] También se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el péptido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol), polilactidas (Patente de EE.UU. N.º 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable, tal como DEPOT™ LUPRON (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D-(-)-ácido 3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten liberar moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

[0061] También se proporciona el uso de un péptido antitumoral, preferiblemente un derivado de RebMab200, para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer, preferiblemente un carcinoma metastásico.

Modo de administración y método de tratamiento

[0062] Los péptidos descritos aquí se pueden administrar, por ejemplo, mediante inyección en bolo, mediante infusión continua, por ejemplo, para prolongar el contacto con la región epidural o mediante otros métodos conocidos. El péptido se puede infundir durante cualquier periodo de tiempo. La dosificación y el tiempo de administración se pueden modificar según las necesidades del sujeto particular, por ejemplo, dentro de la estructura de protocolos clínicos estándar para tratar el dolor. El péptido se puede suministrar por vías intratecales y dentro del flujo sanguíneo. Además, se pueden usar bombas implantables o montables en el cuerpo para suministrar el péptido descrito aquí a una velocidad controlada. Alternativamente, la administración prolongada se puede lograr mediante depósitos conocidos en la técnica o formulaciones de liberación sostenida.

[0063] Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones peptídicas se pueden llevar a cabo con niveles de dosis y patrones seleccionados por el médico tratante. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de péptido suficiente para tratar eficazmente al paciente. La administración debería comenzar con la primera indicación de proliferación celular indeseable o poco después del diagnóstico y continuar hasta que los síntomas hayan disminuido sustancialmente y durante un periodo posterior. En casos bien establecidos de cáncer, se requerirán dosis de carga seguidas de dosis de mantenimiento.

[0064] Además, se proporciona un método para tratar o inhibir el crecimiento tumoral, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad efectiva de al menos un péptido antitumoral o un derivado o un análogo funcional del mismo que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOs: 1-33, junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable para el sujeto. Un tamaño preferido de un péptido antitumoral para su inclusión en una composición farmacéutica según el presente objeto es como máximo de 30 aminoácidos, preferiblemente como máximo de 20 aminoácidos, aunque moléculas más pequeñas de 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos de longitud pueden ser particularmente efectivas.

[0065] Se pueden combinar otros regímenes terapéuticos con la administración de los péptidos antitumorales del presente objeto. Por ejemplo, el paciente que se va a tratar con tales péptidos antitumorales también puede recibir radioterapia. Alternativamente, o además, se puede administrar un agente quimioterapéutico al paciente. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar según las instrucciones de los fabricantes o según lo determine empíricamente el médico experto. Los programas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir a la administración del agente antitumoral del presente objeto, o se puede suministrar simultáneamente con el mismo.

[0066] Puede ser deseable administrar anticuerpos también contra antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen a ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o al factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes asociados al cáncer se pueden coadministrar al paciente. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una forma de realización preferida, los agentes anticancerígenos se coadministran aquí con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar primero, seguido de la administración de un péptido antitumoral del presente objeto. También se contempla primero la administración simultánea o la administración del péptido antitumoral. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las usadas actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y los péptidos del presente documento.

Dosificación

[0067] Se debe determinar una dosificación apropiada para el tratamiento. La determinación de la cantidad o dosis requerida para tratar a un sujeto individual es una rutina para un experto en la materia, por ejemplo, un médico, farmacéutico o investigador.

[0068] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un péptido antitumoral del presente documento dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, de la terapia precedente, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al agente, y de la discreción del médico tratante. El péptido se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para la terapia humana. La gradación interespecies de dosis efectivas se pueden realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-96.

[0069] También se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de los péptidos y/o las formulaciones de los péptidos. Los protocolos rutinarios están disponibles para determinar la LD50 (la dosis letal en el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población) en animales no humanos. El índice terapéutico se mide como la relación de LD50/ED50. Las relaciones adecuadas incluyen, por ejemplo, relaciones superiores a aproximadamente 2, 5, 10, 50 o 100. Se pueden determinar los compuestos, las formulaciones y los métodos de administración con altos índices terapéuticos, ya que dichos tratamientos tienen poca toxicidad a las dosificaciones que proporcionan alta eficacia. Se pueden usar compuestos con efectos secundarios tóxicos o indeseables si hay medios disponibles para suministrar el compuesto al tejido afectado, mientras que se minimiza la herida al tejido no afectado, por ejemplo, tejido endotelial. En una forma de realización, los péptidos actualmente descritos muestran un valor de ED50 de aproximadamente 920 a 930 μM (véase la figura 7).

[0070] Al formular un rango de dosificación para un uso en humanos, la dosis efectiva de una preparación de péptidos se puede estimar a partir de estudios con animales de laboratorio, por ejemplo, como se describe a continuación. Por ejemplo, las dosificaciones terapéuticamente efectivas en ensayos de cultivo celular incluyen, por ejemplo, aproximadamente de 0,1 mM a 1 mM, preferiblemente de 0,25 mM a 1 mM del péptido, y los intervalos entre ellas. Una dosis se puede formular en un animal para lograr una concentración circulante de inhibidor en plasma que se encuentra en este rango. Una dosis ejemplar produce una concentración plasmática que excede la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de un síntoma), como se determina en ensayos de cultivo celular. La concentración plasmática circulante se puede determinar, por ejemplo, al obtener una muestra de sangre, y al analizar la muestra usando un ensayo ELISA específico basado en anticuerpos o con cromatografía líquida de alto rendimiento o espectroscopia de masas.

[0071] Alternativamente, la dosis se puede estimar a partir de pruebas en un modelo animal, como se describe a continuación. El alivio de los síntomas se observa cuando los ratones reciben un péptido o una composición farmacéutica a una dosis de al menos aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta 10 mg/kg. Por ejemplo, la dosis puede ser de 6mg/kg para un péptido libre, no derivatizado o no conjugado, susceptible a hidrólisis plasmática y acalaramiento renal. La interrelación de dosificaciones para animales y humanos (basada en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) está descrita, por ejemplo, en Freireich et al., *Cancer Chemoter. Rep.* 1966, 50, 219. El área de superficie corporal se puede determinar aproximadamente a partir de la altura y le peso del paciente. Véase, por ejemplo, *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, Nueva York, 1970, 537. Una dosis efectiva para tratar a pacientes humanos no se puede estimar actualmente, porque dependerá de la estabilidad del derivado peptídico usado y su farmacocinética. El péptido se puede administrar con una frecuencia o continuamente para mantener una concentración local efectiva para reducir el dolor en el sujeto.

[0072] Dependiendo del método de administración, la dosis apropiada puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg/día}$ a aproximadamente 10 mg/kg/día. Además, teniendo en cuenta la baja naturaleza inmunogénica de péptidos pequeños, será posible dosificar hasta 100 mg/kg con péptidos pequeños, y en algunos casos, cuando se determina que la necesidad de tratamiento es aguda teniendo en cuenta la condición del sujeto que necesita tratamiento, de hasta 200 mg/kg, 500 mg/kg o incluso 1g/kg.

[0073] La dosis para un paciente se puede optimizar mientras el paciente está bajo el cuidado de un médico, farmacéutico o investigador. Por ejemplo, una dosis relativamente baja de los péptidos descritos se puede administrar inicialmente. El paciente se puede monitorear para detectar síntomas y sensación de dolor, como se describe a continuación. La dosis se puede aumentar hasta que se obtenga una respuesta apropiada. Además, el nivel de dosis específico para cualquier sujeto en particular puede variar dependiendo de la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, el índice de excreción y otros fármacos proporcionados en combinación.

[0074] Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLOS5 **Material y métodos**Preparación de líneas celulares tumorales y cultivo celular.

10 [0075] Se clonaron células de melanoma B16F10-Nex2.1 murino en la unidad de oncología experimental, Universidad Federal de São Paulo (UNIFESP). El Instituto Ludwig para la investigación del cáncer, São Paulo, Brasil, proporcionó células de melanoma humano (A2058), de carcinoma de colon humano (HCT-8), de carcinoma de mama humano (MCF-7, MDA y SKBR3), de carcinoma cervical humano (SiHa) y de carcinoma de ovario (OVCAR-3). Todas las líneas celulares se cultivaron a 37 °C, a una atmósfera húmeda y con el 5 % de CO₂, en el medio RPMI-1640 con 10 mM de ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES), 24 mM de bicarbonato sódico, 40 mg/L de gentamicina, pH 7,2 y 10 % de FCS. Las células HeLa (carcinoma cervical humano) fueron proporcionadas por el Dr. Hugo P. Monteiro, departamento de bioquímica, UNIFESP, y las células U87-MG (glioblastoma) fueron proporcionadas por el Dr. Osvaldo K.Okamoto, USP. Las células HeLa y U87-MG se mantuvieron en el medio DMEM suplementado como se ha indicado anteriormente.

20 Crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*

[0076] Los detalles del crecimiento celular tumoral *in vitro*, las pruebas de citotoxicidad, la determinación de células viables y los experimentos de protección *in vivo* con células B16F10 en un modelo metastásico de ratón se describen en Polonelli et al. (*PLoS One*. 3(6):e2371,2008) y Dobroff et al. (*Translat. Onc.*, 3: 204-217,2010).

25 Ensayo de migración de células

30 [0077] Para los estudios de migración, se distribuyeron 5 x 10⁵ o 10⁶ células en placas de 6 pocillos y se dejaron adherir durante 2 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Se cambió el medio de cultivo y se añadió el péptido a 500 µM durante toda la noche. La monocapa celular se "hirió" con una punta P1000 y se incubó durante 24 horas. Las imágenes de células no tratadas (control) y células tratadas con péptidos se capturaron con una cámara JENOPTIK. Los números de células (núcleos) se determinaron usando el *software* Pixcavator versión 5.0.

35 Ejemplo 1: Identificación y preparación de los péptidos

[0078] Se estudió la secuencia de RebMab 200 (huMX35) de la región variable (PCT/US2009/000576) para los dominios de CDR y se seleccionaron los péptidos correspondientes para la síntesis de péptidos.

40 [0079] Se sintetizaron siete (7) péptidos con alta pureza (>95 %) (adquiridos de Peptide 2.0 Inc. Chantilly, VA, EE.UU.).

RB8	AIYPGNGDTSYKQKFRG-NH ₂	(H2)	(SEQ ID N° 7)
RB9	CARGETARATFAYWGQGC-NH ₂	(H3)	(SEQ ID N° 8)
RB10	CARGETARATFAYWGQG-NH ₂	(H3)	(SEQ ID N° 9)
RB10a	CARGETARATFAYWGQG	(H3)	(SEQ ID N° 3)
RB11	GYTFTGYNIH-NH ₂	(H1)	(SEQ ID N° 10)
RB12	SASQDIGNFLN-NH ₂	(L1)	(SEQ ID N° 11)
RB13	YTSSLYS-NH ₂	(L2)	(SEQ ID N° 12)
RB14	QQYSKLPLT-NH ₂	(L3)	(SEQ ID N° 13)

[0080] Se sintetizaron cinco (5) péptidos derivatizados RB9 correspondientes a las secuencias a continuación. Los aminoácidos D-isoméricos, D-alanina (dA), D-citrulina (dCit), D-fenilalanina (dF), y D-arginina (dR) se introdujeron en los péptidos derivados RB9 y RB10.

45

RB9 M1	C(dA)RGETA(dCit)ATFAYWGQ(dA)C-NH ₂	(SEQ ID N° 14)
RB9 M2	C(dA)RGETA(dCit)AT(dF)AYWGQ(dA)C-NH ₂	(SEQ ID N° 15)
RB9 M3	C(dA)RGETARATFAYC-NH ₂	(SEQ ID N° 16)
RB9 M4	CARGETA(dCit)ATFAYWGQGC-NH ₂	(SEQ ID N° 17)
RB9 M5	C(dA)RGETARATFAYWGQGC-NH ₂	(SEQ ID N° 18)

[0081] Se sintetizaron tres (3) péptidos codificados RB9 correspondientes a las siguientes secuencias:

RB9 Scramble	CGTFEYRAQAGWAGRTAC-NH ₂	(SEQ ID N° 19)
RB9 Sc2	YWCRAAFTTEAGRACQGG-NH ₂	(SEQ ID N° 20)
RB9 Sc3	CFTARAGWYATEARGGQC-NH ₂	(SEQ ID N° 21)

[0082] Se sintetizaron otros seis (6) péptidos correspondientes a las series de escaneo de alanina de RB10 con las siguientes secuencias:

RB10 A1	AARGETARATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 22)
RB10 A3	CAAGETARATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 23)
RB10 A4	CARAETARATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 24)
RB10 A5	CARGATARATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 25)
RB10 A6	CARGEAAATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 26)
RB10 A8	CARGETAAATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 27)

- 5 [0083] El péptido C-terminal de RB10 (excluido el fragmento WGQG) con la siguiente secuencia también se sintetizó:

RB10 C-t	TFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 28)
----------	--------------------------	----------------

[0084] Se sintetizaron cuatro (4) péptidos RB10 derivados correspondientes a las secuencias:

RB10 M1	CARGETA(dCit)AT(dF)AYWGQ(dA)-NH ₂	(SEQ ID N° 29)
RB10 M2	CA(dR)GETA(dR)AT(dF)AYWGQ(dA)-NH ₂	(SEQ ID N° 30)
RB10 M3	C(dA)RGETARATFAYWGQG-NH ₂	(SEQ ID N° 31)
RB10 M4	C(dA)RGETA(dCit)ATFAYWGQ(dA)-NH ₂	(SEQ ID N° 32)

- 10 [0085] Se sintetizó un (1) péptido codificado RB10 correspondiente a la secuencia:

RB10 Scramble	CGTFEYRAQAGWAGRTA-NH ₂	(SEQ ID N° 33)
---------------	-----------------------------------	----------------

- 15 [0086] Brevemente, no se encontró ninguna actividad antitumoral para RebMab 200 CDRs L1, L2 L3 y H1. El CDR H2 amidado de RebMab 200 (SEQ ID N° 7) comparte hasta dieciséis (16) aminoácidos idénticos con fragmentos H2 similares de varios anticuerpos murinos de diversas especificidades. Sin embargo, no mostró ningún efecto antitumoral en contraste con la fuerte actividad previamente descrita para el CDR H2 de mAb C7 (IgM) que tiene una especificidad diferente y células de melanoma destruidas por la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis (Polonelli et al., *PLoS One*. 3(6): E2371).

- 20 [0087] El CDR H3 de RebMab 200 (SEQ ID N° 3) en una forma extendida que contiene la secuencia conservada WGXXG, comparte hasta el 82 % de aminoácidos idénticos con las secuencias de H3 de algunos otros anticuerpos. Sin embargo, la secuencia de H3 basada en Kabat GETARATFAY muestra una identidad parcial (8-9/10) o una identidad completa (9/9) con un número de proteínas de diversas fuentes, principalmente de organismos procarióticos, con muy pocas referencias a secuencias de Ig. Sorprendentemente, la secuencia de H3 extendida de RebMab 200 mostró efectos antitumorales incluso contra células tumorales que no reaccionarían a mAb MX35 (por ejemplo, melanoma), lo que sugiere que no actúa como un microanticuerpo y usa probablemente otro receptor de superficie celular para unirse a las células tumorales.

30 Ejemplo 2: Ensayo de adherencia celular

- 35 [0088] El tratamiento de células tumorales con péptidos RB9, RB10 y RB10a (SEQ ID NOs: 8, 9 y 3, respectivamente) hizo que las células mostraran un aumento dependiente de la dosis de la adherencia al sustrato (placas de 96 pocillos, RPMI con el medio de cultivo FCS al 10 %). A una concentración de 1 mM de péptido, la mayoría de las células tumorales mostraron hiperadherencia y no pudieron ser suspendidas incluso por tratamiento a largo plazo con tripsina/EDTA. En una dosis inferior, las células serían separados con tripsina/EDTA con índices

inversamente proporcionales a la concentración peptídica. Posiblemente, los péptidos RB9 y RB10 afectaron a la dinámica del citoesqueleto de las células, lo que indica una mayor adhesión celular. Dicha respuesta se observó en las células de melanoma B16F10-Nex2.1 murino, de glioblastoma U87MG humano, de melanoma A5028, de cáncer de mama SKBR3, cervicales SiHa y de cáncer de colon HCT (figuras 1, 2, 3 y 4).

[0089] Ambas células suspendidas y adherentes fueron viables como se muestra por tinción con azul de tripán y el ensayo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; un tetrazol amarillo], lo que indica que los péptidos no son directamente citotóxicos, pero estimulan fuertemente la adherencia celular de una manera que podría inhibir la migración y la invasión de las células tumorales. Los péptidos H1 (RB11, SEQ ID N° 10), H2 (RB8, SEQ ID N° 7), L1 (RB12, SEQ ID N° 11), L2 (RB13, SEQ ID N° 12), L3 (RB14, SEQ ID N° 13) no mostraron ninguna actividad antitumoral y se usaron como controles negativos.

Ejemplo 3: Efectos de los péptidos RB9 y RB10 en el melanoma murino y células de glioblastoma humano.

[0090] Las células B16F10-Nex 2.1 (5×10^3) y las células U87-MG (1×10^4) se cultivaron en placas de 96 pocillos y se incubaron con diferentes concentraciones de RB9 (SEQ ID N° 8) y RB10 (SEQ ID N° 9) de 0,01 a 1 mM (es decir, 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,7, 0,8 y 1 mM de RB9 y RB10 para células B16F10-Nex 2.1; y 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mM de RB9 y RB10 para células U87-MG). Después de 18 horas de incubación, se contaron las células viables separadas con tripsina/EDTA usando tinción de exclusión con azul de tripán. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. Los resultados se muestran en las figuras 1A a 1D.

Ejemplo 4: Efectos de RB9 y RB10 en cáncer de mama humano SKBR3 y en células A2058 de melanoma.

[0091] Las células SKBR3 (1×10^4) se cultivaron en placas de 96 pocillos y se incubaron con RB9 (SEQ ID N° 8) y RB10 (SEQ ID N° 9). Después de 18 horas de incubación, se contaron las células viables separadas con tripsina/EDTA usando tinción de exclusión con azul de tripán. Los ensayos se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. Las células de melanoma humano A2058 (1×10^4) se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una cámara humidificada con el 5 % de CO₂. Se añadieron a los pocillos medios frescos que contenían diferentes concentraciones peptídicas de RB9 y RB10 que oscilaban entre 0 y 1 mM (es decir, 0, 0,25, 0,5 y 1 mM) y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente se aspiraron los medios, las células se separaron con 30 µl/pocillo de tripsina-EDTA durante cinco minutos a 37 °C y se contaron las células viables a una cámara de Neubauer usando azul de tripán. Como se muestra en las figuras 2A-2D, el 50 % de las células fueron resistentes a la tripsina-EDTA a 630 y 610 µM de RB9 y RB10, respectivamente.

Ejemplo 5: Detección de células SiHa hiperadherentes tratadas con péptidos.

[0092] Las células SiHa viables (1×10^4)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una cámara humidificada con el 5 % de CO₂. El medio fresco que contenía diferentes concentraciones peptídicas de RB9 (SEQ ID N° 8) y RB10 (SEQ ID N° 9) que oscilaban entre 0 y 1 mM (es decir, 0, 0,25, 0,5 y 1 mM) se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 24 horas. Luego se aspiró el medio; las células se separaron con 30 µl/pocillo de tripsina-EDTA durante cinco minutos a 37 °C y se lavaron suavemente con PBS. Las células hiperadherentes se incubaron durante 4 horas con 0,5 mg/mL de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] en el medio fresco y los cristales de formazán se solubilizaron añadiendo 1 volumen de solución SDS al 10% durante la noche. La intensidad se midió usando un lector de placas a 570nm. Como se muestra en las figuras 3A y 3B, RB10 fue más efectivo que RB9 contra la línea celular SiHa; a 500 µM provocó que el 80 % y el 30 %, respectivamente, de células tumorales se volvieran resistentes a la tripsinización.

Ejemplo 6: Detección de células HCT hiperadherentes tratadas con péptidos.

[0093] Las células HCT viables (1×10^4)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas, siguiendo el mismo protocolo del ejemplo 5. Como se muestra en las figuras 4A y 4B, el efecto de RB10 (SEQ ID N° 9) fue similar a RB9 (SEQ ID N° 8) en la línea celular HCT, donde el 80 % de las células fue resistente a la tripsinización a 500 µM de péptido.

Ejemplo 7: Efectos antitumorales *in vivo* de RB9 y RB10.

[0094] Los péptidos RB9 y RB10, junto con el péptido apoptótico A4H3, un verdadero microanticuerpo de antimelanoma citotóxico mAb (A4) (Dobroff et al., *Translat.Onc.*, 3: 204-217,2010), se analizaron para determinar sus efectos protectores contra la colonización pulmonar mediante células de melanoma B16F10-Nex2 (2×10^5) inyectadas por vía intravenosa en ratones C57B1/6 (6 animales/grupo). Los péptidos se administraron intraperitonealmente (250 µg i.p.) los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 después de la exposición a las células tumorales. Los pulmones de los animales tratados con péptidos se muestran en la figura 5 después de 22 días de exposición al tumor. Como se observó, el tratamiento peptídico se interrumpió 10 días antes del sacrificio de los animales.

[0095] Los péptidos RB9 (SEQ ID N° 8) y RB10 (SEQ ID N° 9) se protegieron exitosamente contra el melanoma metastásico, lo que redujo significativamente la colonización pulmonar. En la figura 6 se muestra la protección *in vivo* mediante los péptidos RB9 y RB10 (y A4H3 control) contra la colonización pulmonar mediante células de melanoma B16F10-Nex2 (2×10^5) inyectadas por vía intravenosa en ratones C57Bl/6 (6 animales/grupo). Los otros 5 CDRs de RebMab200 (SEQ ID NOs: 7, 10, 11, 12, 13) no fueron protectores *in vivo*. Los péptidos se administraron de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y se determinó el número de nódulos pulmonares.

[0096] La protección por RB9 y RB10 se observó incluso cuando el tratamiento peptídico se interrumpió días 10 antes del sacrificio de animales, lo que sugiere un efecto temprano sobre la migración e invasión de células tumorales. Estos resultados apuntan a un amplio espectro de reactividad de estos péptidos más allá de lo establecido para huMX35.

[0097] Los péptidos RB9 y RB10 fueron levemente citotóxicos para las células HL-60 de leucemia humana que crecen en suspensión (figura 7) y fueron inactivos contra las células de cáncer de ovario OVCAR-3 (figura 8). Las células de cáncer de ovario tratadas con péptidos normalmente se separaron de tripsina/EDTA, a diferencia de las otras células tumorales evaluadas, lo que sugiere una falta de efecto de ambos péptidos en estas células. Dado que huMX35 se une a las células de cáncer de ovario OVCAR-3, pero no es directamente citotóxico para ellas (datos no mostrados), este experimento no proporciona evidencia de que RB9 y RB10 puedan representar microanticuerpos funcionalmente relacionados con el mAb original. Los experimentos de competición se realizaron usando la célula ELISA, pero RB10 reaccionó con un anticuerpo secundario (es decir, IgG antihumana de GE Healthcare); por lo tanto, se requerirá una metodología diferente para responder a la pregunta. Sin embargo, los péptidos RB9 y RB10 reaccionaron con un receptor expresado en células tumorales y afectaron fuertemente a la adhesión celular dependiente del citoesqueleto al sustrato. Dicha adhesión aumentada parece inhibir la metástasis, lo que es consistente con la inhibición de la colonización pulmonar por las células de melanoma tratadas con péptidos.

Ejemplo 8: Efecto de RB9 sobre células de leucemia humana.

[0098] Las células HL-60 viables (1×10^4)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas con diferentes concentraciones de RB9 (SEQ ID N° 8) que oscilaban entre 0 y 1 mM durante 24 horas. La viabilidad celular se midió directamente contando en una cámara de Neubauer con azul de tripán o se estimó mediante el ensayo MTT colorimétrico. Como se muestra en las figuras 7A y 7B, RB9 redujo en un 50 % la viabilidad celular a 920-930 μ M.

Ejemplo 9: Efecto de RB9 sobre células de carcinoma de ovario.

[0099] Las células OVCAR-3 viables (1×10^4)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas con diferentes concentraciones de RB9 (SEQ ID N° 8) que oscilaban entre 0 y 1 mM durante 24 horas. Las células se separaron con 30 μ l/pocillo de tripsina-EDTA durante cinco minutos a 37 °C y se contaron en una cámara de Neubauer con azul de tripán o se estimaron mediante el ensayo MTT colorimétrico. Como se muestra en la figura 8, RB9 tuvo un bajo efecto en este linaje sin una reducción significativa en la viabilidad mediante el ensayo MTT. A 1 mM de RB9, la mayoría de las células no se vieron afectadas por el efecto hiperadherente, como se muestra en las figuras 1-4.

Ejemplo 10: Series de escaneo de alanina y ensayo de adhesión celular.

[0100] El péptido RB10 (SEQ ID N° 9) se diseñó para reemplazar cada aminoácido mediante alanina usando la metodología Ala-scan, y así ayudar a evaluar el papel de cada aminoácido en el efecto biológico, específicamente en la hiperadherencia observada con 1 mM de péptido.

[0101] Para este fin, las células B16F10-Nex2 de melanoma viables (1×10^4)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas. Se añadieron medios frescos que contenían 1 mM de las series de escaneo de alanina para RB10 y se incubaron durante 24 horas. Las células tratadas se separaron con 30 μ l/pocillo de tripsina-EDTA durante cinco minutos a 37 °C y se lavaron suavemente con PBS. Las células se incubaron durante 4 horas con 0,5 mg/mL de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] en medios frescos y los cristales de formazán se solubilizaron añadiendo 1 volumen de una solución SDS al 10 % durante toda la noche. La intensidad se midió usando un lector de placas a 570 nm. Como se muestra en la figura 9, los derivados RB10 A4 (SEQ ID N° 24) y RB10 A6 (SEQ ID N° 26), así como el péptido RB 10a (con un extremo carboxílico) (SEQ ID N° 3), actuaron como lo hizo el péptido RB10 (SEQ ID N° 9), lo que indujo a una alta adherencia celular resistente a la tripsina/EDTA. Los derivados sustituidos con alanina RB10 A1 (SEQ ID N° 22), A3 (SEQ ID N° 23), A8 (SEQ ID N° 27), y menos efectivos A5 (SEQ ID N° 25), produjeron células que, a diferencia de RB10, normalmente se separaron cuando se trataron con 1 mM de péptido. El valor del 100 % para cada péptido representó las células tratadas que no habían sido tripsinizadas.

Ejemplo 11: Inhibición de la invasión de células tumorales.

[0102] Una suspensión de células B16F10-Nex2 2×10^5 en 500 μ l de RPMI se incubó con 0,5 mM de RB9 y se añadió a la cámara superior de un transpocillo de 8- μ M (Becton-Dickinson) precubierto con Matrigel (Becton-Dickinson). Como quimioatrayente, se utilizó FCS al 10 % en RPMI en la cámara inferior del transpocillo. Después de 24 horas a 37 °C en atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂, las células no invasivas se excluyeron con un hisopo, y las células que cruzaron la membrana se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Las células se contaron en cada membrana transpocillo, y los números de las células invasivas se expresan como porcentajes. El péptido RB9 (SEQ ID N° 8) pudo inhibir la invasión de células tumorales de Matrigel en un sistema transpocillo. La inhibición de la invasión de células B16F10-Nex2 mediante RB9 fue dependiente de la dosis con una inhibición del 60 % a 25 μ M de RB9 (figura 20).

Ejemplo 12: Producción mejorada de anión superóxido mostrada en el ensayo de dihidroetidio (DHE).

[0103] El efecto protector se mostró en un modelo singénico metastásico de melanoma murino cuando se administró por vía intraperitoneal y la notable hiperadherencia de células tratadas mostradas en pruebas *in vitro* sugiere que los péptidos RB9 (SEQ ID N° 8) y RB10 (SEQ ID N° 9) interfieren con la migración y la invasión de células al afectar a la dinámica del citoesqueleto de las células. Sobre la base de las interacciones internas de los componentes, tales como, la actina y los peróxidos en las células tumorales, que incluso conducen a la apoptosis, la producción de superóxido de anión en las células tumorales tratadas con RB10 se examinó mediante el ensayo de dihidroetidio (DHE).

[0104] Las células B16F10-Nex2 se trataron con 1 mM de RB10 durante 18 horas o 5 mM de H₂O₂ durante 20 minutos. Las células tratadas con péptido o H₂O₂ y las células no tratadas se incubaron entonces con DHE. La conversión de DHE a etidio por oxidación se observó usando microscopía de fluorescencia (Magnificación 600X).

[0105] La reacción con dihidroetidio fue positiva en estas células (figura 10).

Ejemplo 13: Estabilidad del péptido - Degradación del péptido RB9 por plasma humano.

[0106] Los péptidos tienen semividas variables en el plasma debido a la actividad proteolítica y la filtración renal, que son aspectos relevantes en la farmacocinética de los candidatos de fármaco. Para estudiar estos aspectos, el péptido RB9 (2mg) (SEQ ID N° 8), que es más soluble que RB10 (SEQ ID N° 9), se disolvió en 200 μ L de agua de MilliQ y se incubó con 1 mL de plasma humano a 37 °C y la cinética de degradación se siguió hasta 24 horas cuando se degradó todo el péptido.

[0107] Para analizar el péptido en HPLC y en el espectro de masas, se transfirió una alícuota de 200 μ L a un tubo Eppendorf nuevo y las proteínas se precipitaron con 20 μ L de ácido trifluoroacético durante 5 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 14,000 r.p.m., el sobrenadante fue analizado en un LC/ESI-MS (Waters). Las figuras 11A-11C muestran el pico de péptido de HPLC y del espectro de masas (0 horas) y su degradación total después de 24 horas.

[0108] Con respecto a los ensayos para determinar la degradación plasmática en el lapso de tiempo del péptido RB9, se monitorizó la degradación peptídica por plasma humano en HPLC y en los espectros de masas cada 30 minutos, como se ha descrito anteriormente (figura 12). Aproximadamente el 50 % de RB9 se escindió después de 2 horas de incubación a 37 °C.

[0109] A modo de comparación, RB8 se incubó igualmente en el plasma. La vida media del mismo fue inferior a 1 hora. El mismo método se puede usar para controlar la resistencia de los péptidos a la proteólisis plasmática después de los procedimientos de derivatización. La media vida de RB9 es comparable con las medias vidas de otros péptidos derivados de CDR estudiados anteriormente (Polonelli et al., *PLoS One*. 3(6): E2371,2008), que, sin embargo, permitieron una exposición suficiente en las células tumorales para tener efectos protectores *in vivo* en el modelo metastásico de ratón.

Ejemplo 14: Migración de células tumorales – Ensayo de cicatrización de heridas.

[0110] Las células B16F10-Nex2 viables (5×10^5)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 6 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 37 °C en una cámara humidificada con el 5 % de CO₂. Se usó una punta P1000 para herir la monocapa celular y la imagen se capturó inmediatamente (0 horas) usando una cámara (Jenoptik) con el *software* Progres 2.8. Después de 24 horas se obtuvo y grabó una nueva imagen del mismo campo (24 horas).

[0111] Las células B16F10-Nex2 de control no tratadas migraron para reconstituir la monocapa después de 24 horas (figura 13A). Tras el tratamiento con el péptido RB10 (SEQ ID N° 9) a una concentración de 500 μ M, se produjo una inhibición del 100 % de la migración de 1×10^6 células tumorales (figura 13B).

[0112] La inhibición total de la migración de células de melanoma B16F10-Nex2 se observó con RB9 (SEQ ID N° 8) y RB10 a 500 μ M, o con RB10M3 (sustitución dAla2Ala, SEQ ID N° 16). Otras sustituciones como en las series de escaneo de alanina y otras derivaciones y péptidos codificados mostraron una inhibición parcial de la migración o no mostraron ningún efecto (figura 16). Esta respuesta apunta a una marcada especificidad de los péptidos H3 para la inhibición de la migración de células B16F10-Nex2.

[0113] El péptido RB9 inhibió completamente la migración de células de melanoma humano A2058, de carcinoma de colon HCT y de cáncer de mama SKBr3. Este inhibió la mitad de la migración de las células Ovar-3 y, de manera pobre, las células tumorales de glioblastoma U87. Este no mostró ningún efecto en las células de cáncer de cuello de útero SiHa (figura 17).

[0114] El péptido RB10 o RB10M3 (SEQ ID N° 31) mostró una inhibición parcial de la migración de células de glioblastoma U87 y una inhibición completa o casi completa de células de cáncer de cuello de útero HeLa y SiHa (figura 18).

[0115] El péptido RB9 no afectó a la migración de células normales no tumorigénicas, una línea celular de fibroblastos murinos (3T3) y dos fibroblastos humanos primarios (figura 19).

Ejemplo 15: Inhibición dependiente de la dosis de la migración de células tumorales por el péptido RB10.

[0116] Las células B16F10-Nex2 viables (3×10^5)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 12 pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una cámara humidificada con el 5 % de CO₂. Se añadió un medio fresco que contenía RB10 (SEQ ID N° 9) a diferentes concentraciones a los pocillos y se incubó nuevamente durante 4 horas. La herida en la monocapa se realizó como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 12, y las imágenes se obtuvieron en consecuencia. Después de 24 horas, se obtuvo y grabó una nueva imagen en el mismo campo (24 horas). Como se muestra en la figura 14, la inhibición de la migración dependía de la dosis e incluso a baja concentración (30 μ M) de RB10 fue capaz de inhibir la migración en más del 30 %. A 500 μ M inhibió el 100 % de la migración de células, como se muestra en la figura 14. Magnification X100.

Ejemplo 16: Inhibición del crecimiento de RB10.

[0117] Las células B16F10-Nex2 viables (5×10^5)/pocillo se distribuyeron en una placa de cultivo de 6 pocillos y se incubaron durante 4 horas. El medio fresco que contenía 0 o 500 μ M de RB10 (SEQ ID N° 10) se añadió a los pocillos y se incubó durante 12 horas. La imagen se capturó usando una cámara (Jenoptik) con el *software* Progres 2.8. El número de células se detectó usando el *software* pxcavator (intelligent perception). Después de 12 horas a 0,5 mM de RB10, las células de melanoma tenían menos células en un 39 % (figura 15); estas células aun fueron capaces de proliferar, pero no de migrar. Estos efectos de RB10 parecen explicar por qué el péptido es protector contra un modelo metastásico de melanoma, pero no contra el desarrollo de un tumor primario en un modelo subcutáneo, ambos en ratones susceptibles. Magnificación X100.

Ejemplo 17: Evaluación de toxicidad de péptidos *in vivo*.

[0118] Los ratones fueron inyectados con RB9 (SEQ ID N° 8) durante siete días consecutivos (300 μ g a través de i.p.) y fueron sacrificados posteriormente por histopatología. No se observaron signos de toxicidad o alteraciones morfológicas en el hígado, pulmón, corazón, riñón y bazo. Además, los péptidos no eran hemolíticos, como se muestra en la figura 21 para RB10M3 (SEQ ID N° 31).

[0119] Los expertos en la materia a los que se refiere el presente objeto apreciarán que pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse de la naturaleza esencial de las mismas. Se pretende abarcar todas esas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0120]

5

<110> Recepta Biopharma S.A.

<120> PÉPTIDO ANTITUMORAL DERIVADO DE UNA REGIÓN DETERMINANTE DE COMPLEMENTARIEDAD DE UN ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA EL TRANSPORTADOR NAPI2B

10

<130> 31146PCT

<150> US 61/422,856

<151> 2010-12-14

15

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

20

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de CDR H1 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<400> 1

30

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Asn Ile His
1 5 10

<210> 2

35

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Secuencia de CDR H2 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<400> 2

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ser Tyr Lys Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

50

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Secuencia de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<400> 3

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly

65

<210> 4

<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de CDR L1 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<400> 4

10 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de CDR L2 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
<400> 5

25 Tyr Thr Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

30 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Secuencia de CDR L3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
<400> 6

40 Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Leu Thr
 1 5

45 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia amidada de CDR H2 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

55 <400> 7

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ser Tyr Lys Gln Lys Phe Arg

60	1	5	10	15
	Gly			

65 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Amidación
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(18)
 <223> Disulfuro
 15
 <400> 8

 Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 20
 Gly Cys

 <210> 9
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia amidada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación
 35
 <400> 9

 Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 40
 Gly

 <210>
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia amidada de CDR H1 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
 <220>
 50
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Amidación
 55
 <400> 10

 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Asn Ile His
 1 5 10
 60
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

10

<223> Secuencia amidada de CDR L1 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Amidación

<400> 11

10

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Phe Leu Asn
1 5 10

15 <210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia amidada de CDR L2 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<220>
<221> MISC_FEATURE

25 <222> (7)..(7)
<223> Amidación

<400> 12

30

Tyr Thr Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

35 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia amidada de CDR L3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<220>
<221> MISC_FEATURE

45 <222> (9)..(9)
<223> Amidación

<400> 13

50

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Leu Thr
1 5

55 <210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<220>
<221> MISC_FEATURE

65 <222> (18)..(18)
<223> Amidación

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(18)
 <223> Enlace disulfuro
 5
 <220>
 <221> MODIFIED_BASE
 <222> (2)..(17)
 <223> (2) y (17) son D-alanina y (8) es D-citrulina
 10
 <400> 14

 Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 Ala Cys
 <210> 15
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Amidación
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(18)
 <223> Enlace disulfuro
 35
 <220>
 <221> MODIFIED_BASE
 <222> (2)..(17)
 <223> (2) y (17) son D-alanina, (8) es D-citrulina, y (11) es D-fenilalanina
 40
 <400> 15

 Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 Ala Cys
 <210> 16
 45 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Secuencia amidada y modificada derivada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (18)..(18)
 <223> Amidación

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (1)..(14)
 <223> Enlace disulfuro

```

5      <220>
      <221> MODIFIED_BASE
      <222> (2)..(2)
      <223> D-alanina

      <400> 16

10      Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Cys
      1          5          10

      <210> 17
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

20      <220>
      <221> MISC_FEATURE
      <222> (18)..(18)
      <223> Amidación

25      <220>
      <221> MISC_FEATURE
      <222> (1)..(18)
      <223> Enlace disulfuro

30      <220>
      <221> MODIFIED_BASE
      <222> (8)..(8)
      <223> D-citrulina

35      <400> 17

40      Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      1          5          10          15

      Gly Cys

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

      <220>
      <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

50      <220>
      <221> MISC_FEATURE
      <222> (18)..(18)
      <223> Amidación

55      <220>
      <221> MISC_FEATURE
      <222> (1)..(18)
      <223> Enlace disulfuro

60      <220>
      <221> MODIFIED_BASE
      <222> (2)..(2)
      <223> D-alanina

65

```

<400> 18

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly Cys

- 5 <210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia amidada y codificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
- <220>
<221> MISC_FEATURE
15 <222> (18)..(18)
<223> Amidación
- <220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (1)..(18)
<223> Enlace disulfuro
- <400> 19

Cys Gly Thr Phe Glu Tyr Arg Ala Gln Ala Gly Trp Ala Gly Arg Thr

1 5 10 15

Ala Cys

- 25 <210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia amidada y codificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
- <220>
<221> MISC_FEATURE
35 <222> (18)..(18)
<223> Amidación
- <220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (3)..(15)
<223> Enlace disulfuro
- <400> 20
- 45 Tyr Trp Cys Arg Ala Ala Phe Thr Thr Glu Ala Gly Arg Ala Cys Gln
1 5 10 15
- Gly Gly
- 50 <210> 21
<211> 18

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia amidada y codificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Amidación

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(18)
 <223> Enlace disulfuro

<400> 21

Cys Phe Thr Ala Arg Ala Gly Trp Tyr Ala Thr Glu Ala Arg Gly Gly
 1 5 10 15
 Gln Cys

20

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

<400> 22

35

Ala Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15

40

Gly

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

55

<400> 23

5 Cys Ala Ala Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 Gly

10 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

 <400> 24

25 Cys Ala Arg Ala Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMx35), obtenible por un método conocido

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

 <400> 25

 Cys Ala Arg Gly Ala Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15
 Gly

50 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

<400> 26

Cys Ala Arg Gly Glu Ala Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Amidación

15

<400> 27

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Ala Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly

20 <210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (8)..(8)

<223> Amidación

<400> 28

35 Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5

<210> 29

40 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

50 <223> Amidación

<220>

<221> MODIFIED_BASE

<222> (8)..(17)

55 <223> (8) es D-citrulina, (11) es D-fenilalanina y (17) es D-alanina

<400> 29

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Ala

- 5 <210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Amidación
- 20 <220>
<221> MODIFIED_BASE
<222> (3)..(17)
<223> (3) y (8) son D-arginina, (11) es D-fenilalanina y (17) es D-alanina
- <400> 30

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Ala

- 25 <210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Amidación
- 40 <220>
<221> MODIFIED_BASE
<222> (2)..(2)
<223> D-alanina
- <400> 31

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly

- 45 <210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia amidada y modificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

10 <220>
 <221> MODIFIED_BASE
 <222> (2)..(17)
 <223> (2) es D-alanina, (8) es D-citrulina y (17) es D-alanina

15 <400> 32

Cys Ala Arg Gly Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 1 5 10 15

20 Ala

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia amidada y codificada de CDR H3 de RebMab 200 (huMX35), obtenible por un método conocido

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Amidación

35 <400> 33

Cys Gly Thr Phe Glu Tyr Arg Ala Gln Ala Gly Trp Ala Gly Arg Thr
 1 5 10 15

Ala

REIVINDICACIONES

1. Péptido antitumoral aislado o sintético que consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID N^{os} 3, 8, 9 y 14-33.
- 5 2. Péptido antitumoral aislado o sintético según la reivindicación 1, donde el péptido de la SEQ ID N^o 8 es cíclico.
3. Composición farmacéutica que comprende uno o más del (de los) péptido(s) antitumoral(es) según la reivindicación 1 o 2 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
4. Péptido según la reivindicación 1 o 2 o composición farmacéutica según la reivindicación 3 para usarse como un medicamento.
- 10 5. Péptido o composición farmacéutica según la reivindicación 4, destinado(a) a usarse para inhibir el crecimiento tumoral o canceroso en un sujeto.
6. Péptido o composición farmacéutica para usarse según la reivindicación 5, donde el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cuello y de cabeza, cáncer gástrico e intestinal, cáncer de próstata, cáncer de hígado y glioblastoma.
- 15 7. Péptido o composición farmacéutica según la reivindicación 4, destinado(a) a usarse en el tratamiento de un tumor o cáncer en un sujeto.
8. Péptido o composición farmacéutica para usarse según la reivindicación 7, donde el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cuello y de cabeza, cáncer gástrico e intestinal, cáncer de próstata, cáncer de hígado y glioblastoma.
- 20

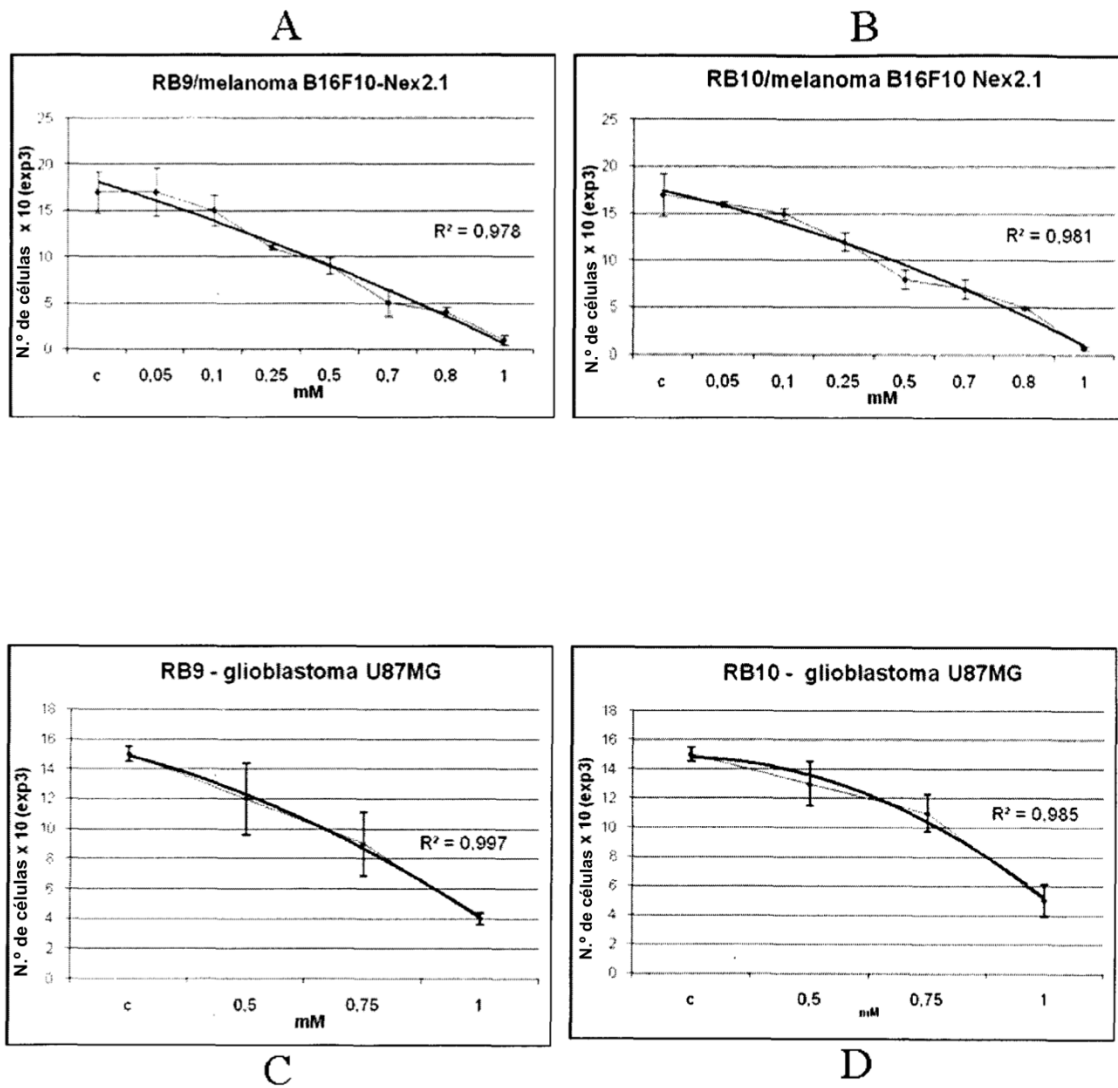


Figura 1

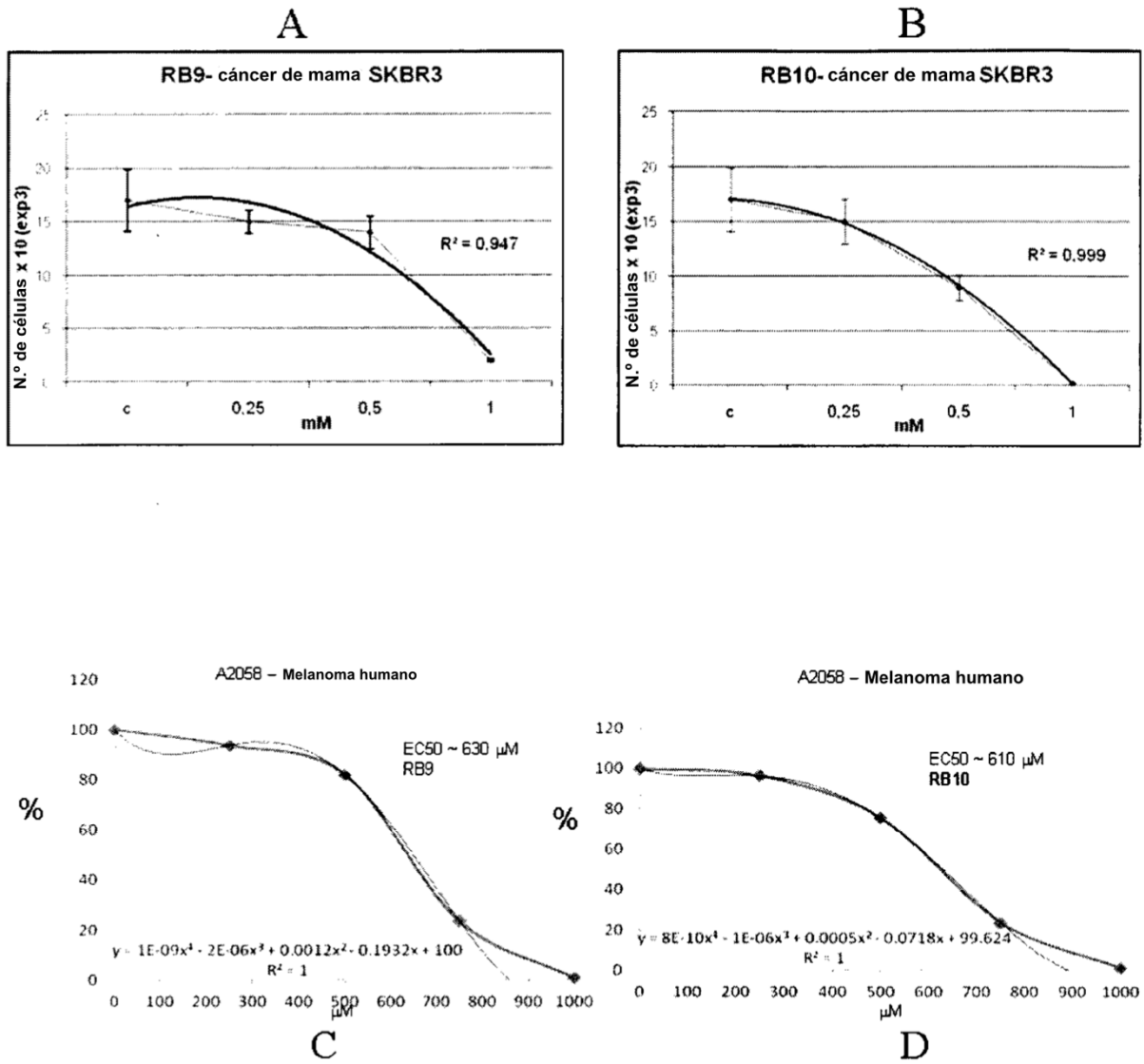


Figura 2

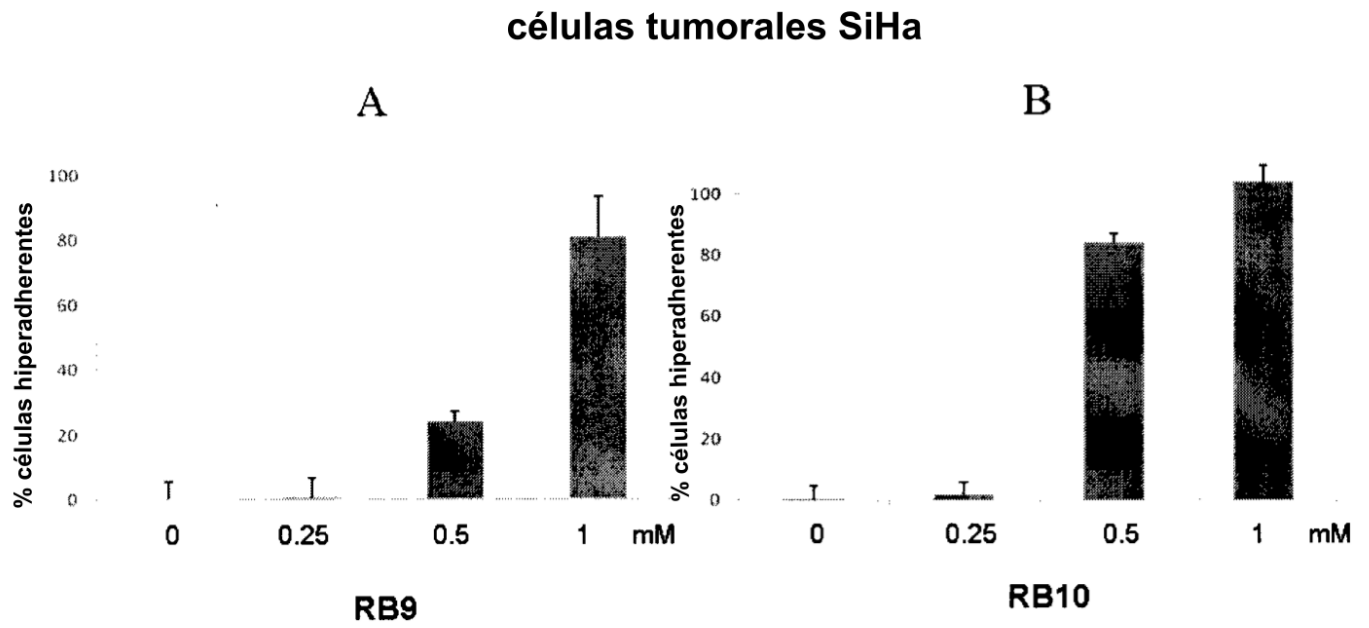


Figura 3

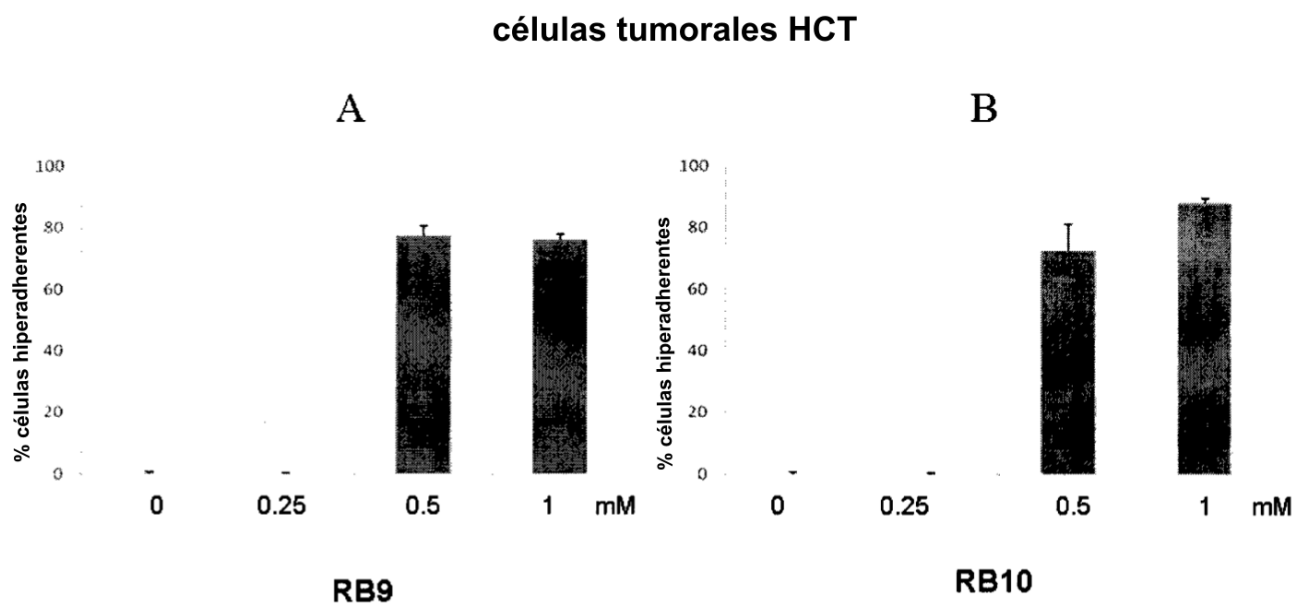


Figura 4

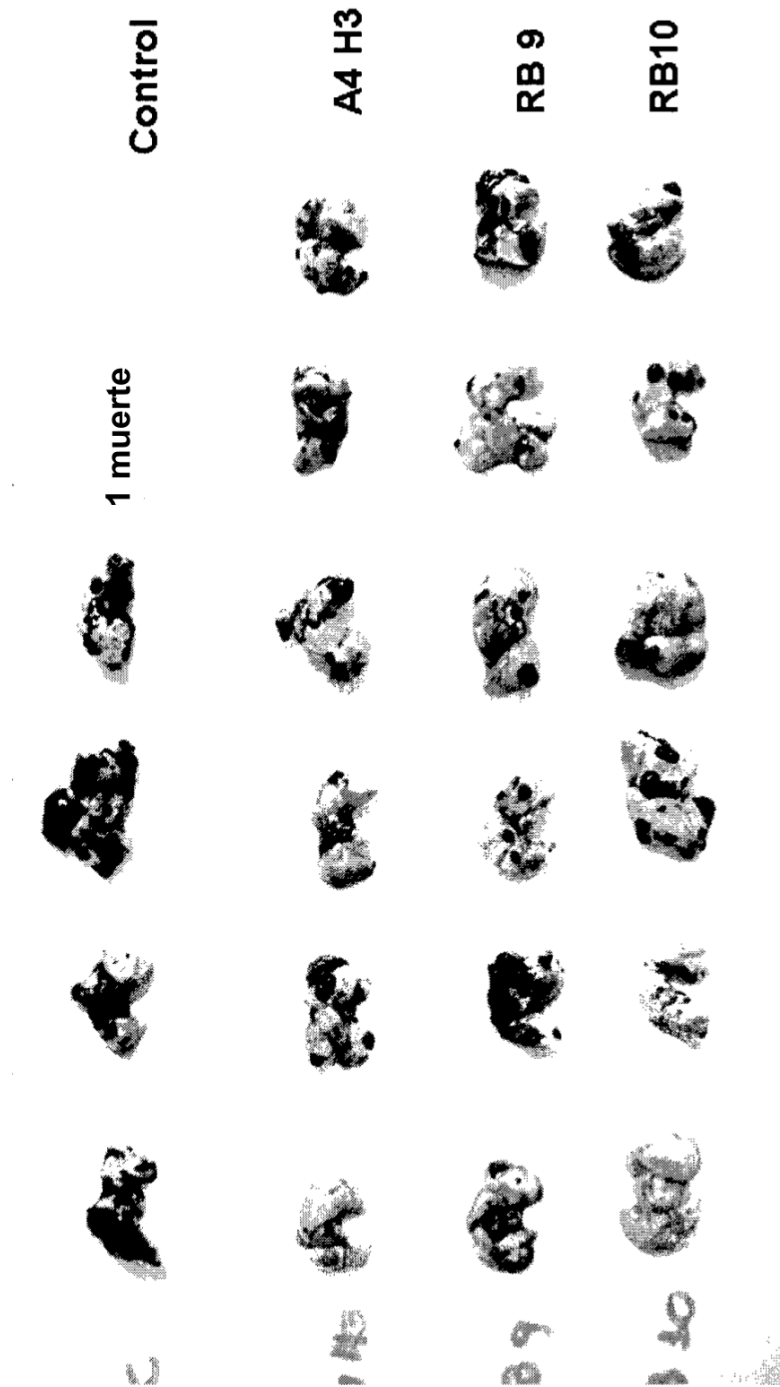


Figura 5

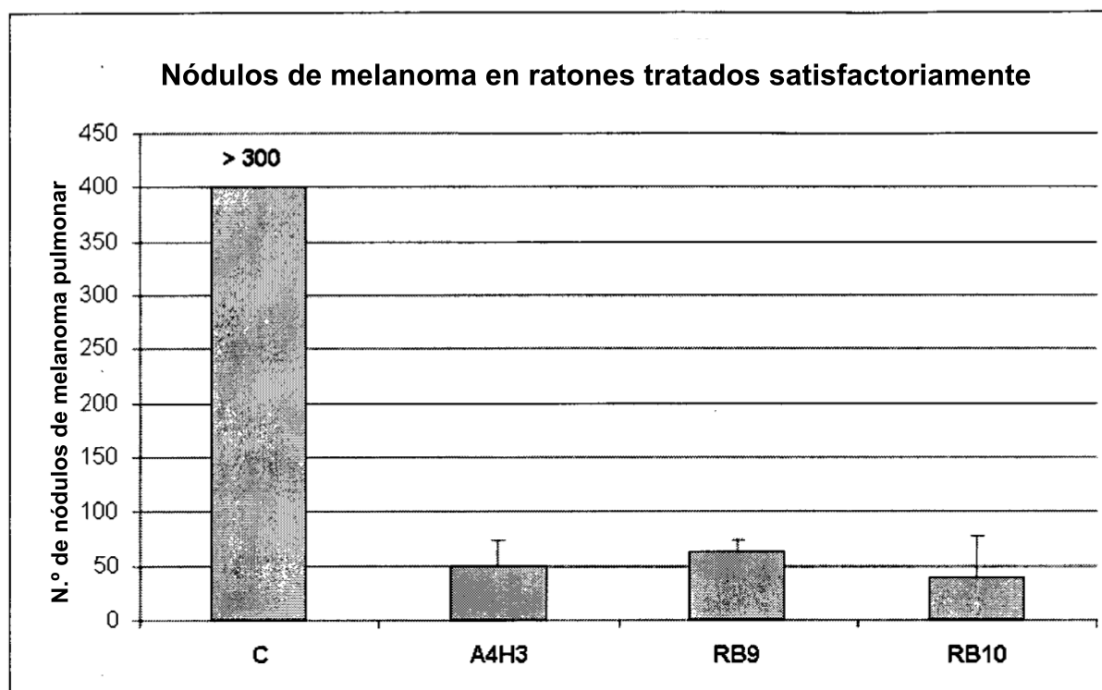


Figura 6

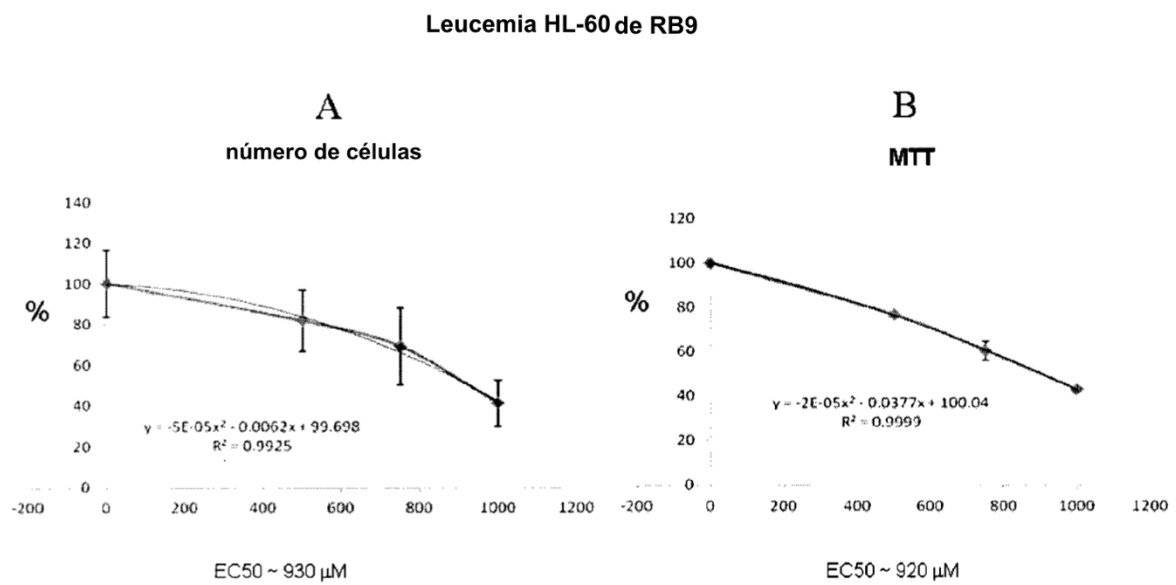


Figura 7

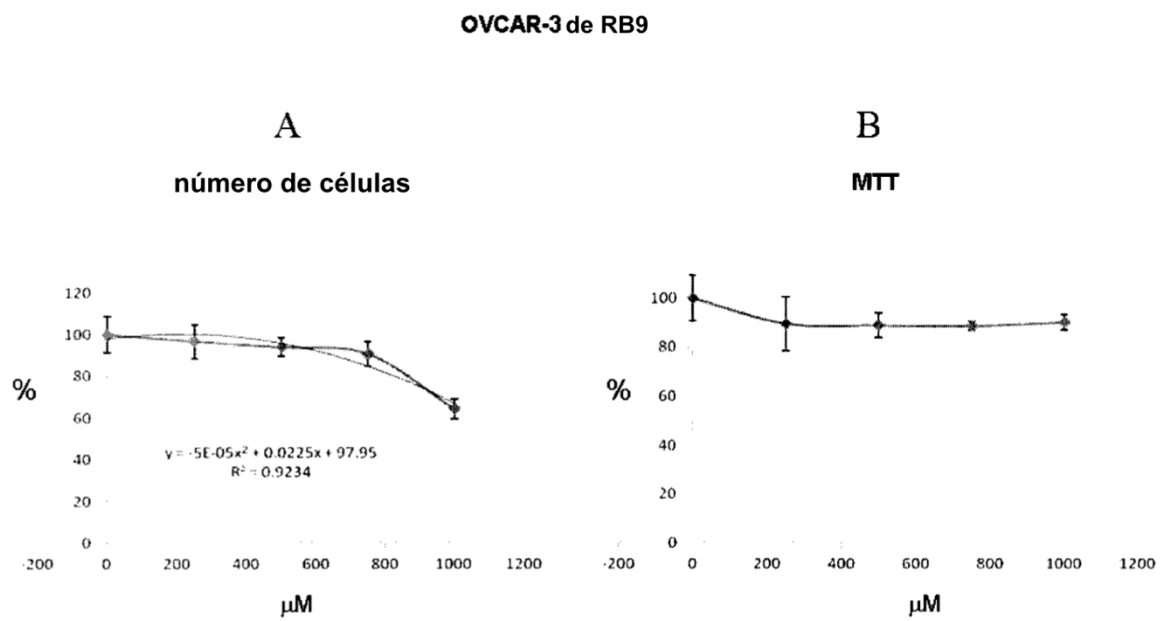


Figura 8

Series de escaneo de alanina - células adherentes
Péptidos 1 mM

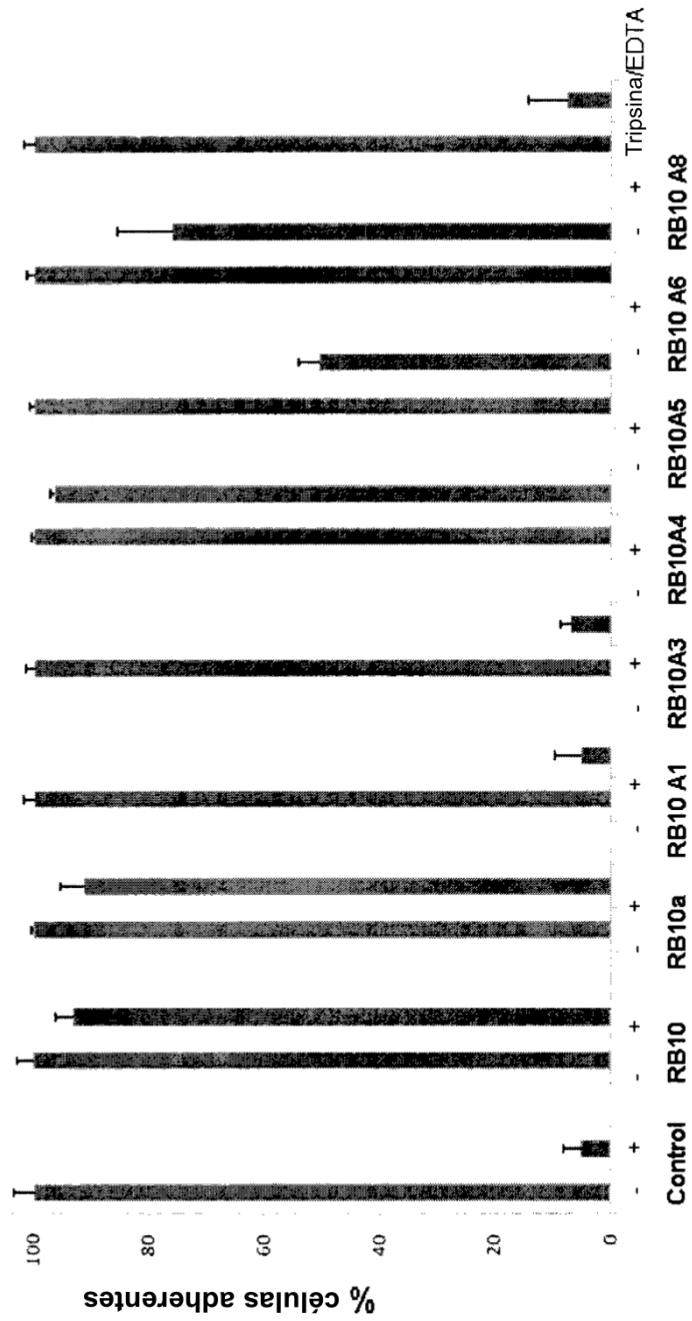


Figura 9

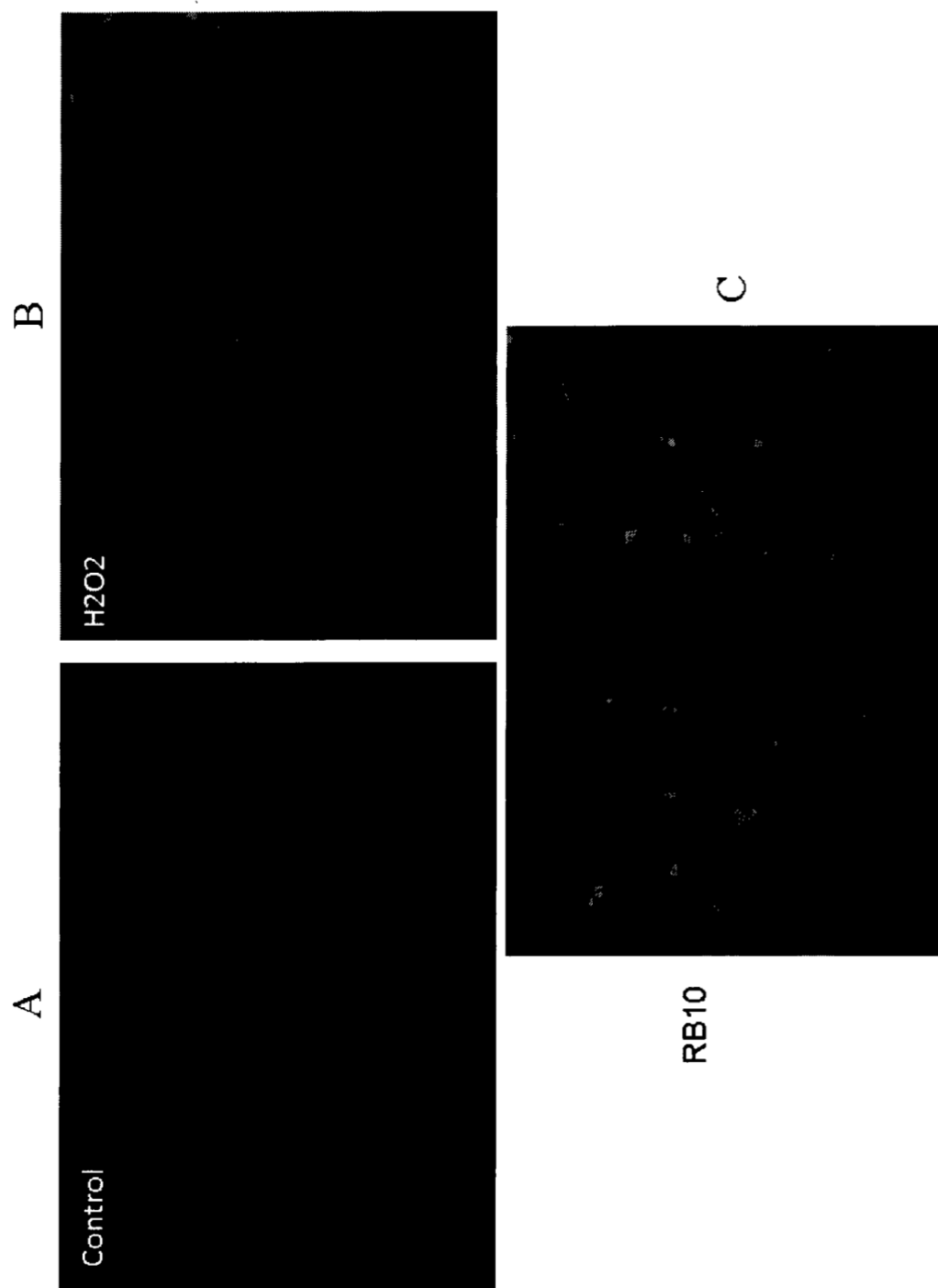


Figura 10

Especteometría de masas por HPLC de RB9

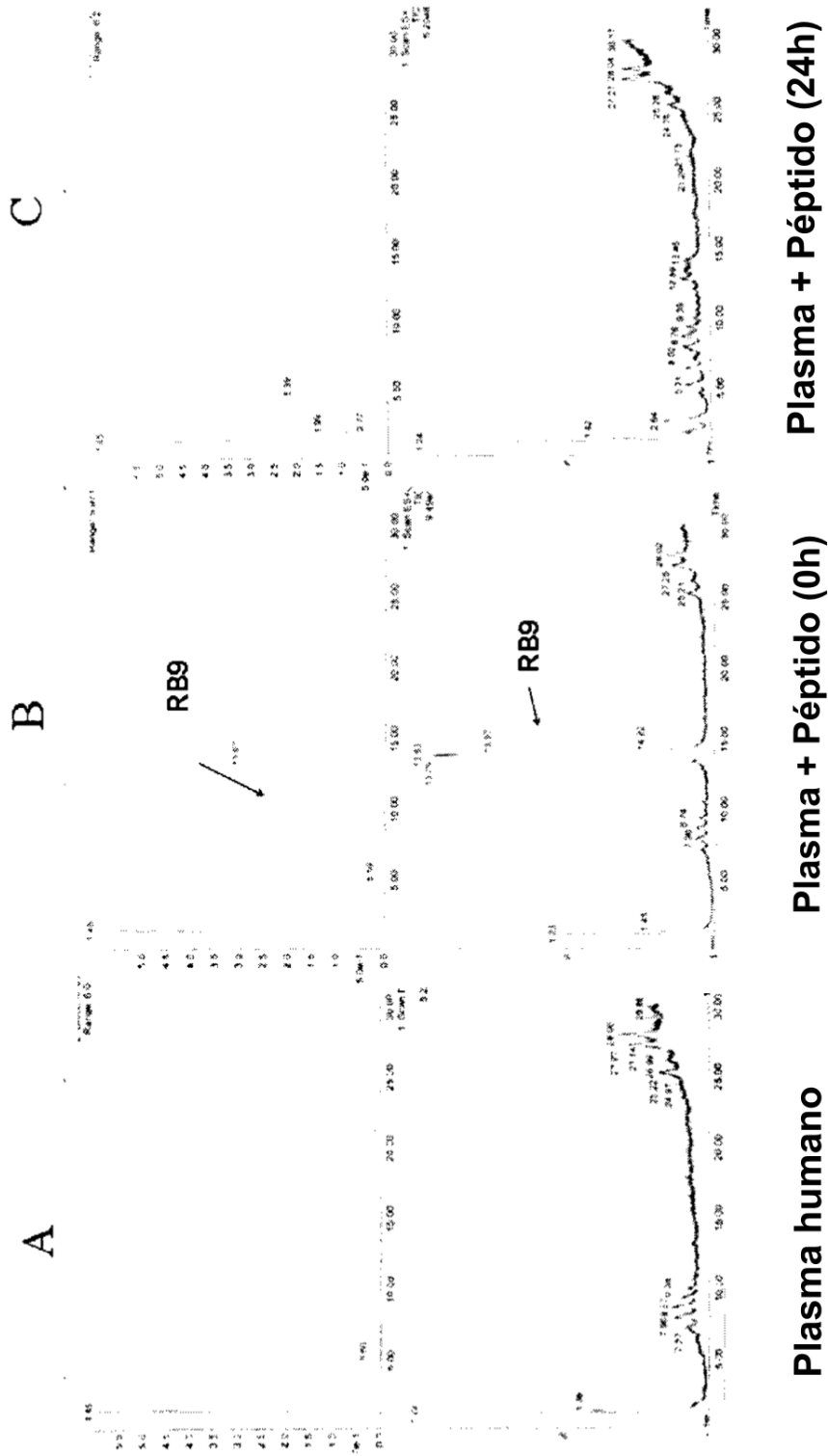


Figura 11

Degradación plasmática del péptido RB9

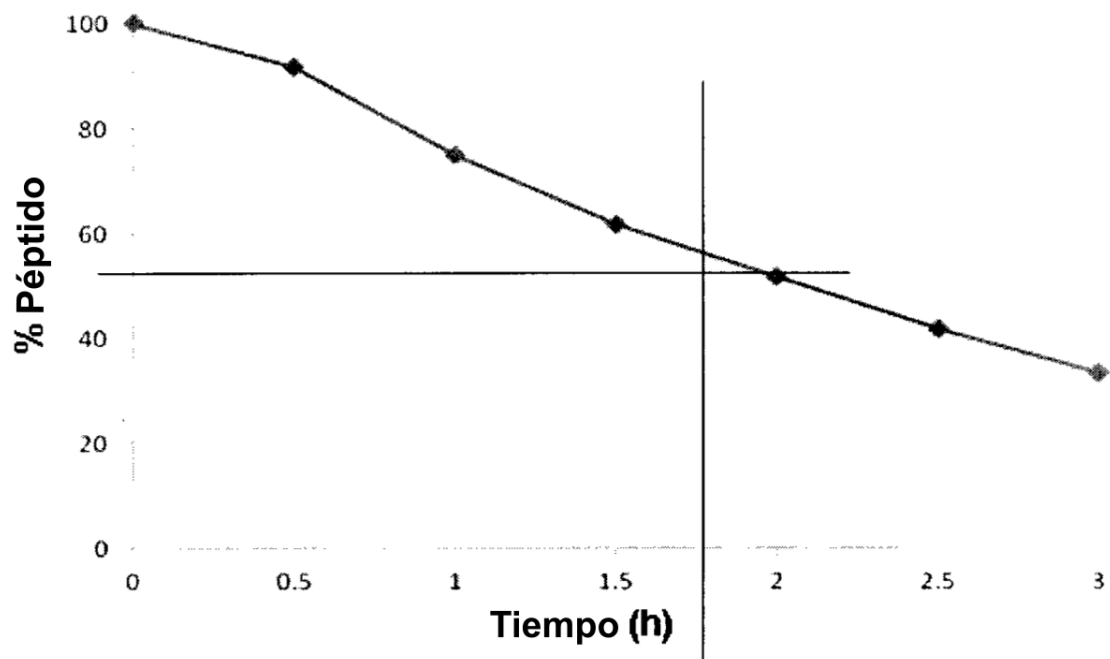
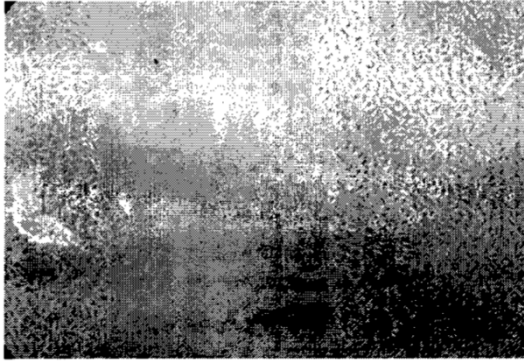
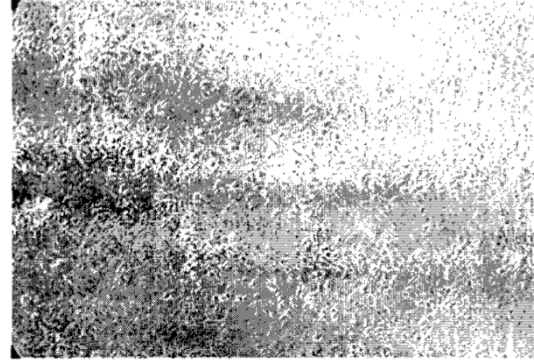


Figura 12

Migración de células de melanoma 5×10^5 B16F10-Nex2 en control



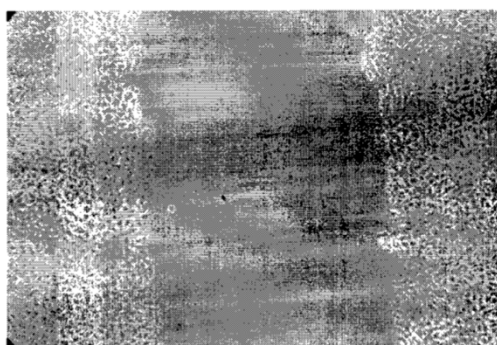
0h



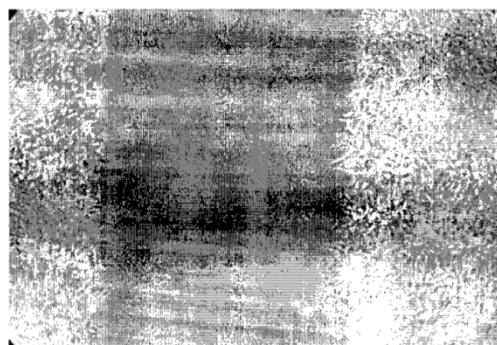
24h

Figura 13A

**100 % de inhibición de la migración de células de melanoma 10^6 B16F10-Nex2
por RB10 500 μ M**



0h



24h

Figura 13B

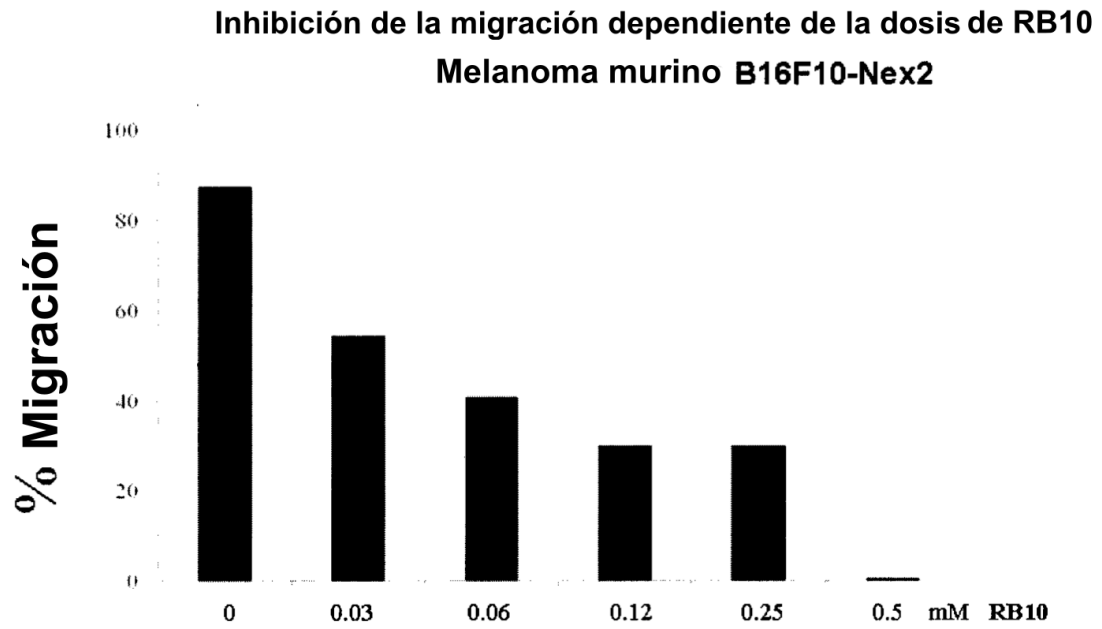


Figura 14

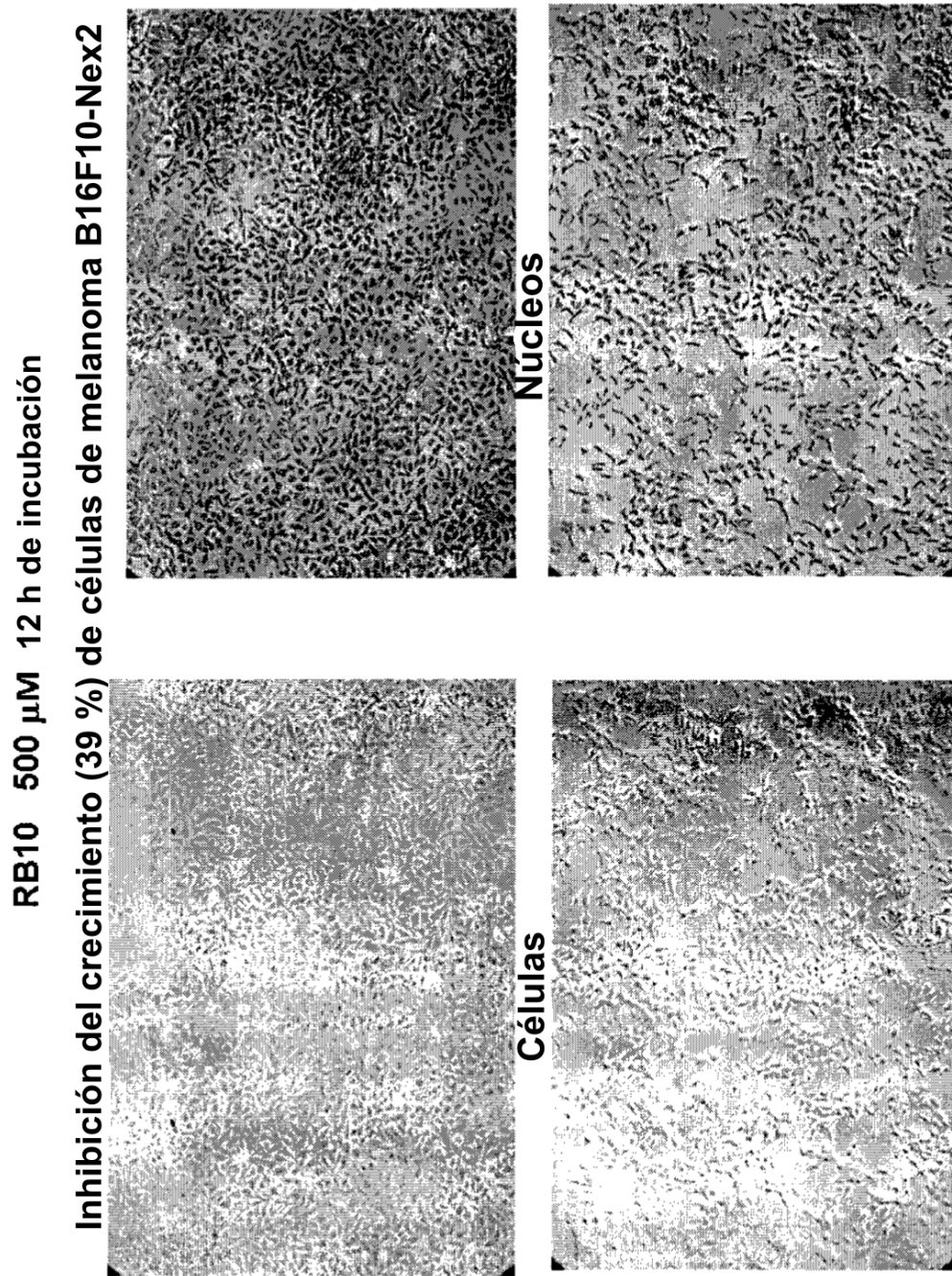


Figura 15

Migración de B16F10-Nex-2

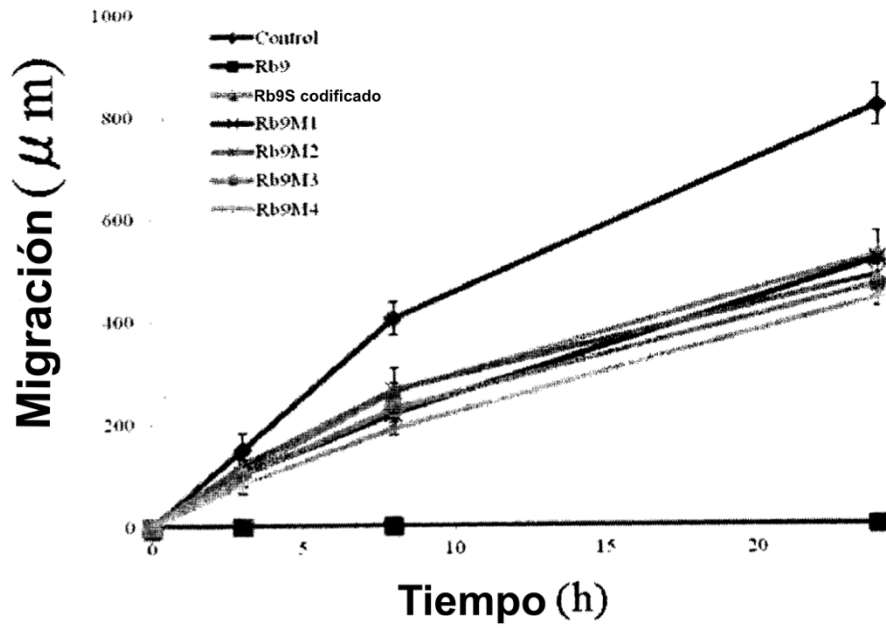


Figura 16A

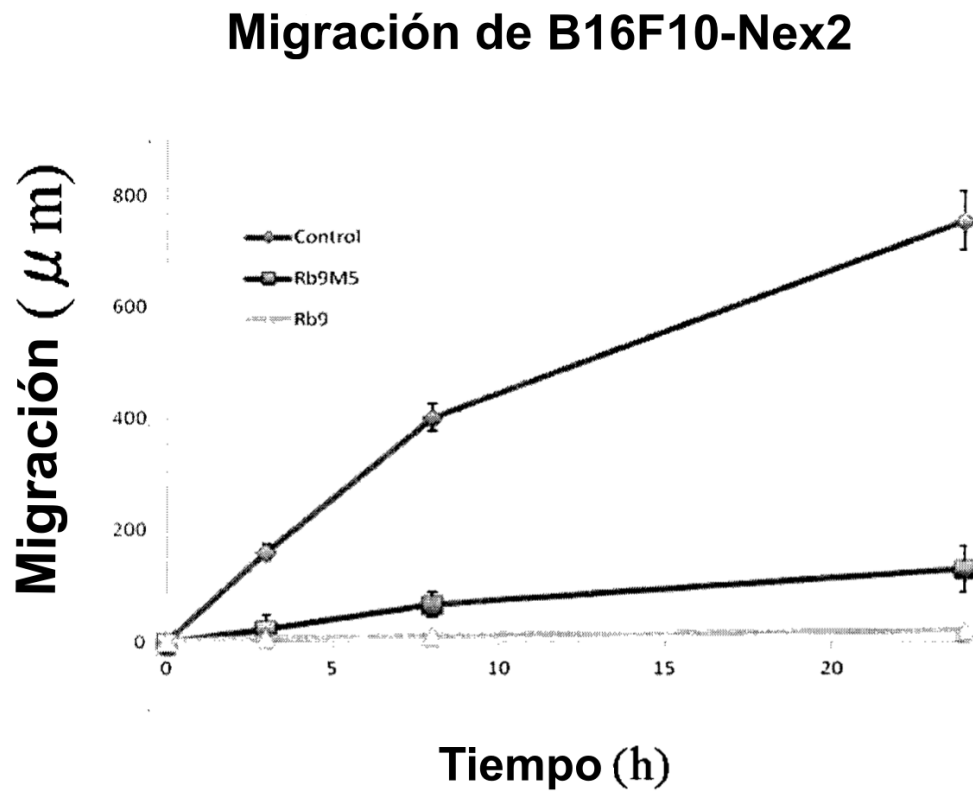


Figura 16B

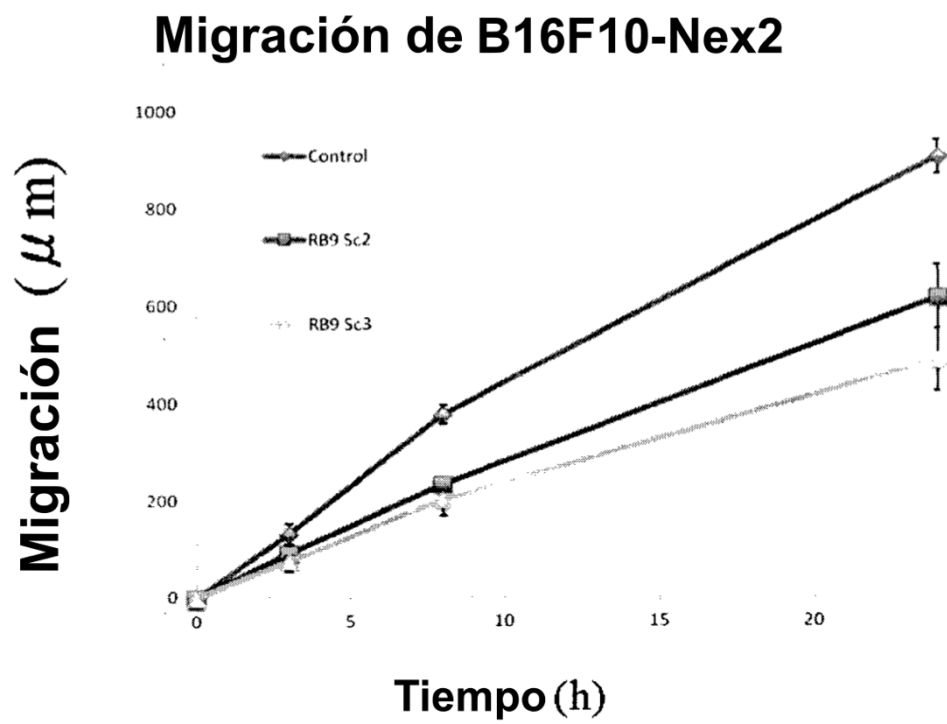


Figura 16C

Migración de B16F10-Nex2

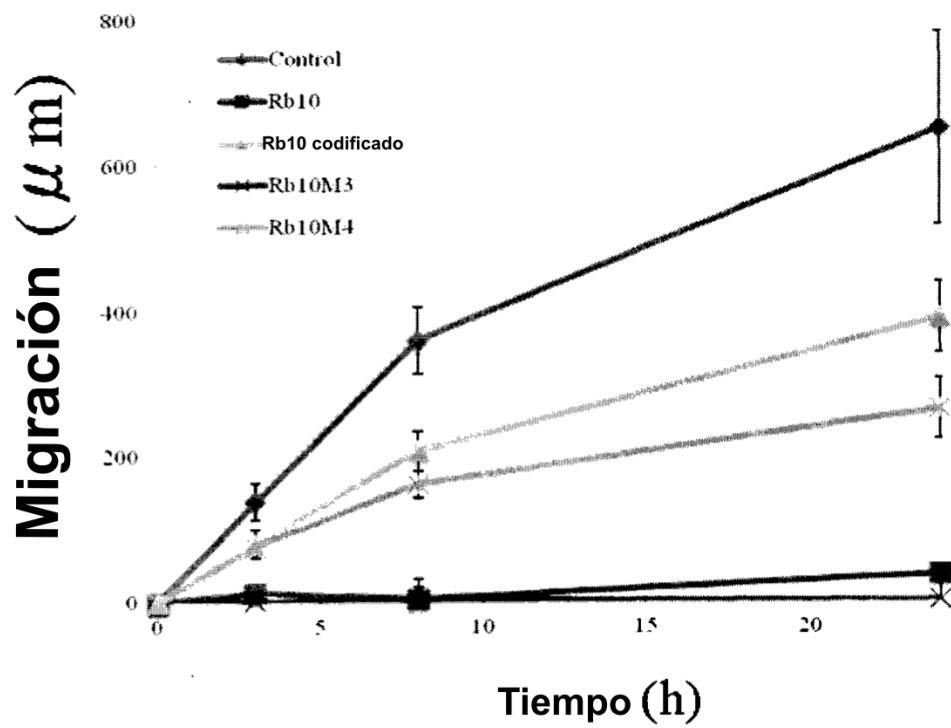


Figura 16D

Migración de B16F10-Nex2 – Rb10 A1 (C1A)

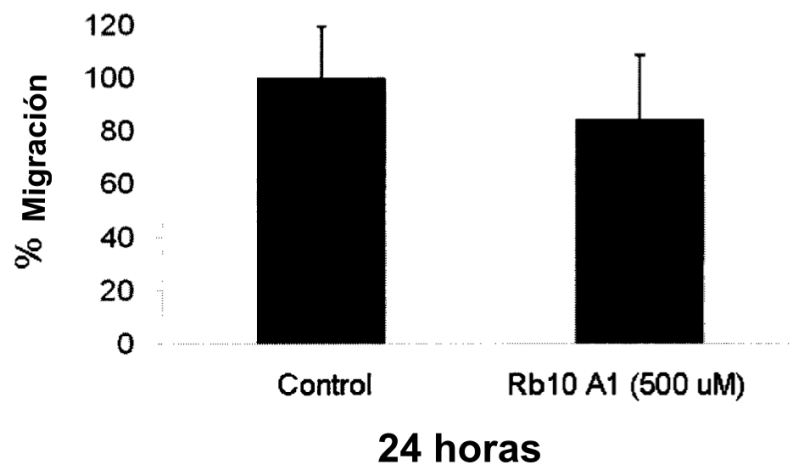


Figura 16E

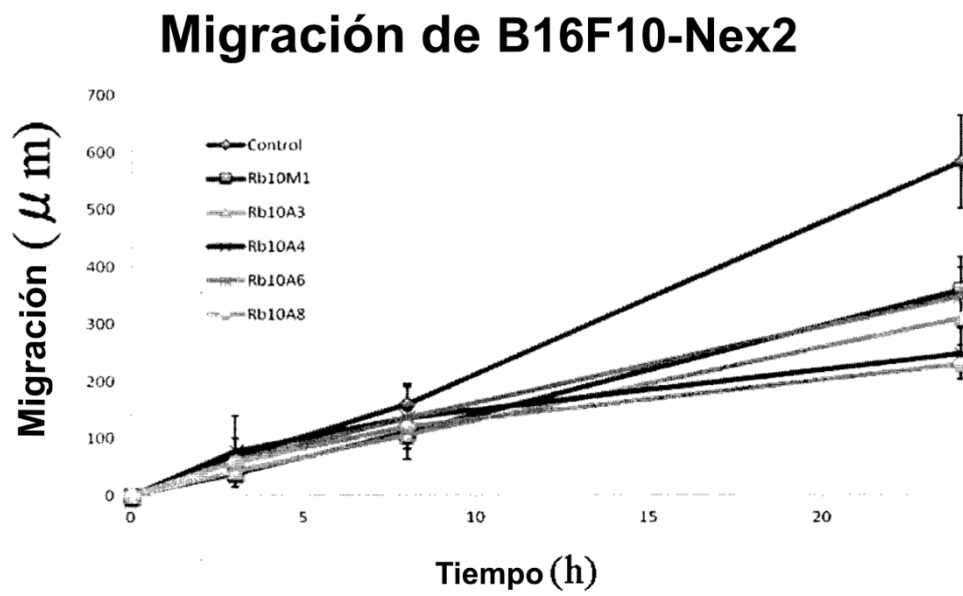


Figura 16F

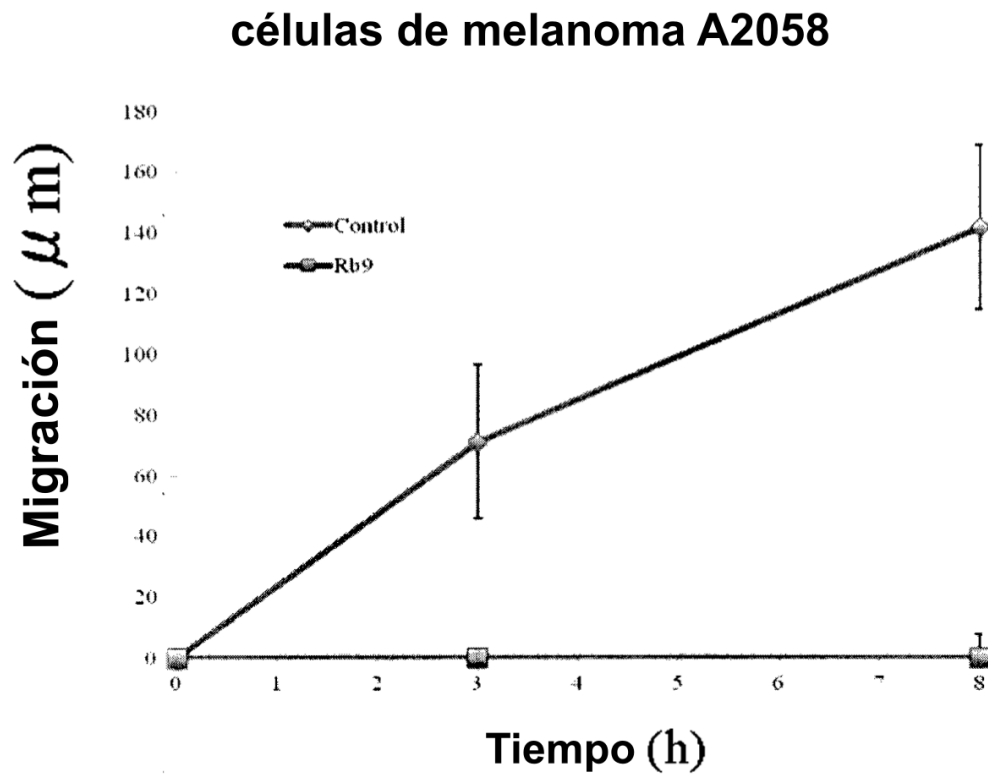


Figura 17A

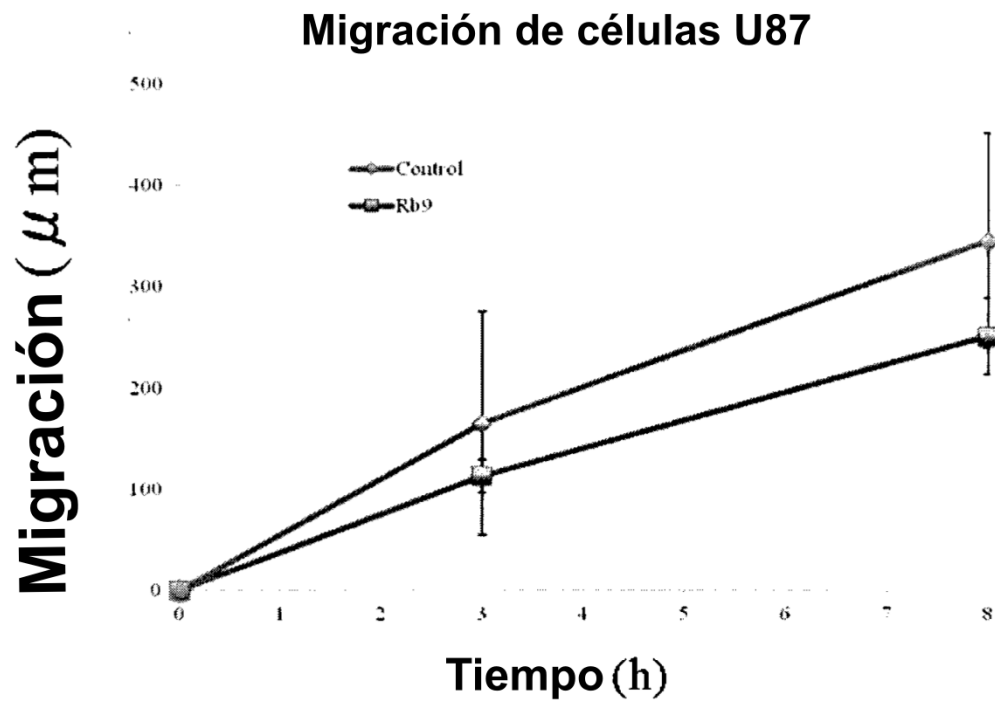


Figura 17B

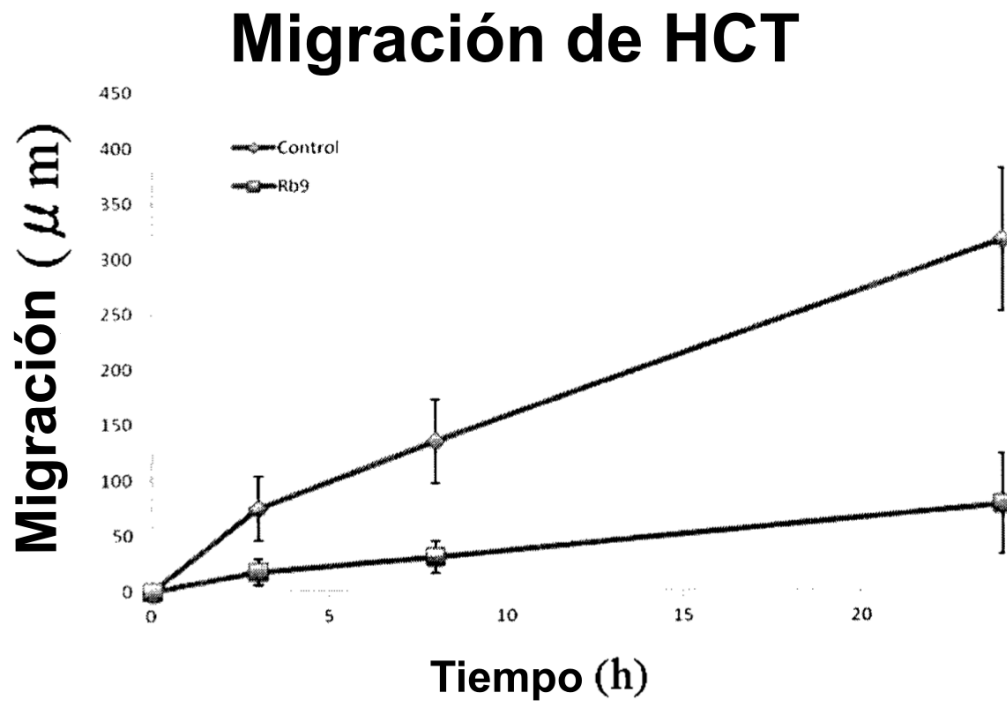


Figura 17C

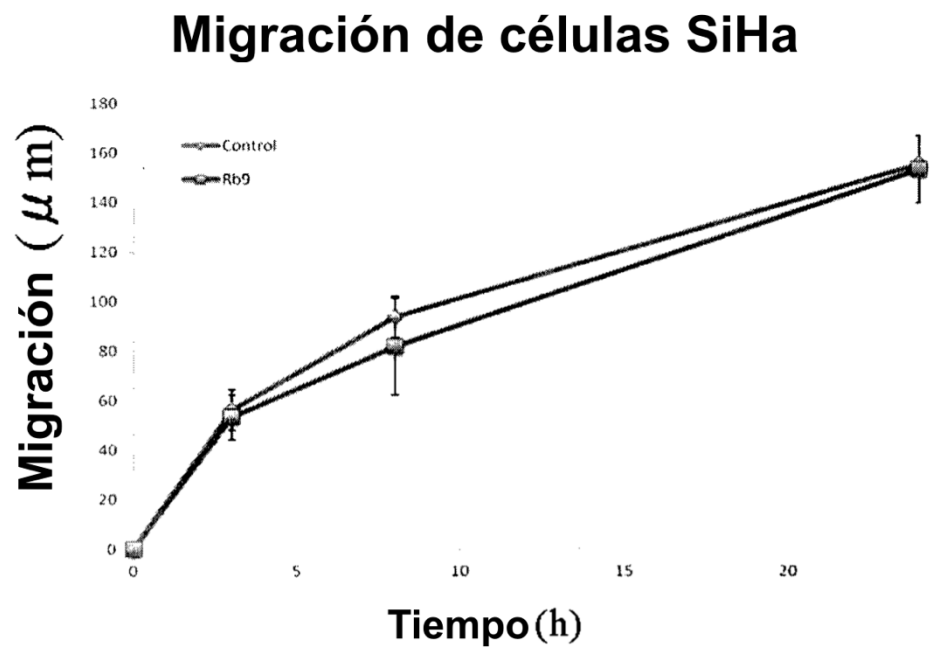


Figura 17D

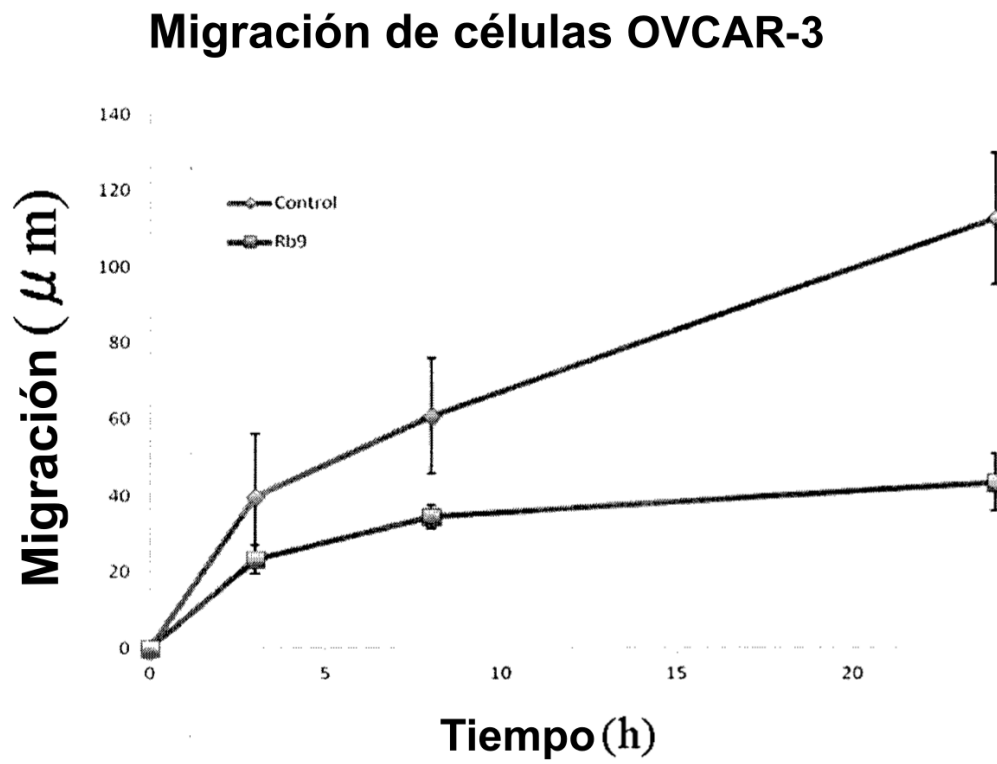


Figura 17E

Migración de células SKBR-3

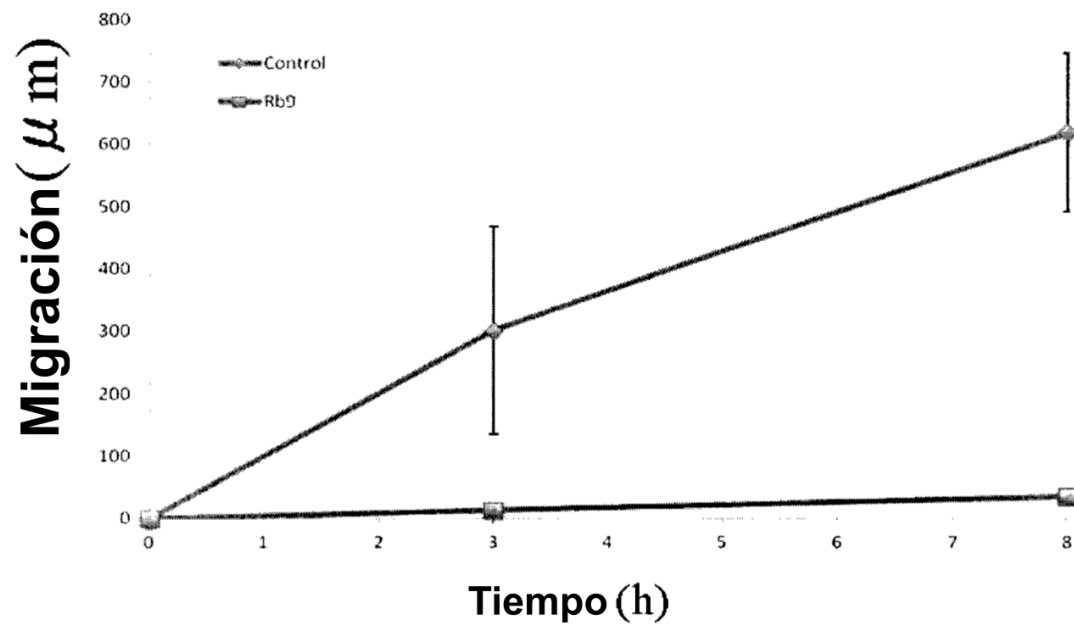


Figura 17F

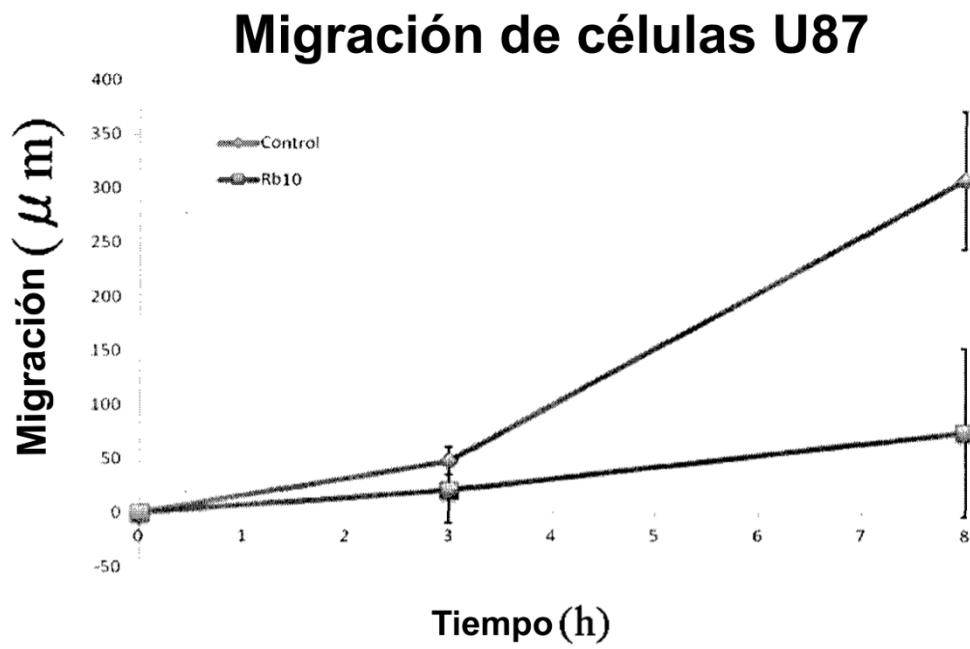


Figura 18A

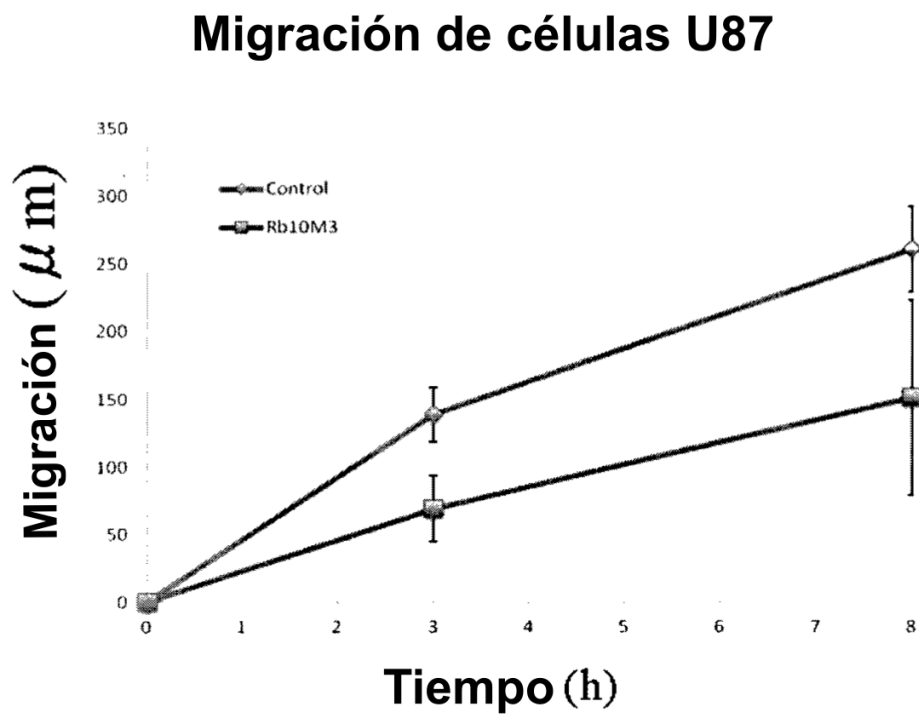


Figura 18B

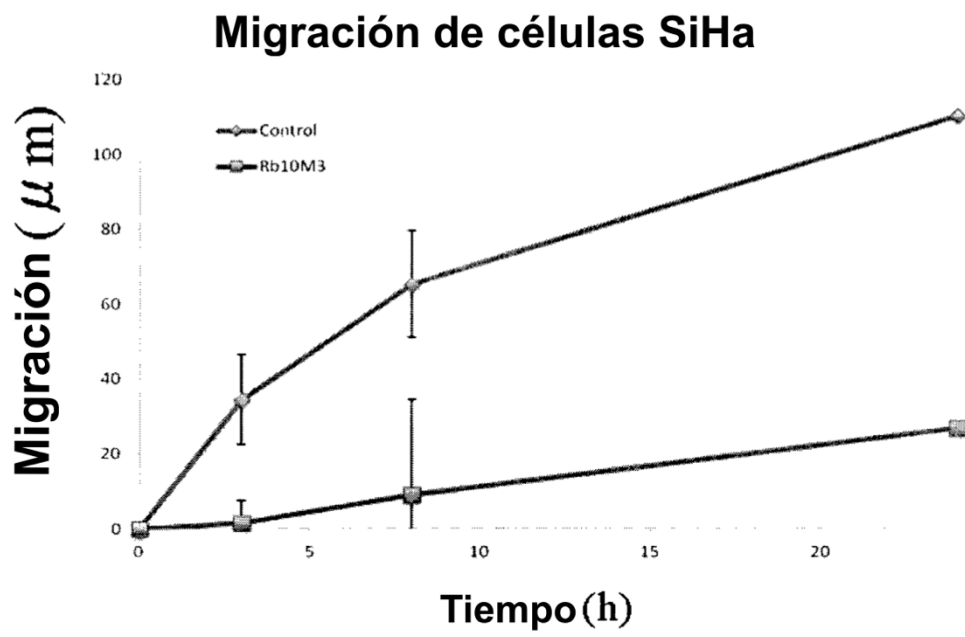


Figura 18C

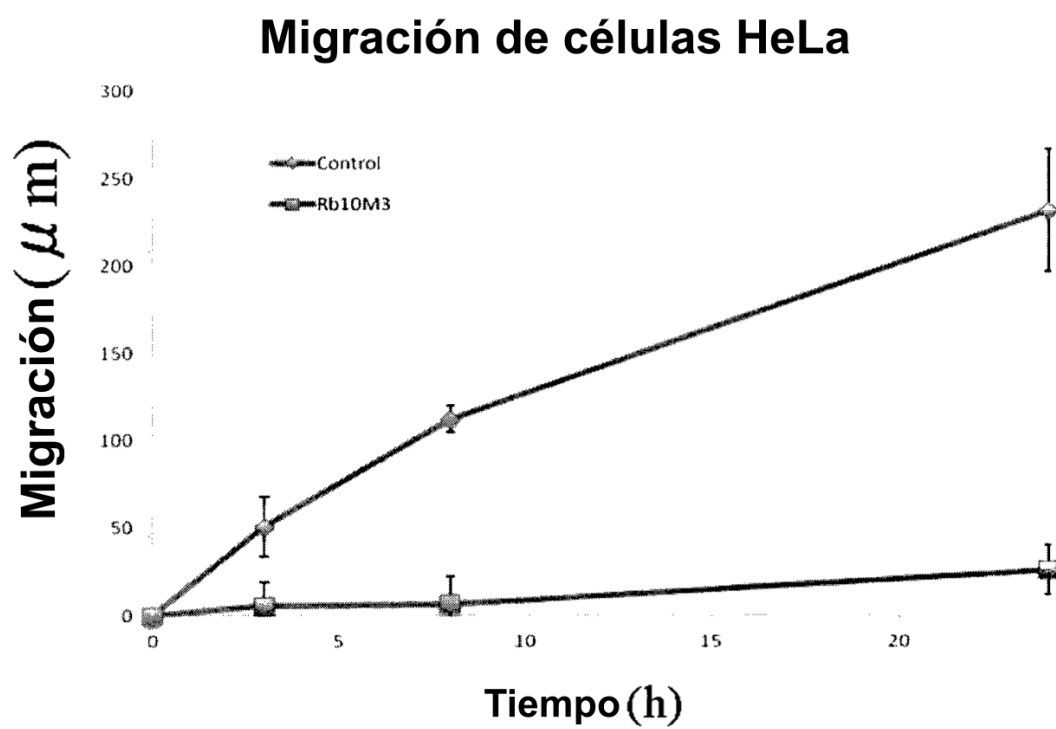


Figura 18D

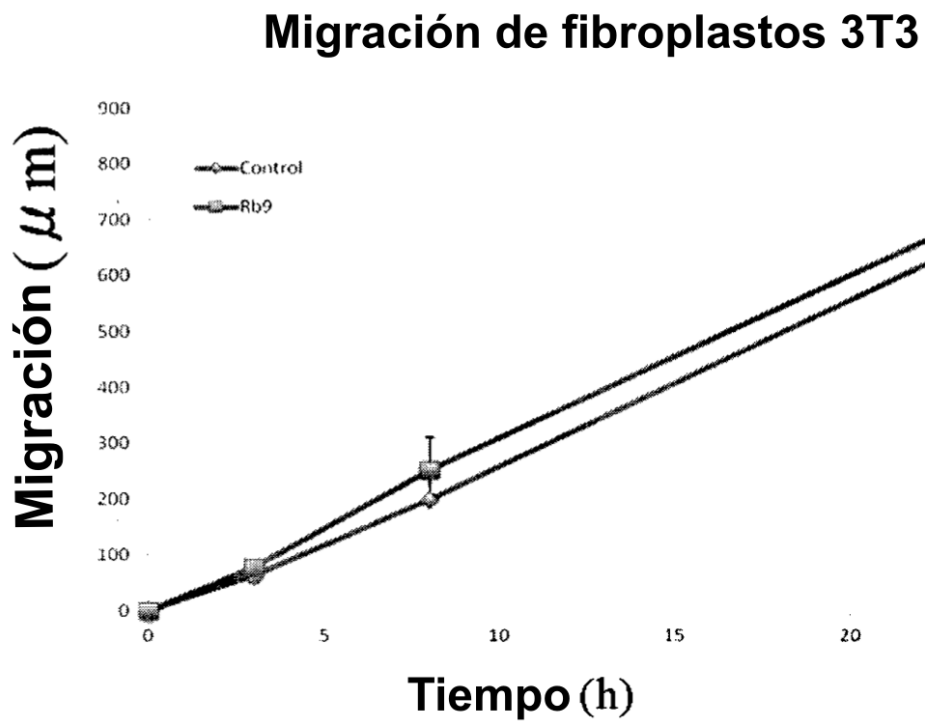


Figura 19A

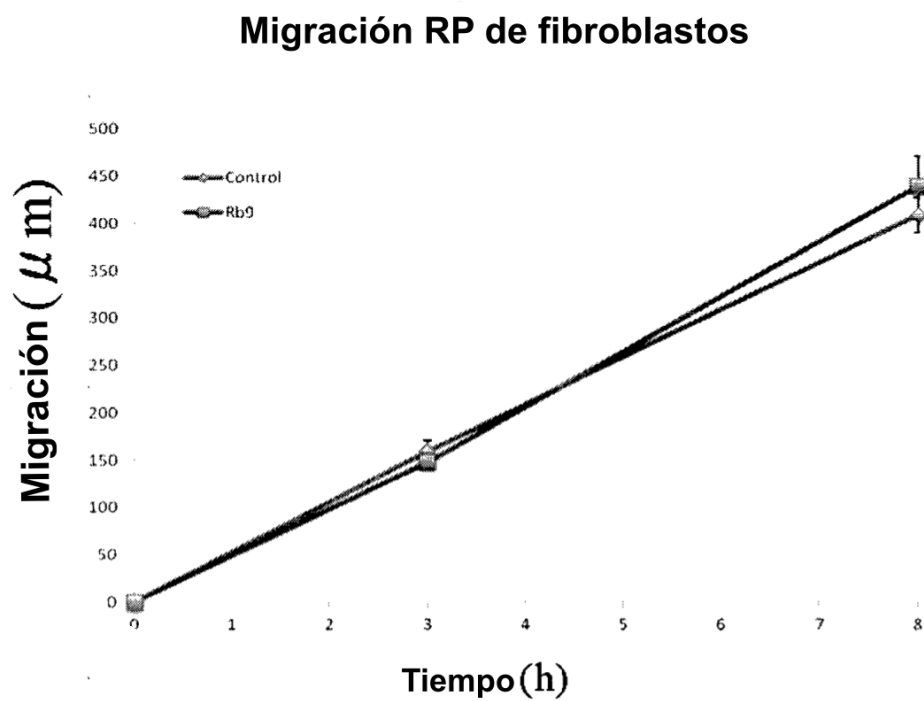


Figura 19B

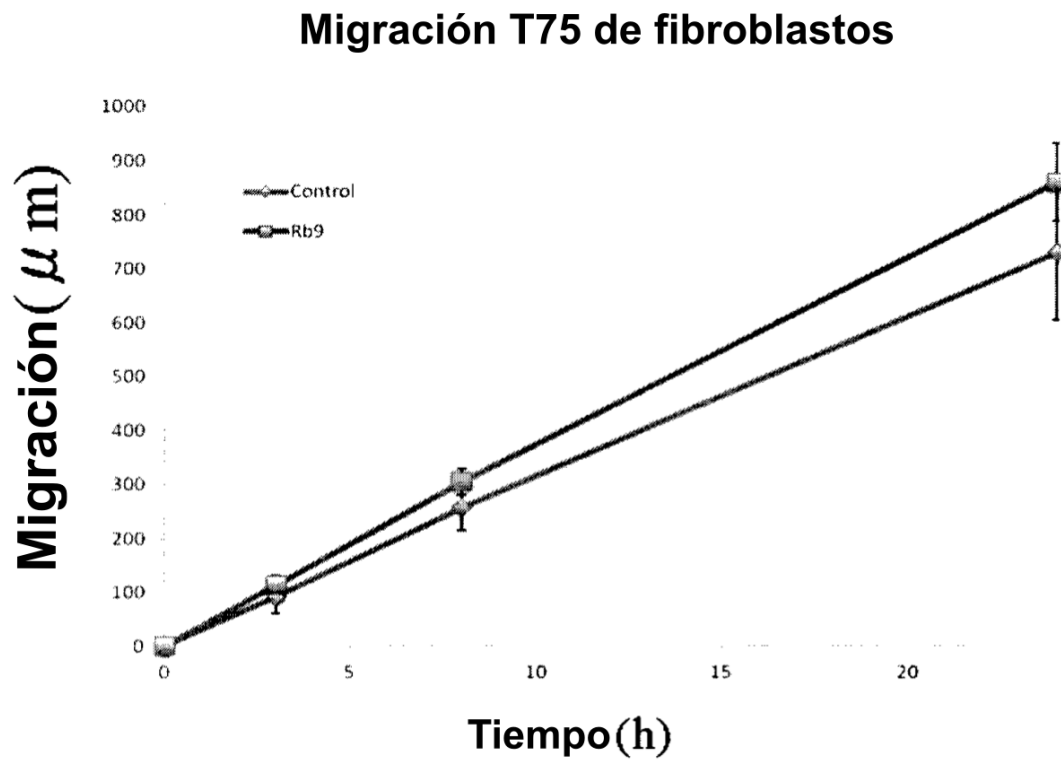


Figura 19C

Rb9 inhibe la invasión de B16F10-Nex2 (Ensayo transpocillo)

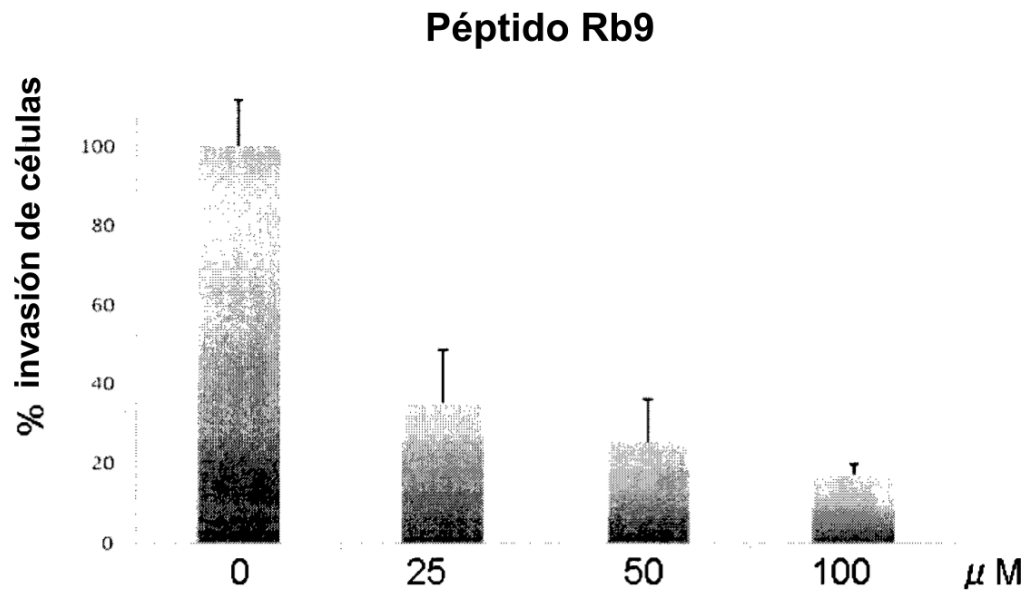


Figura 20

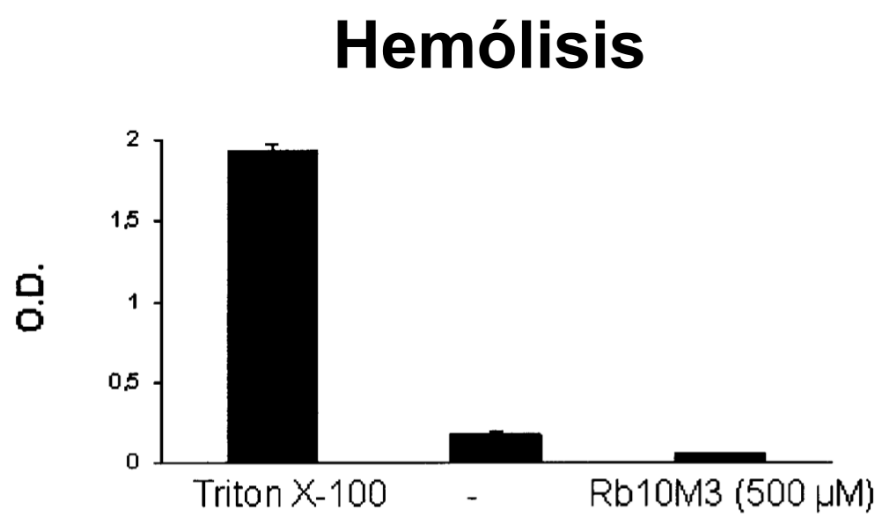


Figura 21