

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ PEPTIDOS CICLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASTICA

Y ANTIANGIOGENICA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

DOMICILIO _____ LA HABANA, CUBA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ación



No. 13-248567- -00000-0000

Fecha: 2013-10-21 10:55:17 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		WO 2012/126441 A3	Fecha 2012/09/27
Publicación Internacional No.		PCT/CU2012/000002	Fecha 2012/03/21
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
PÉPTIDOS CÍCLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA Y ANTIANGIOGÉNICA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 038/008, A61K 038/010, C07K 007/006, C07K 007/008			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 11600, Cuba	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		La Habana	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Cuba	Cuba
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ABRAHANTES PEREZ		Maria Del Carmen	Cubana
2. CHINEA SANTIAGO		Glaiy	Cubano
3. MARTINEZ DIAZ		Eduardo	Cubano
4. GARAY PEREZ		Hilda Elisa	Cubana
5. REYES ACOSTA		Osvaldo	Cubano
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Cuba		La Habana	Calle 186 # 3112 Apto 68, entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana, 11600, Cuba
2. Cuba		La Habana	Ave. 31 No. 18207 entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600, Cuba
3. Cuba		La Habana	Calle 186 # 3117 Apto 14E, entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana, 10600, Cuba
4. Cuba		La Habana	Ave. 31, 18207 entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600, Cuba
5. Cuba		La Habana	Ave. 31, 18207 entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600, Cuba

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO <u>cavelier@cavelier.com</u>
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN CUBA		CÓDIGO PAÍS CU	(31) NÚMERO 2011/0067
(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2011/03/21			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>13-0098031</u> No. <u>13/0098042</u>	Fecha. <u>2013/09/30</u> Fecha. <u>2013/09/30</u>
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <u>Luz Clemencia De Páez</u> <u>TP 23555</u>	
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555	

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 52 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 26 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 8 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. (Declaraciones de acuerdo con la Regla 4.17 del PCT) 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 16 reivindicaciones adicionales a 10 por \$480.000.



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			FECHA DE PRESENTACIÓN	
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. LOPEZ MOLA		Ernesto	Cubano	
7. LOPEZ ABAD		Cruz Matilde	Cubana	
8. GONZALEZ BLANCO		Sonia	Cubana	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. Ave. 186 No. 3112 Apto. 35, entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba		La Habana		Cuba
7. Ave. 186 No. 3107 entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana 11600, Cuba		La Habana		Cuba
8. Calle 184 No. 3112 Apto. 42, entre 31 y 33-A, Playa, La Habana 11600, Cuba		La Habana		Cuba
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de septiembre de 2012
(27.09.2012)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/126441 A3

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2012/000002

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de marzo de 2012 (21.03.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2011/0067 21 de marzo de 2011 (21.03.2011) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
ABRAHANTES PÉREZ, María, del Carmen [CU/CU]; Calle 186, No 3112, Apto 68, e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa., La Habana 11600 (CU). **CHINEA SANTIAGO, Glay** [CU/CU]; Ave 31, No. 18207 entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **MARTÍNEZ DÍAZ, Eduardo** [CU/CU]; Calle 186, No 3117, Apto 14E, e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU). **GARAY PÉREZ, Hilda, Elisa** [CU/CU]; Ave 31, No 18207, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **REYES ACOSTA, Osvaldo,** [CU/CU]; Ave 31, No 18207, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **LÓPEZ MOLA, Ernesto** [CU/CU]; Calle 186 No 3112, Apto. 35, entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU). **LÓPEZ ABAD, Cruz, Matilde** [CU/CU]; Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33 Apto.9-I, Playa, La Habana 11600 (CU). **GONZALEZ BLANCO, Sonia** [CU/CU]; Calle 184 No. 3112, Apto 42, e/ 31 y 33-A, Playa, La Habana 11600 (CU).
- (74) Mandatario: **VAZQUEZ CASTILLO, Mariela**; Departamento de Patentes, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaraciones según la Regla 4.17:**
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- Publicada:**
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- (88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:
22 de noviembre de 2012



WO 2012/126441 A3

(54) Title: CYCLIC PEPTIDES WITH AN ANTI-NEOPLASIC AND ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITY

(54) Título : PÉPTIDOS CÍCLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA Y ANTIANGIOGÉNICA.

(57) Abstract: The invention relates to cyclic peptides having anti-tumoral and anti-angiogenic properties, and to the pharmaceutically acceptable salts thereof and the pharmaceutical compositions containing same. Said cyclic peptides are used in the preparation of medicaments for human and/or veterinary therapeutics and can also be used in diagnostics. Said compounds can be used to detect, monitor and/or control a variety of disorders relating to cellular proliferation, such as oncological diseases and unwanted angiogenesis. Furthermore, they can form part of controlled release systems and systems pertaining to the field of nanobiotechnology, due to the self-assembly capacity thereof and as part of other systems.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a péptidos cíclicos con propiedades antitumorales y antiangiogénicas, así como a sus sales farmacéuticamente aceptables y a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Estos péptidos cíclicos se emplean en la preparación de medicamentos para la terapéutica humana y/o veterinaria, y también pueden emplearse en el diagnóstico. Estos compuestos pueden ser usados para detectar, monitorear y/o controlar una variedad de desórdenes relacionados con la proliferación celular, tales como las enfermedades oncológicas y la angiogénesis no deseada. Además, pueden formar parte de sistemas de liberación controlada y en el campo de la nanobiotecnología, ya sea por su capacidad de autoensamblaje o como parte de otros sistemas.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de septiembre de 2012
(27.09.2012)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/126441 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 7/06 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2012/000002

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de marzo de 2012 (21.03.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2011/0067 21 de marzo de 2011 (21.03.2011) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
ABRAHANTES PÉREZ, María, del Carmen [CU/CU]; Calle 186, No 3112, Apto 68, e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa., La Habana 11600 (CU). **CHINEA SANTIAGO, Glay** [CU/CU]; Ave 31, No. 18207 entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **MARTÍNEZ DÍAZ, Eduardo** [CU/CU]; Calle 186, No 3117, Apto 14E, e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU). **GARAY PÉREZ, Hilda, Elisa** [CU/CU]; Ave 31, No 18207, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **REYES ACOSTA, Osvaldo** [CU/CU]; Ave 31, No 18207, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **LÓPEZ MOLA, Ernesto** [CU/CU]; Calle 186 No 3112, Apto. 35, entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU). **LÓPEZ ABAD, Cruz, Matilde** [CU/CU]; Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33 Apto.9-I, Playa, La Habana 11600 (CU). **GONZALEZ BLANCO, Sonia** [CU/CU]; Calle 184 No. 3112, Apto 42, e/ 31 y 33-A, Playa, La Habana 11600 (CU).

(74) Mandatario: **VAZQUEZ CASTILLO, Mariela**;
Departamento de Patentes, Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia, Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: CYCLIC PEPTIDES WITH AN ANTI-NEOPLASIC AND ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITY

(54) Título : PÉPTIDOS CÍCLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA Y ANTIANGIOGÉNICA.

(57) Abstract: The invention relates to cyclic peptides having anti-tumoral and anti-angiogenic properties, and to the pharmaceutically acceptable salts thereof and the pharmaceutical compositions containing same. Said cyclic peptides are used in the preparation of medicaments for human and/or veterinary therapeutics and can also be used in diagnostics. Said compounds can be used to detect, monitor and/or control a variety of disorders relating to cellular proliferation, such as oncological diseases and unwanted angiogenesis. Furthermore, they can form part of controlled release systems and systems pertaining to the field of nanobiotechnology, due to the self-assembly capacity thereof and as part of other systems.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a péptidos cíclicos con propiedades antitumorales y antiangiogénicas, así como a sus sales farmacéuticamente aceptables y a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Estos péptidos cíclicos se emplean en la preparación de medicamentos para la terapéutica humana y/o veterinaria, y también pueden emplearse en el diagnóstico. Estos compuestos pueden ser usados para detectar, monitorear y/o controlar una variedad de desórdenes relacionados con la proliferación celular, tales como las enfermedades oncológicas y la angiogénesis no deseada. Además, pueden formar parte de sistemas de liberación controlada y en el campo de la nanobiotecnología, ya sea por su capacidad de autoensamblaje o como parte de otros sistemas.

WO 2012/126441 A2

PÉPTIDOS CÍCLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA Y ANTIANGIOGÉNICA

Campo de la técnica

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología y la industria farmacéutica, en particular con el diseño y obtención de péptidos cíclicos destinados al diagnóstico y terapia de enfermedades oncológicas, u otras patologías con proliferación celular no deseada.

Estado de la técnica anterior

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la división y el crecimiento descontrolado de las células. Dichas células poseen la capacidad de invadir el órgano donde se originaron, de viajar por la sangre y el líquido linfático hasta otros órganos más alejados y crecer en ellos. Es un proceso muy heterogéneo, que engloba a más de 200 tipos de cáncer, de evolución muy diferente. Para que esta enfermedad se desarrolle es necesaria la alteración de varios genes simultáneamente. Estas características incrementan la complejidad del estudio y comprensión de estas patologías malignas, por lo que el tema del cáncer es muy amplio, multidisciplinario e involucra a numerosas líneas de investigación. Esta enfermedad constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial y se espera que para el 2020 se convierta en la causa más frecuente de muerte en el mundo, porque habrá sobrepasado a las enfermedades cardiovasculares (Forteza F (2004) Avances médicos de Cuba. 40:33). El cáncer es la causa principal de muerte en los países económicamente desarrollados y la segunda causa principal de muerte en países en vías de desarrollo (World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization; 2008). La incidencia de cáncer está aumentando en países económicamente en vías de desarrollo como resultado del crecimiento de la población que envejece, así como, cada vez más, una adopción de estilos de vida asociado al desarrollo del cáncer- inactividad física, hábito de fumar, y “occidentalización” de las dietas.

En GLOBOCAN 2008 se estimó una incidencia de 12.7 millones de pacientes con cáncer y 7.6 millones de muertes de cáncer en el 2008; de éstos, 56% de los casos y 64% de las muertes ocurrieron en el mundo económicamente en vías de desarrollo (Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France:

International Agency for Research on Cancer; Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>. 2010. Revisado 8/17/2010).

La supervivencia de cáncer tiende a ser más pobre en los países en vías de desarrollo, probablemente debido a una combinación del diagnóstico tardío y el acceso limitado al tratamiento oportuno y normal. Aunque muchos medicamentos citotóxicos han sido desarrollados y perfeccionados para el tratamiento del cáncer, nuevas moléculas biológicas son necesarias para crear una nueva generación de medicamentos anti-cáncer más efectivos y selectivos en el futuro, que penetrarán una gran porción del mercado de terapéuticos del cáncer.

La concepción actualmente aceptada es que un tratamiento efectivo contra el cáncer es aquel que combina principios de acción diferentes, tales como: acción directa sobre células tumorales y acción sobre el ambiente tumoral. Ello se puede lograr mediante la combinación de moléculas que posean cada una de estas propiedades de manera independiente o mediante moléculas que posean ambas propiedades a la vez. Este último tipo de moléculas, lógicamente es más ventajosa desde el punto de vista farmacológico y económico. Ensayos preclínicos usando inhibidores de angiogénesis (con el objetivo de interrumpir el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor) han sido muy promisorios, frecuentemente han mostrado regresión tumoral completa o parcial, sin ninguna resistencia al medicamento. Hasta ahora, el logro mayor en los estudios clínicos ha sido estabilizar la enfermedad para un período sostenido de tiempo. Para ello, actualmente se han empleado agentes anti-angiogénicos como terapia adyuvante en la combinación con otros tratamientos antitumorales.

Resultados de estudios clínicos han mostrado que la inhibición de moduladores individuales de la angiogénesis no son suficientes para sostener esta respuesta. Existe la necesidad de agentes antiangiogénicos más efectivos que sean capaces tanto de arrestar como de revertir el crecimiento del tumor, de manera tal que se logre un incremento significativo de la sobrevida y calidad de vida, con respecto a los tratamientos actuales.

Aunque los péptidos existentes en la actualidad son una parte pequeña de todos los agentes de las terapéuticas actuales, su potencial está mejorándose por nuevas tecnologías que modifican su estructura, farmacocinética, biodistribución, estabilidad y su aplicación en las escenas preclínicas. En particular, ellos han cobrado relevancia en la terapia del cáncer, ya que existen novedosas metodologías para modificarlos e

incrementar su eficacia anticáncer (Li, Zhi J.; Cho, Chi H. Current Pharmaceutical Design, 16 (10), Abril 2010 , pp. 1180-1189).

Se han realizado varios estudios donde se demuestra la factibilidad del empleo de péptidos en el diagnóstico y terapia del cáncer. Algunos de ellos se encuentran en fase avanzada de desarrollo clínico y otras nuevas generaciones están surgiendo en los últimos años, con resultados preclínicos alentadores.

La actividad citotóxica de un péptido lítico diseñado para unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico fue demostrada sobre varias líneas de cáncer humano. Se demostró que los cambios conformacionales en el nuevo péptido lítico, producto de esta unión, incrementó su selectividad de unión a la membrana de las células cancerosas, y debido a la acción sinérgica adquirida demostró la destrucción selectiva de las células tumorales. El tratamiento con el péptido lítico del receptor del factor de crecimiento epidérmico exhibió una suficiente actividad citotóxica *in vitro* contra células de cáncer resistentes a TKI con mutaciones K-ras (Kohno, Masayuki. European Journal of Cancer 47(5), p.773, Mar 2011).

Para incrementar la terapia del cáncer basada en la unión a oligonucleótidos, frecuentemente se acoplan péptidos que facilitan la entrada dentro de las células. Con este objetivo, se han diseñado péptidos penetradores de células consistentes de un péptido glutamato acoplado al extremo N-terminal del Oct6 NLS, que han demostrado colocalización nuclear, así como su captación por líneas celulares de cáncer pancreático y de próstata (Lewis, H Dan. BMC Biotechnology, 10(1), p.79, Oct 2010).

Un péptido perteneciente a un fragmento de la proteína inhibidora de la vía del factor de tejido (TFPI), una proteína anti-coagulante que existe en la naturaleza, bloqueó el crecimiento del tumor y la angiogénesis en modelos *in vivo*. Además, inhibió la metástasis del tumor y el crecimiento de los vasos sanguíneos, y no pareció afectar los vasos normales (HEMBROUGH Todd A.; RUIZ Jose F.; SWERDLOW Bonnie M.; SWARTZ Glenn M.; HAMMERS Hans J.; ZHANG Li; PLUM Stacy M.; WILLIAMS Mark S.; STRICKLAND Dudley K.; PRIBLUDA Victor S. Blood A. 2004, vol. 103, n° 9, pp. 3374-3380).

El desarrollo de agentes más selectivos dirigidos a pruebas de imágenes y tratamiento de diferentes tumores es la tendencia actual en el diagnóstico y terapia del cáncer. Los péptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos que pueden ser obtenidos o diseñados para unirse a un predeterminado blanco molecular y son

potencialmente capaces de interferir con su función. Estos péptidos específicos pueden inhibir componentes de señales individuales, los cuales son esenciales en el desarrollo del cáncer y su progresión.

La serralisina es la proteína mayoritaria extracelular de la bacteria *Serratia marcescens* CMIB4202, y está asociada a la patogenicidad de este microorganismo en humanos, y también se le han asignado propiedades antitumorales dependientes de su actividad catalítica (Wu Jun, Akaike T, Hayashida K, y col., (2001) Japanese J. Cancer Res. 92:439-451). En dicha cepa (*S. marcescens* CMIB4202) la proteína mayoritaria extracelular es la proteína p50 perteneciente a la familia de las serralisinas (SERMA). Se conoce que el polipéptido perteneciente al dominio C-terminal no catalítico de esta serralisina (denominado p25) es un potente inhibidor de la proliferación endotelial y del crecimiento de tumores primarios y metastásis *in vivo* (Abrahantes-Pérez MC y col., "Pharmaceutical composition containing serralisine polypeptide fragments". Solicitud de patente con No. de publicación internacional WO 2006/005268). Cuando dicho polipéptido se expresó por vía recombinante en *Escherichia coli* se le denominó CIGB370r.

A pesar de la existencia de múltiples fármacos que se emplean en la terapéutica del cáncer, debido a la creciente incidencia de esta enfermedad continúa siendo de gran interés la identificación y obtención de agentes antitumorales más potentes que puedan sustituir o complementar la terapia de esta patología en los individuos que lo necesitan.

Explicación de la invención

La presente invención contribuye a resolver el problema antes mencionado, al proveer péptidos cíclicos con propiedades antitumorales y antiangiogénicas. En la misma se aborda el diseño y obtención de estos compuestos peptídicos, y se demuestra su eficacia en varios modelos animales de cáncer.

Sorpresivamente, la actividad antitumoral del polipéptido p25 de *S. marcescens* fue reproducida por un fragmento peptídico constreñido estructuralmente, que se encontraba pobremente expuesto en la interfase del dominio N y C-terminal de la Serralisina, sugiriendo que la conformación estructural de esta región del polipéptido era la mínima unidad estructural funcionalmente activa del polipéptido p25, oculta en la Serralisina y probablemente expuesta durante la autocatálisis de la misma, o en el medio ambiente proteolítico tumoral. Los datos presentados demuestran que los péptidos constreñidos de la presente invención tienen actividad citotóxica directa

sobre células tumorales y actividad antiangiogénica, y sugiere un posible mecanismo y un nuevo paradigma de la regresión tumoral mediada por infección.

Los péptidos son moléculas propiamente flexibles y, como tal, pueden adoptar diferentes estructuras. Una o más de una de sus estructuras posibles pueden tener relevancia biológica específica. Para determinar cuáles conformaciones son importantes, es necesario confinar los péptidos a una simple región de espacio conformacional, y entonces determinar si esta es su forma útil. Examinando muchas de estas conformaciones, es posible determinar cuál es biológicamente importante.

Existen novedosas metodologías para crear estructuras sintéticas más precisas.

Debe tenerse en cuenta que ellas deben mantener cierta flexibilidad. Es decir, si la estructura diseñada es demasiado rígida, no puede asumir otra estructura con las propiedades deseadas para su actividad biológica *in vivo*, considerando que una estructura ligeramente flexible es capaz de realizar este ajuste. Con las técnicas y metodologías propias para el diseño de péptidos sintéticos, se obtiene el valioso conocimiento sobre los requisitos para los receptores del péptido, los sitios activos de enzimas, y una amplia variedad de otros procesos biológicos.

Las propiedades de un péptido en sistemas biológicos son dependientes de su estructura. Así, la habilidad de usar el diseño racional para la generación de péptidos útiles es dependiente de la correspondiente habilidad para determinar las relaciones específicas de estructura molecular con la actividad biológica. La habilidad de reconocer estas relaciones está determinada por una variedad de incertidumbres, tanto en los sistemas del ensayo biológico como en la interpretación de datos. El factor de mayor complicación es la dificultad en determinar la estructura tridimensional del propio péptido. Muchos péptidos son inherentemente flexibles y por eso asumen muchas conformaciones en solución. El problema radica en determinar cual de estas conformaciones es responsable de la actividad observada del péptido, y muchos péptidos pueden ser activos en más de una conformación. El uso de constreñimientos conformacionales ha sido útil para elucidar estas relaciones de estructura-función. Si el péptido se restringe a una conformación particular o estrechamente relacionada a la familia de conformaciones activas, entonces la actividad medida refleja esa estructura. Aunque una molécula absolutamente rígida es imposible, creando los análogos, con los motivos estructurales prescritos, se puede empezar a atribuir ciertas actividades biológicas a sus estructuras causales.

En la presente invención el mapeo peptídico de los sitios funcionales de la secuencia de p50/p25, utilizando péptidos sintéticos de 20 aa solapados en 10 y ensayando la actividad citotóxica sobre células tumorales *in vitro* (ver Ejemplo 2), indicó que el péptido Gly255-Ser274 (N06P87) es activo. No obstante, la actividad de este péptido *in vivo* fue inferior a la observada para la proteína p25. Adicionalmente, la sustitución en el polipéptido recombinante idéntico a p25 (CIGB370r) y también en el péptido sintético N06P87, del segmento Gly266-Asp268 por el tripéptido Ala-Ala-Ala abolió la actividad biológica de ambas moléculas, indicando que este segmento es esencial para la actividad anticancerígena. Ese resultado sugiere además, que una o ambas cadenas laterales de los residuos Arg267 y Asp268 son esenciales en la interacción con el (o los) receptor(es), aún no identificado(s), aunque un efecto negativo de la mutación triple sobre la conformación del péptido y de la proteína biológicamente activa también es concebible. En este sentido, si se asume que la estructura local biológicamente relevante del tripéptido es similar a la adoptada en la estructura cristalográfica de p50, entonces la sustitución de Gly266 por Ala es altamente desfavorable; ya que la cadena principal de este residuo adopta ángulos positivos de torsión prohibitivos para el aa alanina (Figura 14). Adicionalmente, los resultados del Ejemplo 2 también muestran, que la presencia del segmento Gly266-Asp268 *per se* no es suficiente para lograr el efecto biológico y otros residuos son también necesarios. Como se observa en la Tabla 2, el péptido sintético F07P16 correspondiente a la secuencia Thr265-Trp284 y solapado en 10 residuos con el péptido lineal N06P87 (Gly255-Ser274), no es activo a pesar de contener la secuencia Gly266-Asp268.

En la presente invención, la identificación del segmento Gly255-Ser274 como parte de un sitio funcional responsable de la actividad anticancerígena de la proteína p50/p25 es sorprendente, dado el carácter críptico del segmento en la estructura 3D de la proteína p50. La mayoría de los aa del segmento Gly255-Ser274 se encuentran total o parcialmente ocultos en el interior de la estructura 3D de p50, incluyendo a los residuos Thr257, Tyr258, Gly259, Phe260, Thr265, Arg267, Phe269, Leu270 y Thr272. El giro Arg267-Leu270 forma parte de la superficie de interfase entre los dominios N y C-terminal de la proteína. Los residuos Arg267 y Asp268 forman puentes salinos (doble puentes de hidrógenos cada uno) con los residuos del dominio N-terminal Asp98 y Arg171 respectivamente. La interfase incluye también interacciones interdominios de carácter hidrofóbico, que involucran al residuo Phe269

del dominio C-terminal y los residuos Ala232 y Ala233 del dominio N-terminal. Adicionalmente, el carácter críptico del sitio es consistente con la mayor potencia observada de la proteína p25 con respecto a p50, ya que p25 no contiene el dominio N-terminal y presenta una mayor exposición del segmento Gly255-Ser274 (ver Ejemplo 3, Figura 5, Tabla 3).

En la presente invención se evidenció que la conformación del péptido N06P87 es esencial en su actividad biológica. La importancia de la conformación del péptido N03P87 en su actividad antitumoral es apoyada por los resultados del Ejemplo 4, que muestran que su actividad depende de sus regiones flanqueantes que garantizan el plegamiento correcto de la molécula. Por otra parte, cuando el polipéptido p25 se expresó por vía recombinante, y no se le adicionó calcio durante su renaturalización, éste no presentó actividad biológica. Por ende, las preparaciones no plegadas correspondientes a los polipéptidos carentes de átomos de calcio no son activas (la unión de calcio es necesario para el plegamiento correcto y estabilidad de la proteína). Adicionalmente, el Ejemplo 4 muestra que la introducción de un puente disulfuro en el péptido N06P87 - mediante la adición de una cisteína en el extremo N-terminal y otra en el extremo C-terminal - provoca la pérdida de la actividad biológica del péptido (péptido N06P89 de la Tabla 4, Figura 7). La ciclización introducida por este medio reduce el espacio conformacional accesible al péptido en solución, sin embargo esta es incompatible con la conformación que el segmento Gly255-Ser274 adopta en la estructura plegada de p50. La distancia entre los extremos amino y carboxilo terminales del segmento Gly255-Ser274 en la estructura cristalográfica de la proteína es de 24.4 Å (Figura 10E), lo cual es incompatible con la estereoquímica de los puentes disulfuros (distancia carbono alfa- carbono alfa entre cisteínas enlazadas no mayor a 7 Å). Esta modificación, por tanto, presupone una alteración significativa de las propiedades estructurales de la cadena peptídica de N06P87. Estos resultados y su análisis correspondiente sugieren que la conformación activa de N06P87 pudiera ser similar a la adoptada por el segmento Gly255-Ser274 del polipéptido p25 nativo.

Como se muestra en los Ejemplos 2, 4 y 6, es factible el diseño de análogos peptídicos de la actividad biológica del polipéptido p25. En la presente invención se presenta el diseño de una familia de péptidos cortos y medianos (9-25 residuos) potentes, basados en la estructura del péptido N06P87, y modificados mediante la introducción/sustitución de determinados grupos químicos y/o restricciones

estructurales (Tabla 5) que permiten que estos péptidos muestren valores de eficacia y potencia cercanos o mejores que el polipéptido p25.

Además de su alta eficacia y potencia, los péptidos cortos y medianos de la presente invención presentan varias ventajas como agentes anticancerígenos, con respecto a las proteínas originales completas. Generalmente, el tamaño de la molécula influye en las propiedades farmacocinéticas (tales como la biodistribución) de los agentes anticancerígenos. Ejemplos bien documentados son los fragmentos de anticuerpos de cadena única recombinantes (r-sc-Fv) comparados con los anticuerpos, los primeros tienen mejor acceso a tejidos y tumores poco accesibles a los anticuerpos completos (Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S, Revets H; (2004). *Cancer Res.* 64(8):2853-7). Particularmente limitado ha sido el alcance de la terapias de anticuerpos en el tratamiento de tumores sólidos (Stern M, Herrmann R; (2005). *Crit Rev Oncol Hematol.* 54(1):11-29). En general, las evidencias experimentales indican que las propiedades farmacocinéticas mejoran con el uso de ligandos más pequeños (Reilly R. M., Sandhu J., Alvarez-Diez T. M., et al. (1995). *Clin. Pharmacokinet.* 28: 126142). Los péptidos cortos y medianos (típicamente 1-3 kDa) pueden en parte sortear las complicaciones asociadas a la terapia anticancerígena basada en anticuerpos (Ladner R. C., Sato A. K., Gorzelany J., de Souza M. (2004). *Drug Discov. Today* 9: 525529). En particular, los péptidos pueden mostrar una mayor penetración del tumor, menor adquisición inespecífica y elicitar una respuesta inmunológica menor. Por tanto, los péptidos de la presente invención además de estar diseñados para optimizar la interacción con su receptor, también deben garantizar una biodistribución eficiente.

Usualmente los péptidos cortos y medianos de hasta 20-25 residuos, son poco inmunogénicos, a diferencia de las proteínas heterólogas, y especialmente los antígenos de microorganismos, como es el caso de p25. El empleo de tales proteínas como agentes terapéuticos puede generar una respuesta inmunológica en los pacientes, provocando la aparición de anticuerpos que pueden neutralizar el efecto terapéutico de la proteína. Este efecto es especialmente relevante en el tratamiento de padecimientos crónicos, que requieren el uso continuado de los agentes terapéuticos. Por otra parte, si el microorganismo es un patógeno de humanos puede suceder que un determinado porcentaje de las personas posean ciertos niveles preexistentes de anticuerpos neutralizantes, lo cual pudiera elevar las dosis terapéuticas necesarias. Como una parte significativa de la superficie molecular del

segmento Gly255-Ser274 se encuentra comprometida en la interfase entre los dominios N- y C- terminal de la proteína p50, y por tanto es críptica en la estructura nativa de la proteína, en consecuencia el péptido N06P87 es potencialmente poco antigénico, o sea que los anticuerpos anti-proteína p50 no son eficientes en reconocer (neutralizar) el péptido N06P87. Por tanto, desde el punto de vista de la antigenicidad/inmunogenicidad potencial de la molécula terapéutica es más favorable el uso de los péptidos en lugar de las proteínas completas, especialmente cuando los péptidos son capaces de provocar un efecto biológico similar a la proteína natural.

Un elemento esencial del diseño de los agentes anticancerígenos potentes de la presente invención consiste en que los péptidos diseñados son cíclicos, o sea contienen aa que se encuentran enlazados por medio de enlaces covalentes que involucran grupos químicos de las cadenas laterales y/o los grupos de los extremos amino y carboxilo terminales. Por tanto los péptidos aquí diseñados son constreñidos estructuralmente por medio de la ciclización, la cual reduce significativamente la flexibilidad estructural de estas moléculas. Generalmente, el empleo de péptidos como agentes terapéuticos presenta un número de desventajas. Tal es el caso de la flexibilidad intrínseca de los péptidos; especialmente los cortos y medianos son mucho más flexibles que las proteínas plegadas, por lo que el proceso de unión de estos a proteínas u otras macromoléculas receptoras va habitualmente acompañado de una mayor pérdida de entropía conformacional. Este hecho contribuye a que estas moléculas posean como regla una afinidad de unión inferior al de la unión proteína-proteína. La menor afinidad exhibida por los péptidos (consecuentemente también su potencia) puede además estar asociada al hecho que la superficie de contacto péptido-receptor suele ser menor comparada con las interfases proteína-receptor, especialmente cuando los péptidos son un segmento de la proteína nativa. Por esta razón, generalmente se hace necesario el rediseño y la modificación química de los péptidos para incrementar la afinidad de la unión al receptor (y consecuentemente su potencia).

Anteriormente se había identificado un polipéptido derivado de regresión tumoral mediada por infección denominado p25, con efecto antiangiogénico y efecto directo sobre células tumorales (Solicitud de patente con No. de publicación internacional WO 2006/005268). En la presente invención, se desarrolla una plataforma basada en péptidos que mimetizan estructuralmente el motivo activo del polipéptido p25, y que muestran ventajas con respecto a la molécula que le dio origen. El polipéptido, al ser

de origen bacteriano, limita los ciclos de tratamiento del cáncer; ya que puede generar respuesta del sistema inmune que neutralice la actividad del mismo, e impida el tratamiento prolongado de una enfermedad crónica como es el cáncer. Es por ello, que en la presente invención se dirigió la investigación en el campo de la obtención de moléculas derivadas de la regresión tumoral mediada por infección, útiles para la terapia del cáncer, al identificar la mínima unidad funcionalmente activa del polipéptido p25 que reprodujera su actividad contra el cáncer, sin originar respuesta negativa del sistema inmune durante la terapia prolongada de patologías oncológicas o de proliferación celular no deseada.

Un aporte de la presente invención es que es posible desarrollar moléculas peptídicas de 25 aa o menos, que mimetizan desde el punto de vista estructural la unidad mínima funcionalmente activa de proteínas antitumorales derivadas de la regresión tumoral mediada por infección, y que sorprendentemente estas pequeñas moléculas no ejercen su actividad contra el tumor mediada por el sistema inmune, tal como estaba establecido hasta el momento en el paradigma de regresión tumoral mediada por infección (Paglia P, y Guzman CA. Cancer Immunol. Immunother. 1998. 46:88-92). Además, otro aspecto novedoso de la presente invención, es que estas pequeñas regiones activas no se encuentran en la superficie de exposición de las proteínas bacterianas, sino que cambian su superficie de exposición producto de la digestión enzimática de las mismas. Ello puede ocurrir en el ambiente tumoral rico en metaloproteasas, originando un potente efecto citotóxico contra las células tumorales y contra la angiogénesis propia del tumor, contribuyendo a la potente actividad antitumoral adjudicada a la regresión tumoral mediada por infección, que ha sido un campo de investigación por más de un siglo, sin llegar a obtener moléculas útiles para la terapia del cáncer, que puedan convertirse en productos biotecnológicos novedosos en el campo de la terapéutica oncológica. En el presente documento se demuestra que esta hipótesis es válida; ya que los péptidos de la presente invención mostraron eficacia antitumoral *in vitro* e *in vivo*, con tratamientos prolongados, sin evidencias de la presencia de anticuerpos neutralizantes que limitaran su tratamiento continuado. Su tecnología de obtención es escalable. Las bondades de estos péptidos son:

- Presentan amplio espectro de acción sobre células tumorales de diferente origen histológico.

- Acción directa sobre la angiogénesis tumoral y acción directa contra células tumorales.
- Su mecanismo de acción es independiente de p53.
- Tiene efecto citotóxico sobre células aisladas de metástasis humanas y su consiguiente efecto antimetastásico.
- Inducen apoptosis sobre células tumorales y son específicos para células activadas para proliferar.
- Tienen acción antitumoral, tanto por vía sistémica como por vía intratumoral. Reducen la velocidad de crecimiento de tumores xenógrafos y prolongan la supervivencia de animales portadores de tumor.
- En un grupo de tumores, causan regresión completa del tumor.
- No presentan toxicidad después de inyecciones repetidas en animales por un período prolongado.
- Presentan mayor volumen de distribución que la molécula que le dio origen.
- Su perfil de biodistribución permite el tratamiento de tumores malignos de diferentes patologías.
- Sus tecnologías de obtención son económicas.
- Su desarrollo farmacéutico es más factible y rápido que el de moléculas obtenidas por vía recombinante.

Son objeto de la presente invención, péptidos cíclicos con actividad antineoplásica y antiangiogénica que se caracterizan porque su secuencia aminoacídica comprende:

a) Un segmento cuya secuencia aminoacídica es:



Donde,

X^1 es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Ser, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo; o una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por un tetrapéptido, un pentapéptido, y un hexapéptido

X^2 es el aminoácido Gly o D-Ala

X^3 es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Leu, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^4 es opcional y es un aminoácido seleccionado entre el grupo compuesto por Ser, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo;

- 5 b) Un segmento N-terminal, opcional y anterior al segmento descrito en a), cuya secuencia aminoacídica es:



Donde,

10 X^{-1} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Asn, D-Asp, D-Glu, D-Gln y D-Ala, y se encuentra enlazado por un enlace peptídico al residuo X^1 del segmento descrito en a), y dicho enlace peptídico comprende al grupo carbonilo de la cadena principal del residuo X^{-1} y al grupo amino de la cadena principal del residuo X^1 del segmento descrito en a);

15 X^{-2} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Phe, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^{-3} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Gly y D-Ala

20 X^{-4} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Tyr, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^{-5} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Gly y D-Ala

- 25 c) Un segmento C-terminal opcional y posterior al segmento descrito en a) cuya secuencia aminoacídica es seleccionada del grupo compuesto por Thr- $X^{+1}X^{+2}$, Thr- $X^{+1}\text{-}X^{+2}\text{-}X^{+3}$ y Thr- $X^{+1}\text{-}X^{+2}\text{-}X^{+3}\text{-}X^{+4}$

Donde,

30 el residuo N-terminal Thr de dicho segmento C-terminal se encuentra enlazado al segmento descrito en a) por un enlace peptídico que comprende el grupo amino de la cadena principal de dicho residuo N-terminal Thr y el grupo carbonilo de la cadena principal del residuo X^4 del segmento descrito en a)

X^{+1} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Thr, Gly y Ala

X^{+2} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Ser, Asn, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural que comprenda en la cadena lateral el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^{+3} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Cys, Gln, Arg, Asn, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural que comprenda en la cadena lateral el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^{+4} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Gln, Arg, Asn y Lys

- d) Al menos un enlace covalente seleccionado del grupo compuesto por un enlace peptídico que comprende los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido que está presente si la secuencia X^1 del segmento descrito en a) es la secuencia de un tetrapéptido, un pentapéptido o un hexapéptido; un enlace covalente disulfuro que comprende los grupos sulfhidrilo de la cadena lateral de los residuos X^1 y X^4 o X^{-4} y X^3 o X^{-2} y X^{+2} o X^{-2} y X^{+3} si dichos residuos X^1 y X^4 o X^{-4} y X^3 o X^{-2} y X^{+2} o X^{-2} y X^{+3} son Cisteínas o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo sulfhidrilo; un enlace amida que comprende un grupo carbonilo y un grupo amino de las cadenas laterales de los residuos X^1 y X^4 o X^{-4} y X^3 o X^{-2} y X^{+2} o X^{-2} y X^{+3} si dichos residuos X^1 y X^4 o X^{-4} y X^3 o X^{-2} y X^{+2} o X^{-2} y X^{+3} son Lys (o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo amino) y Glu (o Asp o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo carbonilo), o dichos residuos X^1 y X^4 o X^{-4} y X^3 o X^{-2} y X^{+2} o X^{-2} y X^{+3} son respectivamente Glu (o Asp o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo carbonilo) y Lys (o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo amino); y un enlace amida que comprende el grupo carbonilo terminal del péptido y un grupo amino de la cadena lateral del residuo X^{-2} y dicho enlace amida está presente si el residuo X^{+2} es: el residuo del extremo carboxilo terminal del péptido, el aminoácido Asn y X^{-2} es el aminoácido Lys o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo amino.

En una materialización de la invención, los péptidos cíclicos comprenden un enlace peptídico entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido y la secuencia X^1 de dichos péptidos tienen la secuencia aminoacídica de un tetrapéptido, preferentemente de secuencia que se selecciona del grupo compuesto

por (D-Ser)-Pro-Thr-Pro, (D-Ala)-Pro-Thr-Pro y Gly-Pro-Thr-Pro.

En otra materialización de la invención, los péptidos cíclicos comprenden un enlace peptídico entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido y la secuencia X^1 de dichos péptidos tienen la secuencia aminoacídica de un pentapéptido, preferentemente de secuencia que se selecciona entre el grupo compuesto por Arg-Arg-Pro-Asn-Ser, Arg-Arg-Pro-(D-Ala)-Ser, Lys-Lys-Pro-Asn-Ser y Lys-Lys-Pro-(D-Ala)-Ser.

En otra materialización adicional de la invención, los péptidos cíclicos comprenden un enlace peptídico entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido y la secuencia X^1 de dichos péptidos tienen la secuencia aminoacídica de un hexapéptido, preferentemente de secuencia que se selecciona entre el grupo compuesto por Thr-Pro-(D-Ala)-Gln-Asn-Ser, Arg-Pro-(D-Ala)-Gln-Asn-Ser, Thr-Pro-(D-Ala)-(BmGln)-(NmAsn)-Ser y Arg-Pro-(D-Ala)-(BmGln)-(NmAsn)-Ser, donde BmGln es el aminoácido L-b-metilglutamina y NmAsn es el aminoácido L-N-metilasparagina.

En la invención los péptidos cíclicos pueden tener su extremo N-terminal enlazado covalentemente al grupo acetilo, al aminoácido piroglutámico, a un lípido o a un polímero, preferentemente el polietilén glicol, y el enlace se puede establecer directamente, o por medio de un grupo espaciador, preferentemente el aminoácido Gly. Además, los péptidos cíclicos de la invención pueden tener su extremo C-terminal en forma amida, o enlazado covalentemente a un lípido o a un polímero, preferentemente el polietilén glicol, y el enlace se establece directamente, o por medio de un grupo espaciador, preferentemente el aminoácido Gly.

En una materialización de la invención, los péptidos cíclicos pueden comprender un enlace covalente entre el péptido y un lípido o un polímero, preferentemente el polietilén glicol, y dicho enlace covalente comprender el grupo sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} , y dicho residuo X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} es el aminoácido Cys, Lys, Asp, Glu o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo.

En una realización de la invención, los péptidos cíclicos se pueden caracterizar porque X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} son seleccionados del grupo compuesto por el aminoácido cisteína, el ácido (2R)-2-amino-3-sulfanilbutanoico, el ácido (2R)-2-amino-3-methyl-3-sulfanilbutanoico, el ácido (2S)-2-amino-4-sulfanilbutanoico, ácido 2-

amino-5-sulfanil-pentanoico, el ácido 2-amino-3-sulfanil-pentanoico, el ácido 2-amino-4-metil-3-sulfanilpentanoico, el ácido 2-amino-3-metil-4-sulfanilpentanoico, el ácido 2-amino-3,4-dimetil-3-sulfanil-pentanoico, el ácido 2-amino-3-etil-3-sulfanilpentanoico, el ácido (2R)-2-amino-3-metil-3-sulfanilpentanoico, el ácido (4S)-4-amino-2-metil-5-sulfanilpentanoico, el ácido (4R)-4-amino-2-metil-5-sulfanilpentanoico, el ácido (4R)-4-amino-5-sulfanilpentanoico y el ácido (4S)-4-amino-5-sulfanilpentanoico.

En otra realización de la invención, los péptidos cíclicos se pueden caracterizar porque X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} , X^{+3} son seleccionados del grupo compuesto por el aminoácido Lys, el ácido 2-[bis(3-aminopropil)amino]acético, el ácido (2S)-2,5-diaminopentanoico, el ácido 2,2-diaminoacético, el ácido (3S)-3,4-diaminobutanoico, el ácido (2R)-2,4-diaminobutanoico, el ácido (2S)-2,4-diaminobutanoico, el ácido (2S)-2,3-diaminopropanoico, el ácido (2R)-2,3-diaminopropanoico, el ácido 2-[(2-aminoetil)amino]acético, el ácido 2-[(3-aminopropil)amino]acético, el ácido 2-[(4-aminobutil)amino]acético, el ácido (4S)-4,8-diaminooctanoico, el ácido (2S)-2-amino-3-(4-aminofenil)propanoico, el ácido (2S)-2-amino-3-[4-(2-aminoetoxi)fenil]propanoico, el ácido 2-(piperidin-4-ilamino)acético, el ácido (2S)-2-amino-4-[(5R)-2,2-dimetil-1,3-oxazolidin-5-yl]butanoico, el ácido (2S)-2-amino-6-(metilamino)hexanoico, el ácido (2R,4R)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico o el ácido (2R,4S)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico, el ácido 2-(4-aminopiperidin-4-yl)acético, el ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico, el ácido (2S,4R)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico y el ácido imidazolidina-2-carboxílico.

En una materialización de la invención, los péptidos cíclicos se pueden caracterizar porque X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} son seleccionados del grupo compuesto por el aminoácido Glu, Asp, el ácido 3-[(carboximetil)amino]propanoico, el ácido 2-[(carboximetil)amino]acético, el ácido 3-[(2-carboxietil)amino]propanoico, el ácido (3R)-3-aminohexanedioico, el ácido 4-aminoheptanedioico, el ácido 4-aminopiperidina-1,4-dicarboxílico, el ácido (2S,4S)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico, el ácido 2-[(carboximetil)amino]acético, el ácido (2S)-2-amino-6-[(carboximetil)amino]hexanoico, el ácido 3-[(2-carboxietil)amino]propanoico, el ácido (2S)-2-aminoheptanedioico, el ácido (2S)-2-aminooctanedioico, el ácido (2R)-2-amino-3-[(2-carboxietil)sulfanil]propanoico, el ácido (2R)-2-amino-3-[(carboximetil)sulfanil]propanoico, el ácido 4-[(2R)-2-amino-2-carboxietil]sulfanil}butanoico, y el ácido (2S)-2-amino-3-[4-(carboximethoxi)fenil]propanoico.

En una realización particular de la invención, los péptidos cíclicos con efecto

antitumoral y antiangiogénico tienen una secuencia aminoacídica seleccionada entre las SEQ ID 1-76.

Es también objeto de la presente invención el uso de los péptidos cíclicos ya referidos para preparar un medicamento para la terapia del cáncer o el tratamiento de desórdenes de la proliferación celular no deseada, o un medicamento antiangiogénico.

Otro aspecto de la invención lo constituye un método para el tratamiento del cáncer, de los desórdenes de la proliferación celular y la angiogénesis no deseada, en el que se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de al menos uno de los péptidos cíclicos de la invención a un individuo que lo necesita. Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los péptidos de la invención y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables también son objeto de la presente invención.

La invención también provee compuestos para el diagnóstico del cáncer que comprenden al menos uno de los péptidos de la invención y un agente para imagen seleccionado dentro del grupo compuesto por un grupo fluorescente, un grupo no fluorescente, una partícula semiconductor fluorescente, un agente paramagnético o súperparamagnético, y un radioisótopo.

Otro aspecto de la presente invención es una combinación farmacéutica que comprenda al menos uno de los péptidos de la invención con al menos un agente de tratamiento, como los medicamentos anticancerígenos y las hormonas. En una realización de la invención, en dicha combinación el péptido está conjugado directamente al agente de tratamiento mediante enlaces covalentes. En otros casos, el péptido está conjugado al agente de tratamiento por un elemento acoplador.

La invención también comprende las combinaciones farmacéuticas donde al menos uno de los péptidos de invención se combina con prodigiosinas o derivados de estas. Los elementos que forman estas combinaciones pueden ser administrados, a los individuos que lo necesitan, en el curso de un tratamiento médico, de forma secuencial o simultánea.

Un número grande de medicamentos debe ser administrado por vía parenteral, por ejemplo: inyección intravenosa, intramuscular, o subcutánea, para lograr su efectividad terapéutica. Para algunos terapéuticos, el uso de vehículos de liberación controlada puede incrementar la eficacia del medicamento y el grado de satisfacción

del paciente. El autoensamblaje molecular ha sido explorado recientemente para ingeniería de materiales de encapsulación y liberación controlada de terapéuticos. Actualmente, existe gran progreso en el diseño de plataformas de materiales autoensamblados basadas en péptidos y polímeros (Monica C. Branco a,b, Joel P. Schneider. Acta Biomaterialia 5 (2009) 817–831). Algunos de los péptidos de la presente invención, tales como el J08P48, tienen propiedades anfipáticas que le permiten autoensamblarse, y por ende formar parte de sistemas de liberación controlada de moléculas terapéuticas o en el campo de la nanotecnología. Por tanto, también son objetos de la presente invención las formulaciones novedosas encapsuladas en forma de liposomas o microesferas para la liberación controlada de estos péptidos como medicamento para las terapias combinadas del cáncer. Así como los complejos nanoparticulados con sistemas de direccionamiento controlados hacia sitios de interés diagnóstico-terapéuticos o que por sí mismo de manera específica ejerzan estas actividades.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Actividad citotóxica del péptido N06P87 sobre células tumorales de diferente origen histológico. **A:** células Colo 205; **B:** células HEp-2. El polipéptido CIGB370r y el Cisplatino se emplearon como controles positivos de agentes antitumorales.

Figura 2. Actividad citotóxica del péptido N06P87 sobre la línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 (**A**) y sobre la línea de cáncer de colon Ls174T (**B**). Otros péptidos de la librería no mostraron actividad cuando se evaluaron sobre la proliferación de A549.

Figura 3. Ensayos de evaluación de la actividad de varios péptidos de la librería objeto de estudio sobre las células tumorales humanas M14 (**A**) y Ls174T (**B**). El polipéptido CIGB370r se empleó como control positivo de ambos ensayos.

Figura 4. Actividad citotóxica del péptido E07P04 sobre la línea de melanoma M14. El polipéptido CIGB370r se empleó como control positivo del ensayo.

Figura 5. Cálculos de accesibilidad de las superficies del N-terminal (1srpN) y C-terminal (1srpC) de la proteasa mayoritaria de *Serratia*, con respecto a la proteína íntegra (1srp).

Figura 6. Secuencias flanqueantes al péptido líder de 20 aminoácidos (aa) N06P87.

Figura 7. Actividad citotóxica sobre células de Melanoma humano. El péptido líder N06P87 es el único capaz de inhibir la proliferación celular para una concentración de 50 µM.

Figura 8. Evaluación de la actividad antitumoral del péptido lineal N06P87, derivado del polipéptido p25, con respecto a la molécula que le dio origen. Esquema de administración (A); Efecto antitumoral evaluado a través de la medición del volumen del tumor (B); y Efecto antitumoral evaluado a través de la sobrevivencia de los ratones inoculados (C). Modelo empleado: cáncer de colon humano Ls174T implantado en ratones atímicos NIH.

Figura 9. Definición de regiones funcionales del segmento Gly₂₅₅-Ser₂₇₄ (péptido lineal N06P87). El segmento primario del péptido es la región central, limitada por los segmentos secundarios N- y C-terminales.

Figura 10. Modelos de los péptidos cíclicos J08P48s-s, A08P28s-s, A08P25s-s, J08P46s-s y del péptido lineal N06P87 de la presente invención, diseñados a partir del segmento Gly₂₅₅-Ser₂₇₄ de la proteína p50. Los modelos fueron obtenidos con el programa MODELLER, utilizando la estructura cristalográfica de p50 como molde. Los puentes disulfuros fueron introducidos en las posiciones identificadas previamente utilizando el método MODIP. **A:** modelo de N06P87 (péptido lineal) de acuerdo a la estructura tridimensional (3D) del segmento Gly₂₅₅-Ser₂₇₄ en p50; **B:** modelo del péptido J08P48s-s; **C:** modelo del péptido A08P28s-s; **D:** modelo del péptido A08P25s-s; **E:** modelo del péptido J08P46s-s con la señalización de la distancia entre los extremos N- y C-terminales del péptido.

Figura 11. Modelo de la estructura del péptido cíclico 33 de la Tabla 5. La lisina 7 forma un enlace amida con el grupo carbonilo terminal.

Figura 12. Figura estereoscópica del modelo de la estructura del péptido cíclico 69 de la Tabla 5. El segmento primario Asn₂₆₄-Ser₂₇₁ es ciclizado mediante el hexapéptido conector Arg-Pro-(dAla)-Gln-Asn-Ser. El residuo dAla es el estereoisómero D-Ala.

Figura 13. Figura estereoscópica del modelo de la estructura del péptido cíclico 76 de la Tabla 5. El segmento primario Asn₂₆₄-Ser₂₇₁ es ciclizado mediante el pentapéptido conector Arg-Arg-Pro-Asn-Ser, cuyos residuos son subrayados.

Figura 14. Mapa de Ramachandran correspondiente a la estructura 3D del segmento Gly₂₅₅-Ser₂₇₄ de p50.

Figura 15. Esquema general de la estructura química de los péptidos cíclicos diseñados en la presente invención. Las líneas indican presencia de un enlace covalente. Cuando conectan dos residuos del péptido, las líneas indican que estos residuos son ciclizados, o sea enlazados covalentemente. Las líneas ubicadas por encima de la secuencia del péptido corresponden a la ciclización de la cadena principal, por debajo se muestran los enlaces correspondientes a ciclizaciones que involucran al menos una cadena lateral. Si una línea apunta a un residuo X^i significa que el enlace covalente se produce por la cadena lateral de dicho residuo X^i . Si la línea parte de un guión entre dos residuos significa que el enlace covalente involucra el grupo amino o carbonilo del residuo posterior y anterior al guión respectivamente. La línea que apunta al guión delante de X^1 significa un enlace covalente amida que comprende al grupo amino de X^1 , en este caso el péptido no posee segmento secundario N-terminal. Las líneas detrás de X^4 y X^{+2} indican un enlace covalente que comprende el grupo carbonilo de X^4 y X^{+2} respectivamente, detrás de X^4 significa además ausencia de segmento secundario C-terminal y detrás de X^{+2} que este residuo es el residuo carboxilo terminal del péptido. Entre llaves se señalan los grupos involucrados en el enlace covalente y el tipo de enlace: enlace amida o puente disulfuro, también se muestran secuencias preferidas de los péptidos conectores. Las zonas sombreadas sobre la secuencia del péptido indican en orden del N- al C-terminal los segmentos funcionales definidos en la invención: (a) segmento secundario N-terminal, (b) segmento primario y (c) segmento secundario C-terminal. Con el triángulo P se señala los sitios factibles de ser modificados mediante la unión covalente a polímeros u otros grupos químicos, tales modificaciones son factibles si el residuo o grupo de la cadena principal en cuestión no participa de un enlace de ciclización. El péptido puede incluir uno o más enlaces de ciclización, así como una o más modificaciones con polímeros y/o grupos químicos. Los aa análogos mencionados en la figura, como posibles ocupantes de las posiciones de reemplazo X^{-4} , X^{-2} , X^1 , X^3 , X^4 , X^{+2} y X^{+3} son aa cuya cadena lateral comprende el grupo amino o el grupo carboxilo o el grupo sulfhidrilo.

Figura 16. Péptidos cíclicos optimizados, derivados del polipéptido p25 incrementan la sobrevida de los animales tratados. Animales portadores del tumor subcutáneo TC-1 se inyectaron con una dosis de 80 μ M por vía intratumoral (i.t.). Cada grupo recibió un péptido diferente, o el polipéptido CIGB-370r o el vehículo. Se muestra la sobrevida de todos los grupos.

Figura 17. Péptidos cíclicos optimizados, derivados del polipéptido p25 incrementan la sobrevida de los animales tratados independientemente de la vía de administración. Animales portadores del tumor subcutáneo TC-1 se inyectaron con una dosis de 80 µM por vía i.t o intraperitoneal (i.p). Cada grupo recibió un péptido diferente, o el polipéptido CIGB-370r o el vehículo. Se muestra la sobrevida de todos los grupos.

Figura 18. Actividad biológica *in vitro* del péptido J08P48s-s, sobre líneas de células tumorales humanas de diferente origen histológico.

Figura 19. Péptidos cíclicos optimizados, derivados del polipéptido p25 súperan la actividad antitumoral y la sobrevida de los animales tratados con el péptido lineal y su actividad es análoga a la del polipéptido CIGB-370r. **(A)** Esquema de administración; **(B)** Efecto antitumoral evaluado a través de la medición del volumen del tumor **(B)**; y Efecto antitumoral evaluado a través de la sobrevida de los ratones inoculados **(C)**. Modelo: cáncer de colon humano Ls174T implantado en ratones atímicos NIH.

Figura 20. Efecto de dos péptidos cíclicos de la presente invención sobre la diferenciación de células endoteliales en matrigel. Las células HMEC se cultivaron en condiciones de activación (10 ng.mL-1 EGF, 1 µg.mL-1 de hidrocortisona) en presencia de dos péptidos cíclicos de la presente invención o del vehículo. Los péptidos fueron capaces de inhibir la formación de estructuras tubulares por células endoteliales activadas para su proliferación, evidenciando la actividad antiangiogénica de los mismos, mientras que el vehículo permitió la formación de las estructuras tubulares.

Figura 21. Microfotografía de péptidos cíclicos de la presente invención en condiciones que favorecen el autoensamblaje de los mismos.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Los ejemplos y datos siguientes muestran varios aspectos y características relacionadas con la obtención de péptidos cíclicos, a partir de una librería de péptidos sintéticos lineales y de la estructura terciaria de un polipéptido, perteneciente al C-terminal de la serralisina PRZN_SERMA (Braunagel SC, y Benedik MJ (1990). Mol. Gen. Genet. 222:446-451), denominado p25, con demostradas potencialidades farmacéuticas (Abrahantes-Pérez MC y col., "Pharmaceutical composition containing serralisine polypeptide fragments". Solicitud de patente con No. de publicación internacional WO 2006/005268).

En los ejemplos que se exponen a continuación se relacionan los compuestos y/o métodos de la presente invención, incluyendo el uso de moléculas derivadas de estos péptidos, optimizados y/o derivado de estos. Comparado con el estado de la técnica anterior, los compuestos y los métodos relacionados en la presente invención, proporcionan resultados que son sorprendentes y contrarios a lo esperado. La utilidad de esta invención se ilustra a través del uso de estos compuestos en el campo farmacéutico. Dichos compuestos poseen ventajas con respecto a otros compuestos que se conocen por los versados en este campo de la técnica.

Ejemplo 1. Diseño y síntesis de una librería de péptidos lineales derivados del polipéptido p25.

Con el objetivo de identificar la mínima unidad funcionalmente activa del polipéptido p25 (Abrahantes-Pérez MC y col., “Pharmaceutical composition containing serralisine polipeptide fragments”. Solicitud de patente con No. de publicación internacional WO 2006/005268), y generar nuevas moléculas a partir de esta región, que posean mejores cualidades farmacológicas y farmacodinámicas en la terapia del cáncer que la propia p25 se diseñaron péptidos lineales de 20 aminoácidos (aa) solapados en 10 aa. Ello implicaría la identificación de regiones activas comprendidas en una secuencia primaria entre 10 y 20 aa. La Tabla 1 muestra la secuencia primaria de cada uno de estos péptidos, el código en el proceso de obtención, y la masa del mismo una vez sintetizado y purificado. La masa molecular de las preparaciones finales de los péptidos se verificó por espectrometría de masas.

Tabla 1. Diseño y síntesis de una librería de péptidos lineales a partir de la secuencia primaria del polipéptido p25.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Código	Masa Molecular (Da)
MJ01	SYWSETNTGGDNNGGHYAAAP-amida	D06P91	2052.85
MJ02	DNGGHYAAAPLLDDIAAIQH-amida	E07P01	2060.00
MJ03	LLDDIAAIQHLYGANPSTRT-amida	E07P05	2167.10
MJ04	LYGANPSTRTGDTVYGFNSN-amida	E07P06	2131.98
MJ05	GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS-amida	J07P73/N06P87	2137.10
MJ06	TGRDFLSTTSNSQKVIFAAW-amida	F07P16	2227.014
MJ07	NSQKVIFAAWDAGGNDTFDF-amida	M07P38	2192.50
MJ08	DAGGNDTFDFSGYTANQRIN-amida	M07P39	2160.97
MJ09	SGYTANQRINLNEKSFSDVG-amida	A07P42	2198.08
MJ10	LNEKSFSDVGGLKGNVSIAA-amida	A07P47	2004.06
MJ11	GLKGNVSIAGVTIENAIGG-amida	A07P44	1839.01

MJ12	GVTIENAIGGSGNDVIVGNA-amida	A07P45	1854.96
MJ13	SGNDVIVGNAANNVLKGGAG-amida	Y07P48	1824.92
MJ14	ANNVLKGGAGNDVLFGGGGA-amida	A07P43	1785.95
MJ15	NDVLFGGGGADELWGGAGKD-amida	A07P46	1932.87
MJ16	DELWGGAGKDIFVFSAASDS-amida	O07P102	2070.08
MJ17	IFVFSAASDSAPGASDWIRD-amida	O07P103	2110.13
MJ18	APGASDWIRDFQKGIDKIDL-amida	O07P104	2243019
MJ19	FQKGIDKIDLSFFNKEANSS-amida	O07P105	2286.19
MJ20	SFFNKEANSSDFIHFVDHFS-amida	O07P106	2373.20
MJ21	DFIHFVDHFSGTAGEALLSY-amida	O07P107	2224.07
MJ22	GTAGEALLSYNASSNVTDLs-amida	O07P108	1967.99
MJ23	NASSNVTDLsVNIGGHQAPD-amida	E02P04	1993.95
MJ24	VNIGGHQAPDFLVKIVGQVD-amida	E07P02	2104.14
MJ25	FLVKIVGQVDVATDFIV-amida	E07P03	1861.11
MJ26	DVATDFIV-amida	U07P78	877.46

La síntesis de los péptidos se realizó en fase sólida sobre la resina Fmoc-AM-MBHA, utilizando la estrategia Fmoc/tBu (Barany, G. and Merrifield, R. B. J Am Chem Soc. 99 (1977) 7363-7365). Los aminoácidos se acoplaron utilizando el método de activación con DIC/HOBt, y el completamiento de la reacción de acoplamiento se verificó empleando el ensayo de ninhidrina (Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I. Anal Biochem. 34 (1970) 595-598). Los péptidos se separaron de la resina por tratamiento con una disolución de TFA/EDT/H₂O/TIS (94%/2.5%/2.5%/1%), precipitados con éter y liofilizados durante 72 h. Se ciclizaron por formación de un puente disulfuro con la oxidación con dimetil sulfóxido (DMSO) (Andreu, D., Albericio, F., Solé, N. A., Munson, M. C., Ferrer, M. and Barany, G., Pennington, M. W. and Dunn, B. M. (Eds), Peptide Synthesis Protocols, Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, 1994, pp. 91-169) y purificaron por RP-HPLC. Las fracciones colectadas se analizaron independientemente en RP-HPLC analítico, y la preparación final de cada péptido se conformó por la unión de las fracciones con más de 99% de pureza.

Ejemplo 2. Selección de estructuras primarias de la librería de péptidos sintéticos derivados del polipéptido p25, basado en su actividad citotóxica *in vitro* sobre células tumorales.

Para determinar la actividad citotóxica de la librería de péptidos sintéticos derivados del polipéptido p25, sobre células tumorales humanas, se empleó el método de sulforrodamina B (SRB) (Skehan P, Storeng R, Scudiero D, y col., (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107–1112; Monks A, Scudiero D, Skehan P, y col., (1991). J Natl Cancer Inst. 83:757-66; Tesei A, Ulivi P, Fabbri F, y col., (2005). J Transl Med. 3:7). Las células control negativo se cultivaron con un volumen del vehículo igual al de las

muestras experimentales. Una curva “x-y” (dosis-respuesta) se generó con el porcentaje de células sobrevivientes, con relación a las células control negativo, y se estimaron los parámetros siguientes: Inhibición del 50% del crecimiento (GI50), Inhibición total del crecimiento (TGI), o la concentración que causa el 50% de la muerte celular (LC50) (Boyd MR, Paull KD, y Rubinstein LR (1992) “Data display and analysis strategies for the NCI Disease Oriented *In-Vitro* Antitumor Drug Screen, in Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concept for Drug Discovery and Development” (Baleriote FA, Corbett TH and Baker LH eds) pp 11-34, Kluwer Academia Publishers, Boston). Se consideraron péptidos con actividad citotóxica, aquellos que fueron capaces de inhibir el 50% de la proliferación celular, de manera dosis dependiente, y cuyo valor de GI50 fuese inferior a 100 µM, al menos en una línea celular de todas las empleadas en este estudio. Las líneas de células tumorales humanas que se emplearon fueron: HEp-2 (carcinoma de laringe), A549 (adenocarcinoma epitelial de pulmón), M14 (melanoma), Colo 205 (adenocarcinoma de colon), Ls174T (adenocarcinoma de colon), LnCAP (carcinoma de próstata), PC-3 (carcinoma de próstata), H 125 (adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas). En la Tabla 2 se muestran los resultados de este tamizaje peptídico. La misma muestra la secuencia primaria de los péptidos diseñados, el código en su proceso de obtención, y su capacidad citotóxica sobre células tumorales humanas.

Tabla 2. Tamiz peptídico basado en la actividad citotóxica sobre células tumorales humanas *in vitro*, mediante el método de SRB.

Secuencia de aminoácidos	Código	Actividad citotóxica <i>in vitro</i>
SYWSETNTGGDNGGHYAAAP-amida	D06P91	-
DNGGHYAAAPLLDDIAAIQH-amida	E07P01	-
LLDDIAAIQHLYGANPSTRT-amida	E07P05	-
LYGANPSTRTGDTVYGFNSN-amida	E07P06	-
GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS-amida	J07P73/N06P87*	+/+
TGRDFLSTTSNSQKVIFAAW-amida	F07P16	-
NSQKVIFAAWDAGGNDTFDF-amida	M07P38	-
DAGGNDTFDFSGYTANQRIN-amida	M07P39	-
SGYTANQRINLNEKSFSDVG-amida	A07P42	-
LNEKSFSDVGGLKGNVSIAA-amida	A07P47	-
GLKGNVSIAAGVTIENAIGG-amida	A07P44	-
GVTIENAIGGSGNDVIVGNA-amida	A07P45	-
SGNDVIVGNAANNVLKGGAG-amida	Y07P48	-
ANNVLKGGAGNDVLFGGGGA-amida	A07P43	-
NDVLFGGGGADELWGGAGKD-amida	A07P46	-
DELWGGAGKDI FVFSAA SDS-amida	O07P102	-
I FVFSAA SDSAPGASDWIRD-amida	O07P103	-
APGASDWIRDFQKGIDKIDL-amida	O07P104	-

FQKGIDKIDLSFFNKEANSS-amida	O07P105	-
SFFNKEANSSDFIHFVDHFS-amida	O07P106	-
DFIHFVDHFSGTAGEALLSY-amida	O07P107	-
GTAGEALLSYNASSNVTDLs-amida	O07P108	-
NASSNVTDLsVNIGGHQAPD-amida	E02P04	+
VNIGGHQAPDFLVKIVGQVD-amida	E07P02	-
FLVKIVGQVDVATDFIV-amida	E07P03	-
DVATDFIV-amida	U07P78	-

El símbolo + indica que presentó actividad citotóxica y el símbolo – indica que no presentó actividad citotóxica según los criterios definidos en el texto del Ejemplo 2. *Este péptido se sintetizó dos veces, con el objetivo de garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

5

El péptido GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS-amida (Código N06P87/J07P73) resultó positivo (+) para varias líneas de células tumorales, mientras que el péptido NASSNVTDLsVNIGGHQAPD-amida (Código E02P04) solamente mostró actividad sobre el melanoma humano M14. El resto de los péptidos se consideraron negativos (-).

10

En las Figuras 1 y 2 se muestra la potencialidad del péptido N06P87 para inhibir la proliferación de células tumorales de diferente origen histológico, de las líneas Colo 205, HEp-2, A549, y Ls174T. En todos los casos la GI50 fue menor que 100 µM. En el caso del carcinoma de laringe HEp-2 también se emplearon como control

positivo del ensayo dos lotes de Cisplatino. Este es un producto comercialmente disponible para el tratamiento del cáncer de laringe, en primera línea. Se demuestra una vez más su utilidad para este tipo de patología, y la validez del ensayo.

15

En la Figura 3 se muestran los resultados de la evaluación del efecto de varios péptidos de la librería de la Tabla 1, sobre las líneas de células tumorales humanas M14 y Ls174T. Este panel de péptidos no fue capaz de inhibir la proliferación celular de las líneas de células evaluadas.

20

Además de la región comprendida en el péptido N06P87, la región de 20 aa codificada por E07P04 (Tabla 1), mostró actividad citotóxica, pero solamente sobre la línea M14 y su GI50 no fue menor que 100 µM, lo cual se observa en la Figura 4.

25

La Tabla 2, que resume todos los resultados del pesquizaje peptídico con actividad citotóxica sobre células tumorales, evidencia que el péptido GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS-amida, que comprende la región Gly255-Ser274 del dominio C-terminal de la proteína Serralisina PRZN_SERMA y perteneciente a la región N-terminal del polipéptido p25, es activo sobre líneas de células tumorales de

diferente origen histológico, reproduciendo el amplio espectro de acción citotóxica de la molécula p25 que le dio origen. Ello sugirió que este péptido puede ser considerado como la mínima región estructuralmente activa del polipéptido p25, para su posterior optimización para su empleo con fines farmacológicos contra el cáncer.

5 **Ejemplo 3. Impacto de la remoción del domino N-terminal en la exposición al solvente de los residuos de la proteína p50.**

Se conoce que la región C-terminal de las serralisinas (Ej. Serralisina PRZN_SERMA) presenta mayor actividad citotóxica sobre células tumorales, cuando se separa de la región N-terminal de dicha proteína, mediante autocatálisis, digestión química con
10 bromuro de cianógeno, o cuando se expresó en *Escherichia coli* (Solicitud de patente con No. de publicación internacional WO 2006/005268). Ello sugería que la mínima unidad funcionalmente activa de la región C-terminal de las serralisinas incrementaba su accesibilidad a las células tumorales cuando se separaba del dominio N-terminal. Por tanto, se decidió identificar los residuos de la proteína que incrementan su
15 superficie de accesibilidad al solvente cuando los dominios N- y C-terminal de la proteína íntegra son separados y corroborar si el segmento Gly₂₅₅-Ser₂₇₄ (péptido N06P87) contiene tales residuos. Para probar esta hipótesis se realizaron los cálculos de accesibilidad de las superficies del N-terminal y C-terminal de la proteasa mayoritaria de *Serratia* (Hamada K, Hata Y, Katsuya Y, Hiramatsu H, Fujiwara T, Katsube Y. (1996) *J. Biochem.* 119:844-851).
20

Se identificaron las regiones de aa que se convierten en accesibles dentro de los dominios del N-terminal y C-terminal, cuando la digestión proteolítica de proteasas de *Serratia* produce ambas moléculas. El cálculo de superficie de accesibilidad de los residuos se realizó con el programa DSSP (Kabsch W, Sander C. 1983. *Biopolymers*
25 22:2577-2637). Los valores de accesibilidad de los residuos son expresados en ángstrom ($\text{\AA}^2$). La Figura 5 muestra que las principales diferencias en los valores de accesibilidad corresponden a los aminoácidos localizados en la región C-terminal del dominio proteolítico N-terminal (Gln210, Phe211, Asn226, His229, Leu236, Ile239, Ser251) y en la región N-terminal del dominio C-terminal no-proteolítico (Thr252, Phe269, Ile280, Trp284, Arg302, and Phe310) de la proteasa mayoritaria de *Serratia*.
30 La Tabla 3 presenta a los residuos que muestran los cambios más significativos en los valores de accesibilidad.

Tabla 3. Residuos de aminoácidos (aa) que muestran los cambios más significativos en los valores de accesibilidad.

aa	Residuo	1srp	1srpN	Orden	aa	Residuo	1srp	1srpC	Orden
N	20	159	173	51	R	267	47	117	105
I	22	39	80	21	D	268	79	137	14
I	24	76	85	60	F	269	26	110	8
S	29	7	20	53	K	278	63	87	42
S	31	32	51	46	I	280	15	117	4
N	32	11	70	13	F	281	3	15	55
L	91	43	58	50	A	282	11	68	15
Q	94	71	111	25	W	284	15	119	3
D	98	14	109	5	A	286	35	56	43 ⁰
V	99	8	28	45	R	302	59	152	6
Q	210	6	78	9	N	304	4	45	22
F	211	3	49	19	N	306	54	66	56
T	222	19	33	52	K	308	94	135	23
G	223	43	70	37	F	310	4	134	1
G	224	4	13	61	D	312	16	27	58
D	225	59	121	11	L	316	15	57	20
N	226	5	66	12	K	317	104	190	7 ¹⁵
G	227	43	54	57	G	318	2	29	38
H	229	70	121	17	N	319	5	14	63
A	231	2	26	41	S	321	3	19	49
A	232	15	34	47	A	323	1	31	34
A	233	9	39	33	A	324	36	57	44
P	234	6	15	62	V	339	17	55	27
L	235	5	37	30	V	341	0	40	26 ⁰
L	236	0	106	2	V	357	18	46	36 ⁰
I	239	3	52	18	F	359	15	46	32
Q	243	34	65	31	I	375	38	49	59
A	248	27	35	64	S	379	20	33	54
N	249	25	53	35	D	403	0	27	39
L	250	126	163	28	S	405	16	43	40
S	251	97	152	16	F	406	40	81	24
					K	409	120	155	29 ⁵
					I	470	42	60	48

30 Cálculos de accesibilidad de las superficies del N-terminal (1srpN) y C-terminal (1srpC) de la proteasa mayoritaria de *Serratia*, con respecto a la proteína íntegra (1rp). Los residuos son ordenados de acuerdo al valor de la diferencia en exposición (columna orden). Se muestran los 64 residuos de mayor incremento en exposición.

La Asp98 y Arg267, y Asp225 y Lys317 establecen dos puentes de hidrógeno entre los dominios N-terminal y C-terminal. Además, estos residuos muestran una diferencia promedio en los valores de accesibilidad de 78.2 Å². La diferencia promedio en los valores de accesibilidad para el dominio proteolítico N-terminal y para

el dominio no proteolítico C-terminal de la proteasa mayoritaria de *Serratia* son $5.1 \pm 15.4 \text{ \AA}^2$ y $7.1 \pm 20.1 \text{ \AA}^2$, respectivamente. Otras posiciones significativas corresponden a: Ile22, Asn32, Gln94, y Arg171. Hasta donde se conoce, estos residuos no están relacionados a ninguna función biológica.

- 5 En contraste, ni los residuos del sitio activo (His176, Glu177, y His180) localizados en la α -helix E del dominio proteolítico N-terminal ni la Gly183 y His186, incluidos en el motivo de unión al zinc HEXXHXXGXXH cambiaron sus valores de accesibilidad. Estos datos son congruentes con los resultados experimentales que demuestran, de manera eficiente, que la actividad citotóxica de la proteína p50, perteneciente a la
- 10 familia de las serralisinas no se debe a su actividad proteolítica, y sí a su región C-terminal no proteolítica la cual incrementa significativamente su accesibilidad al solvente al ser separada del dominio proteolítico. Por otra parte el segmento Gly255-Ser274 (péptido N06P87) contiene tres residuos (Arg267, Asp268 y Phe269) dentro de los de mayor aumento en exposición (Tabla 3), específicamente entre los primeros
- 15 catorce valores, apoyando así el rol aparente de este segmento como parte de una región estructuralmente funcional de p25 asociado a la actividad antitumoral.

Ejemplo 4. Modificaciones al segmento Gly255-Ser274 del péptido N06P87.

- La librería de péptidos mostrada en el Ejemplo 1 comprende segmentos de 20 aa solapados en 10 aa, partiendo desde el extremo N-terminal del polipéptido p25. Este
- 20 diseño se realizó con el objetivo de identificar una región lineal de 10 aa relacionada con la actividad citotóxica objeto del pesquizaje. Sin embargo, los 10 aa solapados comprendidos en el péptido N06P87 no presentan actividad citotóxica (Tabla 2) en otro contexto (Fig. 6: péptidos E07P06 y F07P16). Ello sugiere que el segmento de 20 aa comprendido en la región Gly255-Ser274 (péptido N06P87) es necesario para
- 25 establecer la correcta exposición del motivo de interacción de este péptido con las células tumorales o los puntos adecuados de interacción secundarias que flanquean al sitio activo, incrementando su afinidad y/o especificidad por su potencial receptor. Partiendo de este criterio, se diseñaron y sintetizaron péptidos con modificaciones, para evaluar sus posibles influencias sobre la actividad citotóxica sobre células
- 30 tumorales y realizar una caracterización parcial del péptido N06P87 con vistas a su posterior optimización. Estas modificaciones comprendieron la sustitución del grupo amida en el extremo C-terminal del péptido N06P87, por un grupo carboxilo, y la ciclización del péptido N06P87 mediante la inserción de una cisteína en ambos

extremos del péptido Los péptidos obtenidos y su masa molecular se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Modificaciones al péptido líder de 20 aa N06P87.

Péptido	Secuencia de aa	Código	Masa Molecular (Da)
MJ27	GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS-amida	N06P87	2136.94
MJ28	GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS-OH	U07P79	2137.91
MJ29	ciclo[GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS]	N06P89	2340.97

5

10

La Figura 7 muestra la incapacidad del péptido N06P89 (ciclisado mediante cisteínas ubicadas en el N y C-terminal), de inhibir la proliferación de las células tumorales humanas melanoma M14. Ello sugiere la necesidad de realizar constreñimientos por otros sitios de la secuencia del péptido N06P87, sobre la racionalidad de mimetizar la estructura terciaria que esta región presenta en la estructura asumida para el polipéptido p25. En esta misma Figura también se demuestra la necesidad del bloqueo del C-terminal (por ejemplo: un grupo amida u otras modificaciones) para lograr la capacidad citotóxica de la región peptídica de interés.

15

Ejemplo 5. Formulaciones del péptido líder no incrementan su actividad citotóxica.

20

Se realizó un estudio para evaluar la influencia de las condiciones de los tampones, pH y aditivos en varias formulaciones parenterales del péptido líder sobre la actividad citotóxica sobre células tumorales. Entre los tampones evaluados se encontraban: glicina, fosfatos, citratos y otros que abarcaron una amplia gama de pH, desde ácidos hasta muy básicos. También se evaluaron diferentes aditivos en el rango de su uso para formulaciones parenterales tales como: glicina, sacarosa, dextrana, glutamato de sodio, sorbitol, ciclodextrina, PEG, EDTA, detergentes no iónicos y otros. El péptido N06P87 formulado con estos aditivos no incrementó su actividad citotóxica sobre células tumorales de diferente origen histológico.

25

Ejemplo 6. Actividad *in vivo* del péptido lineal N06P87.

30

Para evaluar la potencialidad del segmento lineal Gly255-Ser274 (péptido N06P87), con respecto al polipéptido CIGB-370r, sobre modelos tumorales de origen humano, se empleó el modelo de cáncer de colon Ls174T en ratones NIH atímicos. Las células tumorales humanas fueron administradas por vía subcutánea, las moléculas de interés o el vehículo fueron administrados por vía intratumoral (100 µL). Después de

13 días, cuando los tumores estaban establecidos y palpables, comenzaron los esquemas de administración de las moléculas de interés (Figura 8A). El péptido N06P87 se administró con dosis escalonadas: dos administraciones de 600 μ M cada 48 h, luego 4 administraciones de 330 μ M cada 48 h, y por último 4 administraciones de 90 μ M cada 72 h. El polipéptido CIGB-370r se administró una vez por semana durante 4 semanas.

Transcurridos 35 días del inicio del tratamiento, existieron diferencias significativas en el volumen tumoral ($p < 0.001$) entre los grupos tratados con el péptido N06P87 y el vehículo (Fig. 8B). Además, existieron diferencias muy significativas ($p < 0.0001$) entre los grupos tratados con el polipéptido CIGB-370r y el vehículo, cuando se empleó un análisis de varianza de una vía con post test de Bonferroni. También existieron diferencias muy significativas entre los grupos tratados con ambas biomoléculas ($p < 0.0001$).

La Figura 8C muestra la sobrevida de los animales tratados con estas biomoléculas o con el vehículo. Ambas biomoléculas fueron capaces de incrementar la sobrevida de manera significativa (prueba de "Logrank": $p < 0.05$) de los animales tratados, con respecto al grupo que recibió el vehículo. Sin embargo, para el caso del péptido N06P87, la relación T/C (donde T es la sobrevida media de los animales tratados y C es la sobrevida media de los animales que recibieron solamente el vehículo) fue 117%. Ello indicó que este péptido lineal no valida como molécula potencialmente útil para la terapia del cáncer en humanos, ya que la relación T/C es menor que 120%. En el caso de la proteína CIGB-370r la relación de T/C fue 142%, por lo que tuvo el comportamiento esperado para una molécula potencialmente útil para la terapia del cáncer en humanos.

El péptido tampoco validó cuando se calculó la relación T/C referido al volumen tumoral en el día 35 (último día en el que todos los animales se encontraban vivos), ya que el mismo fue de 72%, mientras que para el caso del polipéptido CIGB-370r fue de 35%. En este caso, cuando $T/C < 40-50\%$: es considerado compuesto significativo activo (Marie Suggitt and Michael C. Bibby. 50 Years of Preclinical Anticancer Drug Screening: Empirical to Target-Driven Approaches *Clinical Cancer Research*. 2005. Vol. 11, 971-981.). Ello indicó que la secuencia peptídica seleccionada debía ser optimizada, para lograr una sobrevida media similar al del polipéptido CIGB-370r, para su posterior uso terapéutico.

Ejemplo 7. Definición de residuos / regiones funcionales del péptido N06P87.

Los resultados experimentales expuestos en los Ejemplos 2 y 4, junto al análisis de la estructura tridimensional de la proteína p50 (Ejemplo 3 y el acápite de Descripción de la Invención), permiten la definición en la estructura química del péptido N06P87 de tres segmentos o regiones distintivas de acuerdo al impacto en la relación estructura-función del mismo: a) región - de unión - primaria (lazo central), b) región - de unión - secundaria C-terminal y c) región secundaria N-terminal, de unión y/o apoyo estructural. Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 9.

El lazo central contiene el segmento Gly266-Asp268 esencial en la actividad biológica, así como los residuos Phe269 y Leu270 que incrementan su exposición en p25 con respecto a p50. La región C-terminal es un lazo que adopta una conformación extendida en la proteína p50. Residuos de este segmento aparentemente también participan en la interacción con el receptor, como muestra el Ejemplo 4, en el cual el grupo amida del extremo (C-) terminal del péptido N06P87 es sustituido por un grupo carboxílico resultando en la pérdida de la actividad biológica. Dicha modificación significa la introducción de una nueva carga negativa local, así como la pérdida de un grupo donante de puentes de hidrógeno del péptido. Presumiblemente, esta región también juega un rol estructural: a) Leu270 establece interacciones hidrofóbicas con Phe269, Tyr259 y la cadena lateral alifática de Arg267 del lazo central; b) Thr272 establece contactos hidrofóbicos con Phe261 de la región N-terminal y c) Ser271 forma tres puentes de hidrógenos con residuos del lazo central, el grupo amino de Ser271 es donante de puente de hidrogeno del grupo carbonilo de Arg267 y el grupo OG de la cadena lateral de Ser271 es también donante del carbonilo de Arg267 y aceptor del grupo OH de la cadena lateral de Thr265. El segmento N-terminal juega un rol estructural: puentes de hidrógenos de cadena principal de los residuos Asp256 (grupo carbonilo) y Val258 (grupo amino) con los átomos de la cadena lateral ND2 y OD1 del residuo Asn264, el grupo carbonilo (aceptor) del residuo Val258 como el donante amino (cadena principal) de la Asn264 y el átomo OG de Ser263.

Ejemplo 8. Introducción de estreñimientos estructurales, ciclización, enlaces de cadenas laterales y/o aminoácidos no naturales.

Un elemento esencial del diseño de los agentes anticancerígenos potentes de la presente invención consiste en que los péptidos diseñados son cíclicos, o sea

contienen aminoácidos que se encuentran enlazados por medio de enlaces covalentes que involucran grupos químicos de las cadenas laterales y/o los grupos de los extremos amino y carboxilo terminales. Por tanto los péptidos aquí diseñados son constreñidos estructuralmente por medio de la ciclización, la cual reduce significativamente la flexibilidad estructural de estas moléculas. Generalmente, el empleo de péptidos como agentes terapéuticos presenta un número de desventajas. Tal es el caso de la flexibilidad intrínseca de los péptidos; especialmente los cortos y medianos son mucho más flexibles que las proteínas plegadas, por lo que el proceso de unión de estos a proteínas u otras macromoléculas receptoras va habitualmente acompañado de una mayor pérdida de entropía conformacional. Este hecho contribuye a que estas moléculas posean, como regla, una afinidad de unión inferior al de la unión proteína-proteína. La menor afinidad exhibida por los péptidos (consecuentemente también su potencia) puede además estar asociada al hecho que la superficie de contacto péptido-receptor suele ser menor, comparada con las interfaces proteína-receptor, especialmente cuando los péptidos son un segmento de la proteína nativa. Por esta razón, generalmente se hace necesario el rediseño y la modificación química de los péptidos para incrementar la afinidad de la unión al receptor (y consecuentemente su potencia).

En la presente invención, la ciclización de los péptidos es introducida preferentemente mediante: a) enlaces amida entre las cadenas laterales de los aminoácidos Lys y Asp/Glu (péptidos 5-16, 19-22, 40-43 de la Tabla 5) o entre la cadena lateral de Lys y el grupo carboxilo terminal (péptido 32) y b) mediante la introducción de puentes disulfuros (péptidos 1-4, 17-18, 23-31, 33-39, 44-50). La Tabla 5 muestra la secuencia de péptidos representativos.

Tabla 5. Diseño de péptidos cíclicos análogos al péptido lineal N06P87.

Número	Secuencia Aminoacídica*/Estructura	Tipo de Ciclo/Enlace
1.	CNTGRDFLC	disulfuro
2.	GDTVYGFNCNTGRDFLC	disulfuro
3.	GDTVCGFNSNTGRDFC	disulfuro
4.	GDTVYGCNSNTGRDFLSTGC	disulfuro
5.	GDTVYGFNkNTGRDFLdTTS	amida/cadena lateral
6.	GDTVYGFNkNTGRDFLeTTS	amida/cadena lateral
7.	GDTVYGFNdNTGRDFLkTTS	amida/cadena lateral
8.	GDTVYGFNeNTGRDFLkTTS	amida/cadena lateral
9.	GDTVkGFNSNTGRDFdSTTS	amida/cadena lateral
10.	GDTVkGFNSNTGRDFeSTTS	amida/cadena lateral
11.	GDTVdGFNSNTGRDFkSTTS	amida/cadena lateral

12.	GDTV e GFNSNTGRDF k STTS	amida/cadena lateral
13.	GDTVY Gk NSNTGRDFLST Gd	amida/cadena lateral
14.	GDTVY Gk NSNTGRDFLST Ge	amida/cadena lateral
15.	GDTVY Gd NSNTGRDFLST Gk	amida/cadena lateral
16.	GDTVY Ge NSNTGRDFLST Gk	amida/cadena lateral
17.	GDTVY G CNSNT- (dA) -RDFLST GC	disulfuro
18.	GDTVY G CNSNTGRDFLSTT SC	disulfuro
19.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT Sd	amida/cadena lateral
20.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT Se	amida/cadena lateral
21.	GDTVY Gd NSNTGRDFLSTT Sk	amida/cadena lateral
22.	GDTVY Ge NSNTGRDFLSTT Sk	amida/cadena lateral
23.	GDTVY G CNSNT- (dA) -RDFLSTT SC	disulfuro
24.	GDTVY G CNSNTGRDFLST GCK	disulfuro
25.	GDTVY G CNSNT- (dA) -RDFLST GCK	disulfuro
26.	GDTVY G CNSNTGRDFLSTT SCK	disulfuro
27.	GDTVY G CNSNT- (dA) -RDFLSTT SCK	disulfuro
28.	GDTVY- (dA) -CNSNT- (dA) -RDFLST GC	disulfuro
29.	GDTVY- (dA) -CNSNT- (dA) -RDFLST GCK	disulfuro
30.	GDTVY- (dA) -CNSNT- (dA) -RDFLSTT SC	disulfuro
31.	GDTVY- (dA) -CNSNT- (dA) -RDFLSTT SCK	disulfuro
32.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT N-co-	amida/carboxilo terminal-cadena lateral
33.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT S-co-	amida/carboxilo terminal-cadena lateral
34.	(PEG) -GDTVY G CNSNTGRDFLST GC	disulfuro
35.	GDTVY G CNSNTGRDFLST GQ	disulfuro
36.	GDTVY G CNSNTGRDFLST GCN	disulfuro
37.	GDTVY G CNSNTGRDFLST GCR	disulfuro
38.	GDTVY G CNSNTGRDFLSTT SCQ	disulfuro
39.	GDTVY G CNSNTGRDFLSTT SCN	disulfuro
40.	GDTVY G CNSNTGRDFLSTT SCR	disulfuro
41.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT SeK	amida/cadena lateral
42.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT SeQ	amida/cadena lateral
43.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT SeN	amida/cadena lateral
44.	GDTVY Gk NSNTGRDFLSTT SeR	amida/cadena lateral
45.	CNT - (dA) -RDFL C	disulfuro
46.	GDTVY- (dA) - C - (dQ) -SNT- (dA) -RDFLST GC	disulfuro
47.	GDTVY- (dA) - C - (dQ) -SNT- (dA) -RDFLST GCK	disulfuro
48.	GDTVY- (dA) - C - (dQ) -SNT- (dA) -RDFLSTT SC	disulfuro
49.	GDTVY- (dA) - C - (dQ) -SNT- (dA) -RDFLSTT SCK	disulfuro
50.	GDTVY- (dA) - F - (dQ) - CNT - (dA) -RDFLCTT SK	disulfuro
51.	GDTV C - (dA) - F - (dQ) -SNT- (dA) -RDF C STTS	disulfuro
52.	Lip - G - CNT GRDFL C	disulfuro
53.	CNT GRDFL C - G - lip	disulfuro
54.	GDTVY G CNSNTGRDFLST AC	disulfuro
55.	GDTVY G CNSNTGRDFLST ACQ	disulfuro
56.	GDTVY G CNSNTGRDFLST ACN	disulfuro
57.	GDTVY G CNSNTGRDFLST ACR	disulfuro
58.	GDTVY G CNSNTGRDFLST ACK	disulfuro
59.	GDTVY G CNSNTGRDFLSTT C	disulfuro
60.	pGlu-GDTVY G CNSNTGRDFLST GC	disulfuro
61.	Acetil-GDTVY G CNSNTGRDFLST GC	disulfuro
62.	(PEG) - GDTVY G CNSNTGRDFLST GC - (PEG)	disulfuro
63.	GDTVY G CNSNTGRDFLST GC - (PEG)	disulfuro
64.	- X₃X₄ NTGRDFL Z₁Z₂ -	amida/cadena principal
65.	- L - (dS) -PTPNTGRDF-	amida/cadena principal
66.	- L - (dS) -PTPNT - (dA) -RDF-	amida/cadena principal
67.	(dA) -DTVY G CNSNTGRDFLST GC	disulfuro
68.	-DFLST- P - (dA) - Q -NSNTGR-	amida/cadena principal

69.	-DFLSR-P- (dA) -Q-NSNTGR-	amida/cadena principal
70.	-L- (dA) -PTPNTGRDF-	amida/cadena principal
71.	-L-GPTPNTGRDF-	amida/cadena principal
72.	-DFLST-P-G-Q-NSNTGR-	amida/cadena principal
73.	-DFLSR-P-G-Q-NSNTGR-	amida/cadena principal
74.	-DFLSR-P- (dA) - (BmQ) - (NmN) -SNTGR-	amida/cadena principal
75.	-DFLST-P- (dA) - (BmQ) - (NmN) -SNTGR-	amida/cadena principal
76.	-DFLS-R-R-P-NSNTGR-	amida/cadena principal
77.	-DFLS-K-K-P-NSNTGR-	amida/cadena principal

*, si no se especifica alguna modificación el extremo C-terminal es amidado y el N-terminal es libre; -, enlace covalente, (a) si el guión aparece en los extremos de la secuencia significa que el grupo terminal se encuentra modificado por medio de un enlace covalente a un sustituyente o polímero , (b) dos guiones uno en el extremo N-terminal y otro en el C-terminal significa que el péptido es cíclico por formación de un enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales y (c) en medio de la secuencia es un enlace peptídico; k, residuo de lisina cuya cadena lateral forma un enlace amida intramolecular; d, residuo de ácido aspártico cuya cadena lateral forma un enlace amida intramolecular; e, residuo de ácido glutámico cuya cadena lateral forma un enlace amida intramolecular; -co-, extremo carboxilo terminal enlazado covalentemente mediante enlace amida intramolecular a una cadena lateral de lisina; dA, el estereoisómero D-alanina; dQ, el estereoisómero D-glutamina; dS, el estereoisómero D-serina; (PEG)- y -(PEG), pegilación por el extremo amino terminal y carboxilo terminal respectivamente; pGlu, ácido piroglutámico; X₃X₄ y Z₁Z₂, dipéptidos; BmQ, L-b-metilglutamina (L-glutamina metilada en carbono beta); NmN, asparagina N-metilada

Opcionalmente, la ciclización de los péptidos puede involucrar aminoácidos no naturales, en lugar de los residuos Lys, Asp/Glu y Cys ya mencionados (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Aminoácidos especiales susceptibles de ser utilizados de manera análoga a los residuos Lys y Asp/Glu en la ciclización de cadenas laterales y/o para la modificación química del péptido por unión covalente de un polímero a la cadena lateral.

No	Aminoácido	Grupo Funcional
1.	Ácido 2-[bis(3-aminopropil)amino]acético	NH2
2.	Ácido (2S)-2,5-diaminopentanoico	NH2
3.	Ácido 2,2-diaminoacético	NH2
4.	Ácido (3S)-3,4-diaminobutanoico	NH2
5.	Ácido (2R)-2,4-diaminobutanoico	NH2
6.	Ácido (2S)-2,4-diaminobutanoico	NH2
7.	Ácido (2S)-2,3-diaminopropanoico	NH2
8.	Ácido (2R)-2,3-diaminopropanoico	NH2
9.	Ácido 2-[(2-aminoetil)amino]acético	NH2

10.	Ácido 2-[(3-aminopropil)amino]acético	NH2
11.	Ácido 2-[(4-aminobutil)amino]acético	NH2
12.	Ácido (4S)-4,8-diaminooctanoico	NH2
13.	Ácido (2S)-2-amino-3-(4-aminofenil)propanoico	NH2
14.	Ácido (2S)-2-amino-3-[4-(2-aminoetoxi)fenil]propanoico	NH2
15.	Ácido 2-(piperidin-4-ilamino)acético	NH
16.	Ácido (2S)-2-amino-4-[(5R)-2,2-dimetil-1,3-oxazolidin-5-il]butanoico	NH
17.	Ácido (2S)-2-amino-6-(metilamino)hexanoico	NH
18.	Ácido (2R,4R)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico	NH
19.	Ácido (2R,4S)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico	NH
20.	Ácido 2-(4-aminopiperidina-4-il)acético	NH
21.	Ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico	NH
22.	Ácido (2S,4R)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico	NH
23.	Ácido imidazolidina-2-carboxílico	NH
24.	Ácido 3-[(carboximetil)amino]propanoico	COOH
25.	Ácido 2-[(carboximetil)amino]acético	COOH
26.	Ácido 3-[(2-carboxietil)amino]propanoico	COOH
27.	Ácido (3R)-3-aminohexanodioico	COOH
28.	Ácido 4-aminoheptanodioico	COOH
29.	Ácido 4-aminopiperidina-1,4-dicarboxílico	COOH
30.	Ácido (2S,4S)-4-aminopirrolidina-2-carboxílico	COOH
31.	Ácido 2-[(carboximetil)amino]acético	COOH
32.	Ácido (2S)-2-amino-6-[(carboximetil)amino]hexanoico	COOH
33.	Ácido 3-[(2-carboxietil)amino]propanoico	COOH
34.	Ácido (2S)-2-aminoheptanodioico	COOH
35.	Ácido (2S)-2-aminooctanodioico	COOH
36.	Ácido (2R)-2-amino-3-[(2-carboxietil)sulfanil]propanoico	COOH
37.	Ácido (2R)-2-amino-3-[(carboximetil)sulfanil]propanoico	COOH
38.	Ácido 4-[(2R)-2-amino-2-carboxietil]sulfanil]butanoico	COOH
39.	Ácido (2S)-2-amino-3-[4-(carboximetoxi)fenil]propanoico	COOH

Tabla 7. Aminoácidos especiales susceptibles de ser utilizados de manera análoga a la Cisteína en la ciclización de los péptidos por medio de enlaces por puente disulfuro y/o para la modificación química del péptido por unión de un polímero a la cadena lateral.

No	Aminoácido
1.	ácido (2R)-2-amino-3-sulfanilbutanoico
2.	ácido (2R)-2-amino-3-metil-3-sulfanilbutanoico
3.	ácido (2S)-2-amino-4-sulfanilbutanoico
4.	ácido 2-amino-5-sulfanil-pentanoico
5.	ácido 2-amino-3-sulfanil-pentanoico
6.	ácido 2-amino-4-metil-3-sulfanilpentanoico
7.	ácido 2-amino-3-metil-4-sulfanilpentanoico
8.	ácido 2-amino-3,4-dimetil-3-sulfanil-pentanoico
9.	ácido 2-amino-3-etil-3-sulfanilpentanoico
10.	ácido (2R)-2-amino-3-metil-3-sulfanilpentanoico
11.	ácido (4S)-4-amino-2-metil-5-sulfanilpentanoico
12.	ácido (4R)-4-amino-2-metil-5-sulfanilpentanoico
13.	ácido (4R)-4-amino-5-sulfanilpentanoico
14.	ácido (4S)-4-amino-5-sulfanilpentanoico

En todos los casos los constreñimientos estructurales introducidos en la estructura del péptido diseñado, tienen que ser compatibles con la conformación biológicamente activa de la molécula. Por tanto, el diseño de las ciclizaciones de la presente invención incluye la selección tanto de las posiciones potenciales de la secuencia donde se sustituirán/introducirán los aminoácidos que quedaran enlazados por las cadenas laterales (posiciones de reemplazo) como el (los) tipo(s) de aminoácido(s) a introducir (residuos de enlace). Las distancias inter-residuos correspondientes a las posiciones de reemplazo del péptido tienen que ser compatibles con la naturaleza estereo-química de los residuos de enlace seleccionados. En el caso específico de la introducción de puentes disulfuros por ejemplo, no se consideran como posiciones de reemplazo potenciales aquellos residuos cuyas distancias entre los carbono alfa es superior a 7 Å o inferior a 3.8 Å en la conformación activa (Vardhan S. Dani, C. Ramakrishnan and Raghavan Varadarajan. Protein Engineering vol.16 no.3 pp.187-193, 2003). De manera similar se consideran preferidas posiciones con distancias entre los carbono beta entre 3.6 Å y 4.7 Å. Los descriptores estereoquímicos de las posiciones de reemplazo, tales como las posiciones de los átomos carbono alfa y carbono beta deben permitir que los ángulos de torsión de las cadenas laterales de los residuos de enlace puedan adoptar valores favorables una vez establecido el enlace covalente entre los residuos, lo cual es indicativo de la existencia de interacciones no covalentes (van der Waals) favorables.

Para el diseño de los péptidos ciclizados por puentes disulfuros (mediante cistinas) de la presente invención se siguieron los pasos siguientes: a) selección de pares de posiciones de reemplazo potenciales del péptido N06P87 factibles de ser sustituidas por cisteínas enlazadas por puentes disulfuros, b) modelación de la estructura tridimensional de los péptidos modificados/minimización de energía de los modelos y c) evaluación de la energía y/o de parámetros de calidad estereoquímica de los modelos. Las posiciones de reemplazo por cisteínas del péptido N06P87 fueron seleccionadas utilizando el programa MODIP (Vardhan S. Dani, C. Ramakrishnan and Raghavan Varadarajan. Protein Engineering vol.16 no.3 pp.187-193, 2003), el cual ha sido desarrollado para el diseño de puentes disulfuros en proteínas. El método asigna una puntuación a los puentes disulfuros potenciales, utilizando una función de energía empírica que depende de las distancias interatómicas entre los átomos carbono alfa y

carbono beta, así como de los valores de los ángulos de torsión χ^1 , χ^2 , χ^{SS} , $\chi^{1'}$ y $\chi^{2'}$ (R. Sowdhamini, N. Srinivasan, B. Shoichet, D.V. Santi, C. Ramakrishnan and P. Balaram (1989). Prot. Engng., 3, 95-103). En dependencia de los valores de energía calculados para los puentes disulfuros potenciales, MODIP asigna un grado de calidad A (estereoquímica ideal), B (de geometría apropiada pero con distorsión estereoquímica) o C (sitios suficientemente cercanos para permitir la formación de puentes disulfuros), donde A representa la máxima calidad y C la menor. Los modelos de las estructuras 3D de los péptidos diseñados son obtenidos utilizando un software de modelaje molecular y (preferentemente) pueden ser determinados experimentalmente mediante Resonancia Magnética Nuclear. En la presente invención se han utilizado para el modelaje de los péptidos los programas MODELLER (Sali A, Blundell TL, 1993, J Mol Biol 234:779-815) y WHATIF (Vriend G, 1990, J Mol Graph. 8(1):52-6, 29).

Como punto de partida para este análisis, se tomó la estructura cristalográfica de p50 - fichero PDB 1SRP. Como se discutió en acápite de Descripción de la invención, los datos experimentales sugieren que la conformación biológicamente activa del péptido N06P87 es similar a la adoptada por el fragmento Gly255-Ser274 en la proteína p50/p25. La Tabla 8 muestra los resultados de la predicción de posiciones de reemplazo potenciales en este segmento.

Tabla 8. Predicción, con MODIP, de posiciones de reemplazo por cisteínas enlazadas por puentes disulfuro en el péptido N06P87.

No.	Residuo i		Residuo j		Grado [§]
1*	PHE	7	SER	20	C
2	THR	11	LEU	16	A
3	SER	9	SER	17	A
4	TYR	5	LEU	16	B

*, la predicción se realizó para un modelo del péptido N06P87 modificado mediante la sustitución Thr₁₉→Gly; §, grado de calidad estereoquímica del puente disulfuro predicho, A la mejor, C la peor.

Los pares 2-4 son predichos a partir de la estructura nativa y poseen grados de calidad A y B, mientras que el par 1 requiere de un ligero cambio conformacional del

residuo T₁₉ y el puente así predicho es de menor calidad. La presente invención incluye por tanto péptidos que contienen la sustitución T₁₉→G o T₁₉→A para favorecer la adopción de una conformación favorable con la formación del puente disulfuro. La sustitución por Gly permite que se incremente la flexibilidad local, facilitando cambios estructurales en la región carboxilo terminal que favorezcan la formación del puente. La sustitución por Ala es adecuada, considerando la propensidad favorable de este residuo a adoptar conformaciones tipo helicoidales, como la predicha para el residuo 19 de acuerdo a los modelos obtenidos para la estructura del péptido 4 de la Tabla 5 (los ángulos de torsión phi-psi del modelo son -69, -38). En comparación con la sustitución T₁₉→G, la introducción de Ala se caracteriza por una pérdida menor de entropía configuracional del péptido durante el plegamiento y/o unión al receptor. La Figura 10 muestra los modelos de un grupo de péptidos cíclicos diseñados a partir de la predicción MODIP de la Tabla 8.

Las mismas posiciones de reemplazo utilizadas para el diseño de puentes disulfuros son también factibles para el diseño de los péptidos cíclicos cuyos residuos de enlace forman enlaces amida, como los aminoácidos Lys y Asp/Glu. Como el número de átomos que enlazan los carbonos alfa de los residuos de enlace en este caso es mayor que los existentes en los puentes disulfuros, las restricciones estereoquímicas que determinan su introducción en el diseño de los péptidos son menos estrictas y por tanto las posiciones de reemplazo predichas con MODIP son también adecuadas como primera aproximación. Luego de seleccionado un par de residuos de enlace determinado, el péptido resultante es modelado y evaluado energéticamente (y/o evaluada la calidad de acuerdo a parámetros estéreo-químicos). Siguiendo un protocolo similar se diseñó el péptido cíclico 33 de la Tabla 5, que contiene un enlace amida entre la lisina 7 y el grupo carbonilo terminal (Figura 11).

Otro método de ciclización preferido en la presente invención, consiste en la introducción de un enlace covalente entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminales de los péptidos. Las restricciones estereoquímicas del enlace peptídico hacen necesario la introducción de aa conectores, que faciliten la adopción de una estructura compatible con la actividad biológica de los péptidos. Por ejemplo, cuanto mayor sea en la estructura 3D de p25/p50 la distancia entre los carbono alfa de los residuos "anclas" que serán enlazados (d_{CA-CA}) con respecto a la distancia de 3.9 Å existente entre los CA de una unidad peptídica, mayor será el

número de residuos conectores (N_{con}) necesarios. La no introducción del número de residuos conectores adecuados entre dos residuos anclas, para satisfacer las restricciones de distancia correspondientes, implica necesariamente que el péptido no podrá adoptar la conformación observada experimentalmente, lo cual muy probablemente influya negativamente en la actividad biológica. El diseño de los

- I. selección de los residuos del péptido N06P87 que serán conectados: residuos cercanos en la estructura 3D, preferentemente no incluidos en el segmento de unión primaria o segmento primario;
- II. identificación del número mínimo de residuos conectores necesarios: $N_{con} > d_{CA-CA}/3.9$;
- III. selección de residuos anclas: residuos de N06P87 que serán conectados y los contiguos a estos, se seleccionan 2-3 residuos en ambos extremos terminales;
- IV. búsqueda de segmentos de N residuos ($N_{con} + 4 > N > N_{con} + 6$) en una base de datos no redundantes de estructuras 3D de proteínas, tal que la estructura de la cadena principal de los 2-3 residuos de los extremos de los fragmentos sea similar a la estructura de los residuos anclas;
- V. elección de la secuencia y estructura del segmento conector: se selecciona la estructura del segmento conector más comúnmente observado en el inciso IV y se calculan los parámetros de preferencia de cada aminoácido en cada posición, o sea la relación entre el número de apariciones del aminoácido y el valor esperado de acuerdo a la abundancia relativa del aminoácido en la base de datos. En cada posición se seleccionan los aminoácidos (uno o varios) con mayor parámetro de preferencia. Se permite modificar los residuos adyacentes al segmento conector según el criterio de mayor valor del parámetro de preferencia. En casos de posiciones con ángulos de torsión positivos se permiten la introducción de D-estéreo-isómeros. También es factible la introducción de otros aminoácidos no naturales (tales como los aminoácidos beta- y N-metilados) con el objetivo de incrementar la propensidad estructural del residuo a adoptar la conformación de la cadena principal acorde con la estructura requerida.

Como estos péptidos son ciclizados por enlaces amidas entre los extremos N- y C-terminales, las permutaciones cíclicas de la secuencia constituyen péptidos idénticos. En una ejemplificación de la presente invención los péptidos son diseñados basados

en el segmento de unión primaria definido para N06P87, y dicho segmento es conectado por un tetrapéptido (dos dipéptidos) de secuencia general $Z_1Z_2X_3X_4$ (o X_3X_4 y Z_1Z_2 respectivamente, péptido 64 de la Tabla 5). Estos péptidos contienen en total 11 aa. La secuencia de los conectores de la presente invención puede incluir también D-aa en aquellas posiciones cuyos residuos asuman ángulos positivos de torsión (péptidos 65 y 66 de la Tabla 5). La secuencia del tetrapéptido conector es preferentemente, aunque no exclusivamente, dSer-Pro-Thr-Pro (péptido 65 de la Tabla 5, dS es el estereoisómero D-Ser), aunque también puede ser Gly-Pro-Thr-Pro (péptido 71 de la Tabla 5) o dAla-Pro-Thr-Pro (péptido 70 de la Tabla 5, dAla es el estereoisómero D-Ala).

En otra ejemplificación los péptidos de la presente invención consisten en la secuencia correspondiente al segmento Asn262-Ser271 de p50 conectado por un tetrapéptido. Los péptidos resultantes contienen 14 residuos. La secuencia preferida del tetrapéptido conector puede ser - aunque no exclusivamente - Thr-Pro-Gly-Gln (péptido 72 de la Tabla 5), alternativamente - aunque no exclusivamente - Arg-Pro-(dAla)-Gln (péptido 69, ver Figura 12) o Arg-Pro-Gly-Gln (péptido 73 de la Tabla 5), o Thr-Pro-(dAla)-Gln (péptido 68 de la Tabla 5). Por tanto, la secuencia de estos péptidos puede describirse como el segmento Asn264-Ser271 ciclizado mediante un hexapéptido conector cuya secuencia aminoacídica es preferiblemente: (Thr o Arg)-Pro-(Gly o dAla)-Gln-Asn-Ser. Alternativamente, los residuos cuarto y quinto del hexapéptido conector pueden ser respectivamente los aminoácidos B_m Gln y N_m Asn, donde B_m Gln y N_m Asn son los aa L-b-metilglutamina (L-glutamina metilada en carbono beta) y L-n-metil asparagina (L-asparagina N-metilada), respectivamente. Los aminoácidos betametilados presentan mayor propensión a adoptar conformaciones extendidas (tipo estructura beta) y los N-metilados a adoptar conformaciones poliprolina, las cuales son las conformaciones adoptadas por los residuos cuarto y quinto en los modelos de estructura de péptido obtenidos según el protocolo descrito (puntos I-V) para el diseño de segmentos conectores.

Otra ejemplificación de la presente invención consiste en péptidos cuya secuencia corresponde al segmento Asn262-Ser271 de p50 conectado por un tripéptido (o de manera análoga el segmento Asn264-Ser271 conectado por un pentapéptido). El tripéptido conector tiene preferentemente – aunque no exclusivamente – la secuencia (Arg o Lys)-(Arg o Lys)-Pro (péptidos 76-77 de la Tabla 5, Figura 13), el pentapéptido conector correspondiente tiene secuencia (Arg o Lys)-(Arg o Lys)-Pro-Asn-Ser.

Ejemplo 9. Estéreoisómeros

Con el objetivo de incrementar la estabilidad estructural y, en consecuencia, la afinidad/potencia de los péptidos, una modificación considerada en la presente invención es la sustitución de los L-aminoácidos naturales de la secuencia original de N06P87 por sus estereo-isómeros (D-aminoácidos, D-aa). Como los D-aa adoptan favorablemente ángulos positivos de torsión, los residuos de N06P87 candidatos a ser sustituidos, son aquellos que adoptan tales ángulos de torsión en la estructura de la proteína nativa (y/o en los modelos de la estructura de los péptidos). La Figura 14 muestra el mapa de Ramachandran correspondiente a la estructura 3D del segmento Gly₂₅₅-Ser₂₇₄ de p50. Utilizando la definición de regiones del mapa de Ramachandran de Rooman y Wodak (Rooman MJ, Kocher JP, Wodak SJ. 1991. J Mol Biol. 221(3):961-79), los residuos N₈ y G₁₂ se localizan en la región L (región helicoidal con rotación de mano-izquierda) y G₆ en la región de conformación extendida E (los valores de phi y psi de G₆ son además prohibitivos para el resto de los L-aminoácidos). Por tanto, la sustitución de N₈, G₁₂ y G₆ por D-Ala es favorable considerando la propensidad de este residuo a adoptar dichas conformaciones de la cadena principal y/o a disminuir la pérdida de entropía configuracional asociada al plegamiento/unión. Como los residuos L-Glu, L-Gln y L-Asp tienen elevada propensidad a adoptar conformaciones helicoidales (de rotación de mano derecha) cuando estos residuos forman parte de los lazos de las proteínas (Swindells MB, MacArthur MW, Thornton JM. 1995. Nat Struct Biol. 2(7):596-603), por analogía la D-Glu, D-Gln y D-Asp es favorable a adoptar conformaciones helicoidales de rotación de la mano izquierda (como es el caso de la posición del residuo N₈). Los péptidos 17, 23, 25, 27-31, 45-51 (Tabla 5) contienen entre uno y tres D-aa diseñados de acuerdo a los criterios expuestos. La introducción de D-aa en la estructura de los péptidos de la presente invención además de tener un efecto favorable sobre la conformación, y por ende sobre la afinidad, también contribuye positivamente sobre las propiedades farmacocinéticas de los péptidos al incrementar la resistencia a proteólisis *in vivo* por dos razones fundamentales: a) un efecto directo, ya que las endoproteasas del suero digieren sustratos estereo- específicos y b) la menor flexibilidad de los péptidos los hace menos susceptibles a la digestión proteolítica.

Ejemplo 10. Bloqueo de extremos terminales y/o conjugación a polímeros.

Los péptidos se caracterizan por poseer un menor tiempo de vida media *in vivo* (menor talla, exclusión renal), la mayor flexibilidad también implica mayor susceptibilidad a proteólisis, y por tanto menor biodisponibilidad. Por tanto, la introducción de modificaciones químicas en los péptidos para mejorar la biodisponibilidad *in vivo* puede ser recomendable. La presente invención incluye el diseño de péptidos modificados covalentemente con cadena(s) de polietilén glicol (PEGS), preferiblemente mediante la modificación de los extremos terminales del péptido, aunque no excluye otras modificaciones, como por ejemplo de las cadenas laterales. Ejemplo de péptidos pegilados de la presente invención se muestran en la Tabla 5 (péptidos 62 y 63). Los péptidos pegilados de la presente invención, por tanto, presentan un mejor perfil de resistencia a proteólisis, menor filtrado renal, menor probabilidad de interacción con anticuerpos y neutralización de su actividad, menor antigenicidad e inmunogenicidad.

La pegilación incrementa el tiempo de circulación de las moléculas pequeñas, los péptidos pequeños son excretados rápidamente, en los casos de ser radiomarcados frecuentemente se ha descrito toxicidad renal (Blumenthal R. D., Sharkey R. M., Goldenberg D. M. Goldenberg D. M. eds. Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies, 295-314, CRC Press Boca Raton, FL 1995.) La pegilación se ha usado para la modificación de drogas proteicas, como interferones y anticuerpos. La presente invención incluye la presentación de los péptidos mediante el diseño de estructuras multiméricas, utilizando PEGS lineales o ramificadas, que permiten una mayor avidez en la unión péptido receptor.

La pegilación incrementa la talla molecular aparente de los péptidos, reduciendo la velocidad de la filtración renal (Knauf M. J., Bell D. P., Hirtzer P., Luo Z. P., Young J. D., Katre N. V. J. Biol. Chem., 263: 15064-15070, 1988; Behr T. M., Goldenberg D. M., Becker W. Eur. J. Nucl. Med., 25: 201-212, 1998). Los péptidos de la presente invención son modificados preferiblemente con PEGs que incrementan la talla molecular a valores iguales o superiores de 50 kDa, para reducir drásticamente la filtración glomerular de la molécula.

La pegilación, además de incrementar el tiempo de circulación, reduce la antigenicidad y la sensibilidad a proteólisis de las moléculas terapéuticas (Delgado C., Francis G. E., Fischer D. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 9: 249-304, 1992.), induce un incremento de solubilidad y permeabilidad vascular de estas (Francis G. E.,

Delgado C., Fisher D., Malik F., Agrawal A. K. J. Drug Target., 3: 321-340, 1996), propiedad favorable para las drogas antineoplásicas.

Varias exopeptidasas existen en la sangre, el riñón y el hígado (Werle M, Bernkop-Schnrch A. Amino Acids. 2006 Jun;30(4):351-67), por lo que la modificación en los extremos N- y C-terminales de los péptidos pueden incrementar significativamente su estabilidad proteolítica. N-acetilación es una modificación recomendada en la presente invención, como también la introducción de piroglutamato en el N-terminal, o un aminoácido estéreo-isómero D, etc

Los péptidos de la presente invención son en su mayoría C-amidados (amida en el extremo C-terminal), lo que les proporciona más resistencia a carboxipeptidasas.

La modificación de los extremos N y/o C-terminales puede ser también la pegilación, que además de las propiedades relacionadas con el aumento de tamaño y disminución de antigenicidad/inmunogenicidad, aumenta la resistencia a proteasas y en particular a las exopeptidasas, al modificarse los extremos terminales. Además, la adición de PEGs provoca un incremento de la resistencia a proteólisis en general (endo y exo) por impedimentos estéricos de las enzimas proteolíticas. Con este objetivo los PEGs utilizados pueden ser lineales o ramificados.

La protección de los péptidos a la proteólisis por exopeptidasas también se logra gracias a la ciclización mediada por la formación de un enlace covalente entre los extremos N- y C- terminales descritos anteriormente (péptidos 64-66, 68-69 de la Tabla 5) o mediante el enlace covalente de un extremo con una cadena lateral (péptidos 32-33 de la Tabla 5). También se logra incrementar la resistencia a exopeptidasas mediante la sustitución de aminoácidos terminales por D-aa (péptido 67 de la Tabla 5).

Como alternativa a la modificación con PEGs, también es posible la conjugación a ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), este polímero ocurre naturalmente, es muy hidrófilo, biodegradable, no tiene receptor en humanos, puede incrementar resistencia a proteasas (estabilidad en plasma) y el tiempo de vida media (Gregoriadis G, Fernandes A, Mital M, McCormack B (2000) Cell Mol Life Sci 57: 1964-1969; Fernandes AI, Gregoriadis G (1997) Biochim Biophys Acta 1341: 26-34)

Otra modificación plausible de los péptidos de la presente invención es la sustitución N-terminal por ácidos grasos o lipidación (péptidos 52-53 de la Tabla 5). Esta estrategia incrementa la resistencia de los péptidos a proteólisis por exopeptidasas, y facilita la interacción de los péptidos con membranas. En dependencia de la

naturaleza del lípido se puede favorecer la interacción con determinados dominios de membranas, facilitando la acumulación del péptido en los dominios ricos en el receptor diana de la acción farmacológica de los péptidos. La lipidación también favorece la formación de estructuras supramoleculares con mejores propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (miscelas, agregados, partículas, vesículas).

Ejemplo 11. Descripción de la estructura química de los péptidos de la presente invención.

La Figura 15 muestra una representación general de la estructura química de los péptidos de la presente invención. El diseño está basado, en primer lugar, en el segmento primario definido en el Ejemplo de realización 7. En general, la secuencia peptídica Asn264-Leu270 es expuesta en diferentes contextos estructurales, todos incluyendo diferentes grados de constreñimientos, por medio de ciclizaciones que involucran la cadena principal y/o las cadenas laterales de los péptidos. Las ciclizaciones son realizadas por medio de enlaces de diferente naturaleza química: enlaces amida o disulfuros, pero las posiciones de reemplazo que son ocupadas por los residuos de cadenas laterales cíclicas y dichas cadenas laterales en sí, son seleccionados cuidadosamente para reproducir la estructura y topografía del sitio funcional de la proteína p50/p25 identificado en la presente invención. Una solución particular consiste en la ciclización de la cadena principal, que se realiza mediante la selección de sitios de anclaje y de secuencias conectoras con una alta propensidad estructural para adoptar una conformación compatible con la estructura del segmento primario. Los segmentos secundarios son también utilizados opcionalmente, fundamentalmente como soporte de posiciones de reemplazo por cadenas laterales cíclicas. Además, los segmentos secundarios pueden aportar superficie adicional de contacto con los receptores potenciales, de acuerdo a la topografía del sitio funcional de p50/p25. Un ejemplo es la inclusión de residuos portadores de carga positiva y/o donantes de puente de hidrógeno en las posiciones X^{+3} y X^{+4} del segmento secundario C-terminal. Los péptidos pueden incluir uno o más ciclos de los mostrados en la Figura 15, aunque a modo de ejemplo solo se han incluido monociclos para mostrar en la Tabla 5. Los péptidos de la presente invención pueden incluir aa no naturales o especiales, cuyas cadenas laterales comprenden el grupo amino, carboxilo o sulfhidrilo, con el objetivo de ocupar posiciones de reemplazo para la ciclización u otra modificación química. También pueden incluir aa estereoisómeros D

en posiciones de la cadena polipeptídica que adoptan ángulos positivos de torsión, tanto del segmento primario como de los secundarios. Adicionalmente, los péptidos de la presente invención pueden ser modificados mediante la unión covalente a polímeros, tales como el PEG y/o a otros grupos químicos. Estas modificaciones pueden ser realizadas en los extremos terminales y/o en las cadenas laterales de las posiciones de reemplazo, siempre que estas no estén ocupadas por cadenas laterales ciclizadas.

Los péptidos 1, 2, 3 y 4 de la Tabla 5 (codificados durante su síntesis y purificación como: A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, y J08P48s-s, respectivamente), constituyen ejemplos de realización que cubren los aspectos esenciales de los péptidos de la invención, incluyendo: diferentes tamaños, con y sin segmentos secundarios y las posiciones de reemplazo fundamentales. Estos péptidos se seleccionaron para la demostración de su efecto en modelos tumorales *in vivo*: la simulación estructural del fragmento peptídico críptico con actividad citotóxica de la p25 genera moléculas de 20 aa o menos, que logran reproducir la actividad antitumoral de la p25, de manera ventajosa, para ser empleadas en la terapia del cáncer.

Ejemplo 12. Evaluación de la actividad antitumoral de péptidos cíclicos optimizados en modelos de tumores singénicos y xenógrafos.

Para evaluar la actividad antitumoral de la nueva familia de péptidos cíclicos de la presente invención, que mimetizan la estructura de la región activa de p25, se seleccionaron 4 péptidos modelos que comprenden diferentes variantes de las ciclizaciones e inserciones de esta familia. Ellos fueron los péptidos 1, 2, 3 y 4 de la Tabla 5 (codificados para los ensayos de actividad como: A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s, respectivamente). Como grupo control positivo se empleó un grupo tratado con el polipéptido CIGB370r.

Los ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, hembras con 22 g de peso, aproximadamente, fueron suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Habana, Cuba), y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos en el Bioterio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Los experimentos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones para el uso apropiado y cuidado de animales de laboratorio. El volumen tumoral se midió en cada caso [mediante la fórmula: volumen = $a^2 \times (b/2)$],

donde a es el ancho y b es el largo del tumor] y se evaluó la sobrevida de los animales. La sobrevida de los grupos se comparó mediante la prueba “*Log-rank*”. Los estadígrafos se obtuvieron mediante el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 Los ratones C57BL/6 se inyectaron en el flanco derecho por vía subcutánea (s.c.) con 50 000 células TC-1. Cuando los tumores fueron detectables, se aleatorizaron y se formaron los grupos de tratamiento con los péptidos objeto de estudio, evaluando diferentes vías de administración. Los animales portadores de tumor recibieron 6 administraciones en días alternos, con 80 μ M del péptido en cuestión, o recibieron
10 solamente el vehículo como control. En cada grupo se emplearon 5 ratones. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, y los procedimientos se realizaron en correspondencia con las buenas prácticas del trabajo con animales de laboratorio.

La sobrevida de todos los grupos tratados fue estadísticamente diferente al grupo que
15 recibió el vehículo. La Figura 16 muestra 3 bloques: 1) el de mayor sobrevida, que fueron los grupos tratados con el péptido J08P48s-s y con el CIGB-370r, entre los que no existen diferencias significativas; 2) el de sobrevida intermedia, que comprende los grupos tratados con los péptidos A08P28s-s, A08P25s-s, y J08P46s-s, entre los que no existen diferencias significativas, y que se diferencian del bloque 1; y 3) el grupo
20 control negativo. Estos resultados demuestran que la nueva familia de péptidos descrita en esta invención, representada por los péptidos evaluados en este modelo, es capaz de incrementar significativamente la sobrevida de los animales tratados, hasta alcanzar la actividad descrita por el polipéptido que le dio origen.

Además, de la vía intratumoral, en este modelo TC-1 se evaluaron otras vías de
25 administración de los péptidos, tales como la intraperitoneal. La Figura 17 muestra que en ambas vías de administración los péptidos cíclicos tales como el péptido J08P48s-s, reproducen los efectos observados en este modelo para el polipéptido CIGB-370r. Ello evidencia, la efectividad de los péptidos cíclicos de la presente invención para el tratamiento de tumores sólidos a distancia.

30 Se comparó el efecto del segmento lineal Gly255-Ser274 (péptido N06P87) y de dos péptidos cíclicos modelo de la presente invención, con respecto al polipéptido CIGB370r, sobre el modelo de cáncer de colon humano Ls174T, en ratones atímicos NIH, con las dosis y esquema de administración de la Figura 19. Después de 13 días, cuando los tumores estaban establecidos y palpables, comenzaron los esquemas de

administración de las biomoléculas (Figura 19 A). Los péptidos se administraron con dosis escalonadas: dos administraciones de 600 μ M cada 48 h, luego 4 administraciones de 330 μ M cada 48 h, y por último 4 administraciones de 90 μ M cada 72 h. El polipéptido CIGB-370r se administró una vez por semana durante 4

semanas.

En este caso, a diferencia del péptido lineal, los péptidos cíclicos mostrados en la Figura 19, fueron capaces de incrementar la sobrevida, de manera significativa (prueba de "Logrank": $p < 0.05$), de los animales tratados, con respecto al grupo que recibió el vehículo, y con respecto al péptido lineal N06P87. Los valores de T/C referidos al volumen medio tumoral (Figura 19B) fueron: 35%, 35%, 37%, y 72%, para A08P25s-s, J08P48s-s, CIGB-370r y N06P87, respectivamente. Los valores de T/C referidos a la sobrevida media (Figura 19C) fueron: 144%, 161%, 142%, y 117%, para A08P25s-s, J08P48s-s, CIGB-370r y N06P87, respectivamente. Estos resultados demuestran que los péptidos cíclicos de la presente invención, que mimetizan la estructura tridimensional del sitio activo antitumoral de la p25, son útiles para el desarrollo de terapias antineoplásicas. Los péptidos de la presente invención presentan, con respecto a las proteínas originales, ventajas en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Ejemplo 13. Amplio espectro de acción de los péptidos cíclicos de la presente invención, sobre líneas de células tumorales humanas de diferente origen histológico.

Los péptidos de la presente invención fueron evaluados sobre varias líneas de células tumorales humanas, de diferente origen histológico, usando el método de sulforrodamina B (Skehan P, Storeng R, Scudiero D, y col., (1990) "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107–1112). La Figura 18 muestra, como ejemplo, un péptido con amplio espectro de acción sobre las líneas evaluadas, mostrando efecto dosis-respuesta. Ello evidencia que estas novedosas moléculas son útiles para tratar tumores malignos de diferente origen histológico, tales como: carcinoma de laringe (HEp-2), cáncer de pulmón de células pequeñas (H82), cáncer de pulmón de células no pequeñas (H125), cáncer cérvico-uterinos (HeLa, Caski), y gliomas (U87), entre otros.

Ejemplo 14. Inhibición de la formación de estructuras tubulares en matrigel.

Actualmente, la comunidad científica internacional tiene bien establecido que la combinación es la clave de la terapia del cáncer, especialmente cuando se combina la acción directa sobre células tumorales (inhibiendo su proliferación u originando su muerte) con la acción sobre el medio ambiente tumoral, inhibiendo la angiogénesis.

Es por ello que se evaluó la actividad antiangiogénica de los péptidos de la presente invención, mediante el método de formación de cordones endoteliales por las células endoteliales humanas derivadas de microvasculatura (HMEC) sobre matrigel (Crum R, Szabo S, Folkman J. (1985). Science. 230:1375-8). La Figura 20 muestra la capacidad de los péptidos cíclicos de la presente invención para inhibir la formación de estructuras tubulares, en dependencia de la concentración empleada, demostrando su actividad antiangiogénica.

Ejemplo 15. Estructuras peptídicas con propiedades de autoensamblaje, basadas en péptidos cíclicos derivados de *Serratia marcescens*.

Los péptidos de la presente invención poseen carácter anfipático, aportado por segregación de parches hidrofóbicos e hidrofílicos en la superficie de los péptidos. El parche hidrofóbico fundamental es conformado por las cadenas laterales de los residuos Tyr259, Phe269 y Leu270, que se encuentran cercanos en la estructura 3D de la proteína p50. El resto de la superficie está conformada, fundamentalmente, por residuos polares o cargados. Este carácter anfipático de los péptidos hace que estos tengan propensidad a formar agregados supramoleculares nanométricos y/o micrométricos, tal como se muestra en la fotografía de la Figura 21. La agregación de los péptidos puede, además, ser mediada por la formación de puentes de hidrogeno intermoleculares, que involucran segmentos de la cadena principal y cadenas laterales. Las estructuras extendidas de los segmentos secundarios N- y C-terminales de los péptidos de la presente invención pueden favorecer un tipo de agregación en condiciones de formulación determinadas, para aplicaciones novedosas en la terapia del cáncer, tales como terapia combinada y en el campo de la nanobiotecnología y sistemas de liberación controlada (Monica C. Branco, Joel P. Schneider. Acta Biomaterialia 5 (2009) 817–831).

Ejemplo 16. Péptidos cíclicos antitumorales y antiangiogénicos combinados con prodigiosina, presentan efecto citotóxico sinérgico sobre células tumorales.

Prodigiosinas aisladas de *Serratia marcescens* CMIB4202 (Abrahantes-Pérez MC, Reyes-González J, Véliz Ríos G, y col., (2006) Cytotoxic proteins combined with prodigiosin obtained from *Serratia marcescens* have both broad and selective cytotoxic activity on tumor cells. J Chemother. 18: 172-81) fueron combinadas con péptidos cíclicos de la presente invención, mediante formulaciones apropiadas o por enlaces covalentes, ya sea directamente por síntesis química o por reacciones químicas entre las moléculas simples. Péptidos cíclicos tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s potenciaron la actividad citotóxica de la prodigiosina sobre las diferentes líneas de células tumorales humanas evaluadas (como A549, A375, PC-3, U87, etc.) por el método de SRB (Skehan P, Storeng R, Scudiero D, y col., (1990) "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107–1112), con GI50 en el rango de nM, y disminuyeron la actividad citotóxica producto de la acción de la prodigiosina sobre fibroblastos primarios en al menos un orden de magnitud. Ello infiere que los mecanismos de acción de ambas moléculas son diferentes y que pueden ser combinadas con resultados ventajosos para la terapia del cáncer.

Ejemplo 17. Obtención de la composición farmacéutica de péptidos cíclicos antitumorales y antiangiogénicos encapsulados con polímeros de la familia de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

Con el objetivo de modificar la farmacocinética y biodistribución de los péptidos de la presente invención, acorde a la indicación terapéutica oncológica deseada para cada caso en particular, se exploró la encapsulación de estos péptidos cíclicos con polímeros en microesferas de PLGA. Para ello se preparó una solución de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico 50:50 al 10% (w/v) mediante la disolución de 1g del polímero en diclorometano. A 1 ml de la solución polimérica se le añadió 200 µl de una solución acuosa conteniendo al menos uno de los péptidos de la presente invención, tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s a concentraciones entre 20 y 40 mg/ml. Esta mezcla fue sonicada durante 30 segundos por medio de un ultrasonido de sonda. La emulsión resultante se vertió en 40 ml de alcohol polivinílico al 1% y se obtuvo la segunda emulsión (w/o/w), mediante agitación de las dos fases, a 14 000 rpm, en un homogeneizador Ultraturrax T8. La doble emulsión se vertió en 140 ml de alcohol polivinílico 30 000–70 000 al 0,1% y se agitó en un homogeneizador a 300 rpm durante 1 h para evaporar el diclorometano.

Finalmente, las microesferas se colectaron por filtración, se lavaron 5 veces con 50 ml de agua destilada cada vez y se secaron por congelación-deshidratación en una liofilizadora. Las microesferas secas se almacenaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

- 5 Las microesferas de los péptidos cíclicos tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s con excipientes se obtuvieron de forma similar a la descrita, pero con la adición de Pluronic F-127 (10 mg) y NaCl (0.5mg) en la fase acuosa interna. Ambos tipos de microesferas fueron administradas subcutáneamente en ratones atímicos portadores del tumor tipo melanoma A375 humano, en la región
- 10 cercana al mismo. Se realizó una sola administración cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor a 200 mm³, lográndose similares resultados a los obtenidos con múltiples administraciones (tres veces /semana durante cuatro semanas), con T/C<10% y T/C>170%, para el volumen tumoral y sobrevida, respectivamente.

15 **Ejemplo 18. Obtención de liposomas convencionales cargados con péptidos cíclicos antitumorales y antiangiogénicos.**

- Fosfatidilcolina, a una concentración de 10 mg/mL, fue disuelta en etanol absoluto en un balón de 50 mL de fondo redondo. El lípido fue secado mediante roto-evaporación a temperatura ambiente hasta que se formó una capa seca en las paredes del recipiente. Para encapsular al menos uno de los péptidos cíclicos descritos en la
- 20 presente invención, tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s en liposomas, la capa seca de lípido fue hidratada mediante homogenización con una solución tamponada que contenía al menos uno de los péptidos anteriores. Para disminuir el tamaño de los liposomas, la preparación de liposomas cargados con los péptidos mencionados fue sometida a varios pases de extrusión a través de una
- 25 membrana de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro promedio hasta que el tamaño promedio de los liposomas estuvo alrededor de 100 nm.

- Para separar los péptidos encapsulados en el liposoma de los péptidos no encapsulados, la suspensión fue centrifugada a 100 000 $\times g$ durante 40 min a 4°C. El sobrenadante fue trasvasado a un tubo limpio y el precipitado fue resuspendido con
- 30 una solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2. La centrifugación se repitió una vez más en las mismas condiciones y el sobrenadante fue trasvasado a un tubo limpio y mezclado con el sobrenadante de la primera centrifugación. El precipitado (liposomas cargados con los péptidos cíclicos de la presente invención) fue

resuspendido en una solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2. Esta preparación final fue almacenada a 4°C hasta su uso. Los liposomas cargados con al menos un péptido de la presente invención se administró como dosis única a ratones portadores del tumor TC-1, y con ello se logró reproducir los resultados del efecto antitumoral logrado con administraciones múltiples (mostrados en el Ejemplo 12).

Ejemplo 19. Péptidos cíclicos antitumorales y antiangiogénicos con capacidad de enlazar iones metálicos y dirigir el fármaco a un tejido específico.

La composición aminoacídica de los péptidos de la presente invención tiene la capacidad de unir iones metálicos como radiometales y metales paramagnéticos para ser empleados como farmacéuticos, sin afectar sus propiedades biológicas.

El complejo péptido-ión metálico se puede generar por diferentes procedimientos físico-químicos, por los sitios indicados en ejemplos anteriores. Entre los radiometales podemos incluir los isótopos de los elementos Tc, Re, Au, Ag, Pd, As, Cu, Hg, y Ru. El producto de la reacción entre el ión metálico y el péptido es un complejo entre ambas moléculas que demostró dirigirse específicamente a tumores y metástasis de diferente origen histológico en modelos animales (ratones C57BL/6) portadores de tumor TC-1. Estos complejos pueden ser empleados para el diagnóstico y terapia del cáncer de manera muy específica, minimizando la captación por órganos y tejidos normales.

En el caso de complejos de los péptidos de la presente invención con radioisótopos para el diagnóstico y terapia del cáncer, pueden emplearse radioisótopos tales como: Tc⁹⁹ y I¹³¹, respectivamente. Los péptidos unidos a metales de esta invención pueden ser empleados directamente para la administración o pueden ser conjugados a otras moléculas transportadoras.

Con el objetivo de dirigir los péptidos de la presente invención directamente hacia el tumor y lograr mayor acúmulo en el mismo, con respecto a órganos y tejidos normales, se sintetizó un complejo formado por péptidos, tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s enlazados covalentemente con polietilenglicol, según el Ejemplo 8. Luego se formuló el mismo con nanopartículas de óxido de Fe, generándose un complejo vector magnético nanoparticulado constituido mayoritariamente por: péptidos cíclicos antitumorales de la presente invención, molécula polimérica y nanopartícula de óxido de hierro. El complejo se administró intravenosamente (por la cola del ratón) a ratones C57BL/6 portadores del tumor

subcutáneo TC-1 (ubicado en el flanco derecho de los animales), cuando el volumen tumoral fue mayor que 200 mm³. Un campo magnético externo se aplicó localmente a la región tumoral y el complejo se transportó a través de la circulación sanguínea y se concentró en el tumor (Lübbe AS, Bergemann C, Alexiou C. Targeting tumors with magnetic drugs. In: Pagé M, editor. Cancer drug discovery and development: tumor targeting in cancer therapy. Totowa NJ: Humana Press Inc; 2003. pp. 379–88). Se empleó como grupo control positivo el esquema y dosis de administración similar al mostrado en el Ejemplo 12, y como grupo control negativo el vehículo sin presencia de los péptidos antitumorales. El efecto antitumoral del grupo tratado con el vector magnético nanoparticulado portador de los péptidos antitumorales demostró disminución del volumen tumoral en menor tiempo que los controles positivos ($p < 0.05$) y la sobrevida fue significativamente mayor que el resto de los grupos ($p < 0.05$), demostrando la potencialidad de esta tecnología en el efecto terapéutico de los péptidos cíclicos de la presente invención, debido a su capacidad de concentrar mayor cantidad de moléculas terapéuticas en el tumor.

Ejemplo 20: Efecto sinérgico de la combinación de péptidos cíclicos antitumorales y antiangiogénicos con citostáticos convencionales.

Se evaluó el sinergismo del efecto antineoplásico de los péptidos de la presente invención, tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s, combinado con un grupo de citostáticos por separado, en las siguientes condiciones experimentales. Se cultivaron las células A549 (cáncer de pulmón de células no pequeñas) en placas de 96 pocillos en presencia uno de los péptidos antes mencionados en un rango de concentraciones entre 200-12,5 μ M. Simultáneamente, se adicionó al menos uno de los citostáticos seleccionados para este estudio (Cisplatino, Paclitaxel, 5-Fluouracilo, Vincristina, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Mitomicina C, Imatinib, Velcade, Iressa) en un rango de concentraciones que abarcó desde 1 hasta 2000 nM y la incubación se prolongó durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, se procedió al revelado de la viabilidad celular mediante el método del MTT. Finalmente, la absorbancia a 570 nm se midió en cada caso y se construyeron las respectivas curvas dosis-respuesta. Los valores de dosis que redujeron el 50% de la proliferación celular (IC₅₀) para cada citostático se redujeron entre uno y dos órdenes de magnitud cuando estos se combinaron de manera simultánea con al menos uno de los péptidos de la presente invención. Los resultados de estos ensayos

demuestran una potenciación del efecto antineoplásico de la combinación farmacéutica compuesta por los péptidos cíclicos de la presente invención y los citostáticos referidos en esta invención.

Ejemplo 21: Potenciación del efecto antitumoral de la combinación farmacéutica en un modelo animal de cáncer.

Para este propósito, se inocularon 5×10^6 de células A549 por vía subcutánea en la región dorsal de ratones desnudos (BalBc) de 6-8 semanas de edad. Al cabo de los 10 días cuando los tumores eran palpables (alrededor de 30 mm^3), se procedió a la administración de la combinación farmacéutica de la invención. La administración de los ingredientes de la combinación se realizó mediante la administración intraperitoneal de al menos uno de los péptidos cíclicos de la presente invención tales como A08P25s-s, A08P28s-s, J08P46s-s, J08P48s-s formulados en el vehículo apropiado con el mismo esquema y dosis de administración que el mostrado en el Ejemplo 12 y simultáneamente la inoculación intraperitoneal de 1 mg/kg/día de citostáticos como el cisplatino, ciclofosfamida y Mitomicin C, en la misma frecuencia de tratamiento. Los citostáticos fueron también disueltos en el mismo vehículo que los péptidos cíclicos. Finalmente, se midieron los volúmenes de masa tumoral en función del tiempo para evaluar el efecto antineoplásico *in vivo*. Los resultados indicaron que la combinación farmacéutica de la invención produce una potenciación del efecto antitumoral que se traduce en una regresión completa de la masa tumoral cuando ambos ingredientes son administrados de manera simultánea. Se observó inhibición del crecimiento tumoral y un incremento de la sobrevida de los animales significativo, con respecto al grupo tratado con el placebo. De esta manera se demuestra que la interacción sinérgica entre los ingredientes de la combinación farmacéutica de la invención se manifiesta además *in vivo* según los resultados de un modelo preclínico relevante y predictivo para cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Péptidos cíclicos con actividad antineoplásica y antiangiogénica que se caracterizan porque su secuencia aminoacídica comprende:

a) Un segmento cuya secuencia aminoacídica es:



Donde,

X^1 es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Ser, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo; o una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por un tetrapéptido, un pentapéptido, y un hexapéptido

X^2 es el aminoácido Gly o D-Ala

X^3 es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Leu, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^4 es opcional y es un aminoácido seleccionado entre el grupo compuesto por Ser, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo;

b) Un segmento N-terminal, opcional y anterior al segmento descrito en a), cuya secuencia aminoacídica es:



Donde,

X^{-1} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Asn, D-Asp, D-Glu, D-Gln y D-Ala, y se encuentra enlazado por un enlace peptídico al residuo X^1 del segmento descrito en a), y dicho enlace peptídico comprende al grupo carbonilo de la cadena principal del residuo X^{-1} y al grupo amino de la cadena principal del residuo X^1 del segmento descrito en a);

X^{-2} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Phe, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^{-3} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Gly y D-Ala

X^4 es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Tyr, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^5 es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Gly y D-Ala

- 5 c) Un segmento C-terminal opcional y posterior al segmento descrito en a) cuya secuencia aminoacídica es seleccionada del grupo compuesto por Thr- $X^{+1}X^{+2}$, Thr- $X^{+1}-X^{+2}-X^{+3}$ y Thr- $X^{+1}-X^{+2}-X^{+3}-X^{+4}$

Donde,

10 el residuo N-terminal Thr de dicho segmento C-terminal se encuentra enlazado al segmento descrito en a) por un enlace peptídico que comprende el grupo amino de la cadena principal de dicho residuo N-terminal Thr y el grupo carbonilo de la cadena principal del residuo X^4 del segmento descrito en a)

X^{+1} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Thr, Gly y Ala

15 X^{+2} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Ser, Asn, Cys, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural que comprenda en la cadena lateral el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

20 X^{+3} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Cys, Gln, Arg, Asn, Lys, Asp, Glu y un aminoácido no natural que comprenda en la cadena lateral el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo

X^{+4} es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por Gln, Arg, Asn y Lys

- 25 d) Al menos un enlace covalente seleccionado del grupo compuesto por un enlace peptídico que comprende los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido que está presente si la secuencia X^1 del segmento descrito en a) es la secuencia de un tetrapéptido, un pentapéptido o un hexapéptido; un enlace covalente disulfuro que comprende los grupos sulfhidrilo de la cadena lateral de los residuos X^1 y X^4 o X^4 y X^3 o X^2 y X^{+2} o X^2 y X^{+3} si dichos residuos X^1 y X^4 o X^4 y X^3 o X^2 y X^{+2} o X^2 y X^{+3} son Cisteínas o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo sulfhidrilo; un enlace amida que comprende un grupo carbonilo y un grupo amino de las cadenas laterales de los residuos X^1 y X^4 o X^4 y X^3 o X^2 y X^{+2} o X^2 y X^{+3} si dichos residuos X^1 y X^4 o X^4 y X^3 o X^2 y X^{+2} o X^2 y X^{+3} son Lys (o un aminoácido no natural cuya cadena
- 30

lateral comprende un grupo amino) y Glu (o Asp o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo carbonilo), o dichos residuos X^1 y X^4 o X^{-4} y X^3 o X^{-2} y X^{+2} o X^{-2} y X^{+3} son respectivamente Glu (o Asp o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo carbonilo) y Lys (o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo amino); y un enlace amida que comprende el grupo carbonilo terminal del péptido y un grupo amino de la cadena lateral del residuo X^{-2} y dicho enlace amida está presente si el residuo X^{+2} es: el residuo del extremo carboxilo terminal del péptido, el aminoácido Asn y X^{-2} es el aminoácido Lys o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende un grupo amino.

2. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque comprende un enlace peptídico entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido y porque la secuencia X^1 de dicho péptido es la secuencia aminoacídica de un tetrapéptido, preferentemente de secuencia que se selecciona del grupo compuesto por (D-Ser)-Pro-Thr-Pro, (D-Ala)-Pro-Thr-Pro y Gly-Pro-Thr-Pro.

3. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque comprende un enlace peptídico entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido y porque la secuencia X^1 de dicho péptido es la secuencia aminoacídica de un pentapéptido, preferentemente de secuencia que se selecciona entre el grupo compuesto por Arg-Arg-Pro-Asn-Ser, Arg-Arg-Pro-(D-Ala)-Ser, Lys-Lys-Pro-Asn-Ser y Lys-Lys-Pro-(D-Ala)-Ser.

4. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque comprende un enlace peptídico entre los grupos amino y carbonilo de los extremos N- y C-terminal del péptido y porque la secuencia X^1 de dicho péptido es la secuencia aminoacídica de un hexapéptido, preferentemente de secuencia que se selecciona entre el grupo compuesto por Thr-Pro-(D-Ala)-Gln-Asn-Ser, Arg-Pro-(D-Ala)-Gln-Asn-Ser, Thr-Pro-(D-Ala)-(BmGln)-(NmAsn)-Ser y Arg-Pro-(D-Ala)-(BmGln)-(NmAsn)-Ser, donde BmGln es el aminoácido L-b-metilglutamina y NmAsn es el aminoácido L-N-metilasparagina.

5. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque su extremo N-terminal se encuentra enlazado covalentemente al grupo acetilo, al aminoácido piroglutámico, a un lípido o a un polímero, preferentemente el polietilén glicol, y el enlace se establece directamente, o por medio de un grupo

espaciador, preferentemente el aminoácido Gly.

6. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque su extremo C-terminal se encuentra en forma amida, o enlazado covalentemente a un lípido o a un polímero, preferentemente el polietilén glicol, y el enlace se establece directamente, o por medio de un grupo espaciador, preferentemente el aminoácido Gly.

7. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque comprende un enlace covalente entre el péptido y un lípido o un polímero, preferentemente el polietilén glicol, y dicho enlace covalente comprende el grupo sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} , y dicho residuo X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} es el aminoácido Cys, Lys, Asp, Glu o un aminoácido no natural cuya cadena lateral comprende el grupo funcional sulfhidrilo, el grupo amino o el grupo carboxilo.

8. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} son seleccionados del grupo compuesto por el aminoácido cisteína, el ácido (2R)-2-amino-3-sulfanilbutanoico, el ácido (2R)-2-amino-3-methyl-3-sulfanilbutanoico, el ácido (2S)-2-amino-4-sulfanilbutanoico, ácido 2-amino-5-sulfanil-pentanoico, el ácido 2-amino-3-sulfanil-pentanoico, el ácido 2-amino-4-metil-3-sulfanilpentanoico, el ácido 2-amino-3-metil-4-sulfanilpentanoico, el ácido 2-amino-3,4-dimetil-3-sulfanil-pentanoico, el ácido 2-amino-3-etil-3-sulfanilpentanoico, el ácido (2R)-2-amino-3-metil-3-sulfanilpentanoico, el ácido (4S)-4-amino-2-metil-5-sulfanilpentanoico, el ácido (4R)-4-amino-2-metil-5-sulfanilpentanoico, el ácido (4R)-4-amino-5-sulfanilpentanoico y el ácido (4S)-4-amino-5-sulfanilpentanoico.

9. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} , X^{+3} son seleccionados del grupo compuesto por el aminoácido Lys, el ácido 2-[bis(3-aminopropil)amino]acético, el ácido (2S)-2,5-diaminopentanoico, el ácido 2,2-diaminoacético, el ácido (3S)-3,4-diaminobutanoico, el ácido (2R)-2,4-diaminobutanoic, el ácido (2S)-2,4-diaminobutanoico, el ácido (2S)-2,3-diaminopropanoico, el ácido (2R)-2,3-diaminopropanoico, el ácido 2-[(2-aminoetil)amino]acético, el ácido 2-[(3-aminopropil)amino]acético, el ácido 2-[(4-aminobutil)amino]acético, el ácido (4S)-

4,8-diaminooctanoico, el ácido (2S)-2-amino-3-(4-aminofenil)propanoico, el ácido (2S)-2-amino-3-[4-(2-aminoetoxy)fenil]propanoico, el ácido 2-(piperidin-4-ilamino)acético, el ácido (2S)-2-amino-4-[(5R)-2,2-dimetil-1,3-oxazolidin-5-yl]butanoico, el ácido (2S)-2-amino-6-(metilamino)hexanoico, el ácido (2R,4R)-4-aminopirrolidine-2-carboxílico o el ácido (2R,4S)-4-aminopirrolidine-2-carboxílico, el ácido 2-(4-aminopiperidin-4-yl)acético, el ácido 4-aminopiperidine-4-carboxílico, el ácido (2S,4R)-4-aminopirrolidine-2-carboxílico y el ácido imidazolidine-2-carboxílico.

10. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque X^1 , X^3 , X^4 , X^{-2} , X^{-4} , X^{+2} o X^{+3} son seleccionados del grupo compuesto por el aminoácido Glu, Asp, el ácido 3-[(carboximetil)amino]propanoico, el ácido 2-[(carboximetil)amino]acético, el ácido 3-[(2-carboxietil)amino]propanoico, el ácido (3R)-3-aminohexanedioico, el ácido 4-aminoheptanedioico, el ácido 4-aminopiperidine-1,4-dicarboxílico, el ácido (2S,4S)-4-aminopirrolidine-2-carboxílico, el ácido 2-[(carboximetil)amino]acético, el ácido (2S)-2-amino-6-[(carboximetil)amino]hexanoico, el ácido 3-[(2-carboxietil)amino]propanoico, el ácido (2S)-2-aminoheptanedioico, el ácido (2S)-2-aminooctanedioico, el ácido (2R)-2-amino-3-[(2-carboxietil)sulfanil]propanoico, el ácido (2R)-2-amino-3-[(carboximetil)sulfanil]propanoico, el ácido 4-[(2R)-2-amino-2-carboxietil]sulfanil}butanoico, y el ácido (2S)-2-amino-3-[4-(carboximethoxy)fenil]propanoico.

11. Un péptido cíclico según la reivindicación 1 que se caracteriza porque su secuencia aminoacídica se selecciona dentro del grupo compuesto por las secuencias identificadas en el listado de secuencias como SEQ ID 1-76.

12. Uso de los péptidos cíclicos de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para preparar un medicamento para la terapia del cáncer o el tratamiento de desórdenes de la proliferación celular no deseada, o un medicamento antiangiogénico.

13. Un método para el tratamiento del cáncer, de los desórdenes de la proliferación celular y la angiogénesis no deseada, que se caracteriza porque se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de al menos uno de los péptidos de las reivindicaciones 1-11 a un individuo que lo necesita.

14. El método de la reivindicación 13 que se caracteriza porque la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente seleccionado del grupo compuesto por un grupo no fluorescente, una partícula semiconductor fluorescente, un agente paramagnético o súper-paramagnético, y un radioisótopo.

5 15. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos de las reivindicaciones 1-11 y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 que se caracteriza porque los péptidos están formando parte de sistemas de liberación controlada y sistemas que pertenecen al campo de la nanobiotechnología.

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 donde los sistemas de liberación controlada pueden estar formando liposomas.

18. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 donde los sistemas de liberación controlada pueden estar formando microesferas.

15 19. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 donde los sistemas de liberación controlada pueden estar formando estructuras autoensambladas con los péptidos de las reivindicaciones de la 1 a 11.

20 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 que se caracteriza porque comprende adicionalmente un agente seleccionado del grupo compuesto por una partícula semiconductor, un agente paramagnético o súper-paramagnético, y un radioisótopo.

25 21. Un compuesto para el diagnóstico del cáncer que se caracteriza porque comprende al menos uno de los péptidos de las reivindicaciones 1-11 y un agente para imagen seleccionado dentro del grupo compuesto por un grupo fluorescente, un grupo no fluorescente, una partícula semiconductor fluorescente, un agente paramagnético o súper-paramagnético, y un radioisótopo.

22. Una combinación farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos de las reivindicaciones 1-11 con al menos un agente de tratamiento seleccionado del grupo compuesto por los medicamentos anticancerígenos y las hormonas.

30 23. La combinación de la reivindicación 22 que se caracteriza porque el péptido está conjugado directamente al agente de tratamiento mediante enlaces

covalentes.

24. La combinación de la reivindicación 22 que se caracteriza porque el péptido está conjugado al agente de tratamiento por un elemento acoplador.

5 25. La combinación de la reivindicación 24 que se caracteriza porque el elemento acoplador se selecciona del grupo compuesto por un residuo de aminoácido, un hidrocarbilo y un hidrocarbilo sustituido.

26. Una combinación farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos de las reivindicaciones 1-11 y prodigiosinas o derivados de estas.

RESUMEN

La presente invención se refiere a péptidos cíclicos con propiedades antitumorales y antiangiogénicas, así como a sus sales farmacéuticamente aceptables y a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Estos péptidos cíclicos se emplean en la preparación de medicamentos para la terapéutica humana y/o veterinaria, y también pueden emplearse en el diagnóstico. Estos compuestos pueden ser usados para detectar, monitorear y/o controlar una variedad de desórdenes relacionados con la proliferación celular, tales como las enfermedades oncológicas y la angiogénesis no deseada. Además, pueden formar parte de sistemas de liberación controlada y en el campo de la nanobiotecnología, ya sea por su capacidad de autoensamblaje o como parte de otros sistemas.

Figura 1

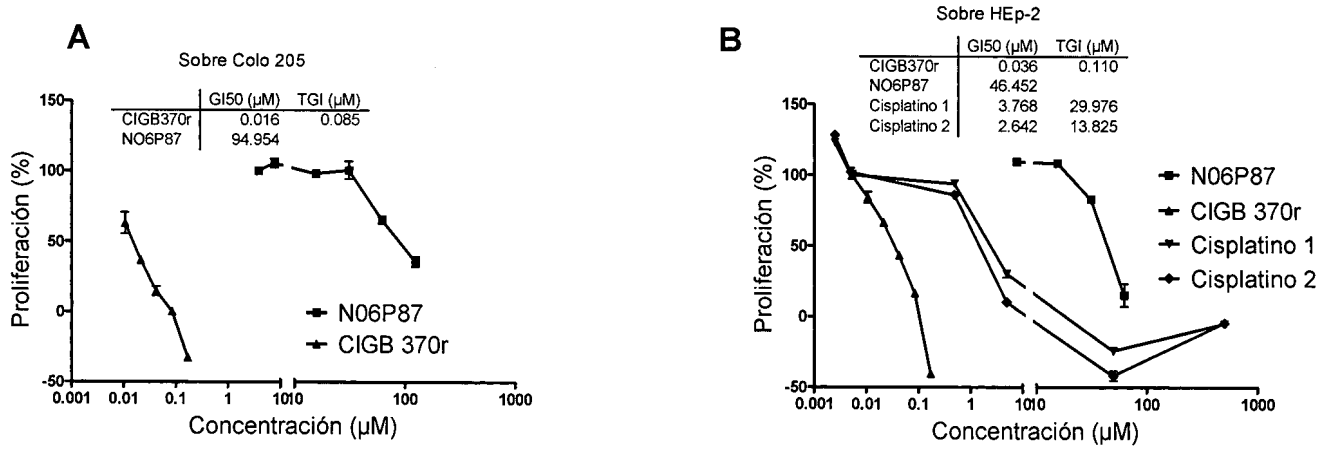


Figura 2

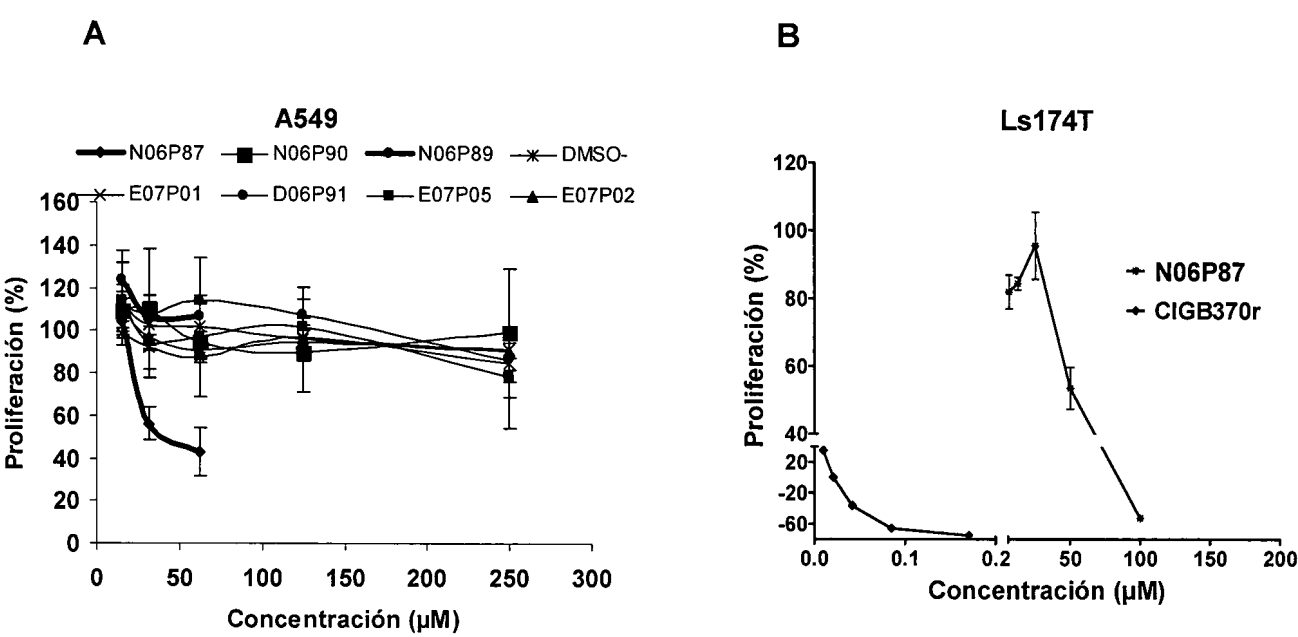


Figura 3

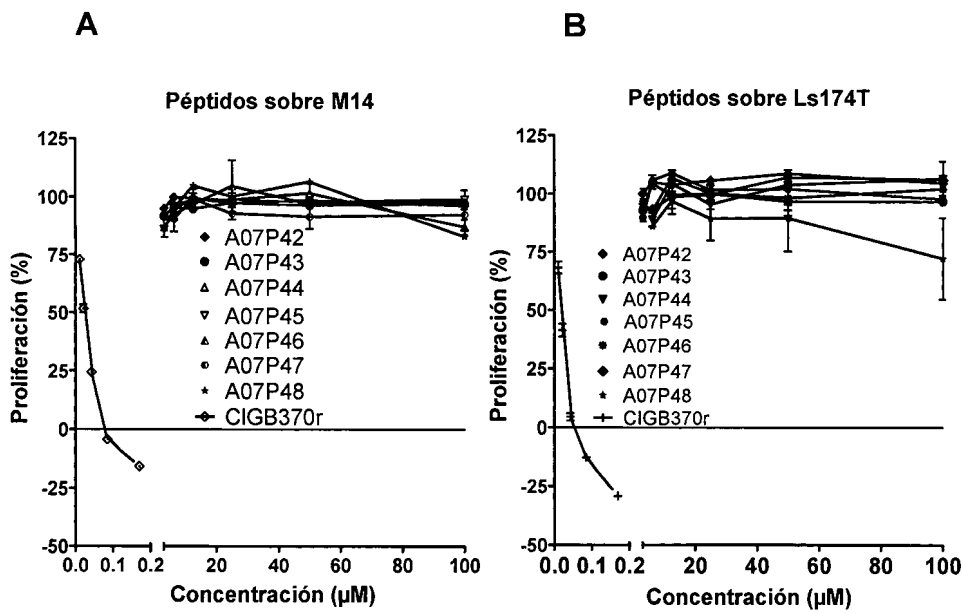


Figura 4

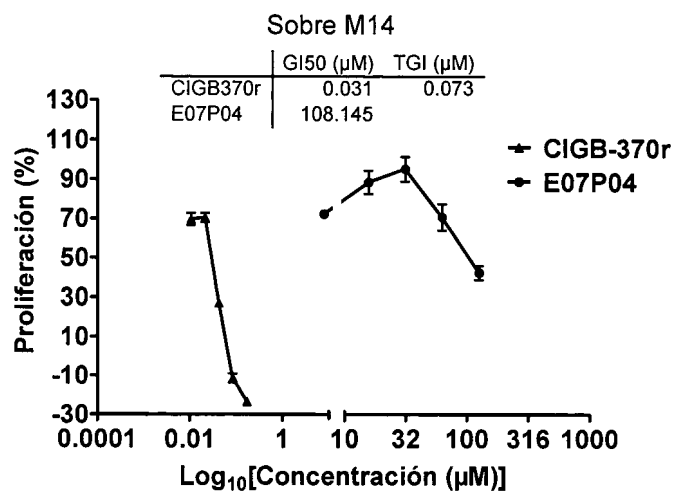


Figura 5

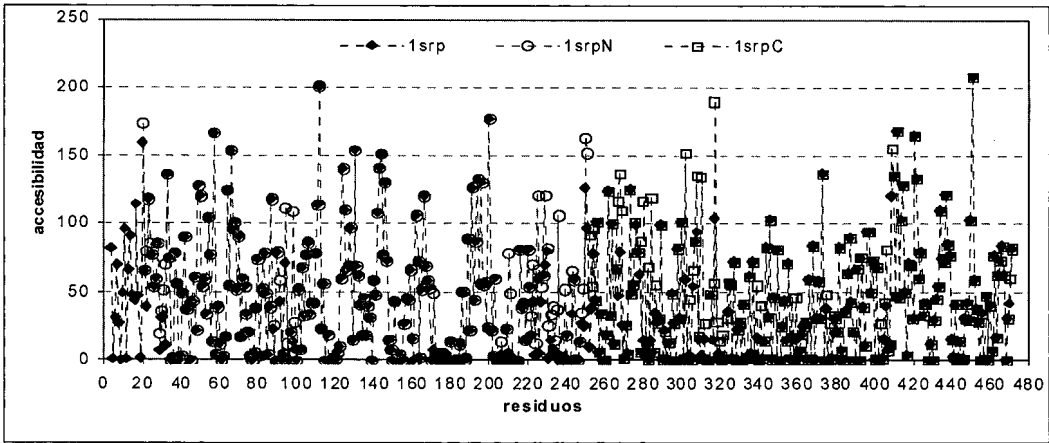


Figura 6

LYGANPSTRTGDTVYGFNSN -amida (E07P06)

GDTVYGFNSNTGRDFLSTTS -amida (N06P87)

TGRDFLSTTSNSQKVIFAAW -amida (F07P16)

Figura 7

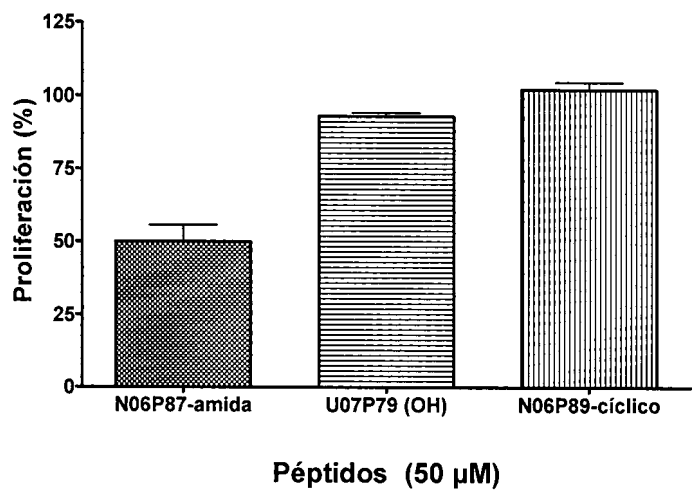


Figura 8

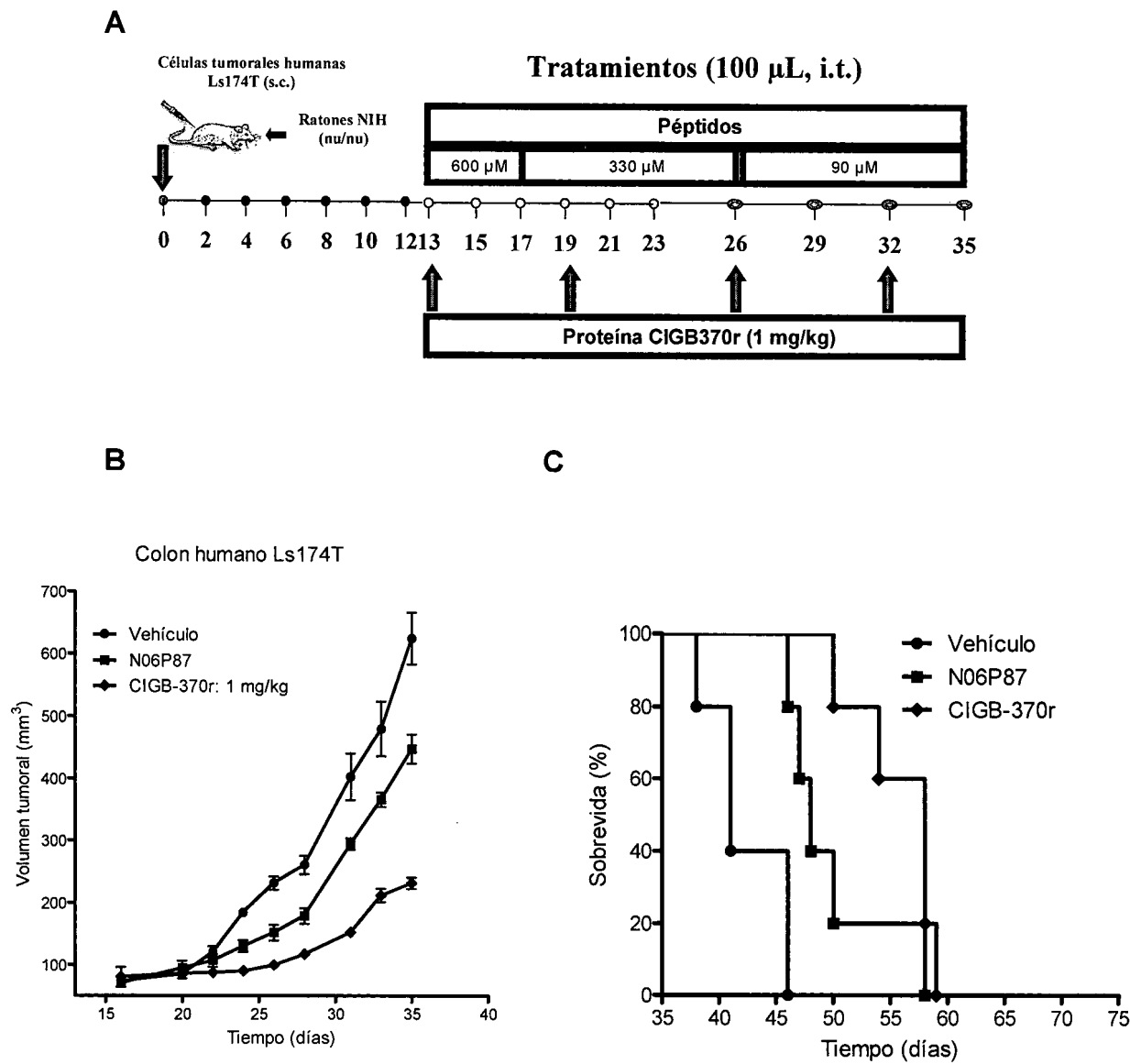


Figura 9

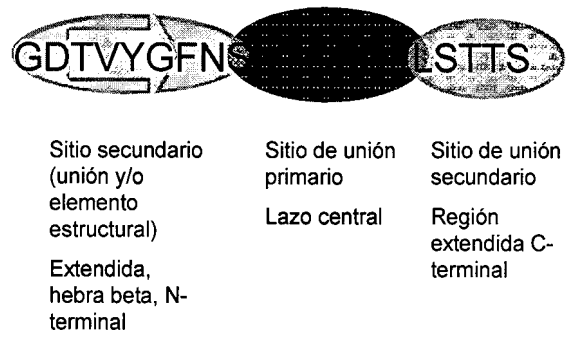


Figura 10

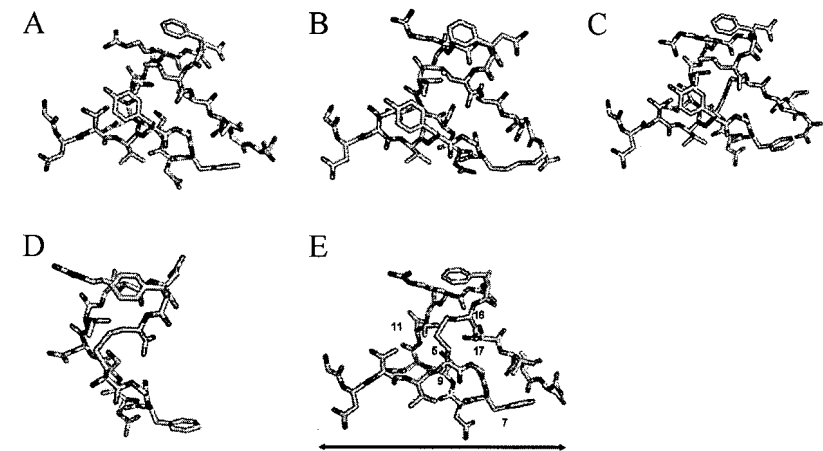


Figura 11

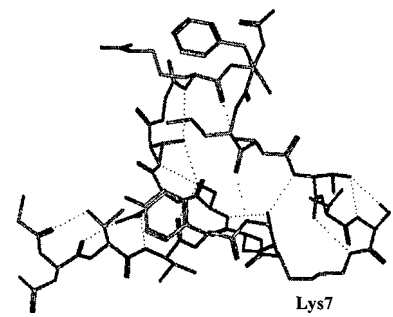


Figura 12

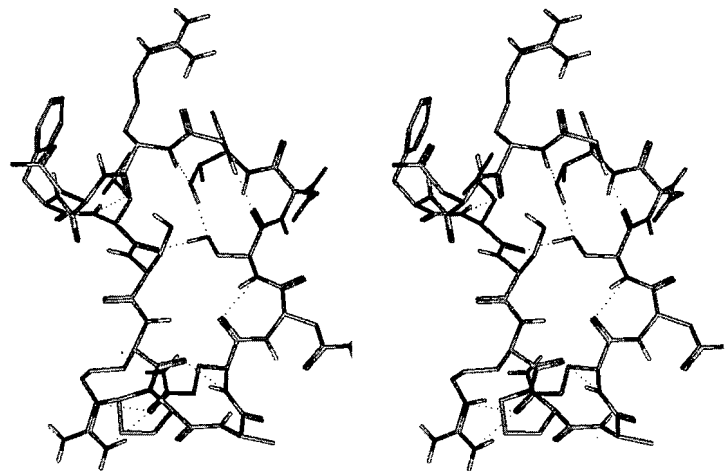


Figura 13

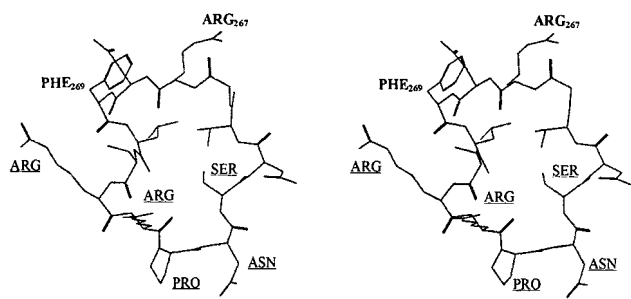


Figura 14

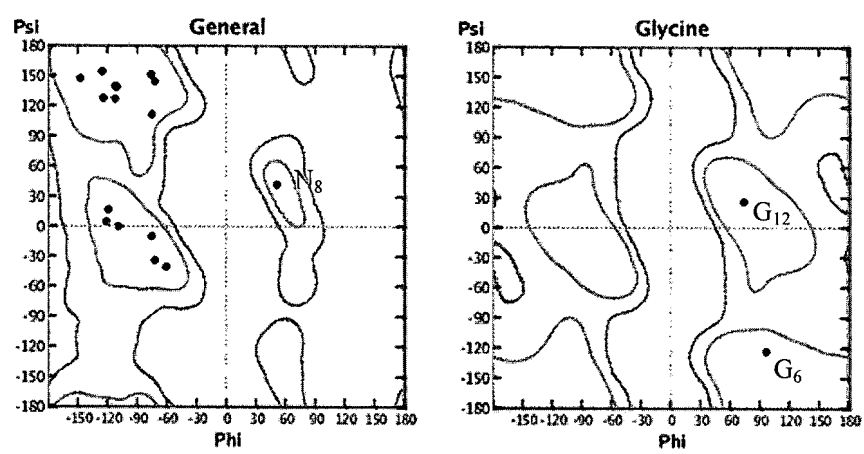


Figura 15

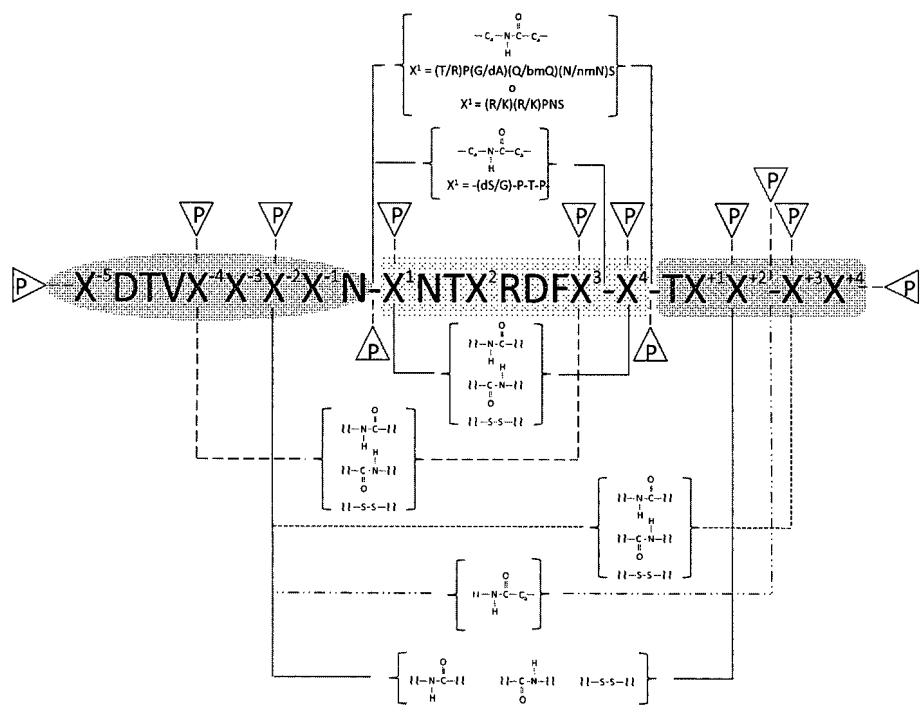


Figura 16

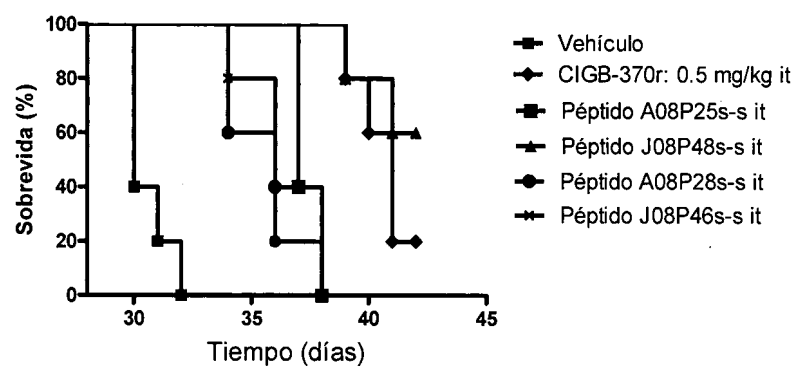


Figura 17

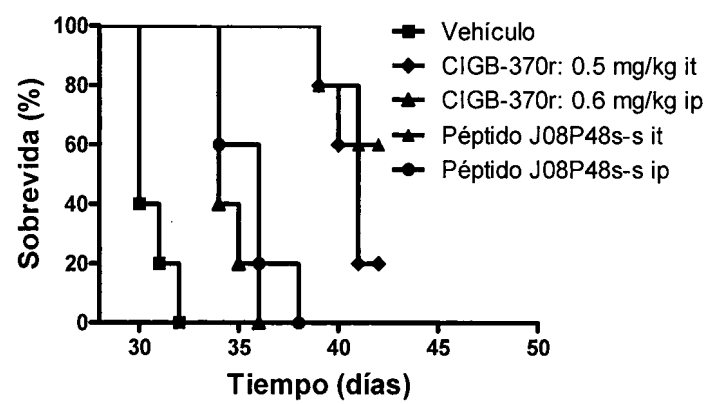


Figura 18

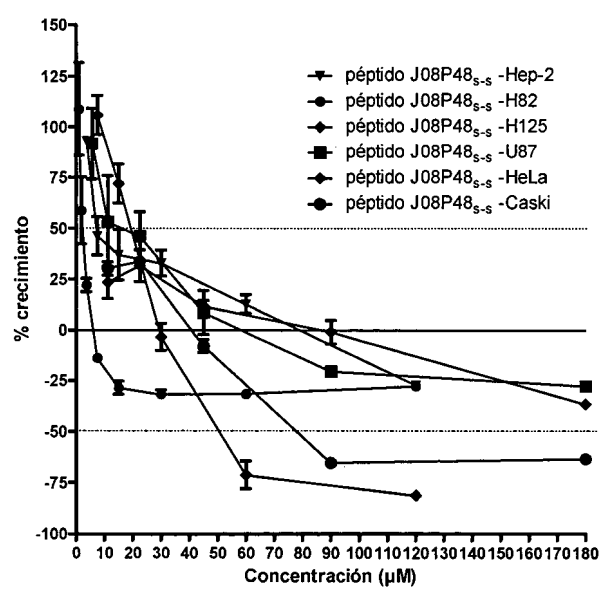


Figura 19

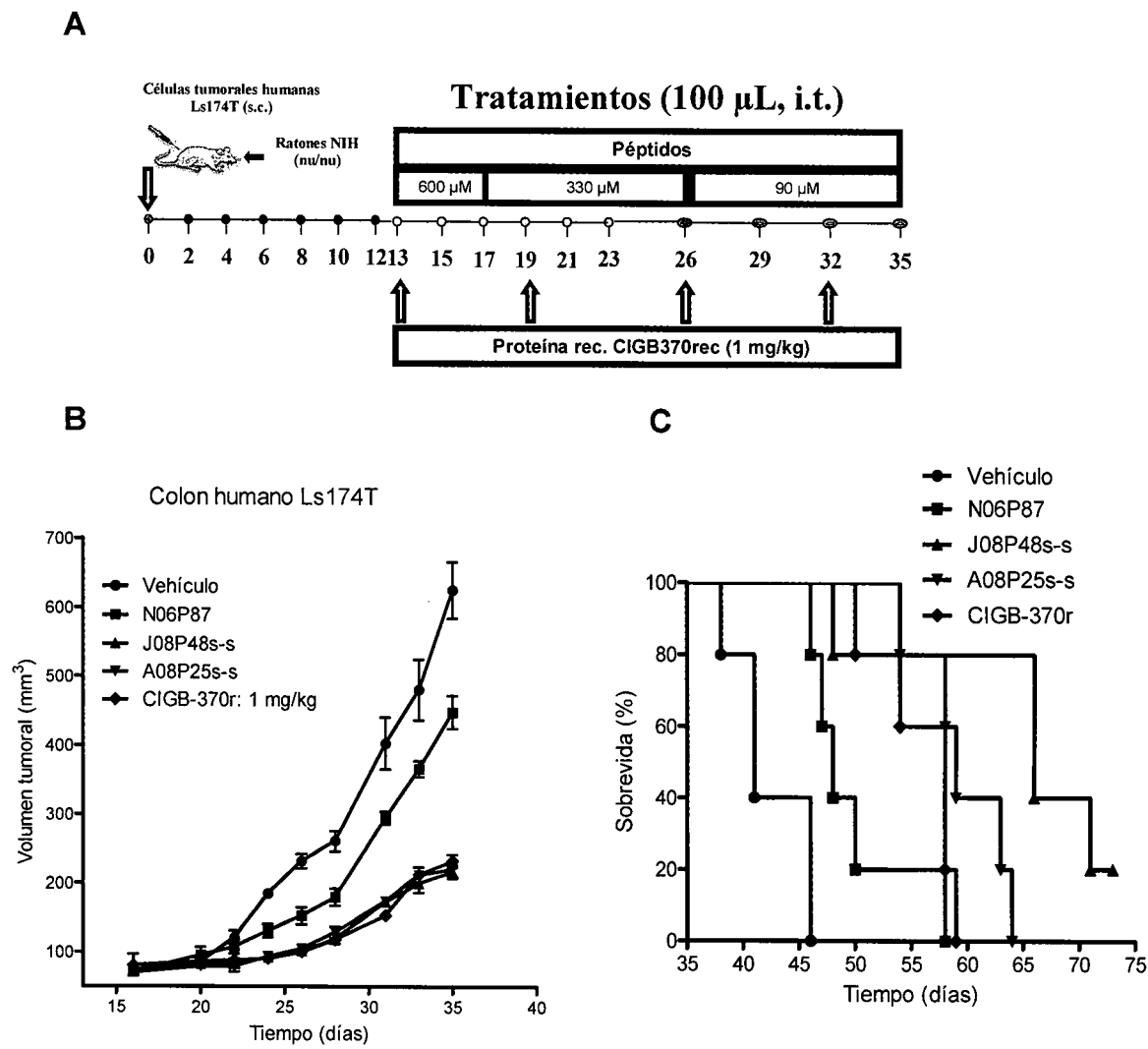


Figura 20

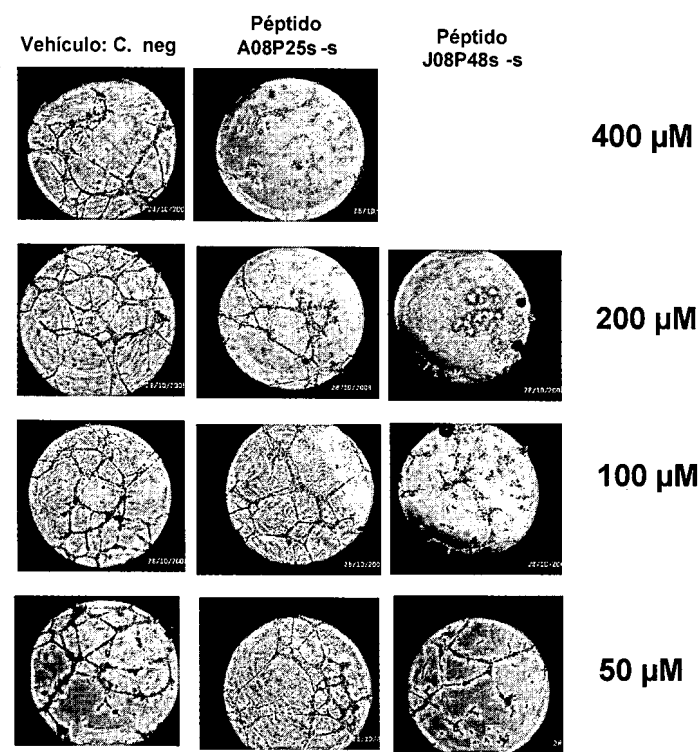
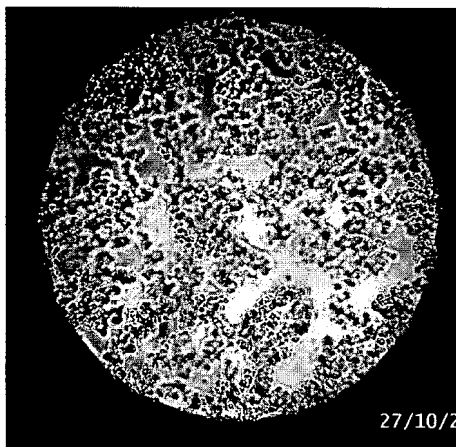


Figura 21

Péptido J08P48s-s



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> PEPTIDOS CICLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA Y ANTIANGIOGENICA

<130> Péptidos cíclicos antitumorales

<140> CU 2011-0167

<141> 21.03.2011

<160> 76

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C1 y C9

<400> 1

Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Cys
1 5

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C9 y C17

<400> 2

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Cys Thr Thr Ser
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C5 y C16

<400> 3

Gly Asp Thr Val Cys Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Cys
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 4
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K9 y D17

<400> 5
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Lys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Asp Thr Thr Ser
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K9 y E17

<400> 6
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Lys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Glu Thr Thr Ser
20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de D9 y K17

<400> 7
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Asp Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Lys Thr Thr Ser
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de E9 y K17

<400> 8
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Glu Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Lys Thr Thr Ser
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K5 y D16

<400> 9
Gly Asp Thr Val Lys Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Asp
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K5 y E16

<400> 10
Gly Asp Thr Val Lys Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Glu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de D5 y K16

<400> 11
 Gly Asp Thr Val Asp Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de E5 y K16

<400> 12
 Gly Asp Thr Val Glu Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de K7 y D20

<400> 13
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Asp
 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de K7 y E20

<400> 14
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Glu
20

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

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de D7 y K20

<400> 15
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Asp Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Lys
20

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de E7 y K20

<400> 16
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Lys
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A12 es un
D-aminoácido

<400> 17
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
20

<210> 18

<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21

<400> 18
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys
20

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K7 y D21

<400> 19
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Asp
20

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 20
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu
20

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de D7 y K21

<400> 21
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Asp Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu

1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Lys

20

```
<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de E7 y K21

<400> 22
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Lys
20

```
<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A12 es un D-aminoácido

<400> 23
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys
20

```
<210> 24
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 24
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Lys
20

```
<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A12 es un
D-aminoácido

<400> 25
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21

<400> 26
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 27
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A12 es un D-aminóacido

<400> 27
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 28
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 28
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
20

<210> 29
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 29
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 30
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys
20

<210> 31
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 31
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 32
<211> 20

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre la cadena lateral de K7 y el extremo carboxilo terminal de N20

<400> 32
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Asn
 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre la cadena lateral de K7 y el extremo carboxilo terminal de S20

<400> 33
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C20, el extremo amino terminal de G1 esta pegilado

<400> 34
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 35
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C20

<400> 35
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Gln
20

<210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 36
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Asn
20

<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 37
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Arg
20

<210> 38
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21

<400> 38
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Gln
20

<210> 39
<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C21

<400> 39

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu

151051

Ser Thr Thr Ser Cys Asn

20

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C21

<400> 40

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu

151051

Ser Thr Thr Ser Cys Arg

20

<210> 41

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 41

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu

151051

Ser Thr Thr Ser Glu Lys

20

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 42

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu

151051

Ser Thr Thr Ser Glu Gln
20

<210> 43
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 43
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu Asn
20

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 44
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu Arg
20

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C1 y C9, A4 es un
D-aminoácido

<400> 45
Cys Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu Cys
1 5

<210> 46
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace

disulfuro entre C7 y C20; A6, Q8 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 46
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Gly Cys
20

<210> 47
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 47
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 48
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 48
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Thr Ser Cys
20

<210> 49
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 49
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 50
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C9 y C17; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 50
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Phe Gln Cys Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Cys Thr Thr Ser Lys
20

<210> 51
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C5 y C16; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 51
Gly Asp Thr Val Cys Ala Phe Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Cys
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C2 y C10, G1 está
lipidada

<400> 52
Gly Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Cys
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C1 y C9, G10 está
lipidada

<400> 53

Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Cys Gly
1 5 10

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 54

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys
20

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 55

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys Gln
20

<210> 56

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 56

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys Asn
20

<210> 57

<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 57
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys Arg
20

<210> 58
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 58
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys Lys
20

<210> 59
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 59
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Cys
20

<210> 60
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C8 y C21, E1 es un ácido
piroglutámico

<400> 60

Glu Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe
1 5 10 15
Leu Ser Thr Gly Cys
20

<210> 61
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, G1 está acetilada

<400> 61
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Gly Cys
20

<210> 62
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, pegilación por el
extremo amino terminal y carboxilo terminal

<400> 62
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15
Ser Thr Gly Cys
20

<210> 63
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C8 y C21, pegilación por el
extremo carboxilo terminal

<400> 63
Asn Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe
1 5 10 15
Leu Ser Thr Gly Cys
20

<210> 64

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; S2 es un D-aminoácido

 <400> 64
 Leu Ser Pro Thr Pro Asn Thr Gly Arg Asp Phe
 1 5 10

 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; S2 y A8 son D-aminoácidos

 <400> 65
 Leu Ser Pro Thr Pro Asn Thr Ala Arg Asp Phe
 1 5 10

 <210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C20; A1 es un D-aminoácido

 <400> 66
 Ala Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

 Ser Thr Gly Cys
 20

 <210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es un D-aminoácido

 <400> 67
 Asp Phe Leu Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es un D-aminoácido

<400> 68
Asp Phe Leu Ser Arg Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A2 es un D-aminoácido

<400> 69
Leu Ala Pro Thr Pro Asn Thr Gly Arg Asp Phe
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 70
Leu Gly Pro Thr Pro Asn Thr Gly Arg Asp Phe
1 5 10

<210> 71
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 71

Asp Phe Leu Ser Thr Pro Gly Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 72
Asp Phe Leu Ser Arg Pro Gly Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es D-Ala; Q8 es L-b-metilglutamina y N9 es asparagina N-metilada

<400> 73
Asp Phe Leu Ser Arg Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es D-Ala; Q8 es L-b-metilglutamina y N9 es asparagina N-metilada

<400> 74
Asp Phe Leu Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 75
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la

cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 75

Asp Phe Leu Ser Arg Arg Pro Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre los grupos amino y carboxilo de la
cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 76

Asp Phe Leu Ser Lys Lys Pro Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 5 10

RATIFICACION, REPRESENTACION Y PODER

8972

5917

La que suscribe, CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,

sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Cuba,

domiciliada en 31 Street 1/150 & 190, Cubanacan, Playa, Habana, Cuba,

por el presente ratificamos la solicitud de patente No. 97.057.986

presentada por EMILIO FERRERO el 3 de octubre de 1997

ante la Superintendencia de Industria y Comercio en Bogotá, Colombia,

y nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de nuestra propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, renuncia voluntaria, y registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Firmado en la ciudad de La Habana

el 19 de noviembre de 1997

Dr. Manuel de Jesús Limonte Vidal



Lic. Carmen Alicia Pérez Dela
Notario de la Notaría Especial a cargo
de la Dirección de Registro y Notarías
del Ministerio de Justicia de la República
de Cuba.

Doy fe. Que la(s) firma(s) que
aparece(n) en el presente Poder por la
señalada(s) que se han con la misma
que se otorgarán a usar en todos sus
actos.

La Habana, a los 19 días del mes
de noviembre de 1997.

Para los países que no son parte del Protocolo Interamericano de 1940 sobre Uniformidad del Régimen Legal de los Poderes, el Cónsul Colombiano debe certificar como sigue*:

Fecha:

Nº _____

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

CERTIFICA:

1º Que el señor
quien autentica el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones de

y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

2º Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
que actualmente ejerce su objeto social y;

existe legalmente, y

3º Que el señor
quien firmó la representación y poder que preceden en su carácter de
de la Compañía
está autorizado para representarla en este acto, y otorgar el poder.

Cónsul de Colombia

* Son parte del Protocolo: Colombia, El Salvador, México, Venezuela y los Estados Unidos. En los demás países el Señor Cónsul de Colombia debe otorgar el certificado según el modelo de esta página.

FECHA

No.

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

C E R T I F I C A :

10. Que el señor
quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente
en la fecha allí indicada, las funciones de
y que la firma
y sello que en el documento aparecen como suyos son los que
usa y acostumbra en sus actos oficiales.
- 20.) Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,
domiciliada en 31 Street 1/156 & 190, Cubanacan, Playa,
Habana, Cuba,
existe legalmente y que actualmente ejerce su objeto social
de acuerdo con las leyes del respectivo país.
- 30.) Que el señor , quien
firmó el poder que precede en su carácter de
está autorizado para
representarla en este acto y otorgar el poder.

DERECHOS US\$

CONSUL



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION JURIDICA

José D. Peraza Chapeau, /o Julio P. Alvarez Doris
/o Orlando F. Acosta Faz, /o María Silvia Fernán-
dez Villar, /o Aida de Puzo Pedraza, /o Manuel
Capaz Ruiz, /o Jesús Fernández Ponce. Funciona-
rios autorizados para certificar Autenticaciones
de firma en Documentos expedidos para surtir
efectos en el extranjero.

CERTIFICO: QUE AL PARECER ES AUTENTICA DEL
FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO,
LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR LA SEMEJANZA QUE
GUARDA CON LA QUE OBRA REGISTRADA EN ESTE
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A
USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO:

LA HABANA

26 NOV 1997



Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 67/97

La Habana, Diciembre 26 de 1997

La suscrita Cónsul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que el Señor Jesús Fernández Ponce, quien como funcionario de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; Que el CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA es una unidad presupuestada constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; Que el Señor Manuel de Jesús Limonta Vidal, quien en su carácter de Director de la citada unidad presupuestada confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Cónsul General de Colombia no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Martha Niño de Stand

Martha Niño de Stand.
Consul General

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL	US\$ 6.00 (seis dólares)
DERECHOS FONDO ROTATORIO	US\$ 100.00 (cien dólares)
TOTAL PAGADO	US\$ 106.00 (cientoseis dólares)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

202496

CON LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 ENE 13 / FEB 12

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

101

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA**

Poder conferido el : 19/11/1997

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,

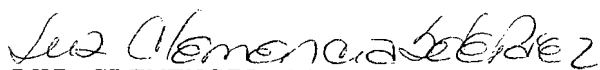


EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL

Bogotá, D.C.

Ante mí AMPARO QUINTERO ANTONIO, 22 OCT 2009

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Comparecieron:

Emilio Fierro
Williamson Fierro
Diego Fierro

Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C.

438019 TP 31929

35446344 TP 23555

Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que se reco(n)

en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y

que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Fierro
Luz Clemencia Solís

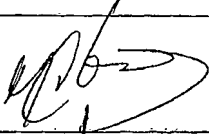
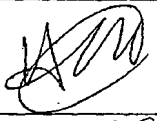
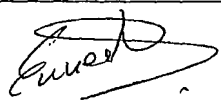
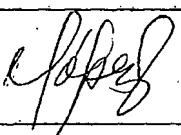
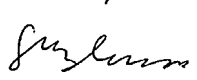


PCT-067

6/8

PETITORIO PCT

Original (para PRESENTACION)

VIII-2-1	Declaración: Derecho para solicitar y que sea concedida una patente Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente (Reglas 4.17.ii) y 51bis.1.a)iii)), en caso de que no proceda la declaración según la Regla 4.17.iv): Nombre (APELLIDOS, Nombre)	Respecto de esta solicitud internacional CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA tiene derecho a solicitar y a que le sea concedida una patente en virtud de lo siguiente:
VIII-2-1(i)v)		una cesión de ABRAHANTES PÉREZ, María, del Carmen a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 19 Marzo 2011 (19.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de CHINEA SANTIAGO, Glay a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de MARTÍNEZ DÍAZ, Eduardo a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de GARAY PÉREZ, Hilda, Elisa a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de REYES ACOSTA, Osvaldo a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de LÓPEZ MOLA, Ernesto a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de LÓPEZ ABAD, Cruz, Matilde a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de GONZALEZ BLANCO, Sonia a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 21 Marzo 2011 (21.03.2011)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0098031
		Bogotá D.C., Septiembre 30 de 2013 - 11:59:00

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	599246756	30/09/2013	10.237.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				<u>\$500.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-248567-00000-0000
Fecha: 2013-10-21 10:55:17 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

0010:08972-841-009-6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0098042
		Bogotá D.C., Septiembre 30 de 2013 - 11:59:00

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	599246756	30/09/2013	10.237.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1612 TASA ANUAL A#OS 9 a 12 CUATRENIO PARA MANTENIMINETO DE	480.000.00 480.000.00 \$480.000.00

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-248567- -00000-0000

Fecha: 2013-10-21 10:55:17 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

Ccto: 08972-841-009-6,

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 30 de 2013 - 11:59:06



No. 13-248567-00000-0000

Fecha: 2013-10-21 10:55:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> PEPTIDOS CICLICOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA Y
ANTIANGIOGENICA

<130> Péptidos cíclicos antitumorales

<140> CU 2011-0167

<141> 21.03.2011

<160> 76

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C1 y C9

<400> 1

Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Cys
1 5

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C9 y C17

<400> 2

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Cys Thr Thr Ser
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C5 y C16

<400> 3

Gly Asp Thr Val Cys Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Cys
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 4
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K9 y D17

<400> 5
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Lys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Asp Thr Thr Ser
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K9 y E17

<400> 6
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Lys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Glu Thr Thr Ser
20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de D9 y K17

<400> 7

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Asp Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Lys Thr Thr Ser
20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de E9 y K17

<400> 8

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Glu Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Lys Thr Thr Ser
20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de K5 y D16

<400> 9

Gly Asp Thr Val Lys Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Asp
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de K5 y E16

<400> 10

Gly Asp Thr Val Lys Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Glu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de D5 y K16

<400> 11
 Gly Asp Thr Val Asp Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de E5 y K16

<400> 12
 Gly Asp Thr Val Glu Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de K7 y D20

<400> 13
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Asp
 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de K7 y E20

<400> 14

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Glu
 20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de D7 y K20

<400> 15

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Asp Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Lys
 20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de E7 y K20

<400> 16

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Lys
 20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20, A12 es un
 D-aminoácido

<400> 17

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 18

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C21

<400> 18
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Ser Cys
 20

<210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de K7 y D21

<400> 19
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Ser Asp
 20

<210> 20
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 20
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Ser Glu
 20

<210> 21
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre las cadenas laterales de D7 y K21

<400> 21
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Asp Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu

1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Lys
20

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de E7 y K21

<400> 22
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Lys
20

<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C21, A12 es un D-aminoácido

<400> 23
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys
20

<210> 24
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C20

<400> 24
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A12 es un
D-aminoácido

<400> 25

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 26

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21

<400> 26

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A12 es un D-aminóácido

<400> 27

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 28

Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
20

<210> 29
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 29
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 30
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys
20

<210> 31
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21, A6 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 31
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Asn Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 32
<211> 20

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre la cadena lateral de K7 y el
 extremo carboxilo terminal de N20

<400> 32
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Asn
 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre la cadena lateral de K7 y el
 extremo carboxilo terminal de S20

<400> 33
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Ser
 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20, el extremo amino
 terminal de G1 esta pegilado

<400> 34
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 35
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20

<400> 35

Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Gly	Cys	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Arg	Asp	Phe	Leu
1				5					10					15	

Ser	Thr	Gly	Cys	Gln
			20	

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 36

Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Gly	Cys	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Arg	Asp	Phe	Leu
1				5					10					15	

Ser	Thr	Gly	Cys	Asn
			20	

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 37

Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Gly	Cys	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Arg	Asp	Phe	Leu
1				5					10					15	

Ser	Thr	Gly	Cys	Arg
			20	

<210> 38

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21

<400> 38

Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Gly	Cys	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Arg	Asp	Phe	Leu
1				5					10					15	

Ser	Thr	Thr	Ser	Cys	Gln
			20		

<210> 39

<211> 22

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C21

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Asn
20

<213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C21

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Arg
20

<213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu Lys
20

<213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu Gln
20

<210> 43
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 43
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu Asn
20

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
amida entre las cadenas laterales de K7 y E21

<400> 44
Gly Asp Thr Val Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Glu Arg
20

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C1 y C9, A4 es un
D-aminoácido

<400> 45
Cys Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu Cys
1 5

<210> 46
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace

disulfuro entre C7 y C20; A6, Q8 y A12 son
D-aminoácidos

<400> 46

Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
20

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 47

Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys Lys
20

<210> 48

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 48

Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys
20

<210> 49

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C21; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 49

Gly Asp Thr Val Tyr Ala Cys Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Cys Lys
20

<210> 50
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C9 y C17; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 50
Gly Asp Thr Val Tyr Ala Phe Gln Cys Asn Thr Ala Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Cys Thr Thr Ser Lys
20

<210> 51
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C5 y C16; A6, Q8 y A12
son D-aminoácidos

<400> 51
Gly Asp Thr Val Cys Ala Phe Gln Ser Asn Thr Ala Arg Asp Phe Cys
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser
20

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C2 y C10, G1 está
lipidada

<400> 52
Gly Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Cys
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C1 y C9, G10 está
lipidada

<400> 53

Cys Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Cys Gly
1 5 10

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 54

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys
20

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 55

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys Gln
20

<210> 56

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
disulfuro entre C7 y C20

<400> 56

Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Cys Asn
20

<210> 57

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20

<400> 57
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Ala Cys Arg
 20

<210> 58
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20

<400> 58
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Ala Cys Lys
 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20

<400> 59
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Cys
 20

<210> 60
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C8 y C21, E1 es un ácido
 piroglutámico

<400> 60

Glu Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 61
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20, G1 está acetilada

<400> 61
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 62
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C7 y C20, pegilación por el
 extremo amino terminal y carboxilo terminal

<400> 62
 Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 63
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 disulfuro entre C8 y C21, pegilación por el
 extremo carboxilo terminal

<400> 63
 Asn Gly Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 64

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; S2 es un D-aminoácido

<400> 64

Leu Ser Pro Thr Pro Asn Thr Gly Arg Asp Phe
 1 5 10

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; S2 y A8 son D-aminoácidos

<400> 65

Leu Ser Pro Thr Pro Asn Thr Ala Arg Asp Phe
 1 5 10

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace disulfuro entre C7 y C20; A1 es un D-aminoácido

<400> 66

Ala Asp Thr Val Tyr Gly Cys Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Cys
 20

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es un D-aminoácido

<400> 67

Asp Phe Leu Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg

Asp Phe Leu Ser Thr Pro Gly Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 72

Asp Phe Leu Ser Arg Pro Gly Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es D-Ala; Q8 es L-b-metilglutamina y N9 es asparagina N-metilada

<400> 73

Asp Phe Leu Ser Arg Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la cadena principal de los residuos extremo-terminales; A7 es D-Ala; Q8 es L-b-metilglutamina y N9 es asparagina N-metilada

<400> 74

Asp Phe Leu Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace amida entre los grupos amino y carboxilo de la

cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 75

Asp Phe Leu Ser Arg Arg Pro Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Enlace
 amida entre los grupos amino y carboxilo de la
 cadena principal de los residuos extremo-terminales

<400> 76

Asp Phe Leu Ser Lys Lys Pro Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10