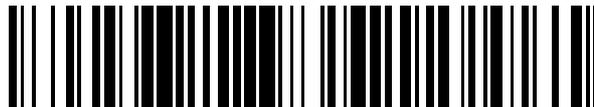


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 676**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05750346 .8**

96 Fecha de presentación: **14.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1781780**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:
15.06.2004 GB 0413346

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.08.2012

73 Titular/es:
Theryte Limited
William Russell HouseThe Square
Lightwater Surrey GU18 5SS, GB

72 Inventor/es:
WARENIUS, Hilmar Meek;
ESSEX, Jonathan y
KILBURN, Jeremy

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 386 676 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos que son citotóxico para, y/o que inhiben el crecimiento de, una célula cancerosa y/o que estimulan el crecimiento de una célula no cancerosa. La presente invención también se refiere a usos médicos de dichos péptidos.

10

Antecedentes de la invención

Aunque la quimioterapia ha sido responsable de curar a mucha gente con cáncer, sigue habiendo una gran cantidad de pacientes cuyos tumores muestran poca respuesta al tratamiento, o solamente responden inicialmente para reaparecer posteriormente. Para estos pacientes, los tratamientos actuales son claramente inadecuados.

15

Se cree que ciertos tumores son insensibles a quimioterapia convencional porque las células de estos tumores tienen un patrón de expresión génica que los vuelve insensibles a agentes quimioterapéuticos. Asimismo, se cree que esos tumores a menudo responden inicialmente a la quimioterapia, pero que posteriormente llegan a ser resistentes porque las células del tumor muestran heterogenicidad tumoral e inestabilidad genética. La heterogenicidad tumoral describe la situación en la que diferentes células en el tumor tienen diferentes patrones de expresión génica con algunas células que son resistentes a un agente quimioterapéutico, mientras que otras células son sensibles al agente. El tratamiento de dicho tumor con este agente quimioterapéutico, por lo tanto, elimina las células sensibles, provocando la reducción del tumor, pero no logra eliminar las células resistentes, que continúan dividiéndose para producir un cáncer que es completamente resistente al fármaco.

20

25

Además, la mayoría de los agentes quimioterapéuticos convencionales desarrollados hasta ahora inhiben el crecimiento de células normales importantes, por ejemplo: a) la inhibición quimioterapéutica de las células progenitoras del sistema hematopoyético provocando una caída en los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas causando anemia, susceptibilidad a infecciones y hemorragia espontánea, b) la inhibición del remplazo de células normales en el intestino causando diarrea o c) la inhibición del remplazo de células escamosas que revisten la boca, la nariz y la garganta, etc.

30

La inestabilidad genérica se halla en la mayoría de los cánceres. Provoca que las células tumorales adquieran nuevas mutaciones. Ciertas de estas mutaciones pueden conferir resistencia a fármacos a las células en que suceden. Estas células resistentes a fármacos sobreviven a la quimioterapia y se dividen para producir un cáncer que es resistente a fármacos.

35

Por tanto existe la necesidad de agentes anticáncer que sean eficaces contra todas las células cancerosas, que no se vean afectados por la heterogenicidad tumoral y la inestabilidad genética y que no inhiban el crecimiento de células normales (no cancerosas) o que puedan incluso promover el crecimiento de células normales no cancerosas.

40

El documento WO 03/081239 identifica productos génicos, llamados productos génicos normales críticos, que son necesarios para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Como los productos génicos normales críticos son necesarios para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas, deben estar presentes y funcionar en cada célula tumoral y por lo tanto proporcionan una diana constante para fármacos anticáncer que no estén afectados por la heterogenicidad tumoral y la inestabilidad genética. El documento WO 03/081239 muestra que los agentes que alteran los productos génicos normales críticos proporcionan agentes anticáncer eficaces. Aunque se describieron métodos genéricos para alterar los productos génicos normales críticos, el documento WO 03/081239 no describió ningún agente que pudiera tratar el cáncer de forma satisfactoria.

45

50

Los productos génicos normales críticos también deberían, por definición, no alterar la función de las células normales. Por tanto, la quimioterapia convencional en los centros de salud es no selectiva y por tanto daña consecuentemente las células normales no cancerosas y es solamente eficaz contra células cancerosas no resistentes.

55

Un agente anticáncer ideal inhibiría el crecimiento de la mayoría, sino todos, los tipos de crecimiento de células cancerosas pero no tendría efectos sobre, o incluso estimularía, el crecimiento de célula normales no cancerosas.

60

El documento WO 03/081239 identificó la proteína CDK4 como un producto génico normal crítico que está presente en la mayoría (sino todos) de los cánceres.

65

Se sabe que la proteína CDK4 regula la entrada en fase S del ciclo celular iniciando los acontecimientos necesarios para que la célula entre en fase S. Más particularmente, CDK4 activada fosforila pRb y las proteínas relacionadas p107 y p130. En su estado hipofosforilado estas proteínas se unen a factores de transcripción E2F. Sin embargo, después de la fosforilación, los factores de transcripción E2F se liberan en forma de heterodímeros con las proteínas

DP-1/DP-2. Los heterodímeros E2F/DP entonces se unen al ADN y activan los factores necesarios para la síntesis del ADN (una actividad que tiene lugar durante la fase S). Además, la proteína E2F libre regula positivamente los genes que controlan la división celular tales como ciclina E, ciclina A, CDK1 y los E2F, progresando de este modo el ciclo celular.

5 La proteína CDK4 se activa solamente cuando las condiciones para la entrada en fase S son adecuadas y se ha demostrado que las vías de transducción de señales positivas que dependen de señales provenientes de receptores de superficie celular tales como la vía Ras/Raf/Erk afectan a la activación de CDK4. La proteína CDK4 se activa por fosforilación de la treonina 164 pero se inhibe por la fosforilación de la tirosina 17.

10 Para posibilitar que realice su tarea, se sabe que la proteína CDK4 tiene muchas funciones incluyendo la unión a ciclina D1, la fosforilación de pRb, la unión a inhibidores de CDK tales como p21, p27, p16, la unión a la quinasa activadora de ciclina y la interacción con las enzimas responsables de la fosforilación y desfosforilación de la tirosina 17.

15 A causa de su papel en la promoción de la división celular, varios estudios han investigado el papel de la proteína CDK4 en el cáncer.

20 Ratones knockout que carecen de la proteína CDK4 no desarrollan cáncer después de inducción con un sistema clásico de iniciador (DMBA) seguido de promotor (TBA, es decir, éster de forbol) (Robles et al. (1998) Genes Dev. 12: 2469; Rodriguez-Puebla et al. (2002) Am. J. Path. 161: 405). Ningún otro knockout (incluyendo un knockout para ciclina D) tiene dicho marcado efecto sobre el desarrollo de cáncer.

25 Sin embargo, la proteína CDK4 típicamente se sobre-expresa en células cancerosas. Además, ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína CDK4 se inducen más fácilmente a desarrollar cáncer usando el sistema de inducción de carcinogénesis mencionado anteriormente (Robles et al. (1998) Genes Dev. 12: 2469; Rodriguez-Puebla et al. (2002) Am. J. Path. 161: 405).

30 Además, se ha demostrado que la transfección de CDK4 normal causa una prolongación de la vida útil proliferativa en fibroblastos humanos normales (Morris et al. (2002) Oncogene 21, 4277). En vista de la importancia aparente de la proteína CDK4 en el cáncer, se ha propuesto que sea una diana anticáncer. Sin embargo, los fármacos que inhiben la actividad quinasa de CDK4 (tal como flavopiridol) tienen muy poco efecto clínico en estudios en fase II.

35 El documento WO00/26228 describe la proteína BBC3 que comprende el motivo PRGPRP. La proteína es capaz de modular la apoptosis en células.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es:

- a) parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4; o
- b) homóloga a parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4;

45 siendo dicho péptido citotóxico para, y/o inhibidor del crecimiento de una célula cancerosa y/o estimulador del crecimiento de una célula no cancerosa; y donde el péptido es lineal o cíclico y consta de:

- n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY) V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son independientemente prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar presente o ausente y n es un número entero de 1-10;
- y m secuencias de aminoácidos adicionales, teniendo cada secuencia adicional independientemente z aminoácidos, donde m es 0, 1 ó 2 y z es un número entero de 1-20 y
- dicho péptido es para uso en el tratamiento del cáncer, y donde dicho péptido es más citotóxico para, o más inhibidor del crecimiento de una célula cancerosa que para una célula no cancerosa.

La presente invención proporciona péptidos y su uso médico como se expone en las reivindicaciones.

60 La presente invención mejora la técnica previa proporcionando agentes anticáncer eficaces que están dirigidos a la proteína CDK4.

65 La descripción se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína CDK4, o es homóloga a parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4, siendo dicho péptido citotóxico para, y/o inhibidor del crecimiento de, una célula cancerosa y/o estimulador del crecimiento de células no cancerosas. En una realización preferida de la presente invención, el péptido es no inhibidor del crecimiento de células no cancerosas. Preferiblemente, la proteína CDK4 es la proteína CDK4 humana.

El término péptido se bien conocido en la técnica y se refiere a una molécula que comprende una secuencia lineal de restos aminoacídicos. Las proteínas, tales como la proteína CDK4, también comprenden secuencias lineales de restos aminoacídicos. El péptido de la presente invención, por lo tanto, puede comprender una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4. Es decir, el péptido comprende un fragmento de la proteína CDK4.

5 En una realización, el péptido comprende secuencias lineales más cortas dentro de la región única parcialmente hidrófoba localizada externamente en la parte c-terminal de la molécula CDK4 (vide infra) y péptidos cíclicos derivados de estas mismas secuencias que inhiben el crecimiento de células cancerosas humanas. Preferiblemente, este péptido es no inhibidor del crecimiento de células no cancerosas. Opcionalmente, el péptido estimula el crecimiento de células no cancerosas.

En una realización preferida, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1. En una realización particularmente preferida, el péptido consta de los aminoácidos expuestos en la SEC ID N° 1.

15 Como alternativa, el péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es homóloga a una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4. En una realización preferida, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2. En una realización particularmente preferida, el péptido consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2.

20 En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula general YRGXRY, donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina. En una realización preferida X e Y son prolina. Se prefiere que el péptido comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada entre PRGPRP (SEC ID N° 5), PRGPR (SEC ID N° 6), RGPRP (SEC ID N° 7), TRGPRP (SEC ID N° 9), TRGTRP (SEC ID N° 10), PRGTRP (SEC ID N° 12), PRGPRT (SEC ID N° 13), PRGTRT (SEC ID N° 14), TPRGPRP (SEC ID N° 15) y PPRGPRP (SEC ID N° 16). El péptido también consta de estas secuencias de aminoácidos. Estos péptidos son particularmente preferidos porque son citotóxicos para las células cancerosas ensayadas y algunos también fueron citotóxicos para las células cancerosas y no inhibidores del crecimiento de las células no cancerosas ensayadas.

30 Estos péptidos que tienen una elevada densidad de prolina y arginina muestran potencia mejorada, posiblemente debido a una mejorada captación celular y una especificidad de diana más cercana.

En una realización, el péptido es lineal y consta de:

- 35 - n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY)V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar presente o ausente y n es un número entero seleccionado entre 2, 3, 4 ó 5;
- 40 - y m secuencias de aminoácidos adicionales, teniendo cada secuencia adicional independientemente z aminoácidos, donde m es un número entero de 0-10 y z es un número entero de 1-20.

En otra realización, el péptido es cíclico y consta de:

- 45 - n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY)V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar presente o ausente y n es un número entero de 1-10;
- y m secuencias de aminoácidos adicionales, teniendo cada secuencia adicional independientemente z aminoácidos, donde m es un número entero de 0-10 y z es un número entero de 1-20.

50 Cuando m es 1 o más, la secuencia o secuencias adicionales pueden estar dispuestas aleatoriamente con las n secuencias de aminoácidos que tiene la fórmula general [(YRGXRY)V]. Como alternativa, la secuencia o secuencias adicionales pueden estar dispuestas alternativamente con cada secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula general [(YRGXRY)V]. En otra alternativa, la secuencia o secuencias adicionales pueden estar dispuestas de tal modo que las n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY)V] estén directamente adyacentes en la secuencia entre sí y las m secuencias de aminoácidos adicionales de z aminoácidos estén directamente adyacentes en la secuencia entre sí.

En una realización preferida X e Y son prolina.

60 En la secuencia o secuencias de aminoácidos adicionales cada uno de los z aminoácidos en la secuencia puede ser cualquier aminoácido. Sin embargo, preferiblemente, los aminoácidos de esta secuencia o secuencias adicionales se seleccionan entre glicina, alanina, valina, fenilalanina, prolina y glutamina. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos adicionales comprenden aminoácidos hidrófobos.

65 En realizaciones preferidas, n es 1, 2, 3, 4 ó 5. En una realización más preferida n es 3.

ES 2 386 676 T3

También se prefiere que m sea 1, 2, 3, 4 ó 5. Más preferiblemente, m es 1 ó 2.

5 En realizaciones preferidas, z es de 2-14, más preferiblemente 2-11 y mucho más preferiblemente 2, 3, 4, 6 ó 12. La secuencia o secuencias adicionales particularmente preferidas incluyen GG, GGG, GGGG, GGGGG, GGGGGG, AA, AAA, AAAA, AAAAA, AAAAAA, W, VW, WW, VWW, WWW o combinaciones de éstas.

Se prefiere que el péptido sea cíclico.

10 En una realización preferida, cuando el péptido comprende n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY)V] y m secuencias de aminoácidos adicionales de z aminoácidos, el péptido consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes:

15 SEC ID N° 18 [GGGGPRGPRPGGGGAAA]
SEC ID N° 19 [GGGGPRGPRPGGGGPRGPRVPRGPRPV]
SEC ID N° 20 [FPPRGPRPVQFPPRGPRPVQFPPRGPRPVQ]
SEC ID N° 21 [AAAGGPRGPRPGGAAA]
SEC ID N° 22 [AAGGGPRGPRPGGGAA]
SEC ID N° 23 [AAAGGGPRGPRPGGGAAA]
SEC ID N° 24 [AVAGGGPRGPRPGGGAVA]
20 SEC ID N° 25 [GGGGGGPRGPRPGGGGGG]
SEC ID N° 26 [AAAAAAPRGPRPAAAAAA]
SEC ID N° 27 [AAAAPRGPRPAAAAVVVV]
SEC ID N° 28 [AAGPGGPRGPRPGPGAA]
SEC ID N° 29 [AAGGGPRGPRPGGGPGAA]
25 SEC ID N° 30 [AAVGGPRGPRPGGPGVAAV]
SEC ID N° 31 [GGPRGPRPGGPRGPRPGGPRGPRP]

30 Es particularmente preferido que las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 18-31 sean secuencias de aminoácidos cíclicas.

Estos péptidos son particularmente preferidos porque comprenden la secuencia PRGPRP, que ha demostrado ser citotóxica para las células cancerosas ensayadas y también selectivamente citotóxica para las células cancerosas y no inhibidora del crecimiento de las células no cancerosas ensayadas. Además, estos péptidos son particularmente preferidos porque están diseñados para penetrar en las células de forma más satisfactoria incluyendo grupos hidrófobos (-CH₃). Además, cuando estos péptidos son cíclicos, probablemente penetran en las células de forma más satisfactoria. Estos péptidos también proporcionan el equilibrio más eficaz entre flexibilidad y limitación conformacional de la secuencia PRGPRP.

40 Cuando m es 0 (es decir, no están presente una secuencia o secuencias de aminoácidos adicionales), se prefiere que el péptido comprenda la secuencia de aminoácidos PRGPRVPRGPRVPRGPRV (SEC ID N° 17). El péptido también puede constar de la secuencia de aminoácidos PRGPRVPRGPRVPRGPRV. En una realización más preferida, el péptido es un péptido cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos PRGPRVPRGPRVPRGPRV (SEC ID N° 17). El péptido cíclico también puede constar de la secuencia de aminoácidos PRGPRVPRGPRVPRGPRV.

45 El término "parte" indica que el péptido no contiene la secuencia de aminoácidos completa de CDK4. Típicamente, el péptido comprende al menos 5 aminoácidos que son idénticos u homólogos a una secuencia de aminoácidos presente en la proteína CDK4. Preferiblemente, el péptido comprende al menos 10 aminoácidos que son idénticos u homólogos a una secuencia de aminoácidos presente en la proteína CDK4.

50 El péptido de la presente invención es citotóxico para, o inhibidor del crecimiento de, una célula cancerosa y/o estimulador del crecimiento de una célula no cancerosa. En este contexto, una célula cancerosa es una célula tomada de un Timor primario, una metástasis u otro sitio sospechoso de cáncer en un sujeto, o una línea celular derivada de un cáncer. Se prefiere que el péptido sea más citotóxico para, o más inhibidor del crecimiento de una célula cancerosa que para una célula no cancerosa. En una realización preferida de la presente invención, el péptido es no inhibidor del crecimiento de células no cancerosas.

60 En el contexto de esta invención, las células no cancerosas son cualquier célula normal (sana), es decir, células no afectadas por cáncer y pueden ser células de cualquier tejido de un paciente. Típicamente, los fibroblastos o queratinocitos humanos en cultivo primario a corto plazo son células no cancerosas y se usan como células de control.

65 Las células cancerosas pueden identificarse midiendo los niveles de expresión de los productos génicos CDK1 y CDK4, como se describe en el documento WO99/42821. Una muestra celular es cancerosa si la proporción de los niveles de expresión de las proteínas CDK1 y CDK4 está en el intervalo de 0,6 a 1,6.

Opcionalmente, el péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que facilita la captación celular del péptido. Dichas secuencias de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. Éstas incluyen penetratin™ (RQIKIWFAQNRRMKWKK; Derossi et al. Trends Cell Biol. (1998) 8: 84-87). Se sabe que también ciertas variantes de la secuencia de aminoácidos penetratin™ son eficaces para facilitar la internalización celular como se describe en Christiaens et al. (European J. Biochemistry (2004) 271: 1187). Otras secuencias de aminoácidos de internalización celular incluyen KKWKMRRNQFWVKVQRG (Kanovsky et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA (2001) 98: 12438-43), poliarginina (11 restos; Wu et al. (2003) Neurosci. Res. 47: 131-135) y LTVSPWY (Shadidi M. y Sioud M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics in cancer cells FASEB J 17 (2003) 256-258).

En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan usos médicos de los péptidos. Por ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido como se ha descrito anteriormente y un vehículo, diluyente o excipiente conocido en la técnica. En una realización preferida, esta composición farmacéutica también comprende un inhibidor de p53.

En el contexto de esta invención, un inhibidor de p53 es un factor capaz de inhibir la producción de la proteína p53 o de inhibir la actividad de la proteína p53. Los inhibidores de p53 son bien conocidos en la técnica e incluyen la proteína MDM2, fragmentos de la proteína MDM2 y pifitrina- α .

También se proporciona un método para preparar una composición farmacéutica. El método comprende proporcionar un péptido y preparar una composición farmacéutica que comprenda este péptido. Cuando la composición farmacéutica contiene un inhibidor de p53, éste se incorpora en la composición farmacéutica durante su la preparación.

La descripción también proporciona un método para tratar a un paciente que tiene un cáncer, comprendiendo dicho método tratar al paciente con esta composición farmacéutica. Cuando el cáncer contiene células que expresan p53 de tipo silvestre, se prefiere que el paciente se trate con una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de p53.

La composición farmacéutica de la presente invención es eficaz para tratar cánceres de diversos orígenes, incluyendo cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer del endometrio, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar macrocítico, melanomas malignos, neuroblastomas, leucemias, linfomas, sarcomas y gliomas. Como se ha analizado anteriormente, las células cancerosas pueden identificarse por el método del documento WO 99/42821. Las células cancerosas son, por ejemplo, células en las que la proporción de los niveles de expresión de las proteínas CDK1 y CDK4 está en el intervalo de 0,6 a 1,6.

La presente invención también proporciona un péptido para su uso en medicina. Además, proporciona una preparación combinada que comprende el péptido o un péptido mimético y un inhibidor de p53 para su uso simultáneo, separado o secuencial en medicina.

La invención también proporciona el uso de un péptido en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres, y el uso de un péptido e inhibidor de p53 en la fabricación de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cánceres, incluyendo los mencionados anteriormente. De nuevo, si el cáncer contiene células que expresan p53 de tipo silvestre, se prefiere que éste se trate con una preparación combinada que comprende un inhibidor de p53.

Las células cancerosas que expresan p53 de tipo silvestre (es decir, p53 que no contiene mutaciones) pueden identificarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, p53 de tipo silvestre puede identificarse por secuenciación de ADN, o por inmunohistoquímica usando anticuerpos que distinguen específicamente entre la proteína p53 mutante y la proteína p53 de tipo silvestre.

En trastornos degenerativos, las células que comprenden las células del tejido particular experimentan muerte celular en un momento anterior que células similares en un individuo sano normal. Se sabe a partir de Morris et al. (Morris et al. (2002) Oncogene 21, 4277) que CDK4 normal puede ser capaz de prolongar la supervivencia de células no cancerosas. Los inventores de la presente invención han demostrado que los péptidos de la presente invención, particularmente los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 17, causan la proliferación de células normales no cancerosas. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención son de utilidad en el tratamiento de muchos trastornos degenerativos en los que células de tejidos particulares mueren antes de lo que deberían en el individuo afectado.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para tratar a un paciente que tiene un trastorno degenerativo, comprendiendo dicho método tratar al paciente con la composición farmacéutica de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención es eficaz en el tratamiento de trastornos degenerativos cuando la composición farmacéutica comprende el péptido o los péptidos miméticos de la presente invención que son capaces de estimular el crecimiento de células no cancerosas y/o de control. Esta composición farmacéutica es eficaz en el tratamiento de trastornos degenerativos incluyendo enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular, degeneración macular, diabetes de aparición temprana debido a la pérdida de células beta en el páncreas, daño traumático en la médula espinal, enfermedad de neuronas motoras y fibrosis quística.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la presente invención eficaz en el tratamiento de trastornos degenerativos comprende el péptido de la presente invención que comprende n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY)V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar ausente o presente y n es un número entero de 1-10, más preferiblemente el péptido es un péptido cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos PRGPRPVPRGPRPVPRGPRPV (SEC ID N° 17), aún más preferiblemente el péptido es un péptido cíclico que consta de la secuencia de aminoácidos PRGPRPVPRGPRPVPRGPRPV (SEC ID N° 17).

La presente invención proporciona una preparación combinada que comprende el péptido o péptido mimético de la presente invención que es capaz de estimular el crecimiento de células no cancerosas para su uso simultáneo, separado o secuencial en medicina.

La invención también proporciona el uso del péptido de la presente invención que es capaz de estimular el crecimiento de células no cancerosas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno degenerativo. La invención también proporciona el uso del péptido de la presente invención que es capaz de estimular el crecimiento de células no cancerosas en la fabricación de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un trastorno degenerativo.

Los especialistas en la técnica podrían determinar los regímenes adecuados de administración para el péptido de la presente invención. El régimen preciso de administración dependerá de las propiedades fisicoquímicas del péptido. Por ejemplo, se requiere una administración prolongada de péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2 ya que las evidencias experimentales indican que las células cancerosas pueden necesitar incubarse en presencia del péptido desde una semana hasta tres semanas para un efecto sobre la viabilidad a observar.

Los péptidos de la presente invención pueden identificarse mediante un método de selección que comprende proporcionar un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de aminoácidos de CDK4, u homóloga a parte de la secuencia de aminoácidos de CDK4, o un péptido mimético capaz de imitar funcionalmente dicho péptido, seguido de tratar una muestra de células cancerosas con el péptido y determinar el efecto citotóxico de, y/o el efecto inhibitor del crecimiento de este péptido o péptido mimético sobre esta muestra. El método también implica una etapa de identificar un péptido que sea eficaz en el tratamiento del cáncer como péptido que es citotóxico para, o inhibitor del crecimiento de, la muestra de células cancerosas. Opcionalmente, puede seguir una etapa de producir el péptido identificado.

En una realización preferida de la descripción, el método comprende adicionalmente tratar una muestra de células de control con el péptido y determinar el efecto citotóxico de, y/o el efecto inhibitor del crecimiento de este péptido sobre esta muestra. Un péptido que es eficaz en el tratamiento del cáncer es un péptido que es más citotóxico para, o más inhibitor del crecimiento de, una muestra de células cancerosas que de una muestra de células de control.

En una realización preferida, el método también implica una etapa de tratar una muestra de células de control con el péptido o péptido mimético y determinar si el péptido o péptido mimético identificado es no inhibitor del crecimiento de una muestra de células de control y opcionalmente determinar si el péptido o péptido mimético identificado es estimulador del crecimiento de una muestra de células de control. Un péptido o péptido mimético que es ventajoso en el tratamiento del cáncer es un péptido o péptido mimético que es no inhibitor del crecimiento de una muestra de células de control y también puede ser estimulador del crecimiento de una muestra de células de control. Un péptido o péptido mimético que es ventajoso en el tratamiento de trastornos degenerativos es un péptido o péptido mimético que es estimulador del crecimiento de una célula de control.

Las células cancerosas, las células de control y las células no cancerosas se han definido anteriormente. Las condiciones de cultivo apropiadas para dichas células son conocidas en la técnica. Típicamente entonces, la etapa de tratar una muestra de células cancerosas y una muestra de células de control con el péptido o péptido mimético y determinar el efecto citotóxico de, y/o el efecto inhibitor del crecimiento de éstas, simplemente comprende añadir el péptido de ensayo o el péptido mimético de ensayo al medio de cultivo. Preferiblemente se incluyen controles. Éstos pueden incluir no añadir péptido de ensayo a las muestras de células o añadir un péptido que no tenga efecto sobre la viabilidad.

Los métodos para determinar si un péptido o péptido mimético es citotóxico o inhibitor del crecimiento para una muestra celular, son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Éstos incluyen la inspección de muestras

celulares tratadas y no tratadas usando microscopía de contraste de fases, el ensayo de citotoxicidad con MTT (Roche Molecular Biochemicals, Indianopolis, IL, EEUU), el ensayo de tinción con yoduro de propidio (Do et al. Oncogene (2003) 22:1431-1444), ELISA de detección de muerte celular (Roche Molecular Biochemical, Indianopolis, IL, EEUU), el ensayo de actividad caspasa (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU) y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo con CytoTox96 (Promega, Madison, WI, EEUU).

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá adicionalmente a modo de ejemplo solamente con referencia a las siguientes figuras:

- 10 La Figura 1 muestra la correlación en los niveles de expresión de 17 proteínas cuya tarea normal es el control de la división celular, diferenciación, senescencia y muerte celular programada en queratinocitos humanos normales.
- 15 La Figura 2 muestra la correlación en los niveles de expresión de 17 proteínas cuya tarea normal es el control de la división celular, diferenciación, senescencia y muerte celular programada en 20 líneas de células cancerosas humanas.
- 20 La Figura 3 es una superposición de las Figuras 1 y 2, que muestra que el patrón de expresión génica en células cancerosas humanas difiere del patrón de expresión génica en queratinocitos humanos normales.
- 25 La Figura 4 muestra la correlación en los niveles de expresión de 17 proteínas cuya tarea normal es el control de la división celular, diferenciación, senescencia y muerte celular programada en 20 líneas de células cancerosas humanas que contienen la proteína p53 de tipo silvestre.
- 30 La Figura 5 muestra la correlación en los niveles de expresión de 17 proteínas cuya tarea normal es el control de la división celular, diferenciación, senescencia y muerte celular programada en 20 líneas de células cancerosas humanas que contienen proteína p53 mutante.
- 35 La Figura 6 es un diagrama esquemático que representa el patrón de expresión génica en células cancerosas humanas con p53 mutante.
- La Figura 7 es un diagrama esquemático que representa el patrón de expresión génica en células cancerosas humanas con p53 tipo silvestre.
- 40 La Figura 8 muestra un alineamiento global de múltiples secuencias de las secuencias de aminoácidos de CDK2, CDK4 y CDK6 humanas.
- La Figura 9 muestra un alineamiento global de múltiples secuencias de las secuencias de aminoácidos de proteínas CDK4 de diversas especies.
- 45 La Figura 10 muestra la traza C α (estructura) de CDK6 humana y CDK2 humana. También se muestra la traza C α modelada de CDK4 humana (modelo 1).
- 50 La Figura 11 muestra las representaciones del potencial electrostático de CDK4 humana (modelo 1), CDK6 humana y CDK2 humana. I muestra la vista de frente. El dominio I está a la derecha de las estructuras, el dominio II está a la izquierda. II muestra la vista desde detrás. El dominio I está a la izquierda de las estructuras, el dominio II está a la derecha. III muestra una vista mirando directamente el fragmento 12 unidades. La flecha negra ancha indica la posición del fragmento o el fragmento correspondientemente alineado en CDK6 y CDK2.
- 55 La Figura 12 muestra el efecto sobre la viabilidad de las cuatro líneas de células cancerosas humanas del tratamiento con péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 3 a concentraciones de 0,5 mM, 1,0 mM y 5,0 mM.
- 60 La Figura 13A muestra células RT112 que se han tratado con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1, y células RT112 que se han tratado con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 4. La Figura 13B muestra células HT29 que se han tratado con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1, y células HT29 que se han tratado con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 4.
- 65 La Figura 14 muestra fibroblastos humanos normales y células MGHU-1 después del tratamiento con péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 4.
- La Figura 15a muestra el efecto sobre la viabilidad de la línea celular MGHU-1 de cáncer de vejiga RT112 y fibroblastos no cancerosos normales por tratamiento con péptido A que tiene la secuencia de aminoácidos

expuesta en la SEC ID N° 5, péptido B que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 6, péptido C que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 7 y péptido D que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 8, donde los péptidos B a D tienen longitudes variables de cadena peptídica de la SEC ID N° 5.

5 Las Figuras 15b y 15c muestran el efecto sobre la viabilidad sobre la línea celular MGHU-1 de cáncer de vejiga RT112 y fibroblastos no cancerosos normales por tratamiento con péptido E que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 9, péptido F que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 10, péptido G que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 11, péptido H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 12, péptido I que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 13, péptido J que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 14, péptido K que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 15 y péptido L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 16, donde los péptidos E a L tienen sustituciones variables de prolina a treonina con respecto a la SEC ID N° 5.

15 La Figura 15d muestra el efecto sobre la viabilidad de la línea celular HT29 de cáncer de intestino (Cáncer de Intestino A), COLO 320 de cáncer de intestino (Cáncer de Intestino B) y fibroblastos no cancerosos normales por tratamiento con péptido A que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 5, péptido B que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 6, péptido C que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 7 y péptido D que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 8, donde los péptidos B a D tienen longitudes variables de cadena peptídica de la SEC ID N° 5.

20 Las Figuras 15e y f muestran el efecto sobre la viabilidad de la línea celular HT29 de cáncer de intestino (Cáncer de Intestino A), COLO 320 de cáncer de intestino (Cáncer de Intestino B) y fibroblastos no cancerosos normales por tratamiento con péptido E que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 9, péptido F que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 10, péptido G que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 11, péptido H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 12, péptido I que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 13, péptido J que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 14, péptido K que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 15 y péptido L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 16, donde los péptidos E a L tienen sustituciones variables de prolina a treonina con respecto a la ID N° 5.

25 La Figura 16 muestra el efecto sobre la fracción superviviente de células de cáncer de vejiga RT112 expuestas al hexámero PRGPRP (SEC ID N° 5) 1,0 a 5,0 mM valorado a los 15, 20 y 25 días después del tratamiento.

30 La Figura 17 muestra la estructura de un heptámero cíclico de la SEC ID N° 17.

35 La Figura 18 muestra células fibroblásticas que se han tratado con un control (sin péptido) después de 10 días de exposición y células fibroblásticas que se han tratado con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 17 después de 10 días de exposición.

40 La Figura 19 muestra células fibroblásticas que se han tratado con un control (sin péptido) después de 20 días de exposición y células fibroblásticas que se han tratado con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 17 después de 20 días de exposición.

Descripción detallada de la invención

45 Los péptidos pueden sintetizarse de acuerdo con métodos convencionales. Como alternativa, pueden producirse por tecnología de ADN recombinante y tecnología de expresión génica.

50 Cuando el péptido comprende la secuencia penetratin™, el péptido puede producirse por clonación del ADN que codifica el péptido en un vector Transvector™ (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, EEUU), transformación de una cepa de *E. coli* que tiene el gen de la polimerasa T7 con el vector y expresión del péptido por inducción con IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IL, USA). Pueden usarse vectores Transvector™ para producir proteínas de fusión que comprenden la secuencia penetratin™.

55 Las observaciones y la teoría que condujeron al inventor a llegar a la presente invención se explicarán ahora brevemente. No se pretende que la teoría sea limitante.

60 Cada tipo celular normal (no canceroso) tiene un patrón complejo de expresión génica interactiva que permite la apropiada supervivencia y proliferación celular. Las células cancerosas tienen un patrón diferente de expresión génica respecto a las células normales (no cancerosas). El inventor cree que cada célula cancerosa comprende un sistema emergente único derivado del daño al sistema interactivo complejo de las células normales (no cancerosas). Los sistemas emergentes de células cancerosas son inherentemente inestables. Por tanto, para sobrevivir, las

células cancerosas requieren del reajuste de los productos génicos normales críticos para mantener la estabilidad. Esta estabilización se llama neostasis. Esto puede observarse a partir de las Figuras 1 y 2. La Figura 1 muestra la correlación en los niveles de expresión de 17 proteínas cuya tarea normal es el control de la división celular, diferenciación, senescencia y muerte celular programada en queratinocitos humanos normales. Esos pares de proteínas cuyos niveles de expresión tienen un coeficiente de correlación de más de 0,5 están resaltados. La Figura 2 muestra la correlación de los niveles de expresión de las mismas proteínas en 20 líneas de células cancerosas humanas. De nuevo, esos pares de proteínas cuyos niveles de expresión tienen un coeficiente de correlación de más de 0,5 están resaltados. La Figura 3 es una superposición de las Figuras 1 y 2. Muestra que los niveles de expresión de diferentes pares de proteínas se correlacionan en queratinocitos humanos normales y células cancerosas humanas, confirmando que los queratinocitos humanos normales tienen un patrón diferente de expresión génica respecto a células cancerosas humanas.

La Figura 4 muestra la correlación de los niveles de expresión de las mismas proteínas en 20 líneas de células cancerosas humanas que contienen proteína p53 de tipo silvestre, y la Figura 5 muestra la correlación de los niveles de expresión de estas proteínas en 20 líneas de células cancerosas humanas que contienen la proteína p53 mutante. De nuevo, por comparación de esos pares de proteínas cuyos niveles se correlacionan en cánceres de p53 mutante y de tipo silvestre, puede observarse que los patrones de expresión génica son diferentes. Por tanto, los patrones de expresión génica son diferentes dependiendo de si las células son normales, células cancerosas con p53 de tipo silvestre, o células cancerosas con p53 mutante.

Las correlaciones observadas entre los niveles de proteínas en las células pueden representarse gráficamente. La Figura 6 representa el patrón de expresión génica en células cancerosas con p53 mutante. Muestra que el nivel de la proteína CDK4 se correlaciona con el nivel de las proteínas CDK1, p27, Bcl2, CDK2 y ciclina D.

La Figura 7 muestra el patrón de expresión génica en células cancerosas con p53 de tipo silvestre. Éste muestra que el nivel de la proteína CDK4 se correlaciona con el nivel de la proteína CDK1. Además, el nivel de la proteína p27 se correlaciona con los niveles de las proteínas Ras, p21 y Bcl2.

Como se ha analizado anteriormente, diferentes cánceres muestran diferentes patrones de expresión génica. El inventor cree que cada cáncer tiene un patrón único de expresión génica que permite la supervivencia y proliferación celular.

El inventor también considera que la proteína CDK4 desempeña una tarea central en las células cancerosas, manteniendo un patrón de expresión génica que permite la supervivencia y proliferación celular. Por consiguiente, sin limitarse por la teoría, el inventor cree que los péptidos y péptido miméticos de CDK4 de la presente invención interfieren con este proceso, conduciendo a un patrón de expresión génica que no permite la supervivencia y proliferación celular, y conduciendo finalmente a la muerte de la célula cancerosa.

El experimento 1 identifica una región en la proteína CDK4 humana que está ausente en CDK2, CDK1 y CDK6. La región es distinta de la región quinasa y los sitios de unión a Rb y p16 en los dos tercios N-terminales de CDK4. También es parcialmente hidrófoba a pesar de estar en el exterior de CDK4. Estas propiedades sugieren que puede formar un sitio de unión a proteína. La unión de una proteína en esta región puede ser directa o indirectamente responsable de regular los niveles de otros productos génicos. Por consiguiente, se cree que los péptidos y péptido miméticos de la invención actúan uniéndose a este factor. Esto puede conducir a que el factor se active o inactivo, provocando una regulación inapropiada de los otros productos génicos. Como alternativa, esto puede evitar que el factor se una a CDK4, conduciendo de nuevo a una regulación inapropiada de los otros productos génicos. En cualquier caso, el patrón de expresión génica se altera, provocando la muerte de la célula cancerosa.

La región de la proteína CDK4 identificada en el experimento 1 también tiene homología con una región de la proteína p27. Los péptidos de la presente invención, por lo tanto, pueden actuar sobre la proteína p27. La Figura 7 muestra que éste es una proteína importante en células cancerosas humanas con p53 de tipo silvestre. Esto puede ayudar a alterar el patrón de expresión génica en células cancerosas humanas con p53 de tipo silvestre.

Las Figuras 4 y 5 muestran que la correlación entre los niveles de CDK1 y CDK4 es más fuerte en células con p53 mutante. Esto sugiere que el papel de CDK4 en la regulación de otros productos génicos puede ser más importante en células con p53 mutante. Por consiguiente, en células cancerosas con p53 mutante, los péptidos de la presente invención se administran ventajosamente junto con un inhibidor de p53 tal como pifitrina- α .

Los experimentos que condujeron al inventor a identificar la actividad anticáncer de los péptidos y péptido miméticos de la presente invención se describen a continuación. No se pretende que los detalles de los protocolos experimentales usados sean limitantes.

Experimento 1

Se sabe que la proteína CDK4 desempeña una tarea importante en el cáncer. Sin embargo, los fármacos que inhiben la actividad quinasa de CDK4 humana son ineficaces en el tratamiento del cáncer. El inventor hipotetiza que

es porque la proteína CDK4 desempeña una tarea en células cancerosas que es independiente de su actividad quinasa. Para verificar esta hipótesis, el inventor intentó identificar la región de la proteína CDK4 que media la tarea en las células cancerosas buscando diferencias entre la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4, y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CDK6 y CDK2, que son altamente homólogas a la proteína CDK4 pero que no median una tarea importante en células cancerosas.

Las secuencias de CDK4, CDK6 y CDK2 humanas se obtuvieron de las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL, mantenidas por el servidor de biología molecular Expasy (<http://ca.expasy.org/>). Estas secuencias se alinearon usando el algoritmo ClustalX 1.83 usando la matriz PAM 250, una penalización por apertura de hueco de 10, y una penalización por extensión de hueco de 0,2. La Figura 8 muestra los resultados de la alineación. La mitad N-terminal de la secuencia de CDK4 humana muestra una homología considerable con las secuencias de CDK6 y CDK2 humanas. A causa de esto, se consideró improbable que esta región mediara la función de la proteína CDK4 humana en células cancerosas.

Los dos tercios C-terminales de la proteína CDK4 no son homólogos a las proteínas CDK2 y CDK6 humanas. Esta región podría, por lo tanto, mediar potencialmente la tarea en células cancerosas. Para identificar si los elementos de esta región son importantes, el inventor buscó secuencias en los dos tercios C-terminales de la proteína CDK4 que estén conservados entre especies.

Las secuencias de aminoácidos de proteínas CDK4 de diversas especies se obtuvieron de las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL, mantenidas por el servidor de biología molecular Expasy (<http://ca.expasy.org/>). Éstas se enumeran en la tabla 1. La tabla 1 también proporciona el número de acceso a la base de datos de cada secuencia, y el porcentaje de homología de cada secuencia con la secuencia de aminoácidos de CDK4 humana.

Tabla 1. Lista de secuencias de CDK4. La identidad y similitud de secuencia se miden respecto a la secuencia de *Homo sapiens*.

Identificador Swiss-Prot/Trembl	Organismo	% de identidad de secuencia	% de similitud de secuencia
P11802	Homo Sapiens	100	100
P79432	Sus Scrofa (Cerdo)	98	98
P35426	Rattus norvegicus (Rata)	95	97
P30285	Mus musculus (Ratón)	94	97
Q9CYR7	Mus musculus (Ratón)	90	93
Q91727	Xenopus laevis (Rana de uñas africana)	77	85
Q8WQU5	Lytechinus variegatus (Erizo verdiblanco)	59	74
Q8WQU6	Strongylocentrotus purpuratus (Erizo púrpura)	59	74
Q94877	Drosophila melanogaster (Mosca de la fruta)	47	66

Se realizó un alineamiento global de múltiples secuencias, usando el programa ClustalX (Jeanmougin et al. (1998) Trends Biochem. Sci. 23: 403-5). Éste se muestra en la Figura 9. Éste muestra que la región N-terminal de la proteína está altamente conservada. Además, la región C-terminal de las secuencias de CDK4 de mamífero también está conservada. Por ejemplo, FPPRGPRPVQ (SEC ID N° 1), presente en CDK4 humana está altamente conservada en otras proteínas CDK4 de mamífero.

Se preparó un modelo tridimensional de CDK4 humana para determinar la localización de la SEC ID N° 1.

Se obtuvieron moldes potenciales para el modelo de CDK4 realizando una búsqueda con Blast con parámetros por defecto sobre la base de datos de proteínas (PDB) para estructuras con secuencias similares a CDK4 humana. La búsqueda recuperó varias estructuras para CDK6 humana y CDK2 humana, teniendo dichas proteínas un 71% y un 45% de identidad de secuencia con la proteína CDK4 humana, respectivamente. Aunque CDK2 tienen una inferior identidad de secuencia con CDK4, la similitud de secuencia entre CDK2 y CDK4 es del 64%, lo que indica que la estructura de CDK2 puede ser un buen modelo para la estructura de CDK4 humana. Las estructuras recuperadas, junto con su identificador PDB y la resolución cristalográfica, se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2. Lista de estructuras molde elegidas. CDK6 tiene un 71% de id. de sec. y un 81% de sim. de sec., CDK2 tiene un 45% de id. de sec. y un 64% de sim. de sec. La rmsd se mide a partir de Ca

Identificador PDB	Resolución (en Å)	Moléculas adicionales/comentarios	sd. a partir de 1BLX A)
<u>Estructuras CDK6</u>			
1BLX	1,9	P19-INK4d	
1G3N	2,9	P18-INK4c, K-Ciclina	
1BI8	2,8	P19-INK4d	
1BI7	3,4	P16-INK4a	
1JOW	3,1	V-Ciclina	
<u>Estructuras CDK2</u>			
1HCL	1,8	-	

Identificador PDB	Resolución (en Å)	Moléculas adicionales/comentarios	sd. a partir de 1BLX Å)
1GII	2,0	Región de unión a ATP mutada a la de CDK4; inhibidor de moléculas pequeña unido	

Las estructuras se comprobaron para errores y problemas que pudieran afectar al proceso de construcción de la estructura. Las estructuras se procesaron todas por el programa WHAT-CHECK (Hooft et al. (1996) Nature 381: 272). La calidad global se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Evaluación de la estereoquímica, distribución de aminoácidos, y empaquetado en las estructuras molde usando WHAT-CHECK. Los valores de calidad de la modelización indican cómo de fiable es la estructura para propósitos de modelado. Los valores de calidad de la cristalografía indican cómo se compara la estructura con otras estructuras de una resolución similar. Valores Z de la estructura por debajo de -2,0 son pobres, y por debajo de -4,0 son malos.

MODELO	1BLX	1G3N	1BI8	1BI7
Resolución	1,9	2,9	2,8	3,4
CALIDAD DE LA MODELIZACIÓN				
<i>Valores Z de la estructura, positivo es mejor que promedio</i>				
Calidad empaquetado 2ª generación ^a	-0,704	-0,108	-0,216	0,044
Aspecto diagrama Ramachandran	-5,658 (malo)	-4,729 (malo)	-1,589	-3,195 (pobre)
Calidad rotámero χ_1/χ_2	-4,32 (malo)	-3,896 (pobre)	-1,489	-2,09
Conformación estructura	-7,733 (malo)	-5,705	-4,496 (malo)	-4,093 (malo)
<i>Valores Z de RMS, deben ser cerca de 1</i>				
Longitudes enlace	0,559 (estricto)	0,717	0,829	0,553 (estricto)
Ángulos enlace	0,909	0,984	1,627 (relajado)	0,845
Limitaciones ángulo omega	0,266 (estricto)	0,316 (estricto)	1,251	0,281 (estricto)
Planicidad cadena lateral	0,559 (estricto)	0,607 (estricto)	1,003	0,423 (estricto)
Distribución dihédrica incorrecta	0,884	1,011	1,524 (relajado)	0,505
Distribución interior/exterior	1,027	1,021	1,054	1,039
CALIDAD DE LA CRISTALOGRAFÍA				
<i>Valores Z de la estructura, positivo es mejor que promedio</i>				
Calidad empaquetado 2ª generación ^a	1,2	1,5	-0,4	1,5
Aspecto diagrama Ramachandran	-2,5	-2,2	-1,4	-0,8
Calidad rotámero χ_1/χ_2	-1,8	-1,6	-0,8	-0,2
Conformación estructura	-5,8 (malo)	-5,4 (malo)	-5,3 (malo)	-3,0 (pobre)
<i>Valores Z de RMS, deben ser cerca de 1</i>				
Longitudes enlace	0,559 (estricto)	0,717	0,829	0,553
Ángulos enlace	0,909	0,984	1,627	0,845
Limitaciones ángulo omega	0,266 (estricto)	0,316 (estricto)	1,251	0,281 (estricto)
Planicidad cadena lateral	0,559 (estricto)	0,607 (estricto)	1,003	0,423 (estricto)
Distribución dihédrica incorrecta	0,884	1,011	1,524 (relajado)	0,505
Distribución interior/exterior	1,027	1,021	1,054	1,039

^aEl valor de empaquetado de 2ª generación indica cómo de cómoda está la secuencia en la estructura. Un valor positivo es bueno. Una valor por debajo de -2,0 es pobre, que indica un problema en la estructura, y valores por debajo de -4,0 son malos, que indican errores graves en la estructura.

Tabla 3. Continuación

MODELO	1JOW	1HCL	1GII
Resolución	3,1	1,8	2,0
CALIDAD DE LA MODELIZACIÓN			
<i>Valores Z de la estructura, positivo es mejor que promedio</i>			
Calidad empaquetado 2ª generación ^a	-2,046	-1,170	-1,363
Aspecto diagrama Ramachandran	-5,911 (malo)	-0,681	-0,816
Calidad rotámero χ_1/χ_2	-3,372 (pobre)	-2,019	-1,935
Conformación estructura	-6,752 (malo)	-2,630	-4,937 (malo)
<i>Valores Z de RMS, deben ser cerca de 1</i>			
Longitudes enlace	0,396 (estricto)	0,511 (estricto)	0,680
Ángulos enlace	0,68	0,778	0,901
Limitaciones ángulo omega	0,217 (estricto)	0,301 (estricto)	0,386 (estricto)
Planicidad cadena lateral	0,228 (estricto)	0,588 (estricto)	0,940
Distribución dihédrica incorrecta	0,429	0,753	1,105
Distribución interior/exterior	1,055	1,007	1,010

MODELO	1JOW	1HCL	1GII
CALIDAD DE LA CRISTALOGRAFÍA			
<i>Valores Z de la estructura, positivo es mejor que promedio</i>			
Calidad empaquetado 2ª generación ^a	0	-1,1	-0,9
Aspecto diagrama Ramachandran	-3,1	-0,6	-0,2
Calidad rotámero χ_1/χ_2	-1,0	-1,6	-1,0
Conformación estructura	-4,8 (malo)	-3,0	-5,0 (malo)
<i>Valores Z de RMS, deben ser cerca de 1</i>			
Longitudes enlace	0,396	0,511 (estricto)	0,680
Ángulos enlace	0,68	0,778	0,901
Limitaciones ángulo omega	0,217 (estricto)	0,301 (estricto)	0,386 (estricto)
Planicidad cadena lateral	0,228 (estricto)	0,588 (estricto)	0,940
Distribución dihédrica incorrecta	0,429	0,753	1,105
Distribución interior/exterior	1,055	1,007	1,010

^aEl valor de empaquetado de 2ª generación indica cómo de cómoda está la secuencia en la estructura. Un valor positivo es bueno. Una valor por debajo de -2,0 es pobre, que indica un problema en la estructura, y valores por debajo de -4,0 son malos, que indican errores graves en la estructura.

Loa valores de calidad de las estructuras iniciales son pobres. Esto probablemente refleja el hecho de que la mayoría de las estructuras se dedujeron en presencia de proteínas unidas que dan lugar a una distorsión de la estructura. En vista de estos valores de calidad y la baja resolución de las estructuras iniciales, puede esperarse que moldeos basados en estas estructuras proporcionen información fiable solamente sobre la estructura terciaria, la posición de los restos aminoacídicos dentro de la estructura, y si esos restos están ocultos o son accesibles al disolvente. Información más detallada, tal como la dirección de los enlaces de hidrógeno internos, las interacciones de cadenas laterales, o la medición de la accesibilidad del disolvente de los restos puede no ser, sin embargo, precisa.

Se construyeron cinco modelos de la estructura de CDK4 humana usando el programa JACKAL 1.5 (Xiang, J.Z. University of Columbia (2002), descrito en Xiang et al. (2001) J. Mol. Biol. 311: 421-430 y Xiang et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:7432-7437). Las estructuras conocidas usadas como punto de partida para estos modelos se dan en la tabla 4.

Tabla 4. Moldes usados en la construcción de cada modelo.

Modelo N°	Moldes
1	1BLX (CDK6)
2	1G3N (CDK6)
3	Molde base = 1BLX, regiones variables que difieren en más de 2,0 Å de rmsd modeladas a partir de 1G3N, 1BI8, 1BI7 y 1JOW (todo CDK6)
4	Molde base = 1BLX, regiones variables que difieren en más de 2,0 Å de rmsd modeladas a partir de 1HCL (CDK2)
5	Molde base = 1BLX, regiones variables que difieren en más de 2,0 Å de rmsd modeladas a partir de 1GII (CDK2)

El proceso de modelado se resume a continuación:

1. Se remplazaron los restos que no estaban conservados entre la estructura inicial y CDK4 humana en el modelo con el resto correspondiente presente en CDK4 humana. Esta etapa se realizó usando Profix, un programa de utilidad distribuido con JACKAL.

Esencialmente, Profix cambia aquellos restos en la estructura de partida que difieren de aquellos presentes en CDK4 humana, reteniendo al mismo tiempo la conformación de la estructura original. La estructura después se sometió a minimización de energía para eliminar las colisiones de átomos. Esto se realiza usando la función minimizadora del ángulo de torsión rápido de JACKAL. Esta función emplea el campo de fuerza atómica total CHARMM22 (MacKerell et al. (1998) J. Phys. Chem. B. 102:3586-3616). Después se hicieron las inserciones y deleciones para completar el cambio en la secuencia de partida a la de CDK4 humana. Después se estrecharon los enlaces usando un método de ajuste aleatorio y después la estructura se sometió de nuevo a minimización de energía para eliminar las colisiones de átomos, como se ha descrito anteriormente.

2. La estructura secundaria se asignó usando una rutina tipo DSSP como se describe en Kabsch y Sander (Biopolymers 22: 2577-2637 (1983)).

3. Después se predijeron las regiones de bucle del siguiente modo. El segmento de estructura original se delecionó y remplazó por un nuevo segmento creado por generación de una gran cantidad de confirmaciones estructurales aleatorias, que después se estrecharon usando un método de ajuste aleatorio. Las nuevas estructuras después se sometieron a minimización de energía para eliminar las colisiones de átomos como se

ha descrito anteriormente. Las cadenas laterales se modelaron usando una gran biblioteca de rotámeros de 3222 rotámeros en ubicaciones de 10° de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y la estructura se sometió de nuevo a minimización de energía. La estructura que tiene la menor energía se retiene y se realiza una ronda adicional de muestreo conformacional usando la nueva conformación. La estructura resultante se somete una vez más a minimización de energía.

4. Se refinaron los elementos de estructura secundaria de nuevo por muestreo a través de una biblioteca de rotámeros estructurales, pero con el rotámero original retenido en el muestreo. Para retener la red de enlaces de hidrógeno de la estructura secundaria existente, se incurre en una gran penalización de energía en cualquier conformación que rompa un enlace de hidrógeno existente. Se retiene la conformación de energía más baja. Después se construyen las cadenas laterales de un modo similar.

5. La estructura final después se somete a minimización de energía usando el minimizador de ángulo de torsión.

6. Después de la construcción del modelo, el modelo se somete a 500 etapas de minimización de energía completa con el descenso de mayor aumento usando AMBER, con el campo de fuerza parm96 (Case et al. (1995) J. Am. Chem. Soc. 117: 5179-5197). Los hidrógenos polar se añadieron por WHATIF después de la optimización de la red de enlaces de hidrógeno (Vriend (1990) J. Mol. Graph. 8: 52-56; Hooft et al. (1996) Proteins 26: 363-376).

7. Se repitieron las etapas 1-6 hasta que no se obtuvo mejora adicional en el modelo.

En algunos puntos también fue necesario ajusta manualmente las estructuras. Esto se realizó a través del visor Swiss-PDB.

La calidad de los modelos producidos se evaluó por el programa WHAT-CHECK. Además, el valor de giro y la energía de mecánica molecular se calcularon por el visor Swiss PDB para evaluar como de bien se adapta la secuencia a la estructura. La energía de giro se basa en el potencial de fuerza media desarrollado por Sippl et al. (J. Mol. Biol. (1990) 213: 859-883) y la energía de mecánica molecular se calcula usando el campo de fuerza GROMOS96 (van Gunsteren et al. (1996) The GROMOS96 manual and user guide, Vdf Hochschulverlag ETHZ). Los resultados se muestran en la tabla 5. Ésta muestra que el más fiable es el modelo 1, aunque la mejor conformación estructural se da en el modelo 2.

Tabla 5. Valores de calidad y precisión para los modelos construidos. Un elevado valor de giro indica un mejor ajuste de la secuencia en la estructura. Una baja energía de mecánica molecular indica una estructura más relajada. Valores Z estructurales menores de -2,0 indican problemas en el modelo, valores menores de -4,0 indican errores graves. Los valores Z de RMS deben estar cercanos a 1,0, $\pm 0,5$ indicando cada extremo distribuciones amplias o estrictas respectivamente.

MODELO	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
Valor de giro	165,6	158,2	151,0	128,8	99,7
Energía de mecánica molecular (kJ mol ⁻¹)	-12203,3	-12526,1	-12182,5	-11900,3	-11795,5
Desviación RMS a partir de 1BLX (en Å)	0,48	0,88	0,62	0,67	0,65
<i>Valores Z de la estructura, positivo es mejor que promedio</i>					
Calidad empaquetado 2ª generación	-1,093	-0,868	-0,964	-1,090	-1,228
Aspecto diagrama Ramachandran	-2,573	-3,374	-2,837	-2,965	-3,104
Calidad rotámero χ -1/ χ -2	-1,148	-1,470	-1,340	-0,955	-0,968
Conformación estructura	-6,485	-5,201	-5,637	-7,016	-7,564
<i>Valores Z de RMS, deben ser cerca de 1</i>					
Longitudes enlace	0,655	0,645	0,652	0,657	0,668
Ángulos enlace	1,187	1,176	1,183	1,168	1,181
Limitaciones ángulo omega	1,354	1,159	1,413	1,478	1,396
Planicidad cadena lateral	1,608	1,667	1,494	1,277	1,292
Distribución dihédrica incorrecta	0,883	0,882	0,907	0,879	0,865
Distribución interior/exterior	1,019	1,038	1,025	1,043	1,051

La Figura 10 muestra las trazas Ca para el modelo 1, CDK6 y CDK2. Esto muestra que la estructura del modelo 1 se parece mucho a la estructura de CDK6, aunque CDK6 tiene extremos C y N más largos.

La Figura 10 también muestra que la estructura de CDK4 humana está dividida en dos dominios. El primer dominio (dominio 1) contiene una mezcla de elementos estructura de hélice α y cadena β . Por analogía con CDK6 y CDK2, este dominio media la actividad quinasa. El segundo dominio (dominio 2) es de naturaleza principalmente α -helicoides.

La Figura 11 muestra representaciones del potencial electrostático del modelo 1, CDK6 y CDK2. Esto muestra que el dominio 1 del modelo 1 está menos cargado que CDK6 o CDK2. Además, el dominio 2 del modelo 1 contiene una secuencia accesible al disolvente de 248-259 que no está presente en CDK6 o CDK2. Éste contiene la SEC ID N° 1, la secuencia identificada en la alineación como conservada en proteínas CDK4 de mamífero. Éste tiene un componente hidrófobo sustancial y también tiene una preponderancia de pequeños restos que dan como resultado una superficie más plana.

Una superficie más plana provoca un mejor contacto para un compañero proteico. En vista de estas características, el inventor hipotetiza que esta secuencia puede formar un sitio de unión a proteína.

Una búsqueda de la base de datos ProDom mostró que esta secuencia no correspondía a ningún dominio reconocido. Sin embargo, una herramienta Toffee de alineamiento múltiple reveló que esta secuencia es homóloga a una región de la proteína p27 (FYRPPRPPKGA).

Experimento 2

Como se ha analizado en el experimento 1, el inventor hipotetizó que la una región de la proteína CDK4 que no media la actividad quinasa de CDK4 podría ser responsable de mantener la neostasis en células cancerosas. El modelo de CDK4 humana producido en el experimento 1 revela que la secuencia de aminoácidos 248-259 puede formar un sitio de unión para una proteína desconocida. Para determinar si este sitio de unión es necesario para el mantenimiento de la supervivencia y proliferación de célula cancerosas, se realizaron experimentos para determinar el efecto de interferir con la unión de proteínas a este sitio.

Se sintetizó un péptido que codificaba los aminoácidos 249-258 (en forma de una sal cloruro) por métodos convencionales. La secuencia de este péptido se da a continuación como SEC ID N° 1.

SEC ID N° 1: FPPRGPRPVQ

También se sintetizó un péptido que tenía un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N° 1 en forma de una sal cloruro. La secuencia de este péptido se da a continuación como SEC ID N° 2.

SEC ID N° 2: FTPRGTRPVQ

Estos péptidos imitan el sitio de unión putativo en la proteína CDK4 humana y podían inhibir la unión de CDK4 humana a su compañero proteico. Si el sitio de unión en la proteína CDK4 humana está implicado en el mantenimiento de un patrón de expresión génica que permite la supervivencia y proliferación celular, se esperaba que estos péptidos impidieran este proceso, conduciendo posiblemente a la muerte de la célula cancerosa.

Se sintetizaron dos péptidos de control en forma de sales cloruro. Las secuencias de estos péptidos se dan a continuación como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4. La SEC ID N° 3 tiene un 30% de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEC ID N° 1. La SEC ID N° 4 contiene los mismos aminoácidos que la SEC ID N° 1. Sin embargo, la secuencia de estos aminoácidos difiere y la secuencia peptídica tiene un 0% de homología con la secuencia de la SEC ID N° 1. Los péptidos de control no se parecen al sitio de unión putativo.

SEC ID N° 3: ATTEGTETVQ

SEC ID N° 4: PGPFRVPQPR

En un primer experimento, se sembraron células MGHU-1 (una línea celular de cáncer de vejiga humano), en placas de cultivo tisular de 48 pocillos en 0,2 ml de medio de cultivo tisular Hams F12 completo suplementado con suero de ternera fetal al 10%. Se sembraron células SKMEL-2 (una línea celular de melanoma maligno humano), células HX34 (una línea celular de melanoma maligno humano) y células H441 (una línea celular de cáncer pulmonar humano) en condiciones idénticas. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Después de 24 h, se retiró entonces el medio de cultivo de cada pocillo y se reemplazó por medio de cultivo tisular completo Hams F12 (sin suero de ternera fetal). El medio de cultivo añadido a cada pocillo se suplementó con un péptido que tiene la secuencia expuesta en la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3 a una concentración de 0,5, 1,0 o 5,0 mM de tal modo que cada línea celular se expuso a cada péptido a cada concentración.

Las células después se cultivaron durante dos días. Después se añadió suero de ternera fetal a una concentración final del 10%, y las células se dejaron durante 5 días adicionales. El % de viabilidad de las células en cada pocillo se calculó por observación visual en microscopía de contraste de fases.

El efecto de los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 3 sobre la viabilidad de las líneas celulares SKMEL-2, MGHU-1, HX34 y H441 se muestra en la Figura 12. La Figura 12 muestra que cada línea celular cultivada en presencia de SEC ID N° 1 5,0 mM se eliminaba completamente en el día

7 del experimento. Cuando la concentración de la SEC ID N° 1 era 1,0 mM, se eliminaba el 100% de las células MGHU-1. No se vio afectada la viabilidad de las otras líneas celulares. A una concentración de 0,5 mM de la SEC ID N° 1, ninguna de las líneas celulares parecía verse afectada. En contraste, el tratamiento de las líneas celulares con la SEC ID N° 3 a cualquier concentración no afectó a la viabilidad de ninguna línea celular.

5 Experimentos posteriores que ensayan líneas celulares cancerosas y no cancerosas (fibroblastos) han demostrado que con el decapeptido de la SEC ID N° 1 hay una eliminación no específica entre líneas de células cancerosas y no cancerosas en los primeros siete días del experimento. Tanto las líneas de células cancerosas como las líneas de células no cancerosas (fibroblastos) después se recuperaron y finalmente se observó la eliminación específica de células cancerosas y no de fibroblastos no cancerosos entre los días 20 y 25.

15 El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2 también fue citotóxico para las líneas de células cancerosas. Sin embargo, fue menos citotóxico que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1, como se evidencia por observación visual de la densidad y viabilidad celular en microscopía de contraste de fases. Esta observación, acoplada con una comparación de las secuencias de la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2, sugiere que las prolínas en las posiciones 3 y 8 de la SEC ID N° 1 que no se sustituyeron por treoninas en la SEC ID N° 2 contribuyen a la citotoxicidad. La citotoxicidad también puede ser dependiente de la relación de las prolínas en las posiciones 3 y 8 a arginina.

20 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
F-P-P-R-G-P-R-P-V-Q

25 En un experimento adicional, usando un lote diferente de péptido sintetizado, se sembraron células RT112 (una línea celular de cáncer de vejiga humano), células HT29 (una línea celular de cáncer de colon humano) y células MGHU (una línea celular de cáncer de vejiga humano) como se ha descrito anteriormente. En paralelo, se sembró un cultivo primario a corto plazo de fibroblastos humanos en placas de 48 pocillos. Después de 24 h, el medio de cultivo tisular se retiró de cada pocillo y se reemplazó con medio de cultivo tisular completo Hams F12 (sin suero de ternera fetal) suplementado con SEC ID N° 1 2,5 mM ó SEC ID N° 4 2,5 mM. Después de cultivar durante 2 días, se añadió suero de ternera fetal a una concentración del 10%. Las células después se cultivaron durante 7 días adicionales y se vieron en microscopía de contraste de fases.

30 La Figura 13 muestra células RT112 y HT29 después de tratamiento con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1. Se muestran las células de cada línea celular que se han expuesto al péptido de la SEC ID N° 4 para comparación. En ambos casos, las diferencias entre las células de control y tratadas son drásticas. Las células de control son de aspecto normal, mientras que las células tratadas están arrugadas y parecen senescentes. Esto demuestra que las células tratadas con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N° 1 están muertas, como se muestra en la Figura 13a.

40 La Figura 14 muestra células MGHU-1 tratadas con péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N° 1 y 4. Las células tratadas con la SEC ID N° 4 parecen estar sanas, mientras que todas las células tratadas con la SEC ID N° 1 parecen estar muertas. La Figura 14 también muestra cultivos primarios a corto plazo de de fibroblastos humanos tratados con péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N° 1 y 4. Las células tratadas con ambos péptidos parecen estar sanas. Estos experimentos demuestran que péptidos que tienen la secuencia expuesta en la SEC ID N° 1 ó 2 son citotóxicos para células cancerosas humanas cultivadas. Estos péptidos no son citotóxicos para cultivos primarios cultivados de células humanas normales.

Experimento 3: ENSAYO DE ANÁLOGOS ADICIONALES DE LA SEC ID N° 1.

50 Se expusieron fibroblastos no cancerosos humanos y células cancerosas al hexámero lineal PRGPRP SEC ID N° 5 en microplacas de 96 pocillos usando el mismo protocolo que para la SEC ID N° 1 como se ha descrito previamente. El porcentaje de viabilidad de las células en cada pocillo se calculó por observación visual en microscopía de contraste de fases como se ha descrito previamente. En el caso del hexámero, a los 7 días pareció haber estimulación del crecimiento de los fibroblastos. No se observaron cambios en las células tumorales hasta los 21 días y después de entonces hubo muerte casi total de las células en los pocillos tratados con hexámero mientras que los fibroblastos no cancerosos normales permanecieron sanos.

Experimento 4

60 Para definir las relaciones estructura/función, se construyeron diferentes péptidos de las SEC ID N° 5-16. Se expusieron fibroblastos no cancerosos normales y células cancerosas a 5 mM de estos péptidos en placas de 96 pocillos como se ha descrito previamente. La secuencia de estos péptidos se enumera a continuación. Los resultados se valoraron a los 21 días.

65 SEC ID N° 5: PRGPRP (Péptido A)
SEC ID N° 6: PRGPR (Péptido B)
SEC ID N° 7: RGPRP (Péptido C)

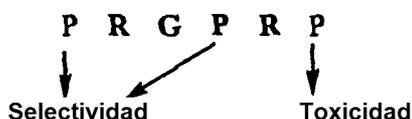
SEC ID N° 8: RGPR (Péptido D)

También se ensayaron sustituciones de prolina a treonina en estos péptidos más cortos, véase:

- 5 SEC ID N° 9: TRGPRP (Péptido E)
 SEC ID N° 10: TRGTRP (Péptido F)
 SEC ID N° 11: TRGTRT (Péptido G)
 SEC ID N° 12: PRGTRP (Péptido H)
 SEC ID N° 13: PRGPRT (Péptido I)
 10 SEC ID N° 14: PRGTRT (Péptido J)
 SEC ID N° 15: TPPRGPRP (Péptido K)
 SEC ID N° 16: PPRGPRP (Péptido L)

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 15.

- 15 Las Figuras 15a, b, c, d, e y f muestran el efecto selectivo sobre fibroblastos no cancerosos normales y células cancerosas de secuencias peptídicas más cortas que incluyen secuencias más cortas en que las treoninas se han sustituido por prolinas. Estas Figuras muestran relaciones claras entre la secuencia del péptido análogo de la nueva región parcialmente hidrófoba C'-terminal de CDK4 y el efecto sobre las líneas celulares ensayadas.



- 20 Sin limitarse por la teoría, se cree que la presencia de prolina en las posiciones de los aminoácidos 1 y/o 4 (PRGPRP) provocó una selectividad mejorada del péptido por las líneas de células cancerosas y una mayor viabilidad de los fibroblastos normal. La presencia de prolina en la posición del aminoácido 6 (PRGPRP) provocó una toxicidad mejorada del péptido sobre las líneas de células cancerosas. Está claro que el hexámero lineal PRGPRP (SEC ID N° 5) muestra la mayor selectividad entre la eliminación de células cancerosas y la evitación de células normales a los 21 días después de la exposición a 5,0 mM. Además, los fibroblastos no cancerosos normales expuestos a PRGPRP crecieron mejor que los fibroblastos de control que no se expusieron a ningún péptido.

30 Experimento 5

- 35 Ensayo clonogénico para obtener datos cuantitativos sobre la eliminación de células cancerosas mediante el hexámero lineal PRGPRP de la SEC ID N° 5. Ya se ha informado del ensayo clonogénico de supervivencia celular (Warenius HM, Jones M, Gorman T, McLeish R, Seabra L, Barraclough R y Rudland P. Br J Cancer (2000) 83(8), 1084-1095). Se sembró una suspensión celular individual de 100 células de células de cáncer de vejiga RT112 en 2 ml de medio Hams F12 suplementado con suero de ternera fetal al 10%. El medio Hams F12 no contenía péptido (control) o contenía hexámero lineal PRGPRP de la SEC ID N° 5 a una concentración de 1,0 mM a 5,0 mM. Es convencional examinar ensayos clonogénicos a los 10 a 14 días, tiempo durante el cual las células han progresado a través de un mínimo de 5-7 duplicaciones produciendo una colonia en el sitio donde cada célula individual se ha adherido a la placa de cultivo tisular. Como la muerte de las células cancerosas en los experimentos de microplacas de 96 pocillos con este péptido no fue evidente hasta los 21 días, las placas se incubaron durante 15, 20 y 25 días. Al final del periodo de incubación, se retiró el medio, se fijaron las colonias en etanol al 70% y se tiñeron con giemsa. Las colonias de más de 100 células se valoraron como positivas. Los resultados mostrados en la Figura 16 indican que no hay muerte obvia de células cancerosas a los 15 días pero que llega a ser más obvia entre 20 y 25 días. Además la curva de respuesta a dosis es muy abrupta, lo que muestra un efecto umbral que también se observó en placas de 96 pocillos.

- 45 La Figura 16 muestra ensayos clonogénicos para células de cáncer de vejiga RT112 expuestas a 1,0 a 5,0 mM del hexámero PRGPRP (SEC ID N° 5). Los ensayos clonogénicos se valoraron a los 15, 20 y 25 días después del tratamiento. Se muestra que con tratamiento con el hexámero PRGPRP (SEC ID N° 5) no había eliminación temprana de las células cancerosas, solamente eliminación específica de las células cancerosas entre los días 20 y 25. Se muestra en la Figura 16 que la exposición temprana de las células de cáncer de vejiga RT112 durante 15 días no tuvo casi efecto sobre la eliminación de las células cancerosas. La observación visual durante estos 15 días mostró que los fibroblastos no cancerosos crecían bien y posiblemente incluso mejor que los controles que no recibieron PRGPRP (SEC ID N° 5).

60 Experimento 6

- Se sembraron por separado células cancerosas y fibroblastos no cancerosos a 10^2 a 10^4 células en 200 μ l de medio de cultivo tisular Hams F12 más suero de ternera fetal al 10% en placas de 96 pocillos y se expusieron a

concentraciones variables de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 17, que varían de 5,0 μM a 100 μM . Se estudió el crecimiento celular por microscopía de contraste de fases diariamente durante 25 días.

- 5 Se observó una estimulación marcada de fibroblastos no cancerosos normales entre los 5 y 10 días después de la exposición a la SEC ID N° 17 (véase la Figura 18, fotografiada después de 10 días de exposición a la SEC ID N° 17 a una concentración de 10 μM).

- 10 Esto demuestra que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 17 estimula el crecimiento de fibroblastos no cancerosos normales. Aunque no muestra un desprendimiento completo de las células muertas de la superficie de plástico del recipiente de cultivo tisular, causa la pérdida de la clara morfología celular que indica que las células cancerosas ya no son capaces de dividirse como células cancerosas.

- 15 Tomado junto con la observación de Morris et al (2002 Oncogene 21: 4277) de que CDK4 normal ha demostrado prolongar la vida útil proliferativa de fibroblastos humanos no cancerosos normales mediante un mecanismo que no implicaba la actividad quinasa normal conocida de CDK4, sin limitarse por la teoría se cree que los análogos peptídicos de la nueva región de CDK4 de la presente invención pueden estimular el crecimiento de células normales y, por lo tanto, tener una tarea en la promoción del crecimiento de células normales tal como en la curación de heridas o en el uso de células madre para repoblar células patológicamente dañadas en trastornos degenerativos humanos. Dichos compuestos también pueden directamente prolongar la vida útil proliferativa de células enfermas en trastornos degenerativos humanos, aliviando de este modo los síntomas y prolongando la vida.
- 20

La Figura 17 muestra la estructura de un heptámero cíclico

- 25 SEC ID N° 17: ciclo-[PRGPRPVPRGPRPVPRGPRPV]

La Figura 18 muestra que después de 10 días de exposición a la SEC ID N° 17 a una concentración de 10 μM hubo una marcada estimulación de fibroblastos no cancerosos.

- 30 La Figura 19 muestra, después de 20 días de exposición de células de cáncer de vejiga MGHU-1 a la SEC ID N° 17, una pérdida marcada de la morfología celular normal con bordes celulares muy indeterminados y sin núcleos obvios. Estos cambios pueden reflejar senescencia. A partir de la Figura 19 puede observarse que las células de cáncer de vejiga MGHU-1 de control tienen una superficie celular clara y membranas nucleares mientras que las células de cáncer de vejiga MGHU-1 tratadas tienen el aspecto de células 'fantasma' sin demarcación nuclear clara y límites celulares muy indeterminados.
- 35

- Los experimentos realizados sobre células cultivadas reflejan la situación *in vivo*. Esto es porque en la mayoría de los cánceres humanos, las células están privadas de nutrientes y son carentes de división/quiescentes. Los experimentos descritos anteriormente reflejan la situación, ya que las células en estos experimentos *in vitro* son confluente y la mayoría de las células son carentes de división debido al agotamiento de nutrientes que sucede durante el largo tiempo de exposición de las células a los péptidos durante el experimento. Además, los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos que producen cultivos constantes sobre-poblados que tienen lugar durante los 25 días de observación. Dichas condiciones experimentales son de ayuda porque reflejan la situación de cáncer humano *in vivo*.
- 40

45

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es:

- 5 a) parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4; o
b) homóloga parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDK4;

siendo dicho péptido citotóxico para, y/o inhibidor del crecimiento de una célula cancerosa y/o estimulante del crecimiento de una célula no cancerosa; y

10 en el que el péptido, es lineal o cíclico y consta de:

- 15 - n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY) V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son independientemente prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar presente o ausente y n es un número entero de 1-10;
- y m secuencias de aminoácidos adicionales, teniendo cada secuencia adicional independientemente z aminoácidos, donde m es 0,1 ó 2 y z es un número entero de 1-20

y

20 siendo dicho péptido para su uso en el tratamiento del cáncer, y en el que dicho péptido es más citotóxico para, o más inhibidor del crecimiento de una célula cancerosa que para una célula no cancerosa.

2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que n es un número entero seleccionado entre 2, 3, 4 ó 5.

25

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 3.

4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso de acuerdo con que comprende la secuencia de aminoácidos PRGPRPVPRGPRPVPRGPRPV.

30

5. Un péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido es cíclico.

6. Un péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1, o la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2.

35

7. Un péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1 o la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2.

40

8. Un péptido que es lineal y consta de:

- 45 - n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY) V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son independientemente prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar presente o ausente y n es un número entero seleccionado entre 2, 3, 4 ó 5;
- y m secuencias de aminoácidos adicionales, teniendo cada secuencia adicional independientemente z aminoácidos, donde m es un número entero de 0-10 y z es un número entero de 1-20.

50

9. Un péptido que es cíclico y consta de:

- 55 - n secuencias de aminoácidos que tienen la fórmula general [(YRGXRY) V], donde R es arginina, G es glicina, Y puede estar presente o ausente y al menos una Y está presente, X e Y son independientemente prolina o treonina y al menos uno de X y/o Y es prolina, V es valina y puede estar presente o ausente y n es un número entero de 1-10;
- y m secuencias de aminoácidos adicionales, teniendo cada secuencia adicional independientemente z aminoácidos, donde m es un número entero de 0-10 y z es un número entero de 1-20.

60 10. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 8 o reivindicación 9 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 2, 9, 10, 12 ó 13 ó 18 y 21 a 27.

11. Un péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula general PRGXPRP, donde P es prolina, R es arginina y X es cualquier aminoácido.

65

12. Una composición farmacéutica que comprende el péptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a

11, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico, siendo dicha composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, y en la que dicho péptido es más citotóxico para, o más inhibidor del crecimiento de una célula cancerosa que para una célula no cancerosa.

5 13. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para su uso en medicina.

14. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 15. Un péptido o composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 14 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer del endometrio, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar macrocítico, melanoma maligno, neuroblastoma, leucemia, linfoma, sarcoma o glioma.

Figura 3

	Ciclina B	Ciclina D1	CDK1	CDK4	CDK2	C-mi-1	C-myc-1	pan ras	pan p53	Topo IIa	Actina	Bcl2	Mos	GSH	Bax	P27Kip1	p21
Ciclina B																	
Ciclina D1																	
CDK1																	
CDK4																	
CDK2																	
C-mi-1																	
C-myc-1																	
pan ras																	
pan p53																	
Topo IIa																	
Actina																	
Bcl2																	
Mos																	
GSH																	
Bax																	
P27Kip1																	
p21																	

Figura 5

	Ciclina B	Ciclina D1	CDK1	CDK4	CDK3	C-mif-1	C-myc-1	pan ras	pan p53	Topo IIa	Actina	Bcl2	Mos	GSH	Bax	p27Nip1	p21
Ciclina B	r = 0.438 p = 0.481	r = 0.414 p = 0.489	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.421 p = 0.480	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.463 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
Ciclina D1	r = 0.438 p = 0.481	r = 0.414 p = 0.489	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.421 p = 0.480	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.463 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
CDK1	r = 0.414 p = 0.489	r = 0.414 p = 0.489	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.421 p = 0.480	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.463 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
CDK4	r = 0.421 p = 0.489	r = 0.414 p = 0.489	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.421 p = 0.480	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.463 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
CDK3	r = 0.490 p = 0.377	r = 0.489 p = 0.377	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.421 p = 0.480	r = 0.567 p = 0.433	r = 0.463 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
C-mif-1	r = 0.483 p = 0.416	r = 0.087 p = 0.870	r = 0.220 p = 0.675	r = 0.187 p = 0.540	r = 0.480 p = 0.540	r = 0.460 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
C-myc-1	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.087 p = 0.870	r = 0.220 p = 0.675	r = 0.187 p = 0.540	r = 0.480 p = 0.540	r = 0.460 p = 0.656	r = 0.035 p = 0.956	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.431 p = 0.469	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.422 p = 0.479	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.468 p = 0.303	
pan ras	r = 0.330 p = 0.566	r = 0.156 p = 0.800	r = 0.237 p = 0.702	r = 0.287 p = 0.627	r = 0.119 p = 0.890	r = 0.232 p = 0.708	r = 0.114 p = 0.855	r = 0.148 p = 0.812									
pan p53	r = 0.431 p = 0.488	r = 0.084 p = 0.850	r = 0.225 p = 0.672	r = 0.102 p = 0.895	r = 0.423 p = 0.478												
Topo IIa	r = 0.776 p = 0.123	r = 0.569 p = 0.298	r = 0.652 p = 0.234	r = 0.714 p = 0.175	r = 0.102 p = 0.895	r = 0.225 p = 0.672	r = 0.276 p = 0.653	r = 0.184 p = 0.782									
Actina	r = 0.546 p = 0.341	r = 0.684 p = 0.203	r = 0.329 p = 0.614	r = 0.288 p = 0.626	r = 0.390 p = 0.610	r = 0.385 p = 0.622	r = 0.321 p = 0.596	r = 0.727 p = 0.184	r = 0.200 p = 0.747								
Bcl2	r = 0.422 p = 0.478	r = 0.624 p = 0.203	r = 0.622 p = 0.203	r = 0.661 p = 0.199	r = 0.757 p = 0.180	r = 0.082 p = 0.808	r = 0.738 p = 0.155	r = 0.360 p = 0.552	r = 0.256 p = 0.678								
Mos	r = 0.815 p = 0.270	r = 0.611 p = 0.296	r = 0.582 p = 0.304	r = 0.522 p = 0.387	r = 0.619 p = 0.287	r = 0.054 p = 0.831	r = 0.680 p = 0.155	r = 0.651 p = 0.224	r = 0.222 p = 0.720								
GSH	r = 0.128 p = 0.839	r = 0.396 p = 0.545	r = 0.781 p = 0.181	r = 0.730 p = 0.181	r = 0.473 p = 0.527	r = 0.256 p = 0.678	r = 0.614 p = 0.171	r = 0.844 p = 0.074	r = 0.074 p = 0.805								
Bax	r = 0.508 p = 0.305	r = 0.445 p = 0.377	r = 0.370 p = 0.470	r = 0.395 p = 0.438	r = 0.387 p = 0.113	r = 0.617 p = 0.138	r = 0.760 p = 0.158	r = 0.421 p = 0.480									
p27Nip1	r = 0.468 p = 0.383	r = 0.724 p = 0.197	r = 0.650 p = 0.204	r = 0.704 p = 0.181	r = 0.704 p = 0.181	r = 0.483 p = 0.179	r = 0.770 p = 0.123	r = 0.386 p = 0.508	r = 0.012 p = 0.985								
p21																	

Figura 6

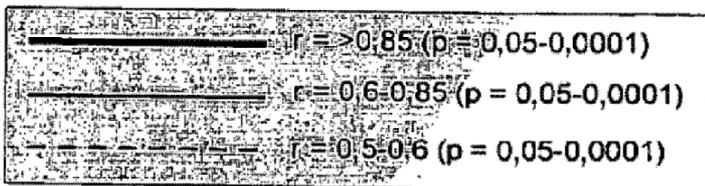
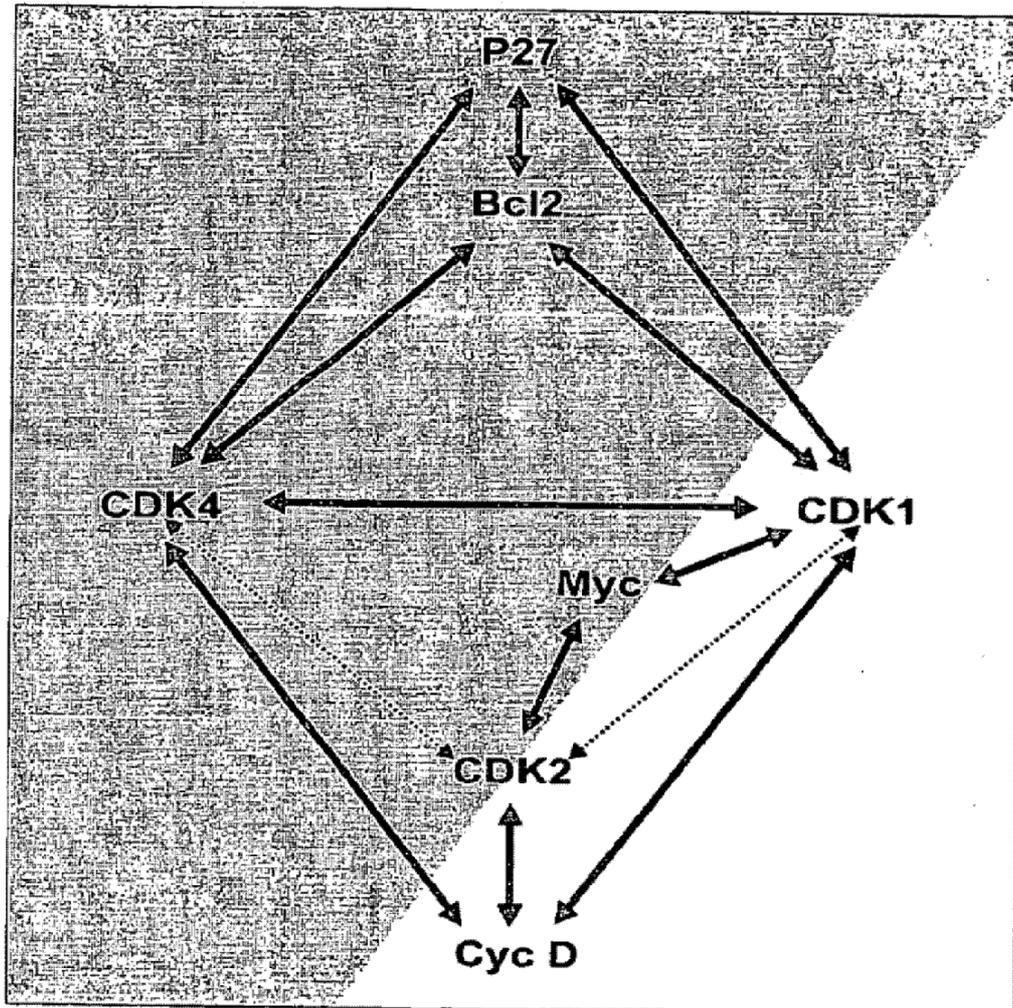


Figura 7

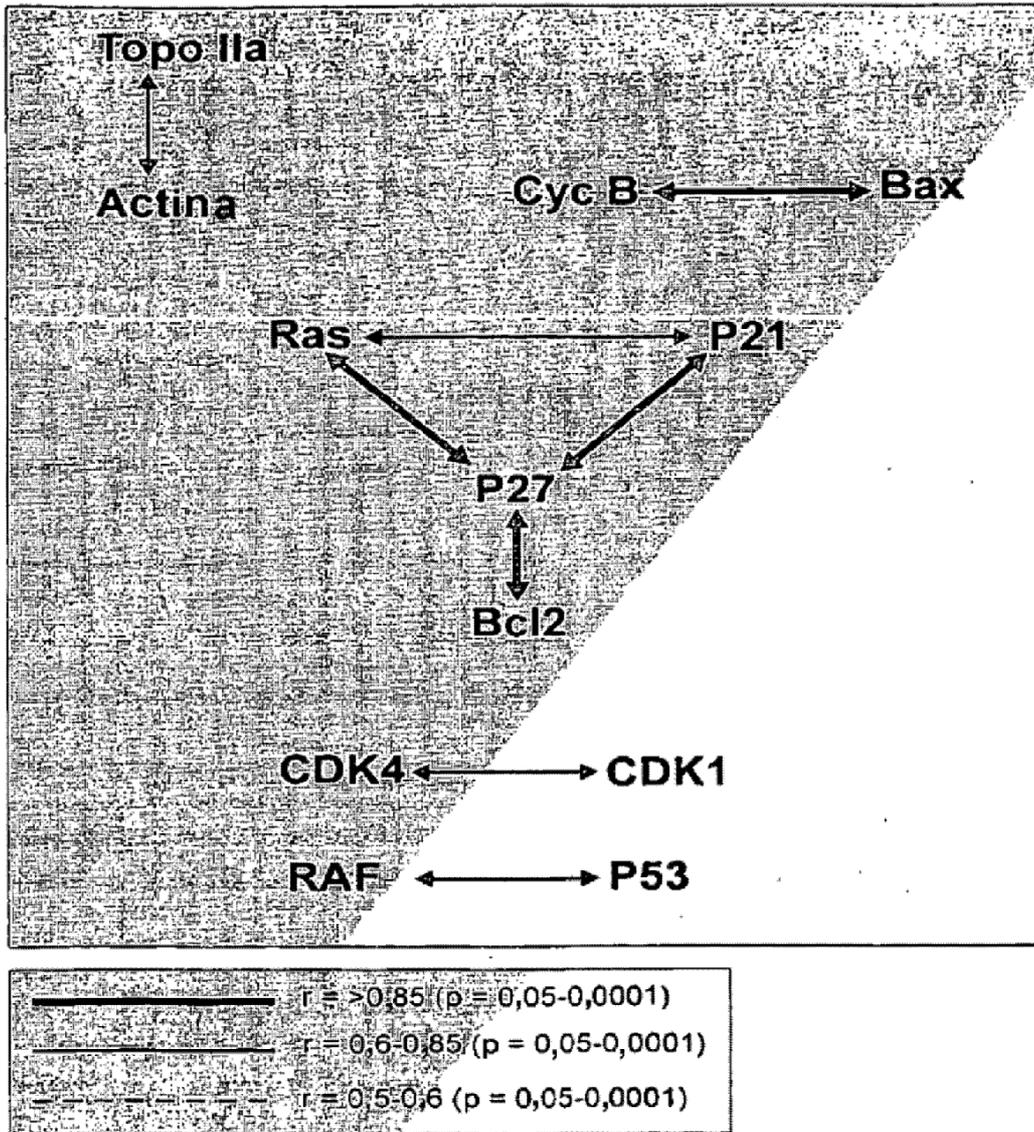


Figura 8

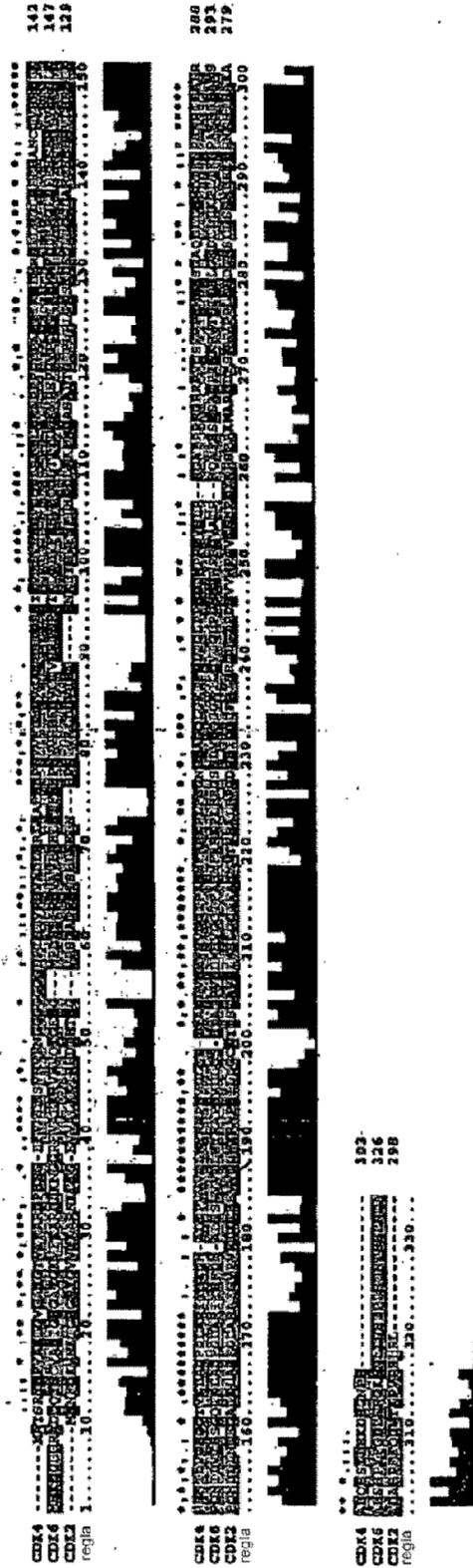


Figura 9

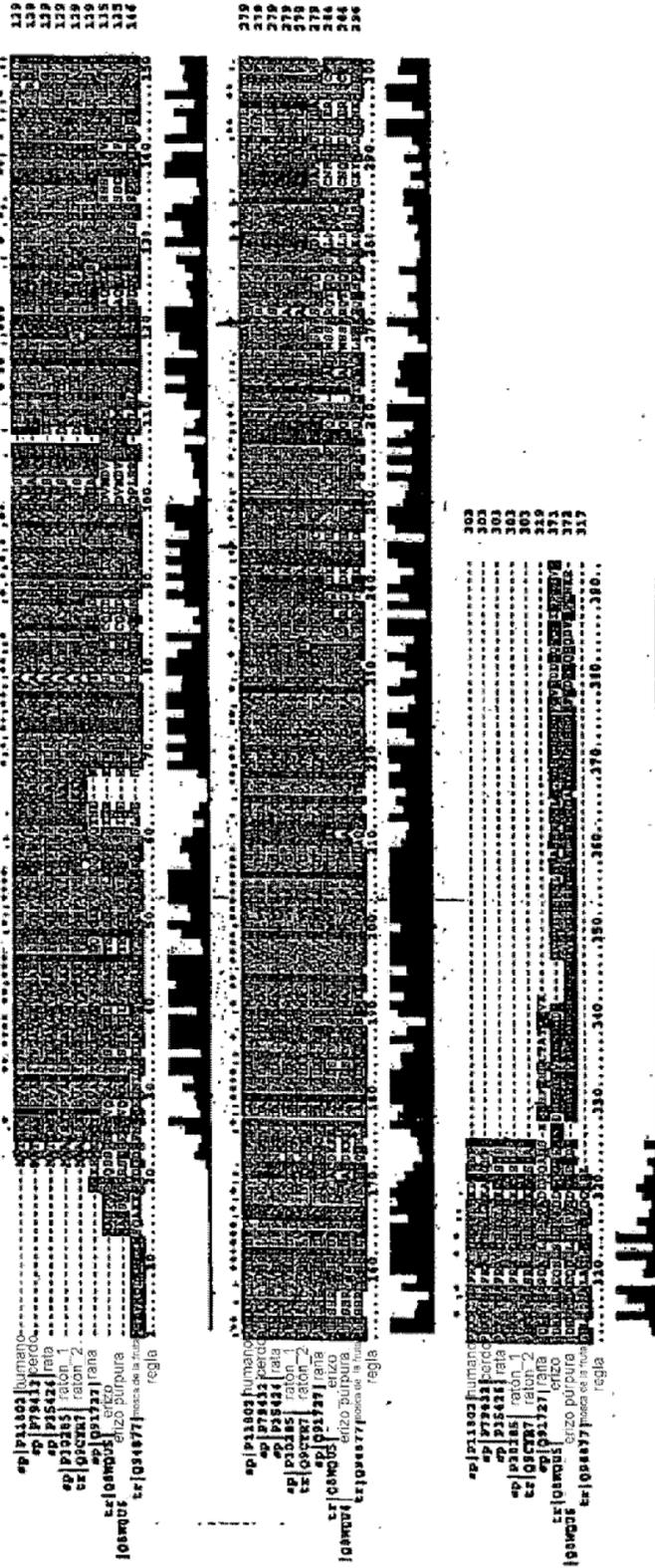


Figura 10

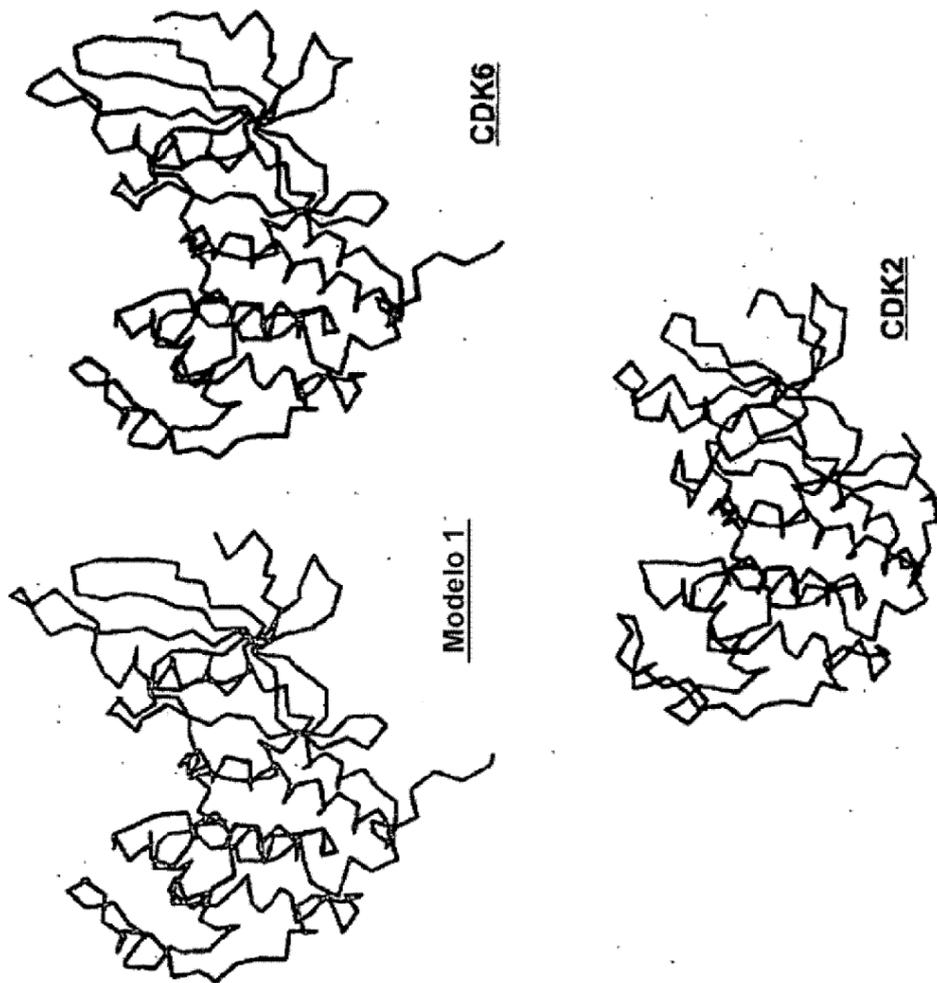


Figura 11

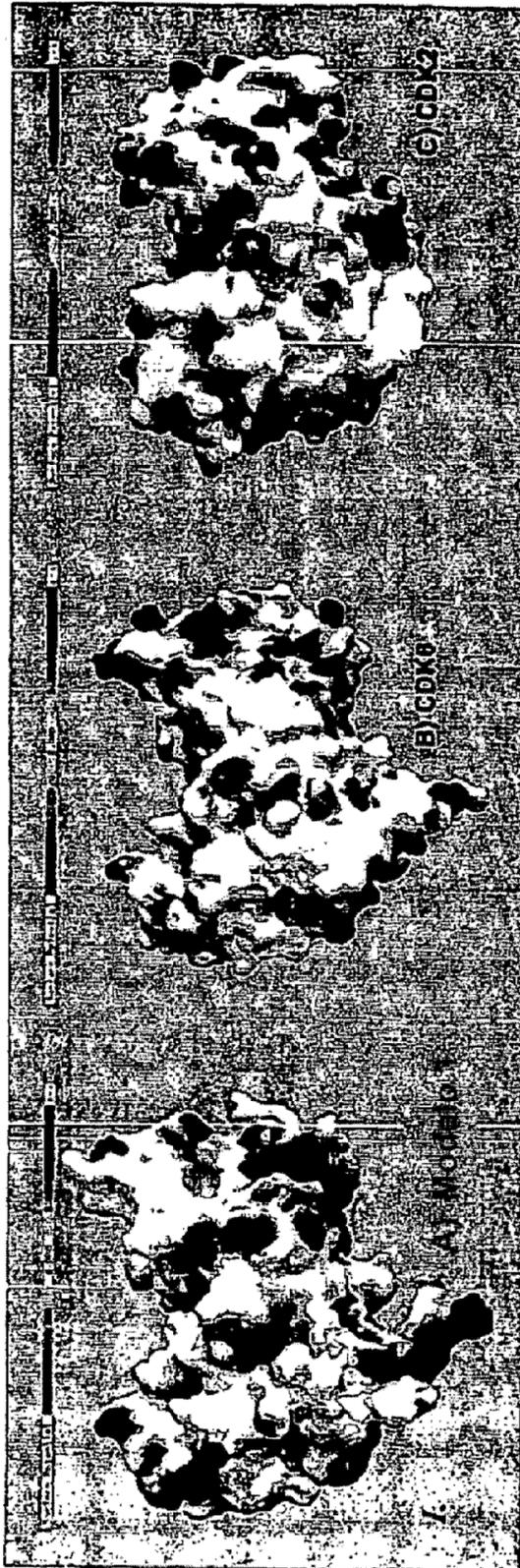


Figura 11

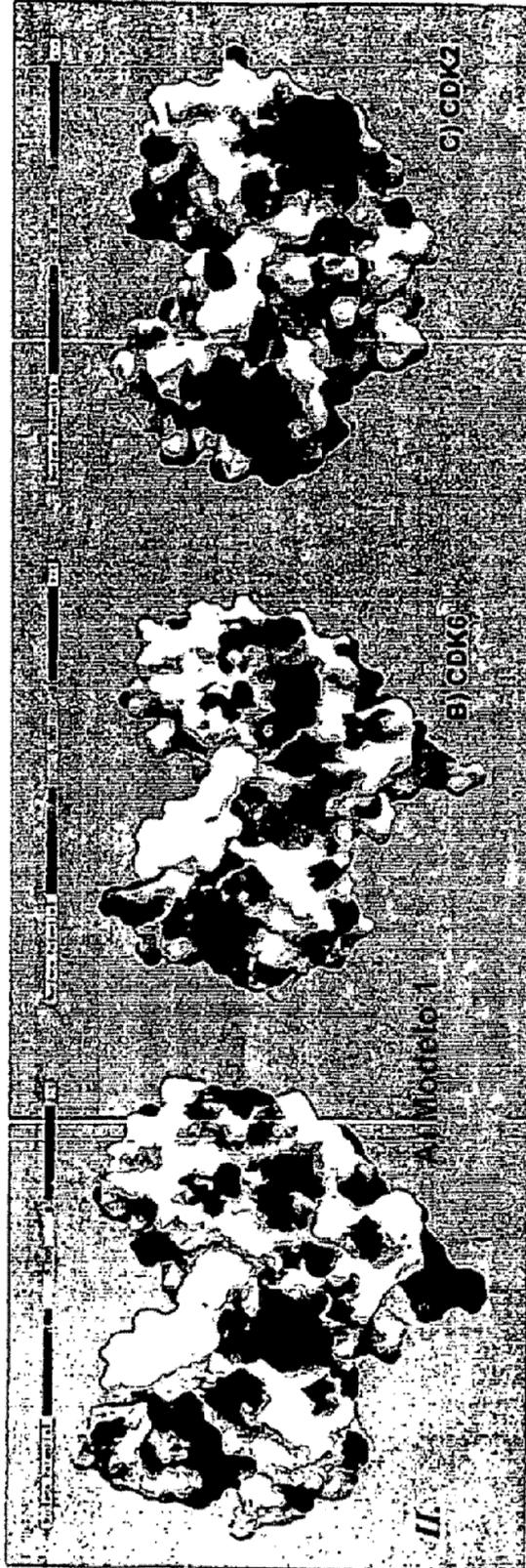


Figura 11

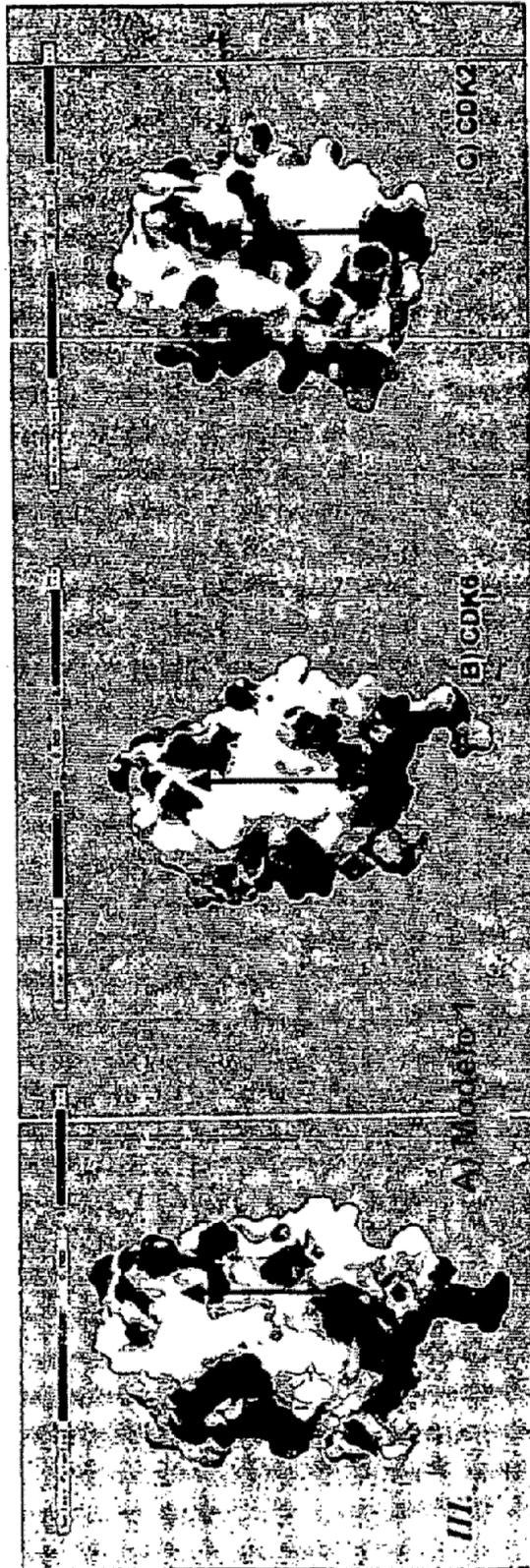


Figura 12

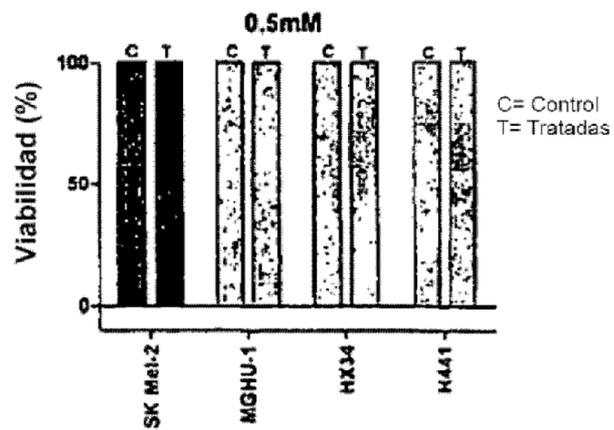
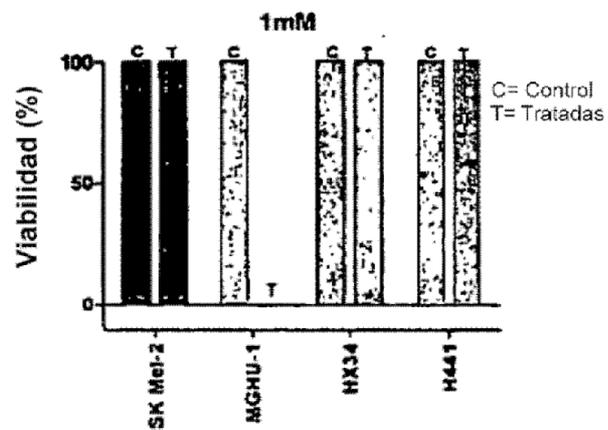
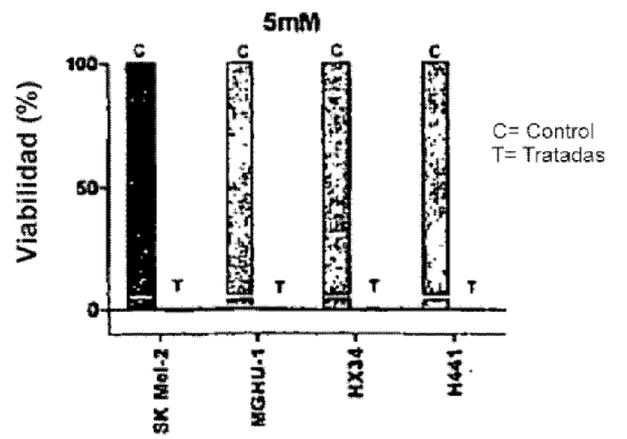
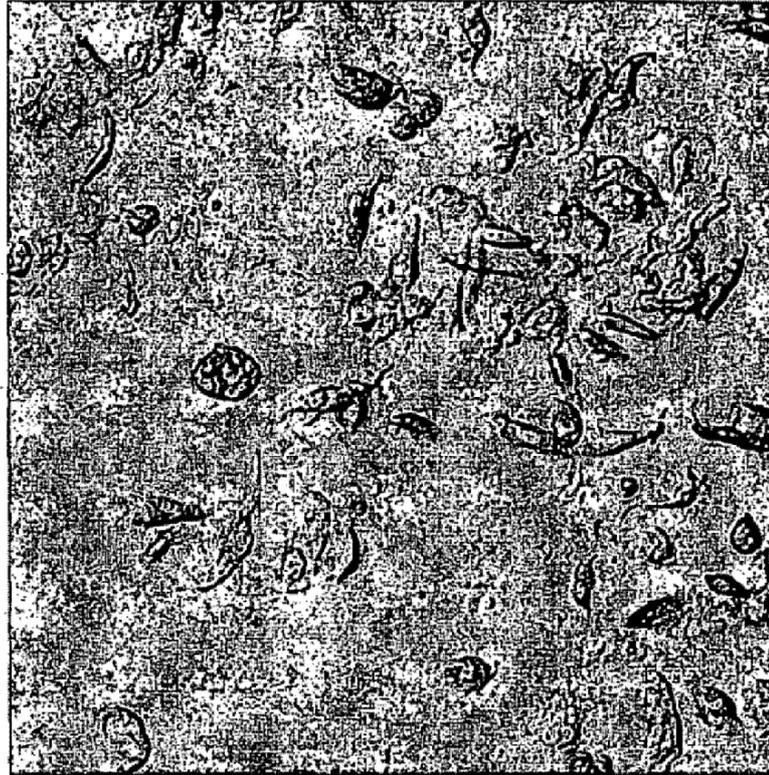


Figura 13A

Cáncer de vejiga humano RT112 – Tratado



Control

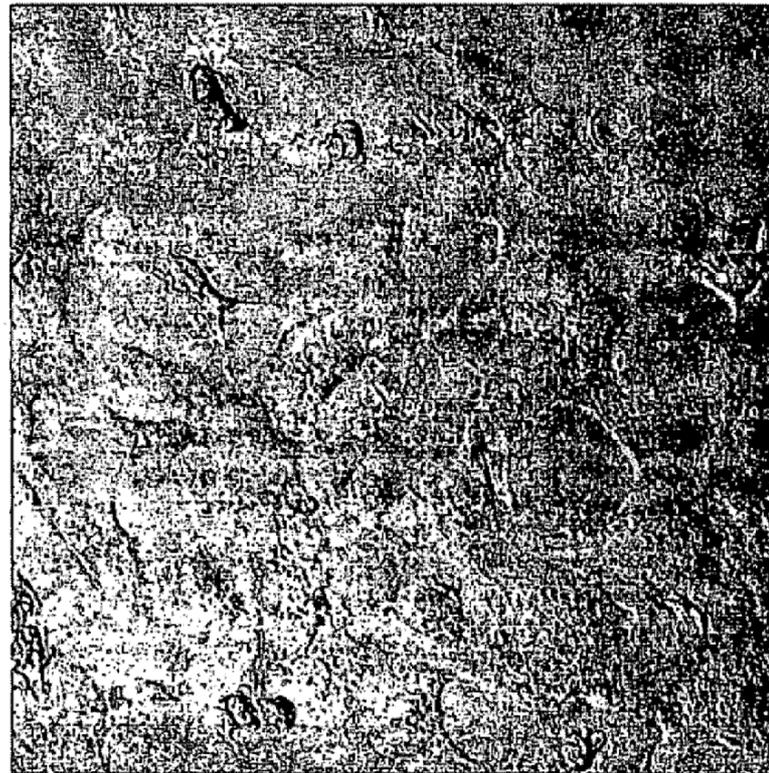


Figura 13B

Cáncer de colon humano HT29 – Tratado



Control

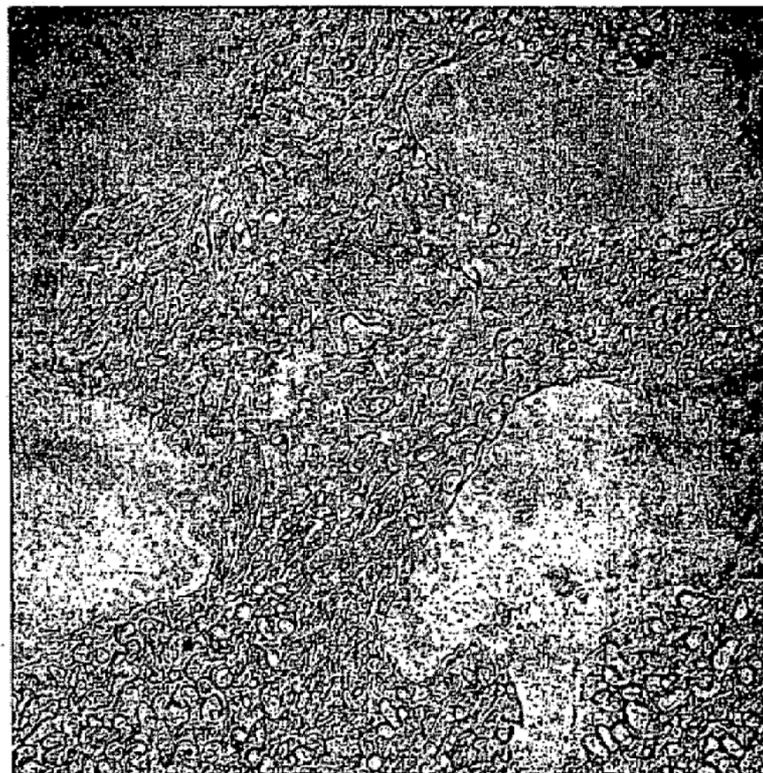
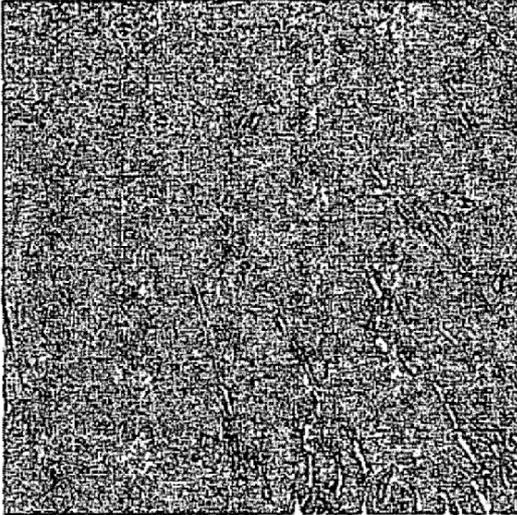
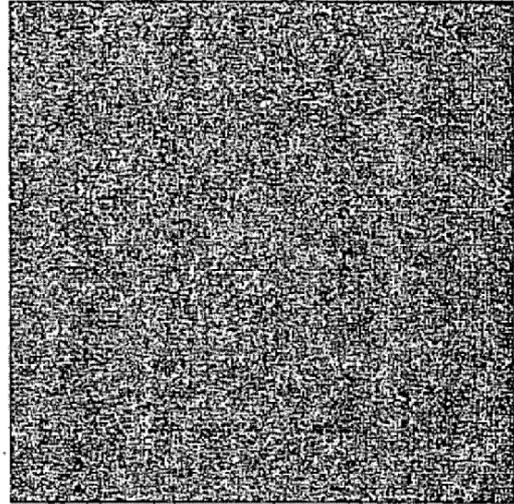


Figura 14

Fibroblastos humanos más
decapéptido CDK4



Fibroblastos humanos más
control sin sentido



Células de cáncer de vejiga MUG-1
más decapéptido CDK4



Células de cáncer de vejiga
MUG-1 más control sin sentido

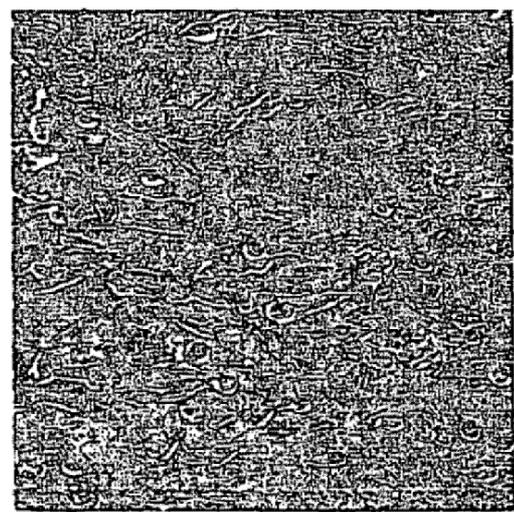
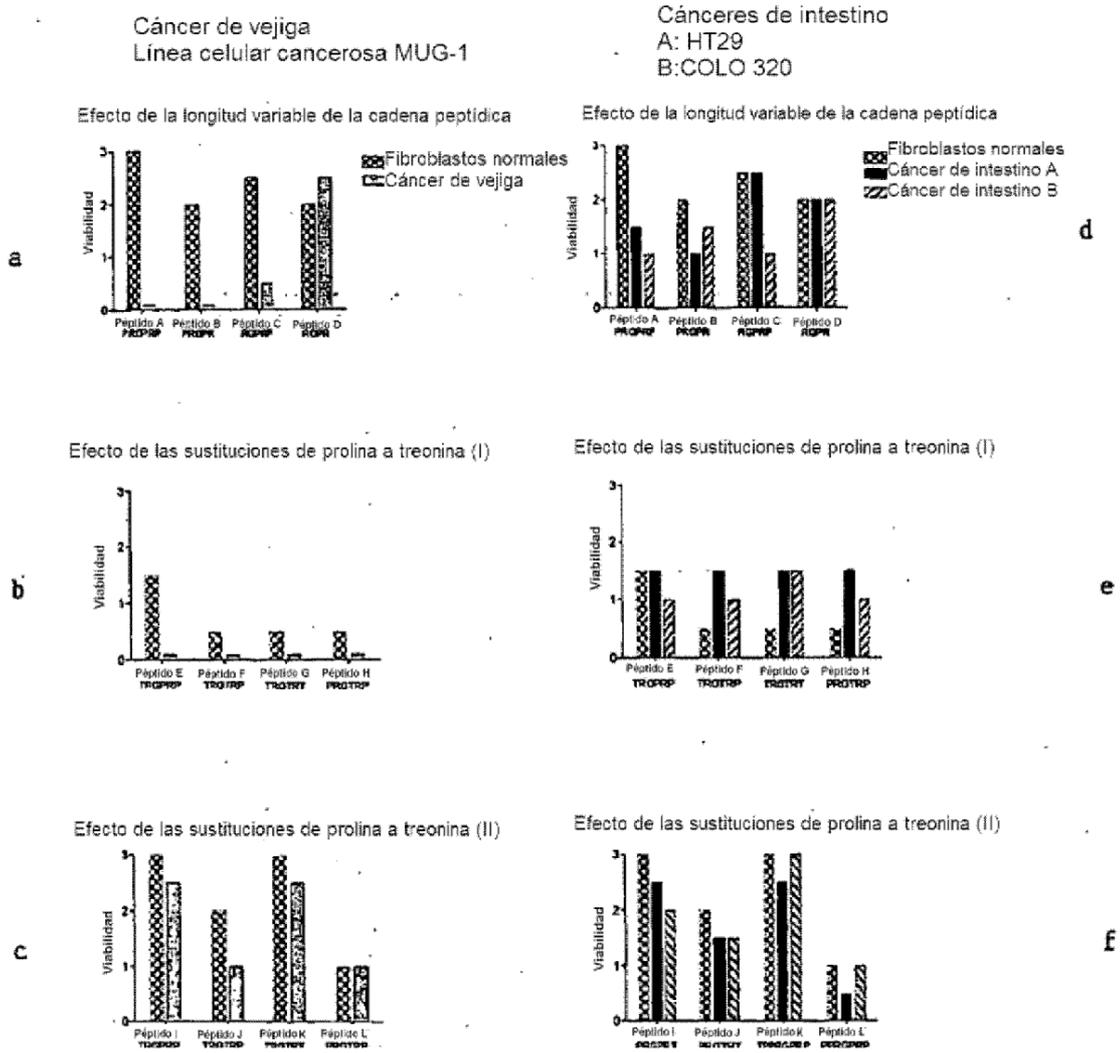
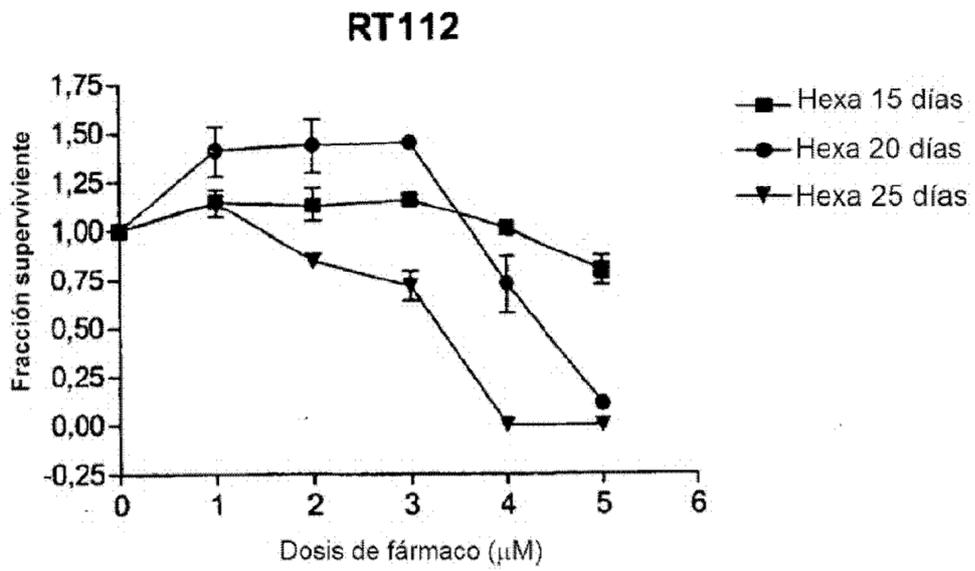


Figura 15



5

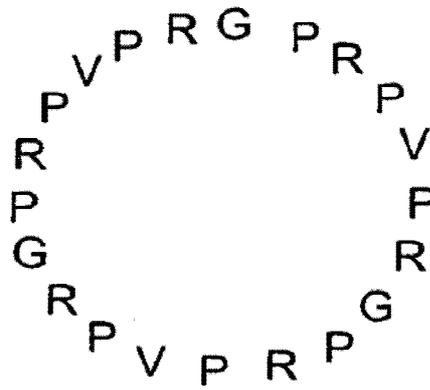
Figura 16



10

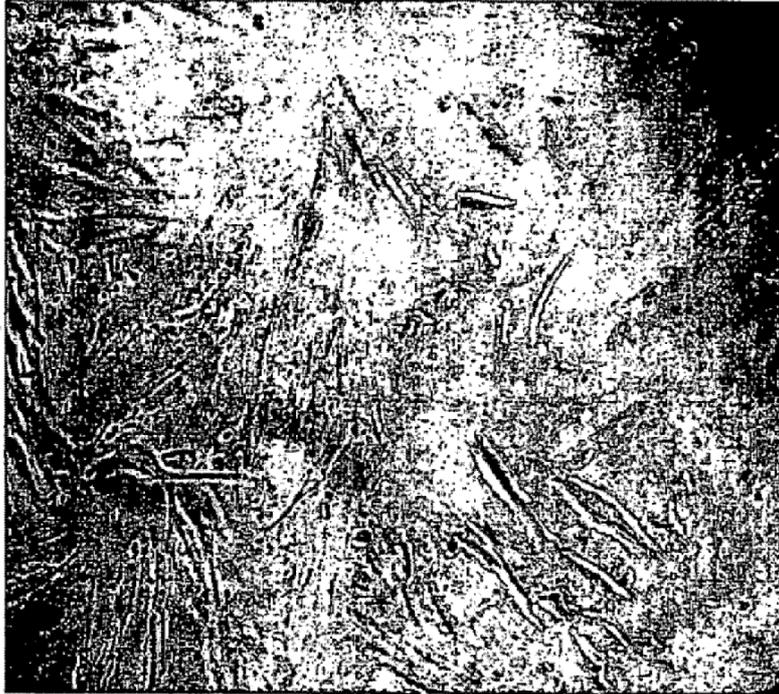
5

Figura 17



CONTROL (SIN PÉPTIDO)

Figura 18



PÉPTIDO SEC ID N° 17

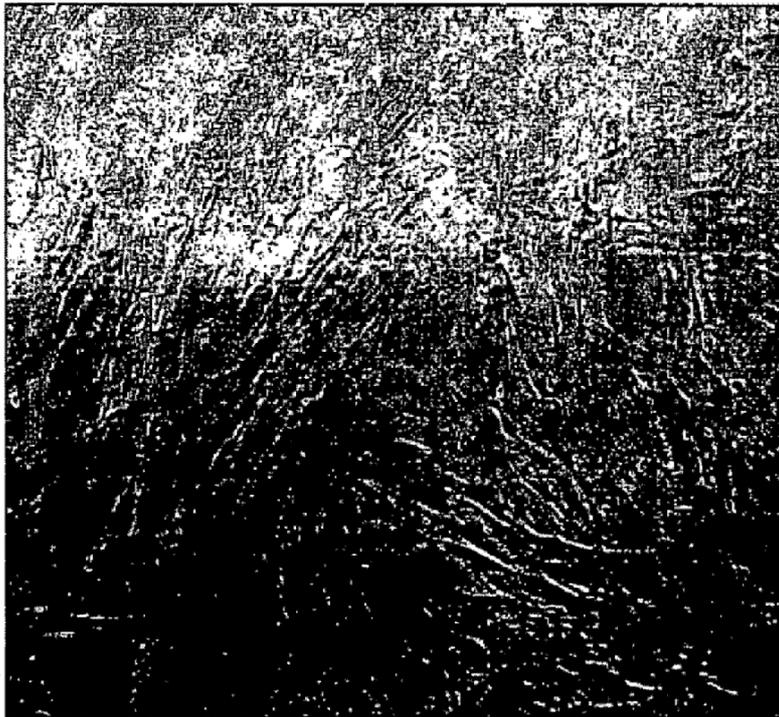


Figura 19

