

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 920**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07710660 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1994152**

54 Título: **Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células**

30 Prioridad:

**28.02.2006 US 776933 P**

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

**15.04.2013**

73 Titular/es:

**NYMOX CORPORATION (100.0%)  
9900 BOULEVARD CAVENDISH, NR. 306  
SAINT-LAURENT, QUEBEC H4M 2V2, CA**

72 Inventor/es:

**AVERBACK, PAUL, A. y  
GEMMELL, JACK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 400 920 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los EE.UU N° 60/776,933, presentada el 28 de febrero de 2006.

10 Antecedentes

1. Área de las realizaciones

15 Las realizaciones posibilitan métodos de tratamiento de afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de elementos celulares, como tumores benignos o malignos en seres humanos, utilizando compuestos a base de péptidos pequeños. El método incluye la administración de los compuestos por vía intramuscular, oral, intravenosa, intratecal, intratumoral, intranasal, tópica, transdérmica, etc., ya sea solos o conjugados a un vehículo.

20 2. Descripción del área relacionada

La esencia de muchos tratamientos y procedimientos médicos consiste en la eliminación o la destrucción del tejido dañino o no deseado. Los ejemplos de tan importantes tratamientos incluyen la extracción quirúrgica de neoplasias, la destrucción de tumores metastásicos mediante quimioterapia y la reducción de la hiperplasia glandular (por ejemplo prostática). Otros ejemplos incluyen la eliminación del vello facial no deseado, la eliminación de verrugas y la eliminación de tejido graso no deseado.

Existe una necesidad obvia de un agente eficaz que destruya y por lo tanto facilite la eliminación o inhiba el crecimiento posterior del tejido y las células dañinos o no deseados pero que tenga principalmente efectos locales y carezca de toxicidad sistémica o ésta sea mínima.

Las clases de dichos agentes se dan a conocer en las solicitudes de patentes pendientes de los Estados Unidos Ser. N° 10/092,934, titulada: Métodos de tratamiento de tumores y afecciones relacionadas utilizando proteínas de la cadena neural, Ser. N° 10/153,334, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células; Ser. N° 10/198,069, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células; Ser. N° 10/198,070, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células, Ser. N° 10/294, 891 titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células; y Ser. N° 10/920,313 titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células.

Además, la publicación de la patente de los Estados Unidos N° 2005/0032704 da a conocer métodos de tratamiento para afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células dañinas o no deseadas mediante la administración de péptidos que contienen una parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cadena neural. Las proliferaciones celulares no deseadas incluyen tumores benignos y malignos, hiperplasia glandular (por ejemplo prostática), vello facial no deseado, verrugas y tejido graso no deseado. Los péptidos corresponden a una parte de la secuencia de aminoácidos de una especie de las proteínas de la cadena neural (NTP) diferente de AD7c-NTP.

WO 03/008444 da a conocer péptidos, composiciones y métodos de tratamiento de afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células dañinas o no deseadas en un paciente, tales como tumores benignos y malignos, utilizando proteínas (y péptidos derivados de las secuencias de aminoácidos de dichas proteínas), cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una secuencia de aminoácidos derivada de NTP y otras moléculas relacionadas. Las proteínas y los péptidos se pueden derivar de AD7c-NTP y otras moléculas relacionadas. Las proteínas y los péptidos se pueden utilizar en un método de tratamiento de proliferaciones celulares no deseadas como tumores benignos y malignos, hiperplasia glandular (por ejemplo prostática), vello facial no deseado, verrugas y tejido graso no deseado.

En este documento se dan a conocer combinaciones, fragmentos y subsecuencias de un agente peptídico como esos (SEC. ID N°. 1: Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) que también son útiles en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células.

El cáncer es una anomalía en los mecanismos de regulación interna de la célula que se traduce en el crecimiento y la reproducción descontrolados de la célula. Las células normales forman los tejidos, y cuando estas células pierden

su capacidad para comportarse como una unidad especificada, controlada y coordinada, (desdiferenciación), el defecto conduce al desorden entre la población de células. Cuando esto ocurre, se forma un tumor.

Los crecimientos excesivos de tejido benignos, son anomalías en las cuales es deseable eliminar las células del organismo. Los tumores benignos son proliferaciones celulares que no dan metástasis en todo el organismo pero que, sin embargo, causan síntomas de enfermedad. Dichos tumores pueden ser mortales si se ubican en zonas inaccesibles de los órganos como en el cerebro. Hay tumores benignos de órganos como pulmón, cerebro, piel, hipófisis, tiroides, corteza suprarrenal y médula, ovario, útero, testículo, tejido conectivo, músculo, intestinos, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, hígado, vesícula, páncreas, próstata, corazón y otros órganos.

A menudo la cirugía es el primer paso en el tratamiento del cáncer. El objetivo de la cirugía varía. A veces se utiliza para eliminar tanto como sea posible del tumor evidente, o al menos para "reducir el volumen" (eliminar la masa o masas principales del tumor para que haya menos tumor que necesite ser tratado por otros medios). Dependiendo del tipo de cáncer y de la ubicación, la cirugía también puede proporcionar cierto alivio sintomático al paciente. Por ejemplo, si un cirujano puede eliminar una gran porción de un tumor cerebral en expansión, la presión dentro del cráneo disminuirá, produciendo una mejoría en los síntomas del paciente.

No todos los tumores son operables. Algunos pueden estar ubicados en partes del organismo que hace imposible eliminarlos totalmente. Ejemplos de estos son tumores en el tallo (una parte del cerebro que controla la respiración) o un tumor que ha crecido en y alrededor de un vaso sanguíneo principal. En esos casos, la función de la cirugía es limitada debido al alto riesgo asociado a la eliminación del tumor.

En algunos casos, la cirugía no se usa para reducir el volumen del tumor porque simplemente no es necesario. Un ejemplo es el linfoma de Hodgkin, un cáncer de los ganglios linfáticos que responde muy bien a las combinaciones de quimioterapia antineoplásica y radioterapia. En el linfoma de Hodgkin, la cirugía rara vez es necesaria para lograr la curación, pero casi siempre se utiliza para establecer un diagnóstico.

La quimioterapia antineoplásica es otra forma común de tratamiento del cáncer. Esencialmente, implica el uso de medicamentos (generalmente administrados por vía oral o inyectable) que atacan específicamente a las células en rápida división (como las que se encuentran en un tumor) en todo el organismo. Esto hace que la quimioterapia antineoplásica sea útil en el tratamiento de cánceres que ya han metastatizado, así como de tumores que tienen una alta probabilidad de diseminarse a través de la sangre y el sistema linfático pero no son evidentes más allá del tumor primario. La quimioterapia antineoplásica también se puede usar para aumentar la respuesta de los tumores localizados a la cirugía y la radioterapia. Este es el caso, por ejemplo, de algunos cánceres de cabeza y cuello.

Desafortunadamente, otras células del organismo humano que normalmente se dividen rápidamente (por ejemplo, el revestimiento del estómago y el cabello) también son afectadas por la quimioterapia antineoplásica. Por esta razón, muchos antineoplásicos inducen efectos secundarios indeseables como náuseas, vómitos, anemia, pérdida del cabello y otros síntomas. Esos efectos secundarios son temporales y existe medicación que puede ayudar a aliviar muchos de esos efectos. Como nuestro conocimiento ha seguido creciendo, los investigadores han diseñado nuevos antineoplásicos que no sólo son mejores para matar las células cancerosas, sino que también tienen menos efectos secundarios para el paciente.

La quimioterapia antineoplásica se administra a los pacientes de diversas maneras. Algunos incluyen pastillas y otros se administran por vía intravenosa u otra inyección. Para la quimioterapia antineoplásica inyectable, el paciente acude al consultorio del médico o al hospital para el tratamiento. Otros antineoplásicos requieren la infusión continua en el torrente sanguíneo, 24 horas al día. Para esos tipos de quimioterapia antineoplásica, se realiza un procedimiento quirúrgico menor para implantar una pequeña bomba que lleva puesta el paciente. La bomba administra entonces lentamente el medicamento. En muchos casos, se coloca un puerto permanente en la vena del paciente para eliminar la necesidad de pinchazos repetidos con la aguja.

La radioterapia es otra arma comúnmente utilizada en la lucha contra el cáncer. La radiación mata al cáncer al dañar el ADN de las células del tumor. La radiación se aplica de diferentes maneras. La más común consiste en apuntar un haz de radiación al paciente de manera muy precisa, centrándolo en el tumor. Para ello, el paciente se acuesta en una mesa y el haz se mueve alrededor de él. El procedimiento dura minutos, pero se puede hacer diariamente durante varias semanas (dependiendo del tipo de tumor) para lograr la dosis particular total prescrita.

Otro método de radiación empleado a veces, llamado braquiterapia, implica tomar bolitas radiactivas (semillas) o cables e implantarlos en el cuerpo en el área del tumor. Los implantes pueden ser temporales o permanentes. En el caso de los implantes permanentes, la radiación de las semillas decae durante un período de días o semanas para que el paciente no sea radiactivo. En el caso de los implantes temporales, generalmente se administra toda la dosis de radiación en unos pocos días y el paciente debe permanecer en el hospital durante ese período. Para ambos tipos de braquiterapia, la radiación se administra generalmente a una zona muy delimitada para lograr el control local de un cáncer (en contraposición a tratar todo el cuerpo, como en la quimioterapia antineoplásica).

Algunos pacientes muy escogidos pueden ser remitidos para trasplante de médula ósea. Este procedimiento habitualmente se lleva a cabo o bien porque el paciente tiene un cáncer particularmente agresivo o porque tiene una recidiva de un cáncer después de haber sido tratado con terapia convencional. El trasplante de médula ósea es un procedimiento complicado. Hay muchos tipos y varían en su potencial para causar efectos secundarios y curar. La mayoría de los trasplantes se realizan en centros especiales, y en muchos casos, su uso se considera en fase de investigación.

Existe una serie de otras terapias, aunque la mayoría de ellas todavía se están estudiando en ensayos clínicos y no se han vuelto todavía atención estándar. Los ejemplos incluyen el uso de inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, factores anti-angiogénesis y genoterapia.

Inmunoterapia: existen diversas técnicas diseñadas para ayudar al sistema inmunitario del propio paciente a luchar contra el cáncer, bastante separadamente de la radiación o la quimioterapia antineoplásica. A menudo, para lograr el objetivo los investigadores inyectan al paciente una vacuna derivada especialmente.

Anticuerpos monoclonales: son anticuerpos diseñados para unirse a las células cancerosas (y no a las células normales) aprovechando las diferencias entre las células cancerosas y no cancerosas en las características antigénicas y otras características. Los anticuerpos se pueden administrar al paciente solos o conjugados a varios compuestos citotóxicos o en forma radiactiva, de modo que el anticuerpo se dirija preferentemente a las células cancerosas, administrando así el agente tóxico o la radiactividad a las células deseadas.

Factores anti-angiogénesis: como las células cancerosas se dividen rápidamente y los tumores crecen, pueden superar pronto su suministro de sangre. Para compensar esto, algunos tumores secretan una sustancia que se cree que ayuda a inducir la proliferación de vasos sanguíneos en su proximidad, proporcionando así a las células cancerosas una fuente vascular de nutrientes. Las terapias experimentales han sido diseñadas para detener la proliferación de vasos sanguíneos a los tumores.

Genoterapia: el cáncer es el producto de una serie de mutaciones que en último lugar conducen a la producción de una célula cancerosa y a su excesiva proliferación. Los cánceres se pueden tratar introduciendo genes en las células cancerosas que actuarán controlando o deteniendo la proliferación del cáncer, encendiendo los mecanismos celulares programados en las células para destruir la célula, aumentando el reconocimiento inmunitario de la célula o expresando un profármaco que se convierta en un metabolito tóxico o una citocina que inhiba el crecimiento del tumor.

Los tumores benignos y las malformaciones también se pueden tratar mediante diversos métodos, que incluyen cirugía, radioterapia, farmacoterapia, ablación térmica o eléctrica, crioterapia y otros. Aunque los tumores benignos no metastatizan, pueden crecer mucho y pueden repetirse. La extirpación quirúrgica de los tumores benignos tiene todas las dificultades y efectos secundarios de la cirugía en general y a menudo para algunos tumores benignos se debe realizar repetidamente, como para los adenomas hipofisarios, meningiomas cerebrales, hiperplasia prostática y otros.

Existen otras afecciones que involucran elementos celulares no deseados en las cuales es deseable la eliminación celular selectiva. Por ejemplo, las cardiopatías y los accidentes cerebrovasculares comúnmente son causados por aterosclerosis, que es una lesión proliferativa de fibrograsa y elementos del músculo liso modificados que distorsionan la pared del vaso sanguíneo, estrechan el lumen, restringen el flujo sanguíneo, predisponen a coágulos sanguíneos focales, y en última instancia producen la obstrucción y el infarto. Hay varios tratamientos para la aterosclerosis como revascularización; injertos artificiales; angioplastia con recanalización, raspado, radiación, láser u otro eliminación; farmacoterapia para inhibir la aterosclerosis a través de la reducción de lípidos; terapias anticoagulantes; y medidas generales de dieta, ejercicio y estilo de vida. Es necesario un método para eliminar las lesiones ateroscleróticas sin el riesgo y los efectos secundarios de los procedimientos quirúrgicos.

Otros ejemplos de elementos celulares no deseados donde es deseable la eliminación celular selectiva incluyen los crecimientos inducidos por virus, como las verrugas. Otro ejemplo son las masas inflamatorias hipertróficas que se encuentran en las afecciones inflamatorias, y las cicatrices hipertróficas o queloides. Aún otros ejemplos se encuentran en contextos estéticos tales como la eliminación de vello no deseado, por ejemplo, vello facial, o para el encogimiento de áreas de tejido no deseado con fines estéticos, como en la dermis facial y los tejidos conectivos o en la dermis y el tejido conectivo de las extremidades.

Otros ejemplos de elementos celulares no deseados en los cuales la eliminación celular selectiva o la inhibición de la proliferación celular es deseable incluyen estenosis y reestenosis de cualquier arteria, válvula o canal en el sistema circulatorio, incluidas válvulas (p. ej., estenosis aórtica que implica estrechamiento del orificio de la válvula aórtica), arterias coronarias (por ejemplo, esclerosis coronaria ostiaria que implica estrechamiento de las bocas de las arterias coronarias), arterias carótidas y arterias renales. Otros ejemplos incluyen la inhibición o eliminación de

crecimiento o acumulación celular no deseados que causan la oclusión parcial o completa de dispositivos médicos como los stents colocados o implantados en un vaso sanguíneo para el tratamiento de las estenosis, constricciones o aneurismas en ellos, o en las vías urinarias y en los conductos biliares.

5 Aún otros ejemplos serán obvios para los expertos en el área. En todos o la mayoría de estos ejemplos existe la necesidad de tratamientos que puedan eliminar o destruir los elementos celulares no deseados sin los riesgos ni los efectos secundarios de los tratamientos convencionales o puedan quitar los elementos celulares no deseados con más precisión.

10 A lo largo de esta descripción, incluida la descripción anterior del área relacionada, todos los documentos descritos que se encuentran a disposición del público, inclusive todas las patentes de los Estados Unidos, se incorporan específicamente por referencia en este documento en su totalidad. La descripción precedente del área relacionada no se propone en modo alguno como una admisión de que alguno de los documentos que allí se detallan, incluidas las solicitudes de patentes pendientes de los Estados Unidos, constituyen estado anterior de la técnica para la  
15 presente divulgación. Por otra parte, la descripción en este documento de cualquier desventaja asociada a los productos, métodos o aparatos descritos, no pretende limitar las realizaciones. De hecho, los aspectos de las realizaciones pueden incluir ciertas características de los productos, métodos o aparatos descritos sin sufrir de sus desventajas descritas.

20 Resumen de las realizaciones

Sigue existiendo en el área la necesidad de contar con nuevos tratamientos menos tóxicos para el tratamiento de los elementos celulares no deseados. Las realizaciones satisfacen esas necesidades.

25 Esta divulgación se basa en parte en el descubrimiento de que determinados péptidos, incluido un péptido específico descrito por la secuencia de aminoácidos Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu, son capaces de tratar o eliminar proliferaciones celulares no deseadas. Esas proliferaciones celulares no deseadas incluyen, entre otras, tumores benignos y malignos, hiperplasia glandular (por ejemplo prostática), vello facial no deseado, verrugas y tejido graso no deseado.

30 Las realizaciones descritas en este documento se basan en parte en el sorprendente e inesperado descubrimiento de que ciertos fragmentos de péptidos y subsecuencias del péptido Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu ("péptidos S05A") también tienen la capacidad de tratar y/o eliminar proliferaciones celulares no deseadas.

35 Algunas realizaciones apuntan a métodos de tratamiento de proliferaciones celulares no deseadas (tumores benignos y malignos, hiperplasia glandular (por ejemplo prostática), vello facial no deseado, verrugas y tejido graso no deseado) que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido S05A.

40 Dicho péptido S05A se puede administrar solo o conjugado a un vehículo o un anticuerpo. Los péptidos S05A se pueden administrar por vía intramuscular, oral, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intratumoral, intralesional, intradérmica, intratecal, intraocular, intraarterial, tópica, transdérmica, mediante un aerosol, infusión, inyección en bolo, dispositivo de implantación, sistema de liberación  
45 sostenida etc., ya sea solo o conjugado a un vehículo. Alternativamente, los péptidos S05A se pueden expresar in vivo administrando un gen que exprese los péptidos S05A, administrando una vacuna que induzca dicha producción o introduciendo células, bacterias o virus que expresen el péptido in vivo, debido a modificación genética o de otra manera.

50 Además, los péptidos S05A se pueden utilizar en combinación con otras terapias para el tratamiento de tumores benignos y malignos y otros crecimientos celulares no deseados o dañinos.

Tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ejemplares y explicativas y pretenden ofrecer mayor explicación de las realizaciones como se las reivindican. Otros objetivos, ventajas y  
55 características serán evidentes para los expertos a partir de la descripción detallada siguiente de las realizaciones.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

60 Antes de que se describan las proteínas, secuencias de nucleótidos, péptidos, etc. y los métodos de la presente, se entiende que esta invención no está limitada a la metodología particular, los protocolos, las líneas celulares, los vectores y los reactivos descritos, puesto que éstos pueden variar. También se debe comprender que la terminología utilizada en este documento tiene únicamente el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de las realizaciones de la presente que estarán limitadas sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Los términos y las frases utilizados en este documento se definen como se indica a continuación a menos que se especifique lo contrario.

5 A lo largo de esta descripción, las formas singulares "un," "una" y "el", "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "una célula huésped" incluye múltiples células huésped, y una referencia a "un anticuerpo" es una referencia a uno o más anticuerpos y sus equivalentes conocidos por los expertos en el área, y así sucesivamente.

10 Los aminoácidos y residuos de aminoácidos descritos en este documento se pueden denominar según el código de una o tres letras aceptado provisto en la tabla siguiente.

Tabla 1.

Aminoácidos tres letras	Símbolo una letra	Símbolo
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	p	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	VAL

La invención se refiere a un péptido aislado que consiste en un péptido seleccionado del grupo que consta de:

- 15 a) el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N° 2 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile); y  
 b) el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N° 7 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile).

20 El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína donde uno o más péptidos se fusionan por recombinación o se conjugan químicamente (covalente y no covalentemente) a una proteína como (pero no exclusivamente) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, como un fragmento Fab o Fv de cadena corta. El término "proteína de fusión" se refiere también a multímeros (dímeros, trímeros, tetrameros y multímeros mayores) de péptidos. Dichos multímeros comprenden multímeros homómeros que contienen un péptido, multímeros heterómeros compuestos por más de un péptido y multímeros heterómeros compuestos por al menos un péptido y al menos otra proteína. Dichos multímeros pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas o covalentes, se pueden formar  
 25 enlaces o ligaduras, mediante conjugación cruzada usando moléculas ligadoras o se pueden ligar indirectamente mediante, por ejemplo, formación de liposomas.

30 Una "composición" según se usa en este documento, se refiere en sentido amplio a cualquier composición que contenga un péptido descrito o una secuencia de aminoácidos descrita. La composición puede estar compuesta por una formulación seca, una solución acuosa o una composición estéril. Las composiciones que contienen péptidos se pueden emplear como sondas de hibridación. Las sondas se pueden almacenar liofilizadas y se pueden asociar a un estabilizador como un carbohidrato. En las hibridaciones, la sonda se puede desplegar en una solución acuosa que contenga sales, por ejemplo, NaCl, detergentes, por ej. dodecil sulfato de sodio (SDS) y otros componentes, por

ejemplo, solución de Denhardt, leche en polvo, ADN de esperma de salmón, etc.

Las realizaciones apuntan a una composición que contenga los péptidos de la invención definidos antes en esta realización.

5 Los péptidos de la invención y sus proteínas de fusión abarcadas por esta realización, se pueden preparar usando métodos conocidos por los expertos, como tecnología de recombinación del ADN, síntesis de proteínas y aislamiento de péptidos de origen natural, proteínas, proteína AD7c y fragmentos, variantes, sus derivados y homólogos.

10 Los péptidos de la invención se pueden preparar a partir de otros péptidos, proteínas, y fragmentos, variantes, derivados sus homólogos usando métodos conocidos por los técnicos con experiencia. Dichos métodos incluyen el uso de proteasas para escindir el péptido o la proteína en los péptidos deseados.

15 Un péptido de la invención se puede preparar utilizando métodos bien conocidos de tecnología de recombinación del ADN como los dados a conocer en Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y/o Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, N.Y.

20 Un gen o ADNc que codifica un péptido de la invención se puede obtener por ejemplo cribando una genoteca genómica o de ADNc, o mediante amplificación por PCR. Las sondas o cebadores útiles para cribar la genoteca se pueden generar basándose en la información de la secuencia para otros genes o fragmentos de genes conocidos de la misma familia de genes o de una familia relacionada, como, por ejemplo, motivos conservados encontrados en otros péptidos o proteínas. Además, cuando se ha identificado un gen que codifica un péptido A de la invención, todo o una porción de ese gen se puede usar como una sonda para identificar genes homólogos. Las sondas o cebadores se pueden usar para cribar las genotecas de ADNc de diversas fuentes tisulares que se cree que expresan un gen del péptido. Normalmente, se emplearán condiciones de gran rigurosidad para el cribado a fin de minimizar la cantidad de falsos positivos obtenidos del mismo.

30 Otra forma de preparar un gen que codifica un péptido de la invención es emplear síntesis química utilizando métodos bien conocidos por los técnicos, tales como los descritos por Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-734. Esos métodos incluyen, entre otros, los métodos de fosfotriéster, fosforamidita y H-fosfonato para la síntesis de ácidos nucleicos. Un método preferido para dicha síntesis química es la síntesis de soportada en polímero utilizando la química estándar de la fosforamidita. Por lo general, el ADN que codifica un péptido o una proteína tendrá varios cientos de nucleótidos de longitud. Se pueden sintetizar ácidos nucleicos de más de aproximadamente 100 nucleótidos como varios fragmentos utilizando estos métodos. Después los fragmentos se pueden ligar entre sí para formar la proteína o el péptido de tamaño natural. Generalmente, el fragmento de ADN que codifica el extremo amino terminal de la proteína tendrá un ATG, que codifica un residuo de metionina. Esta metionina puede, o no, estar presente en la forma madura de la proteína o el péptido, dependiendo de si la proteína producida en la célula huésped está diseñada para ser secretada por esa célula.

45 El gen, el ADNc o un fragmento de éstos que codifique al péptido se puede introducir en un vector de expresión o amplificación adecuado, mediante técnicas de ligación corrientes. El vector se selecciona generalmente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de modo que se pueda producir la amplificación del gen y/o la expresión del gen). El gen, el ADNc o un fragmento de éstos que codifica el péptido se puede amplificar/expresar en células huésped de procariotas, levaduras, insectos (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La elección de la célula huésped dependerá en parte de si el péptido se debe glucosilar y/o fosforilar. Si es así, se prefieren las célula huésped de levaduras, insectos o mamíferos.

50 Normalmente, los vectores usados en cualquiera de las células huésped contendrán por lo menos una secuencia flanqueante 5' (también conocida como promotora) y otros elementos reguladores, como uno o más potenciadores, un elemento de origen de la replicación, un elemento de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contenga un sitio de empalme dador y aceptor, una secuencia de péptido señal, un elemento de sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región poliligadora para introducir el ácido nucleico que codifica al polipéptido que se va a expresar y un elemento marcador seleccionable. Cada uno de esos elementos se analiza más adelante. Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia etiqueta (tag), es decir, una molécula de oligonucleótido situada en el extremo 5' o 3' de la secuencia de codificación de la proteína o el péptido; la molécula de oligonucleótido codifica a poliHis (como hexaHis), u otra etiqueta como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe) o myc para las cuales se dispone de anticuerpos comerciales. Esta etiqueta está normalmente fusionada al polipéptido en el momento de su expresión y puede servir como medio para la purificación por afinidad de la proteína o el péptido de la célula huésped. La purificación por afinidad se puede llevar a cabo, por ejemplo, por cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta se puede eliminar posteriormente de la proteína o el péptido purificados por diversos medios como

mediante el uso de ciertas peptidasas.

Un experto en la materia podría fusionar la región bisagra y Fc de la inmunoglobulina humana en el extremo N-terminal o C-terminal del péptido de la invención. La proteína de fusión-Fc subsiguiente se podría purificar mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Se sabe que FC tiene una vida media farmacocinética larga in vivo y se encontró que las proteínas fusionadas a Fc tienen una vida media sustancialmente mayor in vivo que la contraparte sin fusionar. También, la fusión a la región Fc permite la dimerización/multimerización de la molécula que puede ser útil para la bioactividad de algunas moléculas.

La secuencia flanqueante 5' puede ser homóloga (es decir, de la misma especie o cepa que la célula huésped), heteróloga (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes 5' de más de una fuente), sintética, o puede ser la secuencia flanqueante 5' del gen de la proteína o el péptido naturales. Como tal, la fuente de la secuencia flanqueante 5' puede ser cualquier organismo procarionta o eucariota unicelular, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier vegetal, siempre que la secuencia flanqueante 5' sea funcional en, y pueda ser activada por, la maquinaria de la célula huésped.

Las secuencias flanqueantes 5' útiles en los vectores de esta realización se pueden obtener por cualquiera de los varios métodos bien conocidos en el área. Por lo general, las secuencias flanqueantes 5' útiles en la presente que no son la secuencia flanqueante del gen de la proteína o el péptido, habrán sido identificadas previamente mediante mapeo o por digestión con endonucleasa de restricción y por lo tanto pueden ser aisladas de la fuente tisular adecuada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, se puede conocer la secuencia de nucleótidos completa de la secuencia flanqueante 5'. Aquí, la secuencia flanqueante 5' se puede sintetizar mediante los métodos descritos antes para la síntesis o la clonación de ácidos nucleicos.

Cuando se conoce toda o sólo una porción de la secuencia flanqueante 5', ésta se puede obtener mediante PCR o por cribado de una genoteca genómica con oligonucleótidos adecuados o fragmentos de la secuencia flanqueante 5' de la misma especie u otra especie.

Cuando no se conoce la secuencia flanqueante 5', se puede aislar un fragmento de ADN que contenga una secuencia flanqueante 5' de una pieza más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia de codificación o incluso otro gen o genes. El aislamiento se puede llevar a cabo por digestión con endonucleasa de restricción utilizando una o más enzimas seleccionadas cuidadosamente para aislar el fragmento de ADN adecuado. Después de la digestión, el fragmento deseado se puede aislar por purificación en gel de agarosa, columna Qiagen RTM u otros métodos conocidos por los técnicos. La selección de enzimas adecuadas para llevar a cabo este propósito será evidente para los técnicos con experiencia en el tema.

El elemento de origen de la replicación es generalmente una parte de vectores de expresión de procariontas adquiridos comercialmente, y ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. La amplificación del vector a un cierto número de copias puede, en algunos casos, ser importante para una óptima expresión de la proteína o el péptido. Si el vector de elección no contiene un origen del sitio de replicación, se puede sintetizar uno químicamente basándose en una secuencia conocida, y se puede ligar en el vector. El elemento de terminación de la transcripción generalmente está ubicado 3' respecto al extremo de la secuencia de codificación de la proteína o el péptido y sirve para terminar la transcripción de la proteína o el péptido. Generalmente, el elemento de terminación de la transcripción en las células procariontas es un fragmento rico en G-C, seguido de una secuencia poli T. Si bien el elemento se puede clonar a partir de una genoteca o adquirir en el comercio como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente con métodos para la síntesis de ácidos nucleicos como los descritos antes.

Un elemento del gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y la proliferación de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores seleccionables típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, tetraciclina o kanamicina para las células huésped procariontas, (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos que no están disponibles en los medios complejos. Los marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina.

El elemento de unión al ribosoma, comúnmente denominado secuencia de Shine-Dalgarno (procariontas) o secuencia de Kozak (eucariotas), generalmente es necesario para la iniciación de la traducción del ARNm. El elemento está generalmente ubicado 3' respecto al promotor y 5' respecto a la secuencia de codificación de la proteína o el péptido que se va a sintetizar. La secuencia de Shine-Dalgarno es variada pero es típicamente una polipurina (es decir, tiene un alto contenido de A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales se puede sintetizar fácilmente usando los métodos dados a conocer antes y utilizados en un vector de procarionta.

En los casos en los que es deseable que un péptido S05A sea secretado por la célula huésped, se puede usar una

secuencia señal para dirigir al péptido fuera de la célula huésped donde es sintetizado, y se puede eliminar la parte carboxi-terminal de la proteína para evitar el anclaje a la membrana. Por lo general, la secuencia señal se coloca en la región codificante del gen o ADNc del péptido S05A, o directamente en el extremo 5' de la región codificante del gen del péptido. Se han identificado muchas secuencias señal, y cualquiera de esas que son funcionales en la célula huésped se puede usar conjuntamente con el gen o el ADNc del péptido. Por lo tanto, la secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga al gen o ADNc del péptido y puede ser homóloga o heteróloga al gen o ADNc del péptido. Además, la secuencia señal se puede sintetizar químicamente usando los métodos dados a conocer antes. En la mayoría de los casos, la secreción del polipéptido desde la célula huésped a través de la presencia de un péptido señal resultará en la eliminación de la metionina amino terminal del polipéptido.

En muchos casos, la transcripción del gen o ADNc del péptido de la invención aumenta por la presencia de uno o varios intrones en el vector; esto es particularmente cierto cuando el péptido se produce en células huésped eucariotas, especialmente células huésped de mamífero. Los intrones utilizados pueden encontrarse naturalmente dentro del gen del péptido, especialmente cuando el gen utilizado es una secuencia genómica de longitud completa o un fragmento de la misma. Cuando el intrón no se encuentra naturalmente dentro del gen (como en la mayoría de los ADNc), el intrón o intrones se pueden obtener de otra fuente. En general la posición del intrón con respecto a la secuencia flanqueante y el gen del péptido es importante, puesto que el intrón debe ser transcrito para que sea eficaz. Como tal, cuando el gen del péptido introducido en el vector de expresión es una molécula de ADNc, la posición preferida para el intrón es 3' respecto al sitio de inicio de la transcripción y 5' respecto a la secuencia de terminación de la transcripción de polIA. Preferentemente para el ADNc del péptido, el intrón o intrones se ubicarán en un lado o el otro (es decir, 5' o 3') del ADNc para que no interrumpen esta secuencia codificante. Cualquier intrón de cualquier fuente, incluidos todos los organismos virales, procariotas y eucariotas (vegetales o animales), se puede utilizar para poner en práctica esta realización, siempre que sea compatible con la célula o células huésped en las que es introducido. También están incluidos en este documento los intrones sintéticos. Opcionalmente, se puede usar más de un intrón en el vector.

Cuando uno o más de los elementos indicados arriba no están ya presentes en el vector que se va a usar, se pueden obtener y ligar individualmente en el vector. Los métodos utilizados para obtener cada uno de los elementos son bien conocidos por los técnicos y son comparables a los métodos mencionados antes (es decir, síntesis de ADN, cribado de genotecas y análogos).

Los vectores finales utilizados para llevar a la práctica esta realización se pueden construir utilizando vectores de partida como un vector comercial. Dichos vectores pueden, o no, contener algunos de los elementos que se incluirán en el vector terminado. Si ninguno de los elementos deseados está presente en el vector de partida, cada elemento puede ser individualmente ligado en el vector cortando el vector con la o las endonucleasas de restricción apropiadas, de modo que los extremos del elemento que se va a ligar en el vector y los extremos del vector sean compatibles para ligar. En algunos casos, puede ser necesario dejar romos los extremos que se van a ligar entre sí para obtener un ligación satisfactoria. Dejar romos los extremos se logra llenando primero los "extremos adhesivos" usando ADN polimerasa Klenow o ADN polimerasa T4 en presencia de los cuatro nucleótidos. Este procedimiento es conocido en el área y se describe por ejemplo en Sambrook et al., supra. Alternativamente, dos o más de los elementos que se van a introducir en el vector, se deben ligar primero entre sí (si se van a colocar adyacentes entre sí) y luego ligar en el vector.

Un método adicional para construir el vector es llevar a cabo simultáneamente todas las ligaciones de los distintos elementos en una mezcla de reacción. En la presente, se generarán muchos vectores sin sentido o no funcionales debido a la inadecuada ligación o inserción de los elementos, sin embargo el vector funcional puede ser identificado y seleccionado por digestión con una endonucleasa de restricción.

Los vectores preferidos para llevar a la práctica esta realización son los compatibles con células huésped de bacterias, insectos y mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, California), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, California), pET15b (Novagen, Madison, Wis.), PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N J), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, California), pETL (BlueBach; Invitrogen) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.)

Después de que el vector ha sido construido y se ha introducido una molécula de ácido nucleico que codifica a la proteína o el péptido de longitud completa o truncada en el sitio correcto del vector, el vector terminado se puede introducir en una célula huésped adecuada para amplificación y/o la expresión del polipéptido. Las células huésped pueden ser células huésped procariotas (como E. coli) o células huésped eucariotas (como una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de vertebrado). La célula huésped, cuando se la cultiva en condiciones adecuadas, puede sintetizar la proteína o el péptido que posteriormente se puede recolectar del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta en el medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no es secretado).

Después de la recolección, el péptido de la invención se puede purificar usando métodos como cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de afinidad y similares. La selección de la célula huésped para la producción de la

proteína o el péptido dependerá en parte de si el péptido se va a glucosilar o fosforilar (en cuyo caso se prefieren células huésped eucariotas) y la manera en la cual la célula huésped es capaz de plegar el péptido en su estructura terciaria nativa (por ejemplo, orientación adecuada de los puentes disulfuro, etc.) de modo que la proteína biológicamente activa sea preparada por el péptido que tiene actividad biológica, el péptido se puede plegar después de la síntesis usando condiciones químicas adecuadas, como se explica a continuación. Las células o líneas celulares adecuadas pueden ser células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), renales de embrión humano (HEK) 293, células 293T o células 3T3. La selección de las células huésped de mamífero adecuadas y los métodos de transformación, cultivo, amplificación, cribado y producción del producto, y purificación son conocidos en el área. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas, son las líneas celulares COS-1 y COS-7 de mono y la línea celular CV-1. Otros ejemplos de células huésped de mamífero son las líneas celulares de primate y las líneas celulares de roedores, incluidas las líneas celulares transformadas. Las células diploides normales, las cepas de células derivadas del cultivo in vitro de tejido primario, así como explantes primarios, también son adecuados. Las células candidatas pueden ser genótipicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección que actúa de manera dominante. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero no exclusivamente, las células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares BHK o HaK de hámster .

Son igualmente útiles como células huésped adecuadas para las realizaciones de la presente las células bacterianas. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (por ej., HB101, DH5 $\alpha$ , DH10 y MC1061) son muy conocidas como células huésped en el campo de la biotecnología. En este método se pueden emplear diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., otros *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y análogos. Muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la materia también están disponibles como células huésped para la expresión de los polipéptidos de las realizaciones de la presente.

Además, cuando se desee, se pueden utilizar sistemas celulares de insectos en los métodos de las realizaciones de la presente. Dichos sistemas se describen por ejemplo en Kitts et al (*Biotechniques*, 14:810-817), Lucklow (*Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-572) y Lucklow et al. (*J. Virol.*, 67:4566-4579). Las células de insectos preferidas son Sf-9 y Hi5 (*Invitrogen*, Carlsbad, Calif.)

La inserción (también conocida como transformación o transfección) del vector en la célula huésped elegida se puede llevar a cabo utilizando métodos tales como cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o el método de DEAE-dextrano. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que se va a utilizar. Esos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por los técnicos y se dan a conocer, por ejemplo, en Sambrook et al., *supra*.

Las células huésped que contienen el vector (es decir, transformadas o transfectadas) se pueden cultivar utilizando medios estándar conocidos por los técnicos. Los medios contendrán generalmente todos los nutrientes necesarios para la multiplicación y la supervivencia de las células. Los medios adecuados para el cultivo de células de *E. coli* son por ejemplo, Luria Broth (LB) y/o Terrific Broth (TB). Los medios adecuados para el cultivo de las células eucariotas son RPMI 1640, MEM, DMEM, todos los cuales se pueden complementar con suero y/o factores de crecimiento según lo requiera la línea celular particular en cultivo. Un medio adecuado para cultivos de insectos es el medio de Grace complementado con yeastolate, hidrolizado de lactoalbúmina y suero de feto de ternero, según sea necesario. Normalmente, un antibiótico u otro compuesto útil para el cultivo selectivo de las células transformadas sólo se agrega a los medios de cultivo como complemento. El compuesto que se va a utilizar será estipulado por el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el cual se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es la resistencia a la kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina.

La cantidad de péptido producido en la célula huésped se puede evaluar utilizando métodos estándar conocidos en el área. Dichos métodos incluyen, pero no exclusivamente, análisis de inmunotransferencia tipo Western, electroforesis en gel poliacrilamida-SDS, electroforesis en geles no desnaturizantes, separación por HPLC, espectrometría de masas, inmunoprecipitación o ensayos de actividad como ensayos de retardo de la unión al ADN.

Si la proteína o el péptido fueron diseñados para ser secretados por las células huésped, la mayor parte de la proteína o el péptido se puede encontrar en el medio de cultivo celular. Las proteínas preparadas de esta manera generalmente no poseerán una metionina amino terminal, porque es eliminada durante la secreción de la célula. Si no obstante, la proteína o el péptido no son secretados por las células huésped, estarán presentes en el citoplasma y/o el núcleo (para células huésped eucariotas) o en el citosol (para las células huésped de bacterias gramnegativas) y pueden tener una metionina amino terminal.

En el caso de un péptido situado en el citoplasma y/o el núcleo de la célula huésped, las células huésped, por lo general, primero se desorganizan mecánicamente o con detergente para liberar el contenido intracelular en una solución amortiguada. Después el péptido se puede aislar de esta solución.

La purificación de los péptidos de la solución se puede llevar a cabo usando diversas técnicas. Si el péptido se sintetizó para que contuviera una etiqueta como hexaHistidina (por ej. péptido/hexaHis) u otro péptido pequeño como FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) o péptido de unión a la calmodulina (Stratagene, La Jolla, California) en su extremo carboxilo o amino terminal, esencialmente se puede purificar en un proceso de un solo paso, pasando la solución a través de una columna de afinidad en la cual la matriz de la columna tiene una alta afinidad por la etiqueta o directamente por la proteína (es decir, un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente al péptido). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel, zinc y cobalto; así la cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados que emplea una resina de afinidad a base de níquel (como la utilizada en el sistema QIAexpress de Quiagen o el sistema Xpress de Invitrogen) o una resina de afinidad a base de cobalto (como la utilizada en el sistema Talon de BD Biosciences-CLONTECH) se puede usar para purificar el péptido/poliHis. (Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York).

Cuando el péptido se prepara sin una etiqueta unida y no se dispone de anticuerpos, se pueden utilizar otros procedimientos bien conocidos para la purificación. Dichos procedimientos incluyen, pero no exclusivamente, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de tamiz molecular, HPLC, electroforesis nativa en gel en combinación con elución en gel e isoelectroenfoque preparativo (máquina/técnica Isoprime, Hoefer Scientific). En algunos casos, dos o más de estas técnicas se pueden combinar para lograr mayor pureza.

Si se prevé que el péptido se encontrará principalmente intracelularmente, el material intracelular (incluidos los cuerpos de inclusión para las bacterias gramnegativas) se puede extraer de la célula huésped utilizando cualquier técnica estándar conocida por los técnicos. Por ejemplo, las células huésped se pueden lisar para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante una prensa francesa, homogeneización y/o sonicación seguida de centrifugación. Si el péptido formó cuerpos de inclusión en el citosol, a menudo los cuerpos de inclusión se pueden unir a las membranas celulares internas y/o externas y así se encontrarán principalmente en el material sedimentado después de la centrifugación. Entonces el material sedimentado se puede tratar a pH extremos o con un caótropro como un detergente, guanidina, derivados de la guanidina, urea o derivados de la urea en presencia de un reductor como ditioneitol a pH alcalino o tris carboxietil fosfina a un pH ácido para liberar, romper y solubilizar los cuerpos de inclusión. Después se puede analizar el péptido en su actual forma soluble mediante electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar el péptido, el aislamiento se puede llevar a cabo usando métodos estándar como los indicados a continuación y en Marston et al. Meth. Enz., 182:264-275.

En algunos casos, el péptido puede no ser biológicamente activo en el momento del aislamiento. Varios métodos para desplegar o convertir el polipéptido en su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro, se pueden utilizar para restaurar la actividad biológica. Dichos métodos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH generalmente por encima de 7 y en presencia de una concentración particular de un caótropro. La selección del caótropro es muy similar a las opciones utilizadas para la solubilización del cuerpo de inclusión, pero generalmente a una concentración menor y no es necesariamente el mismo agente caótropro utilizado para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de desplegamiento/oxidación también contendrá un reductor o el reductor más su forma oxidada, en una proporción específica, para generar un potencial redox particular que permita que se produzca el barajado del disulfuro en la formación de los puentes de cisteína de la proteína. Algunos de los pares redox comúnmente utilizados incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditioneitol (DTT)/ditián DTT, 2-mercaptoetanol(bME)/ditió-b(ME). En muchos casos es necesario un cosolvente para aumentar la eficiencia del desplegamiento y los reactivos más comunes utilizados con este fin incluyen glicerina, polietilenglicol de diferentes pesos moleculares y arginina.

Si los cuerpos de inclusión del péptido no se forman en gran medida en la célula huésped, el péptido S05A se encontrará principalmente en el sobrenadante después de la centrifugación del homogeneizado celular, y el péptido S05A se puede aislar del sobrenadante mediante métodos como los indicados a continuación.

En esas situaciones en las que es preferible aislar parcial o totalmente el péptido, la purificación se puede llevar a cabo usando métodos estándar bien conocidos por los técnicos. Dichos métodos incluyen, pero no exclusivamente, separación por electroforesis seguida de electroelución, diversos tipos de cromatografía (inmunoafinidad, tamiz molecular o intercambio iónico) y/o cromatografía líquida de alta presión. En algunos casos, es preferible utilizar más de uno de esos métodos para la purificación total.

Además de preparar y purificar el péptido de la invención, utilizando técnicas de recombinación del ADN, los péptidos y sus proteínas de fusión se pueden preparar por métodos de síntesis química (por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida) utilizando técnicas conocidas en el área como las divulgadas por Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc., 85:2149, Houghten et al. Proc Natl Acad. Sci. USA, 82:5132, y Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. Dichos péptidos se pueden sintetizar con o sin una metionina en el extremo amino-terminal. Los péptidos S05A sintetizados químicamente se pueden oxidar usando métodos dados a conocer en estas referencias para formar puentes disulfuro. Se espera que los péptidos S05A tengan actividad

biológica comparable a la de los péptidos producidos por vía recombinante o purificados de fuentes naturales y por lo tanto se puedan usar de manera intercambiable con el péptido natural o recombinante.

5 Las composiciones peptídicas modificadas químicamente en las cuales el péptido está unido a un polímero son  
 10 posibilitadas por las realizaciones de la presente. El polímero seleccionado suele ser soluble en agua para que la  
 proteína a la cual está unido no precipite en un ambiente acuoso, como un ambiente fisiológico. Generalmente el  
 polímero seleccionado se modifica para que tenga un solo grupo reactivo, como un éster activo para acilación o un  
 aldehído para alquilación, de modo que el grado de polimerización se pueda controlar como se estipula en los  
 métodos de la presente. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser lineal o ramificado. Está  
 incluida en el campo de aplicación de los polímeros peptídicos una mezcla de polímeros.

15 Los péptidos de la invención y sus proteínas de fusión también se pueden preparar usando técnicas de síntesis de  
 péptidos convencionales conocidas por los técnicos. Esas técnicas incluyen métodos de acoplamiento químico (cf.  
 Wünsch, E: "Methoden der organischen Chemie", Volumen 15, Band 1+2, Synthese von Peptiden, thime Verlag,  
 Stuttgart (1974), y Barrany, G.; Marrifield, R. B.: "The Peptides," eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volumen 2, Capítulo 1,  
 pp. 1-284, Academic Press (1980)), métodos de acoplamiento enzimático (cf. Widmer, F. Johansen, J. T., Carlsberg  
 Res. Commun., Vol. 44, pp. 37-46 (1979); Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Press Inc. Boca  
 Raton, Fla. (1987); y Widmer, F., Johansen, J. T. in "Synthetic Peptides in Biology and Medicines," eds. Alitalo, K.,  
 Partanen, P., Väterli, A., pp.79-86, Elsevier, Ámsterdam (1985)), o una combinación de métodos químicos y  
 20 enzimáticos si esto es ventajoso para el diseño y la economía del proceso.

25 Las realizaciones de la presente posibilitan métodos para tratar las afecciones que requieren la eliminación de  
 células, como tumores benignos y malignos, hiperplasia glandular (por ejemplo prostática), vello facial no deseado,  
 verrugas y tejido graso no deseado, o la inhibición o prevención de la proliferación celular no deseada, como la  
 estenosis de un stent. Dicho método comprende administrar a un mamífero que lo necesita, o recubrir un dispositivo  
 como un stent con, una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de la invención.

30 La afección puede ser, por ejemplo, tumores de pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario,  
 piel, riñón, senos paranasales, colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus revestimientos,  
 médula ósea y sus revestimientos, músculo, tejido conectivo, suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo,  
 hipófisis, órganos reproductores, hígado, vesícula, ojo, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, ganglios linfáticos y  
 sistema linfático, y otros órganos.

35 Según se usa en este documento, la expresión "tumor maligno" pretende abarcar todas las formas de carcinomas,  
 sarcomas y melanomas humanos que se producen en formas mal diferenciadas, moderadamente diferenciadas y  
 bien diferenciadas.

40 Esta realización satisface una necesidad del área, de contar con tratamientos que puedan eliminar tumores benignos  
 con menos riesgo y menos de los efectos secundarios indeseables de la cirugía. Es particularmente necesario un  
 método para eliminar tumores benignos en áreas quirúrgicamente peligrosas como en lugares profundos del  
 organismo (p. ej., cerebro, corazón, pulmones y otros).

45 El método de tratamiento de las afecciones en las que se deben eliminar células se puede utilizar conjuntamente con  
 los métodos convencionales de tratamiento de tales afecciones, como escisión quirúrgica, quimioterapia  
 antineoplásica, radioterapia y radiación, los péptidos se pueden administrar antes, durante o después de dichos  
 tratamientos convencionales.

50 La afección a tratar también puede ser una hiperplasia, hipertrofia o crecimiento excesivo de un tejido seleccionado  
 del grupo que consiste en pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, senos  
 paranasales, colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus revestimientos, médula ósea y sus  
 revestimientos, músculo, tejido conectivo, suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, hipófisis, órganos  
 reproductores, hígado, vesícula, ojo, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, y ganglios linfáticos y sistema linfático.

55 Otras afecciones que se pueden tratar son tejidos alterados por virus, bacterias o parásitos, seleccionados del grupo  
 que consiste en pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, senos paranasales,  
 colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus revestimientos, médula ósea y sus revestimientos,  
 músculo, tejido conectivo, suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, hipófisis, órganos reproductores,  
 hígado, vesícula, ojo, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, y ganglios linfáticos y sistema linfático .

60 La afección a tratar también puede ser una malformación o un trastorno de un tejido seleccionado del grupo que  
 consiste en pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, senos paranasales,  
 colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus revestimientos, médula ósea y sus revestimientos,  
 músculo, tejido conectivo, suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, hipófisis, órganos reproductores,  
 hígado, vesícula, ojo, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, y ganglios linfáticos y sistema linfático.

En particular, la afección a tratar puede ser hipertrofia amigdalina, hiperplasia prostática, psoriasis, eczemas, dermatosis o hemorroides. La afección a tratar puede ser una enfermedad vascular, como la aterosclerosis o arterioesclerosis o un trastorno vascular, como venas varicosas, estenosis o reestenosis de una arteria o un stent.  
5 La afección a tratar también puede ser una modificación estética a un tejido, como piel, ojo, oído, nariz, garganta, boca, músculo, tejido conectivo, cabello, o tejido mamario.

Las composiciones terapéuticas de los péptidos de la invención también son posibilitadas por las realizaciones de la presente. Dichas composiciones pueden contener una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido mezclado con  
10 un vehículo farmacéuticamente aceptable. El material del vehículo puede ser agua para inyección, preferentemente complementada con otros materiales comunes en las soluciones para administración a los mamíferos. Por lo general, un péptido para uso terapéutico se administrará en la forma de una composición que comprende el péptido purificado junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. La solución salina neutra amortiguada o la solución salina mezclada con seroalbúmina son ejemplos de vehículos adecuados.  
15 Preferentemente, el producto se formula como un liofilizado con excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa). Se pueden incluir otros vehículos, diluyentes y excipientes corrientes según se desee. Las composiciones de las realizaciones también pueden contener amortiguadores conocidos por los técnicos con experiencia en el área con un rango de valores de pH apropiado, incluidas la solución amortiguadora Tris de aproximadamente pH 7.0-8.5, o la solución amortiguadora de acetato de aproximadamente pH 4.0-5.5, que pueden además incluir sorbitol o un sustituto adecuado.  
20

El uso de péptidos de la invención conjugados o ligados o enlazados a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula tipo anticuerpo o molécula con una alta afinidad por un marcador tumoral específico, como un receptor celular, un péptido señal o una enzima sobreexpresada, para focalización en los elementos celulares no deseados,  
25 también es posibilitado por el alcance de las realizaciones. El anticuerpo, el fragmento de anticuerpo, la molécula tipo anticuerpo o la molécula con una alta afinidad por un marcador tumoral específico se utilizan para dirigir el conjugado del péptido a una diana celular o tisular específica. Por ejemplo, un tumor con un antígeno de superficie distintivo o un antígeno expresado puede ser la diana de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una molécula de unión tipo anticuerpo, y las células del tumor pueden ser eliminadas por el péptido. Dicho método que utiliza anticuerpos dirigidos tiene las ventajas anticipadas de disminuir la dosis, aumentar la probabilidad de unión a, y de absorción por, las células diana, y mayor utilidad para focalizarse en, y tratar, tumores metastásicos y tumores de tamaños microscópicos.  
30

Esta realización también posibilita el uso de los péptidos de la invención conjugados o ligados o enlazados a una proteína u otra molécula para formar una composición que, al momento de la escisión en el sitio o sitios del tumor o de otras células no deseadas, o cerca de éstos, por una enzima o proteasa específica del sitio o el tumor, o por un anticuerpo conjugado dirigido al tumor u otras células no deseadas, libera el péptido en el sitio o sitios del tumor o de otras células no deseadas o cerca de éstos.  
35

Esta realización también posibilita el uso de péptidos de la invención conjugados o ligados o enlazados a una proteína u otra molécula para formar una composición que libera el péptido o algún fragmento biológicamente activo del péptido, en el momento de la exposición del tejido a tratar a la luz (como en terapias con láser u otro tratamiento fotodinámico o fotoactivado), otras formas de radiación electromagnética como radiación infrarroja, radiación ultravioleta, radiación de rayos X o radiación gamma, calor localizado, radiación alfa o beta, emisiones de ultrasonidos u otras fuentes de energía localizada.  
40  
45

Los péptidos de la invención se pueden emplear solos, juntos, o en combinación con otras composiciones farmacéuticas, como citocinas, factores de crecimiento, antibióticos, inductores de la apoptosis, antiinflamatorios, y/o antineoplásicos según sea apropiado para la indicación en tratamiento.  
50

Esta realización también posibilita composiciones terapéuticas de los péptidos que emplean dendrímeros, fullerenos y otras moléculas, polímeros y macromoléculas sintéticos en las que el péptido o su correspondiente molécula de ADN está conjugado a, unido a, o dentro de, la molécula, polímero o macromolécula, solo o junto con otra especie de la molécula como un marcador específico del tumor. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5,714,166  
55 Bioactive and/or Targeted Dendimer Conjugates, proporciona un método para preparar y usar, entre otros, conjugados de polímeros dendríticos compuestos por al menos un dendrímero con uno o más orientadores a la diana y al menos un agente bioactivo conjugado a él. La divulgación de la patente de los Estados Unidos N° 5,714,166 se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

Esta realización también posibilita composiciones terapéuticas de los péptidos y/o genes y vehículos de administración de fármacos como emulsiones lipídicas, polímeros micelares, microsferas de polímeros, polímeros electroactivos, hidrogeles y liposomas.  
60

El uso de los péptidos o genes relacionados o equivalentes del gen transferidos a las células no deseadas, también

es posibilitado por las realizaciones. La sobreexpresión del péptido dentro del tumor se puede utilizar para inducir a las células del tumor a morir y así reducir la población de células tumorales. Se espera que la transferencia del gen o el equivalente del gen del péptido para tratar los elementos celulares no deseados tenga la ventaja de requerir menos dosis y de pasar a la progenie celular de los elementos celulares destinatarios, con lo que se requeriría una

5 terapia menos frecuente y menos total. Esta realización también abarca la transferencia de genes que codifican una proteína de fusión que contiene un péptido de la invención a las células no deseadas o células vecinas donde, después de la expresión del gen y de la producción y/o secreción de la proteína de fusión, la proteína de fusión es escindida por enzimas nativas o proteasas o por un profármaco para liberar el péptido en, o cerca de, las células no deseadas.

10 El uso de conjugados de péptido recombinante clonado-anticuerpo; conjugados de fragmento de péptido recombinante clonado-anticuerpo; y conjugados de péptido recombinante clonado-proteína tipo anticuerpo, también es posibilitado por las realizaciones. Las ventajas de un péptido clonado combinado con un conjugado de focalización (como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula tipo anticuerpo o una molécula con una alta

15 afinidad por un receptor específico del cáncer o de otros marcadores tumorales) son que dicha molécula combina las ventajas de la focalización descritas antes, además de las ventajas para la fabricación y producción estandarizada de la molécula conjugada clonada.

20 Esta realización también posibilita el uso de composiciones terapéuticas de los péptidos de la invención o genes o equivalentes de los genes como un componente del recubrimiento de un dispositivo médico como un stent para eliminar, inhibir o impedir la proliferación o acumulación celular no deseada.

25 Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo se mezcla con al menos uno de los siguientes: (a) uno o más excipientes o vehículos inertes como citrato de sodio o fosfato dicálcico; (b) rellenos o diluyentes como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (c) aglutinantes como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; (d) humectantes como glicerol; (e) desintegrantes como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos y carbonato de sodio; (f) retardadores de la solución como parafina; (g) aceleradores de la absorción como compuestos de amonio cuaternario; (h) humectantes como acetil alcohol y monoestearato de glicerol; (i) adsorbentes como caolín y bentonita; y (j) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio o sus mezclas. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las pastillas, las formas farmacéuticas también pueden contener amortiguadores.

30

35 Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en el área, como agua u otros solventes, solubilizantes y emulsionantes. Los ejemplos de emulsionantes son alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1, 3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, como el

40 aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuate, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerina, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias y análogos.

45 Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes como humectantes, emulsionantes y suspendentes, edulcorantes, saborizantes y aromatizantes.

50 Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones de las realizaciones pueden variar para obtener una cantidad de péptido S05A que sea eficaz para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición y un método de administración particulares. El nivel de dosis seleccionado depende del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento y otros factores.

55 En el caso de los mamíferos, incluidos los seres humanos, se pueden administrar cantidades eficaces basándose en el área de superficie corporal. La interrelación entre las dosis para animales de diversos tamaños, especies y seres humanos (basadas en mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal) es descrita por E. J. Freireich et al., *Cancer Chemother. Rep.*, 50 (4):219 (1966). El área de superficie corporal se puede determinar aproximadamente a partir de la altura y el peso de un individuo (véase por ejemplo, *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y. pp. 537-538 (1970)).

60 La dosis diaria total del péptido a administrar a un huésped puede ser una dosis única o fraccionada. Las composiciones de la unidad de dosificación pueden contener dichas cantidades de dichos submúltiplos de éstas de forma de constituir la dosis diaria. Sin embargo, se comprenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular, dependerá de diversos factores que incluyen el peso corporal, el estado general de salud, el género, la dieta, la hora y la vía de administración, la concentración del fármaco administrado, las velocidades de absorción y excreción, la combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad específica que se está tratando.

Un método para administrar una composición de un péptido de acuerdo con las realizaciones incluye administrar los compuestos por vía intramuscular, oral, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intratumoral, intralesional, intradérmica, intratecal, intranasal, intraocular, intraarterial, tópica, transdérmica, mediante un aerosol, mediante infusión, inyección en bolo, dispositivo de implantación, sistema de liberación sostenida, etc.

Otro método para administrar un péptido de las realizaciones es por vía transdérmica o transcutánea. Un ejemplo de dicha realización es el uso de un parche. En particular, un parche se puede preparar con una suspensión fina del péptido, por ejemplo, en dimetilsulfóxido (DMSO), o una mezcla de DMSO con aceite de semilla de algodón y ponerlo en contacto con la piel de los mamíferos que tienen el tumor, alejado del sitio de localización del tumor, dentro de una bolsa de piel. Otros medios, o mezclas con otros solventes y soportes sólidos funcionarían de la misma manera. El parche puede contener el compuesto peptídico en forma de una solución o una suspensión. Después el parche se puede aplicar a la piel del paciente, por ejemplo, introduciéndolo en una bolsa de piel del paciente formada plegando y sosteniendo la piel entre sí por medio de puntadas, clips u otros dispositivos de sujeción. Esta bolsa deberá utilizarse de tal manera que el contacto continuo con la piel esté asegurado sin injerencia del mamífero. Además de usar una bolsa de piel, se puede usar cualquier dispositivo que asegure la colocación firme del parche en contacto con la piel. Por ejemplo, se podría utilizar un vendaje adhesivo para fijar el parche a la piel.

Los péptidos se pueden administrar en una formulación o preparación de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida son matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida son poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (patente de los Estados Unidos. N° 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556), poli(2-hidroxietilmetacrilato) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 ), etileno vinil acetato (Langer et al., supra) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988) Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar por cualquiera de los diversos métodos conocidos en el área (por ejemplo, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 ; EP 36,676; EP 88,046; y EP 143,949).

Otro método para administrar un péptido de las realizaciones es mediante infusión directa o indirecta del péptido en el tumor u otro tejido a tratar. Un ejemplo de dicha realización es la inyección directa del péptido en el tumor u otro tejido a tratar. El tratamiento puede consistir en una sola inyección, inyecciones múltiples en una ocasión o una serie de inyecciones durante un período de horas, días o meses controlando la regresión o destrucción del tumor u otro tejido a tratar mediante biopsia, imagenología u otros métodos de control del crecimiento del tejido. La inyección en el tumor u otro tejido a tratar puede ser mediante un dispositivo que se introduce en un orificio como nariz, boca, oídos, vagina, recto o uretra o a través de una incisión para llegar al tumor o al tejido in vivo y se puede realizar conjuntamente con un sistema de imagenología u óptico como ultrasonido o fibra óptica para identificar el sitio adecuado para la inyección o inyecciones. Otro ejemplo de dicha realización es el uso de un dispositivo que puede proporcionar en el tiempo una infusión constante de péptido S05A al tejido.

Otro método para administrar un péptido de las realizaciones es en combinación con un procedimiento quirúrgico o similar empleado para escindir físicamente, extirpar o de lo contrario eliminar o destruir el tumor u otros elementos tisulares o celulares que sea necesario o se desee que sean retirados o destruidos, en el cual un péptido de las realizaciones se administra a las zonas inmediatas que rodean las zonas de donde se quitó el tumor u otro tejido para destruir o impedir la proliferación de las células de cualquier tumor u otros elementos celulares no retirados ni destruidos por el procedimiento.

Otro método para administrar un péptido de las realizaciones es mediante implantación de un dispositivo dentro del tumor u otro tejido a tratar. Un ejemplo de dicha realización es la implantación de una oblea que contiene el péptido, en el tumor u otro tejido a tratar. La oblea libera en el tiempo una dosis terapéutica del péptido en el tejido. Alternativa o adicionalmente, la composición se puede administrar localmente mediante la implantación en la zona afectada de una membrana, esponja u otro material adecuado en el cual el péptido ha sido absorbido. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier órgano o tejido adecuado, y la administración del péptido puede ser directamente a través del dispositivo por medio de un bolo, o por medio de administración continua o mediante un catéter usando infusión continua.

Un método alternativo de administración es introducir una o varias copias de un gen que codifica un péptido en la célula diana y, si es necesario, inducir a la copia o copias del gen a comenzar a producir péptido intracelularmente. Una manera en la cual se puede aplicar genoterapia consiste en utilizar el gen que codifica el péptido S05A (ADN genómico, ADNc, o ADN sintético que codifica el péptido (o un fragmento, variante, homólogo o derivado del mismo)) que se podría unir operativamente a un promotor inducible o constitutivo para formar un constructo de ADN para genoterapia. El promotor puede ser homólogo o heterólogo a un gen endógeno que codifica el péptido, siempre que sea activo en el tipo de célula o tejido en el cual se introducirá el constructo. Otros componentes del constructo

- de ADN de genoterapia pueden incluir opcionalmente, según sea necesario, moléculas de ADN diseñadas para la integración específica del sitio (por ejemplo, secuencias flanqueantes endógenas útiles para recombinación homóloga), promotor, potenciadores o silenciadores específicos del tejido, moléculas de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, moléculas de ADN útiles como marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativos, agentes de unión específicos de la célula (como por ejemplo, para focalización en la célula) factores de internalización específicos de la célula y factores de transcripción para aumentar la expresión mediante un vector, así como factores para permitir la fabricación de un vector.
- Los medios de administración de genes a una célula o tejido in vivo o ex vivo incluyen la inyección directa de ADN desnudo, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptor (complejo ligando-ADN), electroporación y precipitación con fosfato de calcio. Véanse la patente de los Estados Unidos. N° 4,970,154, WO 96/40958, la patente de los Estados Unidos N° 5,679,559, la patente de los Estados Unidos N° 5,676,954 y la patente de los Estados Unidos. N° 5,593,875. También incluyen el uso de un vector viral como un retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociado, poxvirus, lentivirus, virus del papiloma o virus del herpes simple, uso de un conjugado ADN-proteína y uso de un liposoma. El uso de vectores de genoterapia se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 5,672,344, la patente de los Estados Unidos. N° 5,399,346, la patente de los Estados Unidos N° 5,631,236 y la patente de los Estados Unidos N° 5,635,399.
- El gen que codifica el péptido se puede administrar a través de la implantación en los pacientes de ciertas células que han sido diseñadas genéticamente ex vivo, utilizando métodos como los descritos en este documento, para expresar y secretar el péptido. Dichas células pueden ser células animales o humanas y se pueden derivar del tejido del propio paciente o de otra fuente, ya sea humana o no humana. Opcionalmente, las células se pueden immortalizar o ser células madre. Sin embargo, con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, se prefiere que las células sean encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son generalmente recintos poliméricos biocompatibles, semipermeables o membranas que permiten la liberación de los productos proteicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes. Los métodos utilizados para la encapsulación de la membrana de las células son conocidos por los técnicos, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en los pacientes se puede llevar a cabo sin experimentación indebida. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N° 4,892,538; 5,011,472 y 5,106,627. Se describe un sistema para encapsular células vivas en PCT WO 91/10425. Las técnicas para formular una diversidad de otros medios de liberación sostenida o controlada, como vehículos de liposomas, partículas bioerosionables o perlas, también son conocidas en el área y se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 5,653,975. Las células, con o sin encapsulación, se pueden implantar en tejidos u órganos adecuados del paciente.
- Las realizaciones particularmente preferidas de métodos de tratamiento de un trastorno que requiere la eliminación o destrucción de células mediante administración de uno o más péptidos de las realizaciones, y las células que debían eliminarse o destruirse son tejido linfoide presente. Otras realizaciones preferidas incluyen el tratamiento de las afecciones que requieren la eliminación o destrucción de células como cualquiera seleccionada individualmente o en combinación entre hipertrofia amigdalina, hiperplasia prostática, enfermedad vascular (aterosclerosis o arteriosclerosis), hemorroides, venas varicosas, psoriasis, eczema, dermatosis y una modificación estética a un tejido. Otras afecciones tratables incluyen estenosis, reestenosis, oclusión u obstrucción de una arteria o de un stent colocado o implantado en una arteria. Tejido adecuado que puede ser tratado en las realizaciones preferidas incluye piel, ojo, oído, nariz, garganta, boca, músculo, conectivo, pelo y mama.
- Otras afecciones preferidas: tratadas según las realizaciones incluyen las seleccionados entre una enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad metabólica, enfermedad genética/hereditaria, enfermedad traumática o lesión física, enfermedad por deficiencia nutricional, enfermedad infecciosa, enfermedad amiloidea, enfermedad por fibrosis, tesaurismosis, malformación congénita, enfermedad por deficiencia enzimática, envenenamiento, intoxicación, enfermedad ambiental, enfermedad por radiación, enfermedad endocrina, enfermedad degenerativa y enfermedad mecánica. En otra realización preferida, el péptido se conjuga, liga o enlaza a una molécula seleccionada entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una molécula de unión tipo anticuerpo, donde dicha molécula tiene una mayor afinidad por unirse a un tumor u otra diana que por unirse a otras células. En otra realización, el péptido es parte de una sola molécula recombinante clonada nueva que consta del péptido y una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula de unión tipo anticuerpo, donde la molécula tiene mayor afinidad por unirse a un tumor u otra diana que por unirse a otras células.
- Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar las realizaciones de la presente. Sin embargo, se debe entender que las realizaciones no se deben limitar a las afecciones específicas ni a los detalles descritos en estos ejemplos.

En particular, se hace referencia a los ejemplos contenidos en la solicitud de patente pendiente de los Estados

Unidos Ser. N° 10/092,934, Methods of Treating Tumors and Related Conditions Using Neural Thread Proteins, que da a conocer que la proteína AD7c entera es un agente eficaz para causar la muerte celular tanto in vitro en cultivos de células de glioma y neuroblastoma como in vivo en el tejido muscular normal de roedores, tejido conectivo subcutáneo y dermis, y en una variedad de tumores diferentes de origen humano y no humano, incluidos carcinoma mamario, carcinoma de piel y papiloma, carcinoma de colon, glioma cerebral y otros, en modelos de roedores. También se hace referencia a los ejemplos contenidos en las solicitudes de patente pendientes de los Estados Unidos Ser. N° 10/153,334, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o destrucción de células; Ser. N° 10/198,069, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o destrucción de células; Ser. N° 10/198,070, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o destrucción de células, Ser. N° 10/294, 891 titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o destrucción de células; y Ser N° 10/920,313 titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o destrucción de células, cada una de cuales da a conocer que ciertos péptidos especificados en ellas son agentes eficaces para causar la muerte celular in vivo en el tejido muscular normal de roedores, el tejido conectivo subcutáneo, la dermis, y otros tejidos.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

El propósito de este ejemplo fue determinar el efecto de péptidos S05A sobre los tejidos, en los sitios de inyección.

Los péptidos S05A siguientes se sintetizaron usando métodos estándar:

S05A -2 (SEC. ID N°: 2) IDQQVLSRI (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile);

S05A-3 (SEC. ID N°: 3) KLEIKRCL (Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu);

S05A-4 (SEC. ID N°: 4) VLSRIK (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys);

S05A-5 (SEC. ID N°: 5) RIKLEIK (Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys);

S05A-6 (SEC. ID N°: 6) VLSRIKLEIKRCL (val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu);

S05A-7 (SEC. ID N°: 7) IDQQVLSRIKLEI (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile).

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley machos (rango de peso 300 gramos) con éter y se les administró uno de los péptidos S05A anteriores mediante infusión intraprostática, una inyección de solución salina normal de control o ninguna inyección, después de cirugía abierta de visualización de la próstata. Las inyecciones consistieron en 300 µl del péptido S05A 1 mg/mL en PBS pH 7.4. (1.0 mg/kg) (n = 36). Las ratas se sacrificaron sin dolor después de 24 horas (n = 12), 72 horas (n = 12) y 7 días (n = 12). Se disecaron las glándulas prostáticas, se fijaron en formalina al 10% amortiguada, durante 24 horas, se incluyeron en parafina, se cortaron y se tiñeron con H & E. Para cada animal se incluyó y se cortó toda la glándula prostática. Todos los cortes teñidos se examinaron histológicamente y se midieron. Para cada próstata se examinaron al menos 2 cortes histológicos y para cada corte histológico se midieron dos diámetros transversales (D) a 90° entre sí (total ≥8 mediciones por próstata). La media de los diámetros transversales (D) para cada grupo se utilizó para estimar el volumen según  $V = 4/3\pi(D/2)^3$  y se calculó el volumen medio para cada grupo. Se evaluaron los cambios histológicos en la siguiente escala:

-	Ausente
+	Presente, mínimo
++	Presente, moderado
+++	Presente, moderado y difuso
++++	Presente, difuso y extenso

Resultados: la tabla 4 a continuación expone los cambios histológicos de muerte celular observados.

Tabla 4.

Péptido S05A	Cambios histológicos de muerte celular a las 24 horas	Cambios histológicos de muerte celular a las 72 horas
S05A-2	++++	++++
S05A-3	+	+
S05A-4	+	+
S05A-5	+	+
S05A-6	+	+

Péptido S05A	Cambios histológicos de muerte celular a las 24 horas	Cambios histológicos de muerte celular a las 72 horas
S05A-7	++++	++++

Estudios de control previos de inyecciones de 1 mg/mL de PBS solo mostraron ausencia de cambios o cambios histológicos mínimos, que consistieron en inflamación focal leve por las agujas (véase los ejemplos contenidos en las solicitudes de patente pendientes de los Estados Unidos Ser. N° 10/153,334, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células; Ser. N° 10/198,069, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células; Ser. N° 10/198,070, titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células, Ser. N° 10/294, 891 titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células; y Ser. N° 10/920,313 titulada: Péptidos eficaces en el tratamiento de tumores y otras afecciones que requieren la eliminación o la destrucción de células, incorporadas por referencia).

La tabla 5 a continuación expone los cambios de volumen observados.

15

Tabla 5.

Péptido S05A	Volumen medio calculado (mm <sup>3</sup> )			
	24 Horas	72 Horas	7 días	Global
S05A-2	180	249	165	198
S05A-3	249	435	463	382
S05A-4	357	408	333	366
S05A-5	249	408	392	350
S05A-6	310	493	408	404
S05A-7	180	165	357	234

20

La reducción global en el volumen prostático en las ratas a las que se les inyectaron los péptidos So5A, S05A-2 y S50A-7 se estimó que fue en promedio >40% en comparación con los controles. Las ratas tratadas con S50A-2 y S50A-7 mostraron amplia muerte celular, necrosis, pérdida de epitelio glandular y atrofia. Los controles mostraron ausencia de cambios o cambios mínimos que consistieron en inflamación aguda en los sitios de inyección y microhemorragias focales por las agujas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado que consiste en un péptido seleccionado del grupo que consta de:
  - 5 a) el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N° 2 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile); y
  - b) el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N° 7 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile).
- 10 2. Una composición que comprende al menos uno de los péptidos reivindicados en la reivindicación 1 y un vehículo.
3. Un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente a por lo menos uno de los péptidos reivindicados en la reivindicación 1.
- 15 4. Una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos como como los reivindicados en la reivindicación 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. El péptido como el reivindicado en la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, seleccionada del grupo que consiste en un tumor benigno de un tejido, un tumor maligno de un tejido, una hiperplasia de un tejido, una hipertrofia de un tejido, un crecimiento excesivo de un tejido, un tejido alterado por virus, un tejido alterado por bacterias, un tejido alterado por parásitos y una malformación de un tejido.
- 25 6. El péptido de la reivindicación 1 para usar en el tratamiento como el reivindicado en la reivindicación 5, en el cual el péptido se administra por un método seleccionado del grupo que consiste en vía oral, subcutánea, intradérmica, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal, intratumoral, tópica y transdérmica.
- 30 7. El péptido de la reivindicación 1 para usar en el tratamiento como el reivindicado en la reivindicación 5, donde el método se lleva a cabo en el mamífero antes, durante o después del tratamiento del mamífero con un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en escisión quirúrgica, trasplante, injerto, quimioterapia antineoplásica, inmunoterapia, vacunación, ablación térmica o eléctrica, crioterapia, terapia con láser, fototerapia, genoterapia y radiación.
- 35 8. El péptido de la reivindicación 1 para usar en el tratamiento como el reivindicado en la reivindicación 5, en el cual el tejido se selecciona del grupo que consiste en pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, senos paranasales, colon, intestino, estómago, recto, esófago, corazón, bazo, glándula salival, sangre, cerebro y sus revestimientos, médula ósea y sus revestimientos, músculo, tejido conectivo, suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, hipófisis, órganos reproductores, hígado, vesícula, ojo, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, y ganglios linfáticos y sistema linfoide.