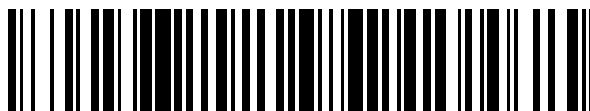


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 863**

51 Int. Cl.:

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010 E 10712217 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2411043**

54 Título: **Tratamiento del cáncer con polipéptidos inmunoestimuladores derivados de Tat del VIH**

30 Prioridad:

03.03.2010 US 310221 P

19.02.2010 US 306278 P

23.03.2009 US 162605 P

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

05.12.2013

73 Titular/es:

**PIN PHARMA, INC. (100.0%)
Audubon Technology and Business Center, 3960
Broadway, Suite 206
New York, NY 10032-1543, US**

72 Inventor/es:

COHEN, DAVID, I.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 432 863 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del cáncer con polipéptidos inmunoestimuladores derivados de Tat del VIH

Referencia a solicitudes de patente relacionadas**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al campo de los agentes terapéuticos inmunitarios para el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El transactivador de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un péptido de unión a ARN variable de 86 a 110 aminoácidos de longitud que está codificado en dos exones diferentes del genoma del VIH. El Tat está muy conservado entre todos los lentivirus humanos y es esencial para la replicación vírica. Cuando el Tat del lentivirus se une a la región TAR (respondedora a la transactivación) del ARN, los niveles de transcripción (conversión del ARN vírico en ADN y después a ARN mensajero) aumentan significativamente. Se ha demostrado que el Tat aumenta la transcripción del ARN vírico y se ha propuesto que el Tat puede iniciar la apoptosis (muerte celular programada) en los linfocitos T4 y los macrófagos (una parte clave del sistema de vigilancia inmunitario del organismo para la infección del VIH) y posiblemente estimula la sobreproducción de alfa-interferón (el α -interferón es una citocina inmunosupresora bien establecida).

15 La presencia de Tat extracelular en la evolución de la infección por VIH podría reducir la respuesta inmunitaria del paciente, lo que proporciona al virus una ventaja sobre el huésped. Además, la destrucción directa de los linfocitos T y la inducción de la producción de α -interferón podría ayudar a explicar la falta de una respuesta inmunitaria celular sólida que se ve en los pacientes de síndrome de deficiencia adquirida (SIDA), además de ser la responsable de la profunda inmunosupresión inicial.

20 No obstante, la proteína Tat aislada de pacientes infectados por VIH que no progresan durante un tiempo prolongado (LTNP) es diferente del C-Tat hallado en los pacientes con SIDA. La proteína Tat hallada en LTNP puede transactivar el ARN vírico, no obstante, el Tat de LTNP (en lo sucesivo en el presente documento denominado IS-Tat para Tat inmunomodulador) no induce apoptosis en linfocitos T4 o macrófagos y no es inmunosupresor. Además, los linfocitos T4 infectados ex vivo con VIH aislado de LTNP (estas líneas celulares se denominan Tat TcL) pueden dar lugar a la sobreexpresión de las proteínas IS-Tat, a menudo a la exclusión virtual de otras proteínas víricas, que son potentes estimuladores del crecimiento en lugar de pro-apoptóticos. Los genes Tat clonados de estas Tac TcL revelan variaciones de secuencia en dos regiones Tat, en el extremo amino y dentro de la primera parte del segundo exón. Estos sorprendentes descubrimientos podrían ayudar a explicar por qué los linfocitos T4 LTNP infectados por el VIH no mueren a la asombrosa velocidad que se ha visto en individuos infectados por el VIH que evolucionan a SIDA.

25 Adicionalmente, se encuentran variantes de Tat en los lentivirus que infectan especies de mono, aunque no dan lugar al desarrollo de inmunodeficiencia y a infección epidémica. Estas proteínas Tat variantes dirigen la diferenciación de los monocitos en células dendríticas (CD) que estimulan las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (LTC). Estas variantes Tat de simios y otras variantes Tat que no son inmunosupresoras se han denominado Tat inmunoestimuladoras (IS-Tat) o atenuadas.

30 En base a las observaciones con líneas de linfocitos T Tat CD4+, observaciones clínicas y experimentos en animales, la proteína Tat atenuada (más específicamente IS-Tat o, como alternativa, proteínas Tat que se han modificado química o físicamente) puede actuar como linfocitos T4 activadores estimulantes del sistema inmunitario que inducen su proliferación. Este principio puede ayudar a explicar los niveles estables de T4 observados en los LTNP. Además, las Tat atenuadas pueden ser útiles como adyuvantes cuando se administran junto con otros componentes vacunales activos, tales como, entre otros, vacunas para otros virus, bacterias, rickettsia y células cancerosas.

35 Los cánceres y las infecciones crónicas son los ejemplos más importantes de enfermedades humanas comunes que responden a tratamientos inmunitarios. Aunque las infecciones han sido las primeras enfermedades combatidas mediante inmunización, en los ensayos clínicos realizados en seres humanos se ha establecido que una respuesta inmunitaria, en particular de la rama de los LTC del sistema inmunitario, podía remitir algunos melanomas y cánceres renales humanos. Estas observaciones se ampliaron con el descubrimiento de que las CD, una clase específica de células presentadoras de antígenos (CPA) son particularmente eficaces en el inicio de la actividad de los LTC contra cánceres y otras enfermedades. Las tecnologías que están dirigidas a las CD y las activan han proporcionado algunos éxitos tempranos contra las pre-neoplasias malignas cervicales causadas por infección por el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de pulmón humano. En contraste con los fármacos quimioterapéuticos que actualmente se usan contra el cáncer, los agentes que provocan respuesta de los LTC contra el cáncer se acompañan potencialmente de pocos efectos secundarios debido a la gran especificidad de la respuesta inmunitaria.

40 Los esfuerzos para desarrollar fármacos inmunoterapéuticos que traten el cáncer se han visto retrasados por las dificultades técnicas a la hora de apuntar a las CD y activarlas, para liberar y mantener las señales de entrada a los

LTC requeridas. El antígeno dirigido a la inducción de una respuesta de LTC es un reto en cuanto que el procesamiento natural requiere que el antígeno entre en el citoplasma de la célula para unirse al antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I del sistema inmunitario, un requisito previo para la activación de los LTC porque el ligando para activar el receptor de los linfocitos T en las LTC es un complejo de antígeno y MHC de clase I. En casi todos los casos, los antígenos proteicos, incluso cuando están acoplados al coactivador de las CD, entran exclusivamente en la vía de presentación del antígeno de MHC de clase II alternativa que excluye la estimulación de los LTC. Esto puede superarse, en parte, con tecnologías basadas en péptidos, porque los péptidos se unen al MHC de clase I que ya está en la superficie de las CD. No obstante, esta tecnología es inespecífica y la mayoría de los péptidos son poco activadores de las CD, lo que limita su eficacia como tratamientos del cáncer para seres humanos.

Se sabe que un grupo limitado de proteínas biológicas estimula una respuesta de LTC. Variantes y derivados del transactivador de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) puede estimular esta respuesta de los LTC. Productos biológicos adicionales que actualmente se sabe que desencadenan directamente una respuesta de LTC están basados en las proteínas del choque térmico (HSP) o en la proteína de la cubierta externa de determinadas bacterias. Las proteínas del choque térmico han mostrado una eficacia limitada en el tratamiento de determinadas neoplasias genitales relacionadas con la infección por el VPH.

El cáncer de mama es una causa principal de muerte relacionada con el cáncer en las mujeres de todo el mundo. Anualmente se producen aproximadamente 1 millón de nuevos casos de cáncer de mama que tienen como resultado 370.000 muertes en todo el mundo. En EE.UU. se diagnostican más de 200.000 casos nuevos de cáncer de mama invasivo todos los años y aproximadamente 45.000 muertes se atribuyen a esta enfermedad, o que hace del cáncer de mama la segunda causa principal de mortalidad por cáncer en EE.UU. entre el sexo femenino y la quinta causa más importante de muertes por cáncer en general. Después de un descenso constante de la morbilidad por cáncer de mama, la supervivencia media del cáncer de mama desde el momento del diagnóstico de enfermedad ampliamente invasiva (estadio 4) no ha cambiado en las últimas dos décadas. La tasa de supervivencia a cinco años para el cáncer de mama en estadio 4 sigue en aproximadamente un 20% desde 1988, lo que significa que las ventajas sobre la supervivencia de los agentes más recientes han llegado a término en lo referente a enfermedad terminal.

El tratamiento del cáncer de mama como adyuvante ha experimentado significativas mejoras en los últimos cuarenta años. Además de mejores tumorectomía, radioterapia, quimioterapia convencional y tratamiento de sustitución hormonal, han emergido nuevas clases de terapias con distintos mecanismos oncolíticos, tales como TAXOL® y HERCEPTIN®. HERCEPTIN® ha sido el último de estos agentes en ser introducido en 2003. No se ha expandido significativamente para los pacientes desde 2007. Adicionalmente, la eficacia de HERCEPTIN® se limita a únicamente el 20% de las mujeres con cáncer de mama, aquellas que sobreexpresan el oncogen Her2/neu de un modo más predominante. Por tanto se necesitan nuevos y más agentes obliterantes para combatir y evitar el cáncer de mama.

En investigación para mejorar el tratamiento de muchos cánceres, la inmunoterapia es un mecanismo dirigido que podría controlar el crecimiento tumoral y evitar metástasis al mismo tiempo que se evitan muchos de los efectos secundarios asociados con las terapias estándar. Esta última consideración es particularmente importante en cuanto a que el cáncer de mama es una enfermedad que afecta de un modo desproporcionado a mujeres más jóvenes en edad fértil. Las primeras investigaciones sobre inmunoterapia en el cáncer de mama se ha centrado en modos de dirigir la respuesta inmunitaria natural contra las células cancerosas administrando una vacuna o anticuerpo monoclonal para un antígeno del cáncer de mama. Aunque este abordaje ha significado mucho debido a que el cáncer de mama es una rica fuente de proteínas específicas de los tumores (p. ej., los antígenos de la lactancia mamaglobina A y lactadherina entre otros), se ha probado en gran medida que no tiene éxito porque el anticuerpo, en contraste con la activación de los linfocitos T citolíticos, parece tener una utilidad limitada para combatir el crecimiento de tumores sólidos en la mayoría de las situaciones.

La siguiente generación de inmunoterapias para el cáncer de mama se ha centrado en modos de potenciar la respuesta inmunitaria anti-cáncer de mama preexistente del paciente en base a la teoría de que la supresión inmunológica también ha limitado la eficacia de estrategias dirigidas a tumores. Una de estas inmunoterapias es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CTLA4, un receptor sobre los linfocitos T citolíticos implicados en la supresión. Aunque parecen algo prometedores contra el melanoma y el cáncer de ovarios, se ha visto que los anti-CTLA4 son ineficaces como agentes individuales en modelos animales de cáncer de mama, incluidos los usados en los estudios notificados en el presente documento. Una segunda clase de inmunoestimulantes evaluados en los cánceres, los agonistas del receptor de tipo Toll (TLR) funcionan iniciando nuevas señales desencadenantes en el sistema inmunitario de células dendríticas derivadas de monocitos. Hasta la fecha, estos agentes han exhibido una utilidad limitada en la mayoría de los cánceres sólidos, incluido el cáncer de mama, porque rápidamente inducen inmunosupresión concomitante a la activación de los linfocitos T.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana inicia una inmunosupresión progresiva que, en ausencia de tratamiento, progresa de forma rutinaria a SIDA y, después, a la muerte del individuo infectado. Dado que la inmunosupresión está implicada en varios modelos de evolución de cáncer sólido, incluido el cáncer de mama, no es sorprendente que las personas infectadas por el VIH tengan mayor riesgo de diversas neoplasias malignas,

específicamente linfoma no Hodgkin (LNH), sarcoma de Kaposi (SK) y cáncer cervicouterino invasivo, que son cánceres que definen el SIDA en individuos infectados por el VIH. Paradójicamente, al menos tres grupos han notificado un menor riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres con enfermedad por VIH progresiva. Las mujeres infectadas por el VIH tienen un patrón estadísticamente significativo de disminución del riesgo relativo (RR) para el cáncer de mama en comparación con la población francesa general. Tras una epidemia de SIDA en Tanzania, un segundo grupo ha hallado una disminución estadísticamente significativa de la incidencia del cáncer de mama tanto en mujeres como en varones. En tercer lugar, un consorcio de EE.UU. que analiza más de 8.500 casos de enfermedad por VIH evolutiva notificó una disminución del riesgo estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el desarrollo del cáncer de mama que pasó al nivel basal cuando se alcanzó el control de la replicación vírica.

10 **Sumario de la invención**

En el presente documento se divulgan derivados de la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) para usar como agentes inmunoterapéuticos para el cáncer.

15 En una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), teniendo la secuencia de aminoácidos modificada una identidad de secuencia mayor del 95% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4. La composición puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 3.

20 En otra realización, se proporciona un polipéptido derivado de Tat que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el que dicha secuencia de aminoácidos modificada tiene una identidad de secuencia mayor del 95% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4 para usar en el tratamiento del cáncer causando el cese del crecimiento de dicho cáncer o la regresión de dicho cáncer en un sujeto o para usar en la reducción de la carga del tumor causando la regresión de dicho cáncer en un sujeto.

25 En otra realización, se proporciona el uso de un polipéptido derivado de Tat que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el que dicha secuencia de aminoácidos modificada tiene una identidad de secuencia mayor del 95% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4, en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer causando el cese del crecimiento de dicho cáncer o la regresión de dicho cáncer en un sujeto o para reducir la carga del tumor causando la regresión de dicho cáncer en un sujeto.

El polipéptido derivado de Tat se puede administrar en una pluralidad de dosis.

35 La etapa de administración puede comprender un ciclo de administración repetida en la que cada ciclo comprende administrar una pluralidad de dosis del polipéptido derivado de Tat en un periodo de tiempo definido seguido de un periodo de descanso y en la que el ciclo se repite una pluralidad de veces. Como alternativa, la etapa de administración puede comprender un ciclo de administración repetida en la que cada ciclo comprende administrar una pluralidad de dosis del polipéptido derivado de Tat en un periodo de tiempo definido seguido de una administración de una o una pluralidad de dosis de un agente terapéutico en un periodo de tiempo definido y en la que el ciclo se repite una pluralidad de veces.

El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, ciclofosfamida.

40 El cáncer, por ejemplo, puede ser cáncer de mama o cáncer de ovarios.

El polipéptido derivado de Tat puede tener, por ejemplo, una identidad de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 representa la estimulación de monocitos humanos con derivados de Tat.

45 La FIG. 2 representa una curva de dosis-respuesta de la estimulación de monocitos humanos con derivados de Tat.

50 La FIG. 3 representa el efecto del tratamiento con derivados de Tat sobre el crecimiento del tumor 4T1 in Vitro. Ratones BALB/c a los que se inyectó 1×10^4 células tumorales 4T1 recibieron tratamiento con Nani-P1 o Nani-P2 (400 ng, por vía subcutánea [SC]) (FIG. 3A) o Nani-P3 (400 ng o 2 μ g, SC) (FIG. 3B) los días 0, 7, 14 y 21 después de la inyección de células tumorales. El grupo control se trató con PBS. Los datos representan el volumen medio del tumor, barras \pm SE. Cada grupo contenía 10 ratones. Desde el día 15, las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con Nani-P1 o Nani-P2 fueron significativas ($p < 0,05^{**}$). Las diferencias entre el control y Nani-P2 o Nani-P2 fueron muy significativas comenzando el día 22 ($p < 0,01^{**}$). No se observaron diferencias entre Nani-P3 (cualquier dosis) y controles.

La FIG. 4 representa una curva de dosis-respuesta de los efectos de Nani-P2 purificado sobre el crecimiento del tumor de mama 4T1 in vivo. En cuatro grupos de diez ratones BALB/c se implantaron 1×10^4 células 4T1. En tres grupos se administraron dosis crecientes de 0,4 ng, 4 ng y 40 ng por ratón, respectivamente, en el costado izquierdo cuatro veces en 21 días. En el cuarto, el grupo control, se inyectó PBS en el flanco izquierdo. Los datos representan el volumen medio del tumor. Las diferencias entre el grupo control y la dosis de 0,4 ng fueron significativas ($p < 0,5^*$) y la diferencia entre el control y los grupos tratados con 4 ng o 40 ng de Nani-P2 fue muy significativa ($p < 0,1^{**}$, $p < 0,01^{**}$).

La FIG. 5 representa una curva de supervivencia de Kaplan-Meier del tratamiento con Nani-P2 de ratones portadores de tumores de mama 4T1. En los ratones se inyectó s.c. 1×10^4 células 4T1 en la almohadilla mamaria el día 0. El tratamiento se inició el día 0 con cuatro dosis de Nani-P2 (40 ng) administradas s.c. El día 42, el grupo de tratamiento tenía una mejor supervivencia estadísticamente significativa sobre los controles ($**$) (FIG. 5A). En un grupo, el tratamiento se retrasó hasta el día 13, momento en el cual se administró una serie de tres dosis de Nani-P2 (40 ng) semanalmente por vía intravenosa (i.v.), s.c. en los ganglios linfáticos drenantes o intratumoral (i.t.) (FIG. 5B). El beneficio sobre la supervivencia de Nani-P2 i.v. fue estadísticamente significativo el día 47 ($**$), mientras que el beneficio sobre la supervivencia de Nani-P2 s.c. también fue estadísticamente significativa (*).

La FIG. 6 representa la actividad antitumoral de Nani-P2 en modelos de carcinoma de mama TS/A y SM1. Se implantó en los ratones s.c. 1×10^5 células de cáncer de mama TS/A (FIG. 6A) y fueron tratados con dosis crecientes de Nani-P2 (0,4, 4 y 40 ng) s.c. Incluso a la dosis más baja, la diferencia anti-cáncer primario fue muy significativa ($p < 0,01^{**}$), mientras que la dosis de 40 ng fue también muy significativa ($p < 0,01^{***}$). La FIG. 6B representa ratones a los que se ha implantado s.c. 2×10^5 células de cáncer de mama SM1 y que son tratados s.c. con Nani-P2 (40 ng) los días 0, 7, 14 y 21. La diferencia en el crecimiento del tumor primario entre animales SM1 control y tratados con Nani-P2 fue estadísticamente significativa ($p < 0,01^{***}$).

La FIG. 7 representa la producción de INF- γ en esplenocitos de ratón portadores de tumores de mama 4T1. En ratones BALB/c se inyectaron por vía s.c. 1×10^4 células 4T1. Los animales control recibieron inyecciones semanales de PBS, mientras que el tratamiento con Nani-P2 comprendía inyecciones s.c. (40 ng) una vez a la semana iniciadas el día 0 y que continuaron durante 4 semanas. El día 33, cuando los ratones estaban en estado terminal, se les sacrificó, los bazo se recogieron y congelaron como suspensiones de una sola célula hasta el momento del ensayo. En placas de 96 pocillos se sembraron esplenocitos (2×10^5) y 1×10^4 células estimuladoras (S) 4T1 tratadas con mitomicina C (50 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos). Tras 72 horas de estimulación se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de INF- γ usando un kit comercial de ELISA INF- γ . La producción de INF- γ fue significativamente mayor ($p < 0,05^*$) en cultivos de esplenocitos de ratones tratados con Nani-P2 en todas las condiciones del cultivo in vitro. 1: sin reestipulación; 2: IL-4 (50 ng/ml)/GM-CSF (100 mg/ml); 3: células estimuladoras/IL-4/GM-CSF; 4: solo células estimuladoras. La adición de agonistas de IL-4 y GM-CSF (2 y 3) indujo incrementos muy significativos en la producción de INF- γ ($p < 0,01^{**}$).

La FIG. 8 representa la regresión de tumores de mama 4T1 establecidos y la inhibición de metástasis pulmonares por el tratamiento con Nani-P2. En la FIG. 8A, en dos grupos de 10 ratones BALB/c se inyectaron 1×10^4 células 4T1 en la almohadilla mamaria el día 0. En un grupo se administró Nani-P2 (40 ng) semanalmente durante tres semanas comenzando el día 14. Un segundo grupo fue tratado con PBS y se usó como control. La carga tumoral fue muy significativa el día 22 y permaneció así durante todo el ensayo ($p < 0,01^{**}$). Se sacrificó a los ratones cuando el diámetro del tumor alcanzó 15 mm, momento en el cual se contaron las metástasis pulmonares (FIG. 8B). Los datos representan las metástasis pulmonares totales cuantificadas por dos observadores enmascarados para el protocolo del tratamiento ($p < 0,01^{**}$). La FIG. 8C representa la supervivencia.

La FIG. 9 representa el crecimiento del tumor 4T1 y las metástasis pulmonares en ratones BALB/c. En dos grupos de ratones BALB/c se implantó por vía subcutánea (s.c.) 1×10^4 células 4T1, se inyectó en los ratones i.v. 40 ng de Nani-P2 o PBS. El día 28 de tratamiento, se sacrificó a los ratones y los pulmones y el tumor se extrajeron y los nódulos tumorales se contaron a simple vista. Se muestran las fotografías de los tumores y los pulmones, que eran representativas de 10 ratones. Se pueden observar lesiones tumorales blancuzcas sobre la superficie de los pulmones. Tres experimentos dieron resultados similares.

La FIG. 10 representa la regresión de tumores de mama 4T1 establecidos inducida por el tratamiento con Nani-P2. Uno de 10 ratones experimentó una remisión completa y permaneció sin enfermedad durante 50 días, momento en el cual el estudio se terminó. En dos grupos de 10 ratones BALB/c se inyectaron 1×10^4 células 4T1 en la almohadilla mamaria el día 0. En un grupo se administró Nani-P2 (40 ng) por ratón i.v. semanalmente durante tres semanas comenzando el día 14 y el otro grupo fue tratado con PBS y sirvió como control. La diferencia en el crecimiento del tumor primario entre los grupos control y tratados con Nani-P2 fue estadísticamente significativa ($p < 0,01^{**}$).

La FIG. 11 representa el crecimiento del tumor después del tratamiento con varias dosis de Nani-P2 y de ciclofosfamida.

La FIG. 12 representa el beneficio sobre la supervivencia de varias dosis de Nani-P2 y de ciclofosfamida frente a la ciclofosfamida semanal.

Descripción detallada

Se ha diseñado una serie de derivados peptídicos del transactivador de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) artificiales que son muy activos en modelos animales de cáncer de mama. Las moléculas se denominan en el presente documento derivados de Tat o "Estimulantes inmunitarios de precisión" (EINP) y comprenden moléculas Tat que tienen delección de elementos que podrían contribuir a la inmunosupresión mediada por VIH. Uno de estos derivados, Nani-P2), produce regresión de la enfermedad de cáncer de mama metastático establecido. A las dosis notificadas en el presente documento no se asoció una toxicidad significativa con la administración subcutánea o intravenosa de derivados altamente purificados (> 95% de pureza).

A pesar de una abundancia relativa de los antígenos específicos del tumor, se ha demostrado que el cáncer de mama es una diana difícil para los productos inmunoterapéuticos. Se han acumulado pruebas de que el estado resistente del cáncer de mama, y de otros tipos de cáncer, a los productos inmunoterapéuticos, podría proceder de la supresión inmunitaria que acompaña a los cánceres establecidos. Al menos en tres estudios epidemiológicos distintos se ha demostrado que las mujeres con infección por VIH e incluso con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) paradójicamente han estado protegidas frente al desarrollo de cáncer de mama, incluso en la enfermedad en estadio terminal cuando la inmunodeficiencia es prolongada.

En base al análisis molecular, la proteína Tat (SEC ID N° 1) codifica cuatro actividades peptídicas unidas distintas. La presente divulgación describe composiciones polipeptídicas que derivan de la estructura tal del VIH-1 en al menos el primer aminopéptido de un modo que aumenta el potencial inmunoterapéutico del polipéptido. La porción amino terminal de Tat incluye una región peptídica corta de un factor de transcripción nuclear (FT) normalmente flanqueado por restos de prolina. Esta región determina, al menos en parte, el efecto estimulador o supresor del polipéptido Tat para células del sistema inmunitario, en particular células inmunitarias innatas tales como células dendríticas (CD) y macrófagos (células presentadoras de antígenos o CPA). En consecuencia, se ha predicho que las modificaciones en la región del FT puede hacer que los polipéptidos sean más activos en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades crónicas

La proteína Tat del VIH-1 (SEC ID N° 1) MEPVDPRLPEWKHPG
SQPKTACTTCYCKKCCFHCQVCFTKKALGISYGRKKRRQRRRAPEDSQTHQVSPK QQPAPQFRGDPTGPKESKKK-
VERETETHPVD

Mediante análisis *in silico* se ha descubierto que el VIH-1 codifica un corto dominio de unión SH3 idéntico a la secuencia hallada en otra proteína FT, *sin vello* (*hr*) que anteriormente se había demostrado que tenía propiedades inmunosupresoras en ratones. Los ratones portadores de la mutación *hr* desarrollan una alteración de la regulación inmunitaria, ahora con más frecuencia denominada "el desplazamiento TH1 o TH2" necesaria en los individuos afectados por el VIH que progresan a SIDA. Otros análisis establecieron que la secuencia de unión a SH3 derivada del gen *hr* es una característica casi invariable de Tat aislado del VIH-1 y una característica muy consistente del VIH-2. Los individuos infectados por VIH-1 o VIH-2 progresan a SIDA excepto en raras circunstancias.

Por el contrario, los primates infectados por determinadas cepas del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), un lentivirus estrechamente relacionado con el VIH, rara vez progresa a SIDA o lo hace de forma impredecible. Esta observación acoplada al descubrimiento de un fragmento de FT *hr* posiblemente inmunosupresor en tat inmunosupresor del VIH-1 sugirió que algunos primates podrían tener un fragmento del FT diferente (o no) en el extremo amino del Tat del VIS. El Tat de determinados mangabey gris infectados por el VIS con una evolución atenuada de la inmunodeficiencia tiene en su extremo amino un fragmento del FT TARA en lugar del FT *hr*. TARA está asociado con la familia rho de los activadores de la GTPasa que están implicados en determinadas activaciones oncogénicas.

Los ensayos con animales con derivados de proteínas Tat producidos de forma recombinante en tres modelos murinos diferentes ampliamente afectados de cáncer de mama, 4T1, SM1 y TS/A respaldaron que estos derivados Tat son activos en la supresión del crecimiento del cáncer de mama primario en ratones. Además, el derivado más activo, Nani-P2, inhibió de forma significativa el desarrollo de metástasis pulmonares 4T1 espontáneas y aumentó la supervivencia en comparación con los ratones control. De forma significativa, el tratamiento de cánceres de mama murinos con derivados de Tat se acompañó de un incremento de los niveles de producción de IFN- γ . En los estudios en los que los cánceres de mama 4T1 se sembraron durante catorce días antes del inicio del tratamiento, los derivados de Tat eran tan eficaces que cuando se administran en el momento de la implantación del tumor cuando se evaluó mediante el crecimiento del tumor primario, la supervivencia y la reducción de la carga pulmonar metastásica cuando se comparó con los controles tratados con PBS.

Los derivados sintéticos de Tat son inmunoestimuladores de las CPA tienen una actividad considerable contra los cánceres primarios y los establecidos en tres modelos de carcinoma mamario murino de uso habitual. En concreto, uno de los derivados, Nani-P2, produjo un impacto dependiente de la dosis y de la vía sobre el crecimiento del tumor primario, la formación de metástasis pulmonar y la supervivencia en el modelo de cáncer de mama Her2(-) 4T1 agresivo. No es sorprendente que la disminución de las metástasis pulmonares se correlaciona con una mejor supervivencia, ya que la metástasis pulmonar es la principal causa de mortalidad en el cáncer de mama avanzado. Cabe destacar que los ratones portadores de tumores de mama 4T1 establecidos tratados por vía intravenosa con la

proteína Nani-P2 presentaban una inhibición significativa del crecimiento tumoral y beneficios sobre la supervivencia que se extendían al menos 36 días más desde la última dosis. En casos limitados, aparentemente se observó que las remisiones totales eran más frecuentes con los tumores de mama menos agresivos (SM1) y/o alo más inmunogénicos (TS/A). Retrasar la administración de Nani-P2 después del implante tumoral ha tenido poco efecto negativo sobre la supresión del crecimiento tumoral 4T1, en cuanto a que la terapia (s.c.) iniciada el día 0 después de la inyección de células tumorales disminuyó la carga tumoral una media del 53%, mientras que la terapia s.c. iniciada el día 13, cuando el crecimiento medio del tumor ya había alcanzado los 5 mm de diámetro, disminuyó la carga tumoral una media del 52% en su efecto máximo. En conjunto, estas observaciones indicaron que Nani-P2 puede afectar de forma favorable al cáncer de mama humano avanzado y Her2(-) en seres humanos.

Además, los derivados de Tat divulgados en el presente documento comprenden secuencias completamente humanas. En ratones a los que se ha administrado más de tres dosis (datos no mostrados) se observa una taquifilaxia gradual contra los derivados de Tat que puede deberse sustancialmente al huésped que desarrolla una respuesta de anticuerpos inhibidora anti-derivados. Dado que este tipo de respuesta de anticuerpos en seres humanos podría bloquear la activación de las CD, de modo que se restringe espectacularmente la replicación del VIH, aparentemente no puede generarse fácilmente en seres humanos lo que hace mucho menos probable que un grado similar de taquifilaxia al menos debido a un mecanismo basado en anticuerpos sea operativo en productos terapéuticos humanos.

Los estudios notificados en el presente documento usaron un protocolo de tres o cuatro dosis aproximadamente semanales de derivado de Tat administradas por i.v. o s.c., siendo la administración i.v. más eficaz para aumentar la supervivencia y reducir las metástasis. No se observó toxicidad en más de 250 ratones a los que se han administrado estas composiciones. La sensibilidad del cáncer de mama a los derivados de Tat contrasta favorablemente cuando se compara con la curva dosis-respuesta de HERCEPTIN®, en el que 4-8 g/kg es el tratamiento estándar. Se ha estimado que los derivados de Tat serán hasta 100 veces más bioactivos en seres humanos que en ratones, lo que significa que incluso dosis menores asociadas con un riesgo incluso menor de toxicidad podrían tener éxito.

En el presente documento se ha establecido que los derivados de Tat activan la rama de INF- γ de la respuesta inmunitaria de los linfocitos T anticancerosos (FIG. 5). Los niveles basales de INF- γ secretado por esplenocitos de ratones tratados con Nani-P2 son 8 veces mayores que los procedentes de los ratones control tratados con PBS. La secreción de INF- γ en respuesta al tratamiento con derivado de Tat in vivo podría aumentar adicionalmente (hasta 53 veces más) in vitro mediante agonistas inmunitarios innatos GM-CSF e IL-4, mientras que los esplenocitos de ratones control permanecen suprimidos incluso después de los intentos de co-estimular con dosis altas de GM-CSF y/o IL-4.

Mientras que los derivados de Tat divulgados son agentes contrasupresores con eficacia "individual" en el carcinoma de mama murino tanto avanzado como inicial, estas observaciones también respaldan la perspectiva de que los derivados de Tat pueden ser sinérgicos con otros productos terapéuticos anti-cancerosos contrasupresores actualmente en desarrollo clínico que pueden tener un efecto restringido sobre la carga del tumor avanzado e inmunosupresión grave acompañante.

Un modelo de cáncer de mama más inmunogénico (SM1) y/o un tumor de mama con un epítipo inmunodominante (TS/A) tienen una tasa de regresión relativamente alta después del tratamiento con un derivado de Tat, mientras que el modelo 4T1 "no inmunogénico" es más resistente. Esto es consistente con un modelo en el que la inmunosupresión es un factor dominante en la progresión del cáncer de mama y, de hecho, puede contribuir a la capacidad de invasión del cáncer de mama. Este modelo se ve respaldado por la observación de que 4T1 expresa varios antígenos de cáncer de mama comunes, incluyendo lactadherina y la proteína de unión a andrógenos a niveles altos contra los que la respuesta inmunitaria es, aparentemente, contrasupresión inducida por el derivado de Tat en ausencia de supresión completa. En conjunto, estas observaciones suscitan la posibilidad de que los derivados de Tat, cuando se administran a mujeres sanas en riesgo junto con uno o varios antígenos del cáncer de mama humano, podrían desarrollarse, en último término, en una vacuna profiláctica anti-cáncer de mama.

En realizaciones adicionales, en el presente documento se divulga el uso de variantes modificadas de forma conservadora de los derivados de Tat. Las variantes descritas en el presente documento mantienen la actividad biológica de la molécula parental o fuente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "variantes modificadas de forma conservadora" hace referencia a péptidos variantes que tienen la misma o igual actividad biológica de los péptidos originales. Por ejemplo, se pueden realizar cambios conservadores de aminoácidos que, aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o péptido, no alteran su función. Normalmente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones dentro de los grupos siguientes: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina, y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen la derivación química in vivo o in vitro de polipéptidos, por ejemplo acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de la glicosilación, por ejemplo las realizadas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y

procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales, por ejemplo exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo enzimas de glicosilación o desglicosilación de mamíferos. También se abarcan secuencias que tienen restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

5 También se incluyen polipéptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular habituales para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen aquéllos que contienen residuos distintos a los L-aminoácidos naturales, por ejemplo D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los péptidos divulgados en el presente documento no se limitan a productos de cualquiera de los procedimientos ilustrativos específicos que se indican en el presente documento.

10 Además de los polipéptidos de longitud sustancialmente completa, la presente divulgación también proporciona fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos.

15 Como se usa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente las mismas comparten más del 95% de identidad de los aminoácidos. No obstante, se ha reconocido que las proteínas (y ADN o ARNm que codifica dichas proteínas) que contienen menos que el nivel de homología descrito anteriormente que surge como variantes de corte y empalme o que están modificadas mediante sustituciones conservadoras de aminoácidos (o sustitución de los codones degenerados) están dentro del alcance de la presente divulgación. Como los expertos en la técnica reconocen fácilmente, se han concebido varios modos para alinear secuencias para comparar, por ejemplo, matriz de puntuación Blosum 62, como han descrito Henikoff y Henikoff in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). Los algoritmos usados de forma conveniente para este fin están ampliamente disponibles (véase, por ejemplo, Needleman y Wunsch in J. Mol. Bio. 48:443 (1970).

20 Por tanto, en el presente documento se divulgan secuencias de aminoácidos con una identidad del 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con los derivados de Tat divulgados en las SEC ID N° 1-4.

25 Los siguientes sistemas de expresión son adecuados para usar en la expresión de los derivados de Tat divulgados: Sistemas de expresión en células de mamífero, tales como, entre otros, sistemas de expresión en células de insecto tales como, entre otros, el sistema de expresión Bac a Bac, el sistema de expresión en baculovirus y los sistemas de expresión DES; y sistemas de expresión en E. coli que incluyen, entre otros, los sistemas de expresión pET, pSUMO y GST. En otra realización, los derivados de Tat se expresan con una cola de 6-His útil para aislar el polipéptido. Los expertos en la técnica conocen los sistemas de purificación con cola de 6-His.

30 Con "cantidad terapéuticamente eficaz" se pretende indicar la cantidad necesaria para alcanzar un efecto terapéutico.

Los derivados de Tat divulgados son polipéptidos inmunoestimulantes que son útiles en muchos tipos de cáncer. En una realización, los derivados de Tat son útiles en el tratamiento de un tipo de cáncer, incluyendo, entre otros, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, mieloma, cáncer colorrectal, cáncer renal, linfoma o cáncer de colon.

35 En otra realización, el cáncer es cáncer de mama. En otra realización, el cáncer es cáncer de ovarios.

40 La presente divulgación también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos derivados de Tat descritos anteriormente. Las dosis y las concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden variar en función del uso concreto para el que están concebidas. La determinación de la dosis o vía de administración adecuadas está dentro del alcance de un médico habitual. Los experimentos con animales proporcionan guías fiables para la determinación de dosis eficaces para tratamiento humano. Entre especies, se puede aumentar la dosis eficaz siguiendo los principios dispuestos por Mardenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al, Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96. En una realización, la enfermedad está presente. En otra realización, la vida de una célula o individuo se prolonga debido a los procedimientos descritos en el presente documento.

45 Los polipéptidos derivados de Tat descritos anteriormente se pueden formular sin experimentación indebida para administrar a un mamífero, incluidos seres humanos, según sea adecuado para la aplicación concreta. Adicionalmente, las dosis adecuadas de las composiciones se pueden determinar sin experimentación indebida usando protocolos dosis-respuesta estándar.

50 De acuerdo con esto, las composiciones diseñadas para administración oral, nasal, lingual, sublingual, bucal, intrabucal, intravenosa, subcutánea, intramuscular y pulmonar se pueden preparar sin experimentación indebida por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo con un diluyente inerte o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. A efectos de la administración terapéutica, las composiciones farmacéuticas pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, soluciones, jarabes y similares. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. En la técnica se conocen bien los ejemplos de vehículos adecuados pueden incluir, entre otros, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar como soluciones salinas tamponadas con fosfato, solución salina tamponada con

fosfato que contiene Polysorb 80, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua y varios tipos de agentes humectantes. Otros vehículos pueden incluir también soluciones estériles, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas. Normalmente, dichos vehículos contienen excipientes como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

Las composiciones polipeptídicas derivadas de Tat pueden administrarse fácilmente por vía parenteral tal como, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, intratecal o subcutánea. La administración parenteral se puede realizar incorporando los compuestos en una solución o suspensión. Dichas soluciones o suspensiones también pueden incluir diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos. Las formulaciones parenterales pueden también incluir agentes antibacterianos tales como, por ejemplo, alcohol bencílico o parabenos metílicos, antioxidantes tales como, por ejemplo, ácido ascórbico o bisulfito sódico y agentes quelantes tales como EDTA. También se pueden añadir tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tal como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico.

La administración transdérmica incluye absorción percutánea de la composición a través de la piel. Las formulaciones transdérmicas incluyen parches, dispositivos iontoforéticos, pomadas, cremas, geles, bálsamos y similares.

La composición puede incluir diversos materiales que modifiquen la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una cubierta de revestimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento son habitualmente inertes y se pueden seleccionar de, por ejemplo, azúcar, goma shellac y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los ingredientes activos se pueden encapsular en una cápsula u oblea.

Las composiciones polipeptídicas derivadas de Tat de la presente divulgación se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz de acuerdo con un régimen de dosificación adecuado. Como entiende un experto en la técnica, la cantidad exacta requerida puede variar de un sujeto a otro en función de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el o los agentes concretos y el modo de administración. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de la composición en base al peso corporal del sujeto, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. En otras realizaciones, se administran aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de la composición en base al peso corporal del sujeto, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

La dosis diaria total de las composiciones la determinará el médico encargado dentro del alcance de su responsable juicio médico. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente o sujeto dependerá de diversos factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y su gravedad, la actividad del compuesto específico usado, la composición específica usada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente o sujeto; la hora de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico usado; la duración del tratamiento, los fármacos usados en combinación o coincidiendo con el compuesto específico usado y otros factores bien conocidos en las técnicas médicas.

Las composiciones divulgadas también se pueden usar en tratamientos de combinación. Es decir, las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden administrar con, antes de o después de una o más de las otras composiciones, agentes terapéuticos, tratamientos o procedimientos médicos deseados. La combinación de terapias concreta administrada la determinará el médico encargado del tratamiento y tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y el efecto terapéutico que se desea conseguir. Se apreciará que los agentes terapéuticamente activos usados en combinación se pueden administrar juntos en una única composición, tratamiento o procedimiento, o, como alternativa, se pueden administrar por separado.

En otra realización se contemplan dosis repetidas o frecuentes de los derivados de Tat divulgados que pueden efectuarse antes de la taquifilaxia, así como invertir la acción inmunosupresora establecida durante la evolución del cáncer de mama. La dosificación frecuente es un procedimiento usado en, por ejemplo, tratamientos de la alergia que pueden soportar tolerancia inmunológica a un agente. Una vez que el derivado de Tat se pueda usar para conseguir inmunorreactividad a un tumor de mama, otros agentes inmunoterapéuticos que han perdido utilidad debido a la enfermedad avanzada podrían potencialmente recuperar la eficacia. En un segundo protocolo, se usan pautas quimioterapéuticas que puedan liberar una avalancha de antígenos tumorales en alternancia con inmunoterapia con el derivado de Tat. Dado que los cánceres de mama en estadio avanzado son resistentes a múltiples fármacos, la radioterapia podría ser una alternativa práctica en ensayos humanos.

El número de dosis repetidas de los derivados de Tat lo puede establecer el profesional médico según la respuesta del paciente a las dosis. En una realización, el derivado de Tat se administra una vez cada tres días para 3 dosis en un periodo de diez días. Este esquema de administración se repite después para una pluralidad de ciclos. La

presente divulgación idea varios esquemas de administración diferentes en los que el derivado de Tat se administra muchas veces dentro de un marco de tiempo seleccionado y después se repite el esquema de administración para una pluralidad de ciclos. En otra realización, la administración del derivado de Tat se puede alternar con la administración de uno o más agentes anticancerosos, inmunomoduladores o inmunosupresores. En una realización, el agente inmunosupresor es ciclofosfamida.

EJEMPLO 1

Diseño y producción de derivados de Tat

En el presente documento se divulgan tres derivados de Tat ilustrativos cada uno de los cuales sustituye al fragmento hr del FT de un modo diferente. Las partes subrayadas de las secuencias representan las secuencias entre las prolinas.

Nani-P1 (MPM1; SEC ID N° 2) – MEPVDANLEAWKHAGSQPR
 KTA~~CTTCYCKKCCFHCQVCFTRKGLGISYGRKKRRQRRRAPQDSQT~~
 HQASLSKQPASQSRGDPTGPTESKKKVERETETDPFD

Nani-P2 (ASH4; SEC ID N° 3) – MDPKGEEDQDVSHQDLIKQYRKP
 RTACNNCYCKKCCFHCYACFLRKGLGITYHAFRTRRKKIASADRIPVP
 QQSISIRGRDSQTTQESQKKVEEQAKANLRISRKNLGDETRGPVGAG
 N .

Nani-P3 (TMPD5; SEC ID N° 4) – METPLKEQENSLESCREHSS
SISEVDVPTPVSCLRKGGRCWNRCIGNTRQIGSCGVPFLKCKRKP
 TRKGLGISYGRKKRRQRRRAPQDSQTHQASLSKQPASQSRGDPTG
 PTESKKKVERETETDPFD

Las proteínas de unión a SH3 contienen una serie de prolinas internas necesarias para la función del FT. Nani-P1 carece de las prolinas internas, cada una sustituidas por alanina, lo que hace que el sitio de unión de SH3 sea inactivo. Esta alteración paraliza la totalidad de la proteína Tat como FT, porque ahora se produce predominantemente como proteína intracitoplásmica, al contrario que los demás derivados de Tat.

Nani-P2 tiene un extremo amino de Tat derivado de una variante del VIS del mono verde africano con una patogeneidad baja en el huésped. Solo la prolina que flanquea al carboxilo está conservada en esta secuencia.

En Nani-P3, una secuencia de homología con TARA rica en serina sustituye la secuencia de unión a SH3 como un péptido FT amino flanqueado por prolinas. El Tat se secuenció inicialmente a partir de una variante del VIS de baja patogeneidad en macacos y monos mangabey gris.

EJEMPLO 2

Actividad in vitro de derivados de Tat

Se cultivaron monocitos humanos durante 24-28 horas con un derivado de Tat (Nani-P2), una secuencia inmunoestimuladora (ISS) de un receptor de tipo Toll (TLR) ((FIG. 1) o lipopolisacárido (LPS) (FIG. 2) y las células se lavaron después y se tñieron con CD86 marcado con fluorescencia. El derivado de tat estimuló una expresión de CD86 más alta que ISS (TLR) o LPS.

EJEMPLO 3

Evaluación de derivados de Tat en modelos de ratón de cáncer de mama

Materiales y procedimientos

Animales. Se adquirieron ratones BALB/c hembra de 6ª 8 semanas de edad del Jackson Laboratory (Bar Harbor, NE). Los ratones se aclimataron durante al menos 1 semana antes de usar. Los ratones se mantuvieron en condiciones sin patógenos en la Instalación de Mantenimiento de Animales del Columbia University of Medical Center y todos los experimentos fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee of Columbia University of Medical Center.

Líneas celulares. Las células 4T1, una línea celular resistente a la 6-tioguanina derivada de un carcinoma de mama

espontáneo de BALB/c, se obtuvieron de la ATCC; TS/A, una línea celular de adenocarcinoma murino, fue proporcionada por la Dra. Sandra Demaria (Demaria S. et al. Clin Cancer Res. 11:728-34, 2005); y SM1, el carcinoma de mama derivado de BALB/C, fue amablemente suministrado por el Dr. James Allison, University of California, Berkeley. Todas las líneas celulares tumorales se cultivaron en DMEM, suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 Mm, 150 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, FCS al 10% inactivado con calor (Invitrogen), 2-mercaptoetanol 50 mM (Sigma) y 50 mg/ml de gentamicina (Lanza).

Provocación y tratamiento del tumor. En ratones BALB/c se inyectaron (s.c.) 1×10^4 células 4T1, 1×10^5 células TS/A o 2×10^5 células SM1, respectivamente, en la almohadilla mamaria izquierda el día 0. La inmunoterapia se realizó inyectando directamente un derivado de Tat en el flanco derecho a 0, 7, 12 y 17 días después del establecimiento de los tumores. El grupo control recibió inyección de PBS. En algunos experimentos, cuando todos los ratones tenían un tumor mensurable establecido (diámetro de 3-5 mm a los 14 días de la inyección del tumor), los animales fueron asignados aleatoriamente a varios grupos de tratamiento como se ha indicado. La carga del tumor (volumen tumoral) se midió y registró tres veces a la semana. Se sacrificó a los animales cuando los tumores alcanzaron un volumen de 15 mm de diámetro y los tumores se recogieron y se pesaron.

Detección de metástasis pulmonares. Se analizaron los pulmones para detectar metástasis de 4T1 como se ha descrito en lo que antecede (Pulaski B. et al., Cancer Res. 60:2710-2715, 2000). Los tumores 4T1 primarios establecidos durante 2-3 semanas en ratones BALB/c metastatizan en los pulmones en una gran mayoría de los animales. En resumen, se sacrificó a los ratones de acuerdo con las guías de la IACUC establecidas al principio de los ensayos, los pulmones se extrajeron y los nódulos tumorales en la superficie de los pulmones fueron enumerados a simple vista por dos investigadores independientes enmascarados para los protocolos de tratamiento.

Análisis ELISA de la producción de IFN- γ por esplenocitos inmunitarios. La secreción de IFN- γ por los esplenocitos se evaluó mediante un kit de ELISA OptEIA™ (BD Biosciences). En resumen, se cultivaron esplenocitos (1×10^5 /pocillo) de ratones portadores de 4T1 con o sin 5×10^3 /pocillo de células 4T1 tratadas con mitomicina C (50 g/ml) (usadas para proporcionar antígenos tumorales) en DMEM en una proporción de 20:1 de E:T (efectoras:tumorales) con IL-2 (50 ng/ml) y GM-CSF (100 ng/ml) en placas de 96 pocillos. Los sobrenadantes se recogieron tras 72 horas y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su análisis sin pérdida de actividad. El IFN- γ se midió en sobrenadantes sin células de pocillos por duplicado mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La producción de IFN- γ específico de tumor se calculó restando los valores de fondo medidos en sobrenadantes de esplenocitos cultivados con medio solo y los valores de densidad óptica (DO) se convirtieron en cantidades de pg/ml de IFN- γ usando una curva estándar de IFN- γ recombinante. El índice de estimulación (S1) se calculó como la proporción de IFN- γ en cultivos control frente a estimulados.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron estadísticamente usando la prueba t de Student (Graph Pad Prism versión 5; Graph- Pad). Los datos de experimentos de supervivencia con animales se analizaron estadísticamente usando una prueba del orden logarítmico (Graph Pad Prism versión 5).

Resultados

Se investigó el efecto terapéutico de la administración sistémica de composiciones sintéticas derivadas de Tat en modelos murinos de cáncer de mama. Para comparar la protección relativa conferida por un pequeño panel de diferentes derivados contra el crecimiento de tumor de mama primario, se inyectó a ratones BALB/c hembra 1×10^4 células 4T1 de cáncer de mama s.c. en la almohadilla mamaria y después se trató con 400 ng de derivados de Tat parcialmente purificados los días 0, 7, 14 y 21 (inyección s.c. de PBS) en los ganglios linfáticos axilares drenantes.

Dos de los derivados, Nani-P1 and Nani-P2, redujeron significativamente la carga tumoral cuando se compararon con los ratones control que solo recibían inyecciones de PBS, poniéndose de manifiesto primero esta diferencia a los 15 días de la implantación del tumor, FIG. 3A, día 15 $p < 0,05$). Por el contrario, un tercer derivado, Nani-P3, producido y purificado parcialmente con el mismo protocolo que los demás, fue menos eficaz en la supresión del crecimiento de tumores 4T1 primarios incluso a dosis cinco veces más altas (2 μg , fig. b) o para prolongar la supervivencia (no mostrado) Estos resultados descartaron con eficacia que los contaminantes en la preparación contribuían a la eficacia antitumoral, en particular en cuanto a que los ensayos posteriores se realizaron con materiales altamente purificados (> 95% de pureza) a dosis mucho menores. La eficacia de Nani-P2 fue significativamente más sostenida que Nani-P1, de modo que el día 21 (la última dosis), la diferencia en la carga tumoral primaria entre los tumores tratados con Nani-P2 y con Nani-P1 fue de 18 mm³ y fue muy estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Este efecto persistió a lo largo del recordatorio de este ensayo a pesar de no existir terapia adicional.

El efecto inhibitor del crecimiento del tumor de mama de Nani-P2 altamente purificado en tumores 4T1 fue dependiente de la dosis, con efectos significativos evidentes tras la administración s.c. de solo 0,4 ng del compuesto (FIG. 4). El incremento de la dosis de Nani-P2 administrado s.c. en el flanco axilar drenante mediante incrementos logarítmicos de 0,4 ng a 40 ng por dosis inhibió progresivamente el crecimiento del tumor de mama 4T1. La inhibición más sólida del crecimiento de 4T1 a dosis más altas de Nani-P2 entre 0,4 ng a 40 ng fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$), mientras que incrementar la dosis a 400 ng e incluso a 2 μg no tuvo como resultado un incremento de la eficacia antitumoral (datos no mostrados). Es importante el hecho de que no se observó toxicidad

tras la administración s.c. o i.v. de 40 ng de Nani-P2 en múltiples ensayos usando múltiples programas de dosis. A una dosis de 40 ng, se seleccionó Nani-P2 para estudios adicionales.

5 Para determinar si el tratamiento con Nani-P2 podría prolongar la supervivencia además de reducir el tamaño de los tumores primarios en ratones se realizaron protocolos de tratamiento usando varios programas de dosis y vías de administración (s.c., i.v. o i.t.) de 40 ng de Nani-P2. Se realizó un seguimiento de la duración de la supervivencia en cohortes de diez ratones, evaluado mediante el uso del procedimiento del límite de producto de Kaplan Meier. Según los reglamentos de la Columbia University Medical Center Animal Facility se sacrificó a cada ratón con un diámetro de tumor medio de aproximadamente 15 mm o antes si el ratón estaba moribundo, de modo que uno de estos desenlaces se convierte en el criterio de definición de letalidad.

10 En el primer ensayo de evaluación de Nani-P2, el tratamiento s.c. se inició de forma simultánea al implante del tumor. La mediana del tiempo de supervivencia para los ratones control (tratados con PBS) fue de 30 días y para el día 23 se había producido una letalidad del 100%. Con la administración de Nani-P2 (4 dosis en 14 días), el 35% de los ratones tratados seguía vivo el día 48 ($p < 0,001$, FIG. 6A) punto en el cual se sacrificó a todos los ratones debido a la carga tumoral primaria.

15 En un segundo ensayo de supervivencia, se dejó establecerse a los tumores durante catorce días para evaluar mejor la eficacia en la enfermedad metastásica, tras lo cual se administraron tres ciclos de tratamiento con Nani-P2 a la semana mediante una de varias vías (s.c., i.v. o i.t.) para comparar la eficacia relativa para cada vía de dosificación (FIG. 5B). Similar al ensayo previo, la mediana de la supervivencia de los ratones control (s.c. tratados con PBS) fue de 32 días, llegando a un 100% de letalidad el día 36. La supervivencia se prolongó mediante la administración i.v. de Nani-P2 ($p < 0,005$, FIG. 5B) con una supervivencia del 60% el día 47 en comparación con una supervivencia del 20% de los ratones tratados s.c. el día 47 ($p < 0,05$). La administración intratumoral del compuesto fue ligeramente inferior a la administración s.c.

25 El modelo de tumor mamario murino 4T1 se eligió para estudiar porque es un tumor agresivo y rápidamente invasivo, es rutinariamente metastático a los catorce días del implante, tiempo tras el cual es difícil de tratar. Para saber si la eficacia de Nani-P2 podría prolongarse a otros modelos de tumor de mama murino se estudiaron dos tumores de mama adicionales TS/A y SM1 (FIG. 6). Los tumores de mama primarios TS/A fueron aproximadamente tan agresivos como 4T1 y alcanzaron un volumen tumoral de 15 mm a los 30 días (FIG. 6A). No obstante, los tumores TS/A eran considerablemente más respondedores al tratamiento de Nani-P2 con una supresión aproximada del 50% del crecimiento tras el tratamiento con 0,4 ng de Nani-P2 y una tasa de revisión total del 40% a 30 días.

30 El modelo de carcinoma de mama SM1 (FIG. 6B) es inicialmente menos agresivo como tumor primario y las muertes parecen ser a través de mecanismos distintos de la enfermedad metastásica. Para el día 30 de tratamiento, los tumores SM1 alcanzaron un volumen medio aproximadamente n 33% más pequeño que S/A o 4T1. Esto indicó una mayor sensibilidad del tumor SM1 a la inmunoterapia Nani-P2 en comparación con 4T1, de un modo tal que el crecimiento del tumor se suprimió en el 100% de los animales durante 16 días y el 40% de los animales permaneció en remisión incluso a los 28 días del implante y completamente una semana después de la finalización de la pauta.

35 Para determinar si los linfocitos T citotóxicos desempeñan un papel en el rechazo tumoral inducido por tratamiento con Nani-P2, se realizó un ensayo ELISA de IFN- γ (FIG. 7) para comparar los esplenocitos de los ratones portadores del tumor 4T1 tratados sin (control) o con Nani-P2 (FIG. 7). Se extrajeron los bazos en condiciones estériles y se prepararon como se ha descrito en otros lugares (duPre' S. et al. Exp. Mol. Path. 85:174-188, 2008). En resumen, los bazos se homogeneizaron y los esplenocitos, como fuente rica en linfocitos T citolíticos sistémicos y en CPA, se cultivaron con células estimuladoras 4T1 tratadas con mitomicina C para inducir las respuestas inmunitarias de memoria. Los pocillos control se cultivaron con medio solo.

45 Las concentraciones de IFN- γ , un sustituto estándar de la activación de los LCT se cuantificaron mediante ELISA comercial (BD Biosciences). La producción de IFN- γ fue significativamente mayor ($p < 0,01^{**}$) en cultivos de esplenocitos tomados de ratones BALB/c tratados con Nani-P2 en todas las condiciones del ensayo. La actividad de IFN- γ en animales tratados con Nani-P2 pero no en los controles se pudo potenciar mediante la adición de IL-4 y GM-CSF ($p < 0,05$) en condiciones que se demuestra que estimulan la diferenciación de las CD y podían reforzarse todavía más si se volvían a añadir estimulantes tumorales al inicio del cultivo (índice de estimulación= 53 frente a control, 3S+IL4+GM-CSF) lo que demuestra la potencia de Nani-P2 en sinergia con otros agonistas de los LCT.

50 Para investigar adicionalmente la eficacia de Nani-P2 contra el cáncer de mama establecido y metastático, las células 4T1 se inyectaron s.c. en la glándula mamaria abdominal de los ratones y se retrasó el tratamiento hasta cuando los tumores habían metastatizado en los pulmones y tenían un tamaño medio de 3,5 mm (FIG. 8A, día 13), correspondiente a un tumor de mama humano de 2,4 cm o en estadio T2. Se realizó un seguimiento de los ratones para determinar el crecimiento tumoral (FIG. 8A), las metástasis pulmonares (FIG. 8B) y la supervivencia (FIG. 8C). En la necropsia, los animales que habían recibido tratamiento con Nani-P2 mostraron una reducción espectacular del número visible de metástasis pulmonares en comparación con los controles (FIG. 9). El número medio de nódulos tumorales visibles macroscópicamente en los pulmones de ratones tratados i.v. con Nani-P2 fue de siete en comparación con el grupo control tratado con PBS, que tenía una media de 35,3 ($p < 0,01^{**}$). Esto correspondía a un aspecto del tumor primario menos agresivo, así como a metástasis pulmonares con un tamaño medio mucho más

pequeño (FIG. 8B).

La eficacia de Nani-P2 en el contexto del cáncer de mama 4T1 agresivo preestablecido se ha demostrado clara y significativamente comparando la carga del tumor primario en animales tratados por vía intravenosa (40 ng i.v. de Nani-P2) frente a los animales control (tratados con PBS) (el día 18, $p < 0,01^{**}$, FIG. 10). Este beneficio estadísticamente significativo en la supresión del tumor primario (FIG. 10) permaneció durante todo el ensayo de una duración de 50 días ($p < 0,01^{**}$) aunque solo se administraron tres dosis semanales de PINS entre los días 14 y 28. Además, m7/10 ratones mostraron regresión del tumor en el tratamiento inicial del tumor el día 14. Esto se tradujo en un beneficio altamente estadísticamente significativo sobre la supervivencia ($p < 0,005^{**}$, y véase la Fig 5B). Cabe destacar que 1/10 animales sufrió una remisión completa y permaneció sin enfermedad 50 días, momento en el cual el estudio se terminó, lo que respalda a interferencia de que este animal estaba aparentemente sin tumor.

EJEMPLO 4

Tratamiento de dosis repetidas de derivados de Tat y ciclofosfamida

En cuatro grupos de diez ratones BALB/c se implantaron 1×10^4 células 4T1 s.c. en la almohadilla de grasa mamaria. El tratamiento se inició cuando los diámetros de los tumores alcanzaron 4-5 mm el día 10. En los ratones control se inyectó i.v. PBS a intervalos de 3 días, mientras que los ratones del tratamiento alterno recibieron 3 dosis de fármaco cada 3 días en ciclos rotativos de 10 días. La carga tumoral (tamaño de tumor mm^3) se calculó usando una fórmula estándar. CY: Se inyectó a los ratones CY (ciclofosfamida sola) i.p. semanalmente con 80 mg/kg por ratón comenzando el día 10. Cy/Nani-P2: (ciclofosfamida primero, seguida de Nani-p2) primero se inyectó i.p. ciclofosfamida (80 mg/kg) a intervalos de 3 días para tres dosis comenzando el día 10 y después se inyectó i.v. Nani-P2 (40 ng) a intervalos de 3 días para tres dosis en rotación. El ciclo de 3 dosis de CY, seguida de 2 dosis de Nani-P2 se repitió hasta el día 50. Nani-P2/CY: (Nani-P2 primero seguido de ciclofosfamida): se inyectó primero a los ratones i.v. Nani-p2) (40 ng) a intervalos de 3 días para tres dosis comenzando el día 10 y después se inyectó i.p. ciclofosfamida a intervalos de 3 días en rotación. El ciclo de 3 dosis de Nani-P2, seguidas de 3 dosis de CY se repitió hasta el día 50.

La menor carga tumoral en el grupo Nani-P2/CY en comparación con el grupo CY es muy altamente estadísticamente significativa (FIG. 11, $p=0,003077$).

El beneficio sobre la supervivencia del tratamiento por inyección en embolada con Nani-P2 alternando con ciclofosfamida frente a ciclofosfamida semanal es altamente estadísticamente significativo (FIG. 12, $p=0,0001$). La cohorte de Nani-P2 tiene 3/10 ratones en remisión total y 9/10 ratones en remisión parcial el día 50 (no mostrado), mientras que 10/10 ratones tratados con ciclofosfamida habían muerto el día 42.

A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades, tales como el peso molecular, las condiciones de reacción etc. usadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con esto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Como mínimo y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico deberá interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando las técnicas de redondeo habituales. Aunque los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos indicados en los ejemplos específicos se indican lo más precisamente posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que necesariamente son el resultado de la desviación estándar en sus respectivas mediciones de ensayo.

Los términos "un", "una/uno". "el/la" y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deberá interpretar que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o esté claramente contraindicado por el contexto. La mención de intervalos de valores en el presente documento solo está destinado para servir como procedimiento acortado de referirse individualmente a cada valor distinto que entra dentro del intervalo. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara de forma individual en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o que, de otro modo, claramente se contradiga en el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o términos ilustrativos (p. ej., "tal como") proporcionados en el presente documento está destinado simplemente a aclarar mejor la invención y no impone una limitación del alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como indicativa de ningún elemento no reivindicado esencial en la práctica de la invención.

Los grupos de elementos o realizaciones alternativos de la invención divulgados en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. A cada miembro del grupo se puede hacer referencia a y reivindicar individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos hallados en el presente documento. Se

prevé que uno o más miembros de un grupo se incluyan en, o eliminen de, un grupo por motivos de comodidad y/o patentabilidad. Cuando se produce cualquier inclusión o deleción de este tipo, se estima que la memoria descriptiva contiene el grupo según está modificado, de modo que cumple la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

5 Ciertas realizaciones de la presente invención se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, variaciones de estas realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la lectura de la descripción anterior. El inventor espera que los expertos usen dichas variaciones según sea adecuado y los inventores pretenden que la invención pueda ponerse en práctica de otro modo distinto a lo descrito específicamente en el presente documento. De
10 acuerdo con esto, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto citada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de la misma entra dentro de la invención a menos que se indique otra cosa en el presente documento o de otro modo el contexto lo contradiga claramente.

15 Realizaciones específicas divulgadas en el presente documento pueden estar limitadas además en las reivindicaciones usando constituido por o constituido esencialmente por. Cuando se usa en las reivindicaciones, archivado o añadido como modificación, la expresión de transición "constituido por" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La expresión de transición "constituido esencialmente por" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y nuevas. Las realizaciones de la invención reivindicadas de este modo
20 están descritas y permitidas de forma inherente o expresamente en el presente documento.

Listado de secuencias

<110> NaniRx, Inc.

Cohen, David I.

25 <120> Tratamiento de cáncer con polipéptidos inmunoestimuladores derivados de Tat del VIH

<130> 1951311-00015

<150> 61/162,605

30 <151> 23-03-2009

<150> 61/306,278

<151> 19-02-2010

35 <150> 61/310,221

<151> 03-03-2010

<160> 4

40 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 1

```

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1           5           10           15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20           25           30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35           40           45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Glu Asp Ser Gln Thr
 50           55           60

His Gln Val Ser Pro Pro Lys Gln Pro Ala Pro Gln Phe Arg Gly Asp
 65           70           75           80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85           90           95

Thr His Pro Val Asp
 100
    
```

5

<210> 2

<211> 102

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de Tat del VIH modificada con Nani-P1

<400> 2

```

Met Glu Pro Val Asp Ala Asn Leu Glu Ala Trp Lys His Ala Gly Ser
 1           5           10           15

Gln Pro Arg Lys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys
 20           25           30

Phe His Cys Gln Val Cys Phe Thr Arg Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr
 35           40           45

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln
 50           55           60

Thr His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Ser Arg Gly
 65           70           75           80

Asp Pro Thr Gly Pro Thr Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr
 85           90           95

Glu Thr Asp Pro Phe Asp
 100
    
```

15

ES 2 432 863 T3

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Secuencia de Tat del VIH modificada con Nani-P2

<400> 3

Met Asp Pro Lys Gly Glu Glu Asp Gln Asp Val Ser His Gln Asp Leu
1 5 10 15

Ile Lys Gln Tyr Arg Lys Pro Arg Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys
20 25 30

Lys Lys Cys Cys Phe His Cys Tyr Ala Cys Phe Leu Arg Lys Gly Leu
35 40 45

Gly Ile Thr Tyr His Ala Phe Arg Thr Arg Arg Lys Lys Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Asp Arg Ile Pro Val Pro Gln Gln Ser Ile Ser Ile Arg Gly Arg
65 70 75 80

Asp Ser Gln Thr Thr Gln Glu Ser Gln Lys Lys Val Glu Glu Gln Ala
85 90 95

Lys Ala Asn Leu Arg Ile Ser Arg Lys Asn Leu Gly Asp Glu Thr Arg
100 105 110

Gly Pro Val Gly Ala Gly Asn
115

<210> 4

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de Tat del VIH modificada con Nani-P3

20

<400> 4

ES 2 432 863 T3

Met Glu Thr Pro Leu Lys Glu Gln Glu Asn Ser Leu Glu Ser Cys Arg
 1 5 10 15

Glu His Ser Ser Ser Ile Ser Glu Val Asp Val Pro Thr Pro Val Ser
 20 25 30

Cys Leu Arg Lys Gly Gly Arg Cys Trp Asn Arg Cys Ile Gly Asn Thr
 35 40 45

Arg Gln Ile Gly Ser Cys Gly Val Pro Phe Leu Lys Cys Cys Lys Arg
 50 55 60

Lys Pro Phe Thr Arg Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys
 65 70 75 80

Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln Thr His Gln Ala
 85 90 95

Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly
 100 105 110

Pro Thr Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu Thr Asp Pro
 115 120 125

Phe Asp
 130

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), teniendo dicha secuencia de aminoácidos modificada una identidad de secuencia mayor del 95% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4.
2. Un polipéptido derivado de Tat que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la proteína Tat como se define en la reivindicación 1 para usar en el tratamiento del cáncer causando el cese del crecimiento de dicho cáncer o la regresión de dicho cáncer en un sujeto o para usar en la reducción de la carga del tumor causando la regresión de dicho cáncer en un sujeto.
3. Uso de un polipéptido derivado de Tat que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la proteína Tat como se define en la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer causando el cese del crecimiento de dicho cáncer o la regresión de dicho cáncer en un sujeto o para reducir la carga del tumor causando la regresión de dicho cáncer en un sujeto.
4. El polipéptido derivado de Tat de la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3, para tratar el cáncer o reducir la carga tumoral en dicho sujeto mediante la administración del polipéptido derivado de Tat en una pluralidad de dosis.
5. El polipéptido derivado de Tat de la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3 para tratar el cáncer o reducir la carga tumoral en dicho sujeto mediante la administración mediante un ciclo de administración repetida en la que cada ciclo comprende administrar una pluralidad de dosis de dicho polipéptido derivado de Tat en un periodo de tiempo definido seguido de un periodo de descanso y en la que dicho ciclo se repite una pluralidad de veces.
6. El polipéptido derivado de Tat de la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3 para tratar el cáncer o reducir la carga tumoral en dicho sujeto mediante la administración mediante un ciclo de administración repetida en la que cada ciclo comprende administrar una pluralidad de dosis de dicho polipéptido derivado de Tat en un periodo de tiempo definido seguido de una administración de una o una pluralidad de dosis de un agente terapéutico en un periodo de tiempo definido y en la que dicho ciclo se repite una pluralidad de veces.
7. El polipéptido derivado de Tat, o el uso, de la reivindicación 6, en el que el agente terapéutico es ciclofosfamida.
8. El polipéptido derivado de Tat de la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido derivado de Tat tiene una identidad de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

35

Figura 1

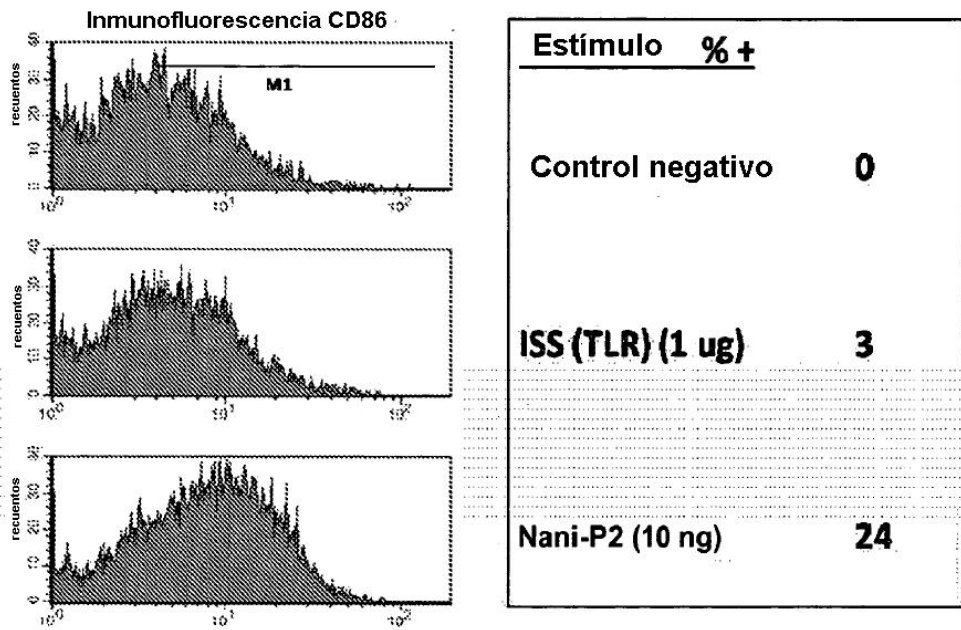
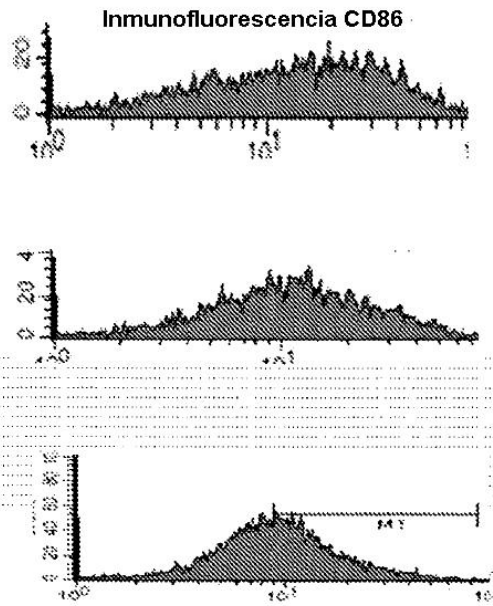


Figura 2



| Estímulo (ng) | PFV |
|-----------------|-----|
| Nani-P2 (10 ng) | 25 |
| Nani-P2 (1 ng) | 15 |
| LPS (100) | 10 |

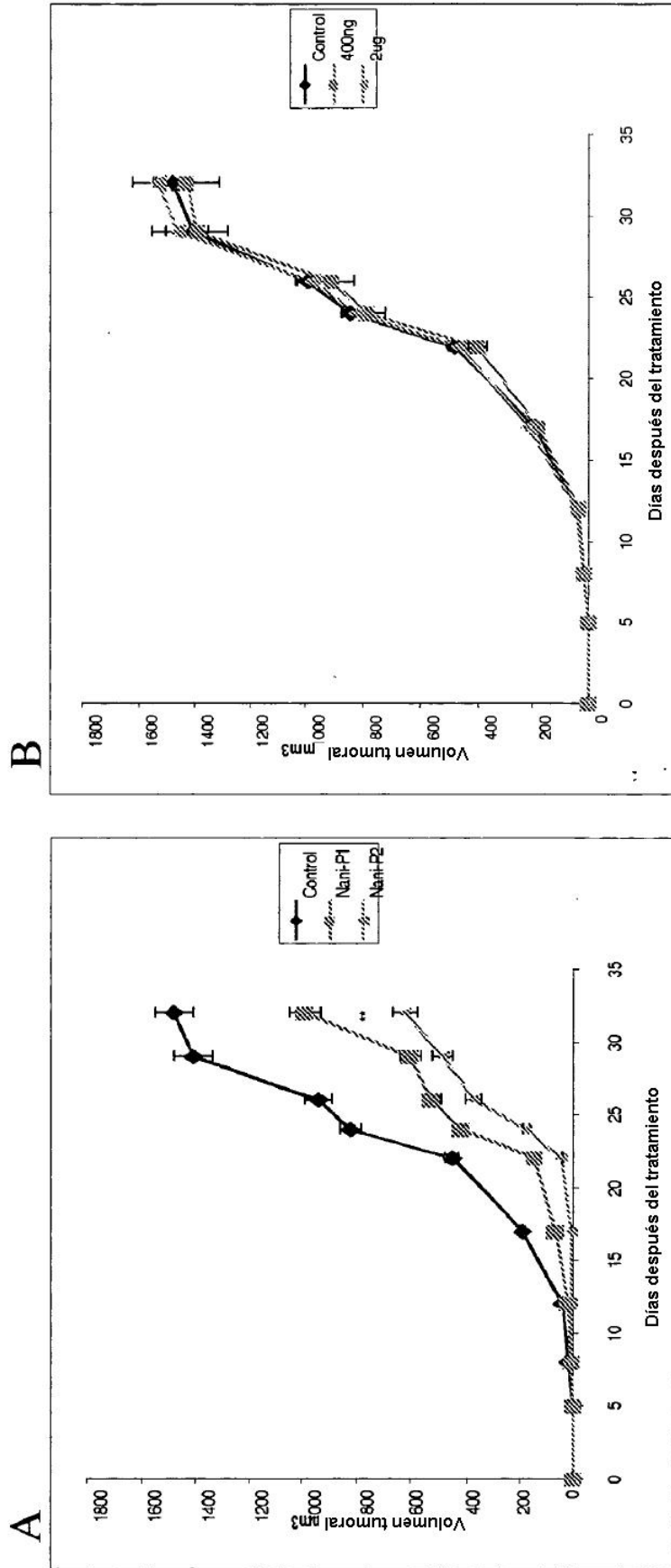


Figura 3

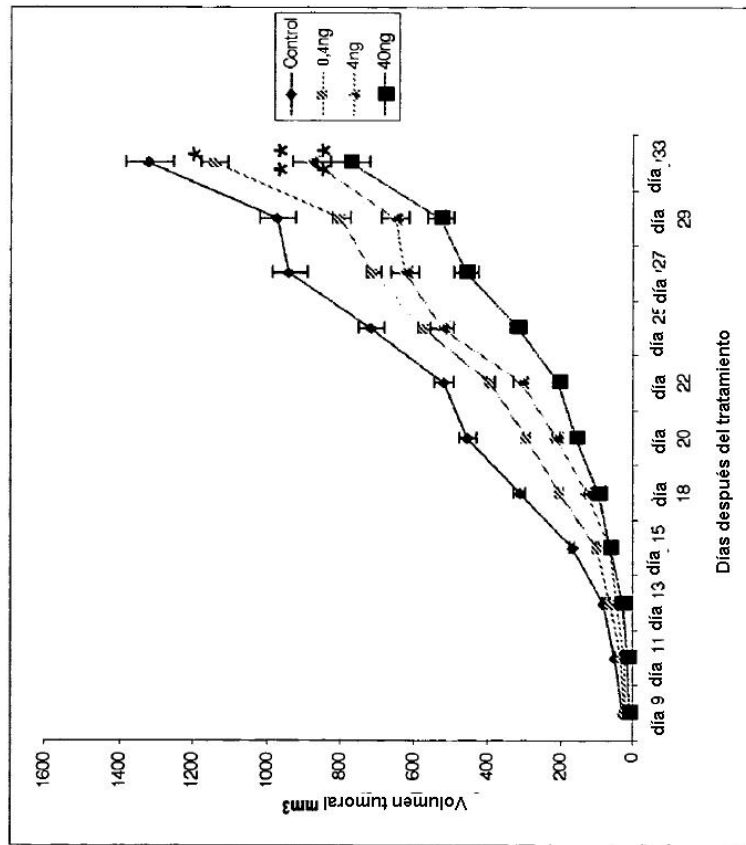


Figura 4

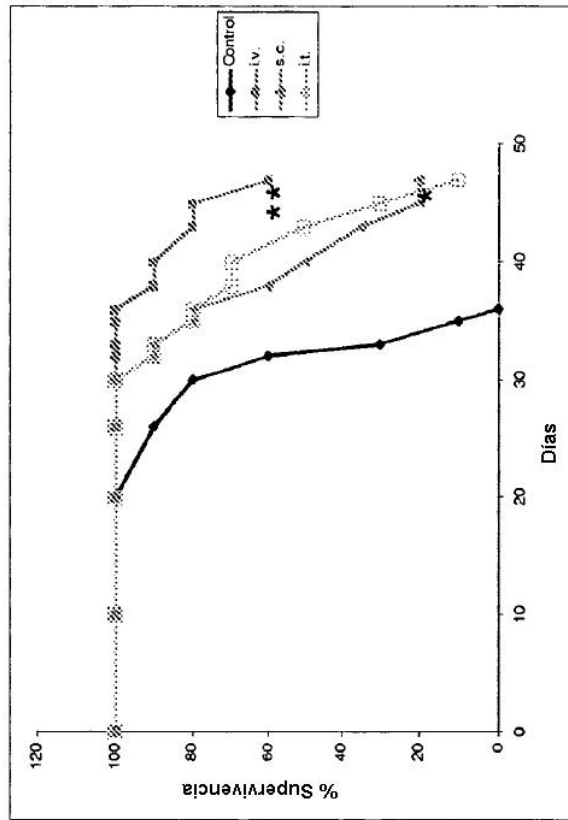


Figura 5B

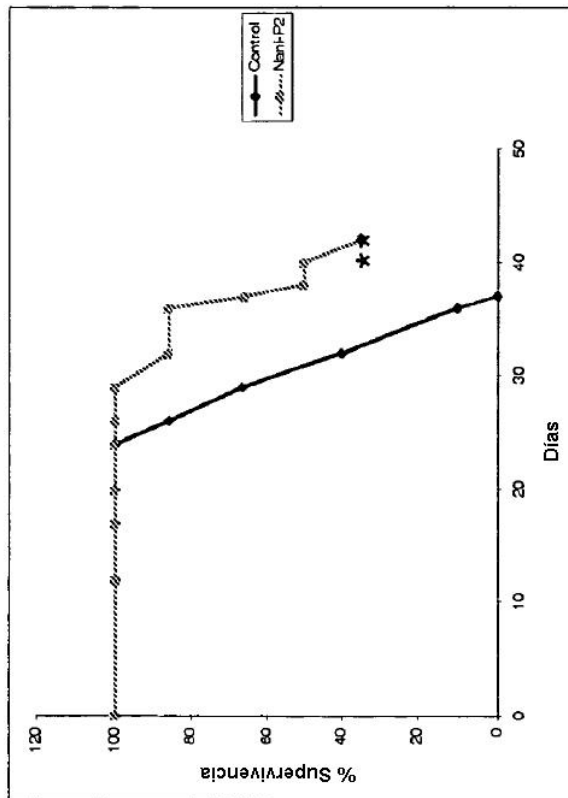


Figura 5A

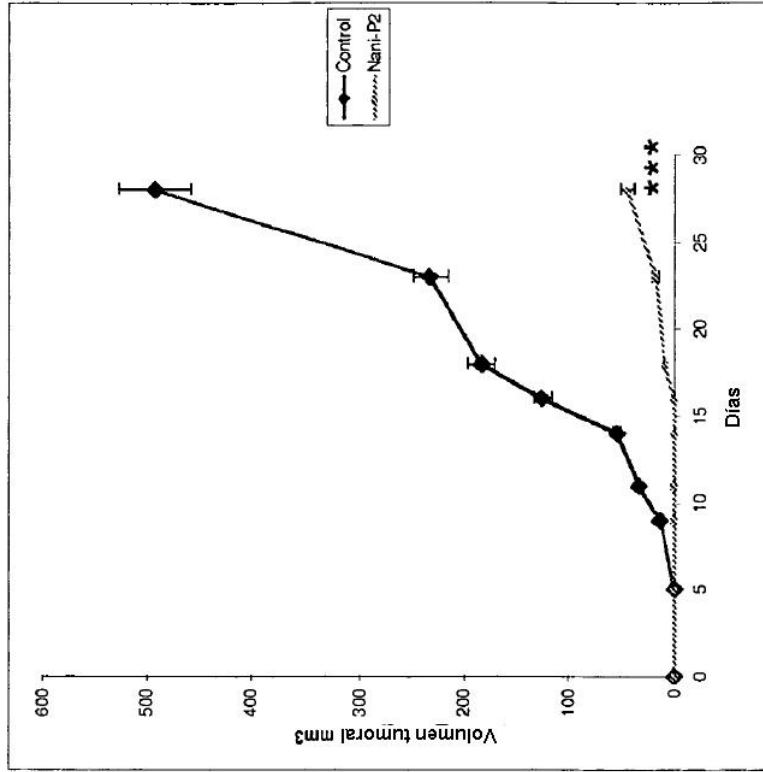


Figura 6B

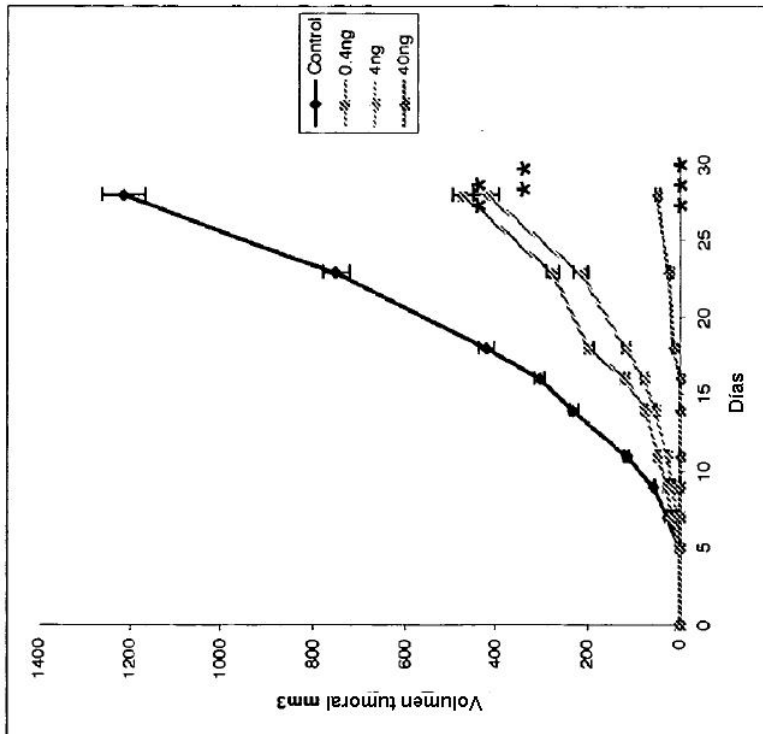


Figura 6A

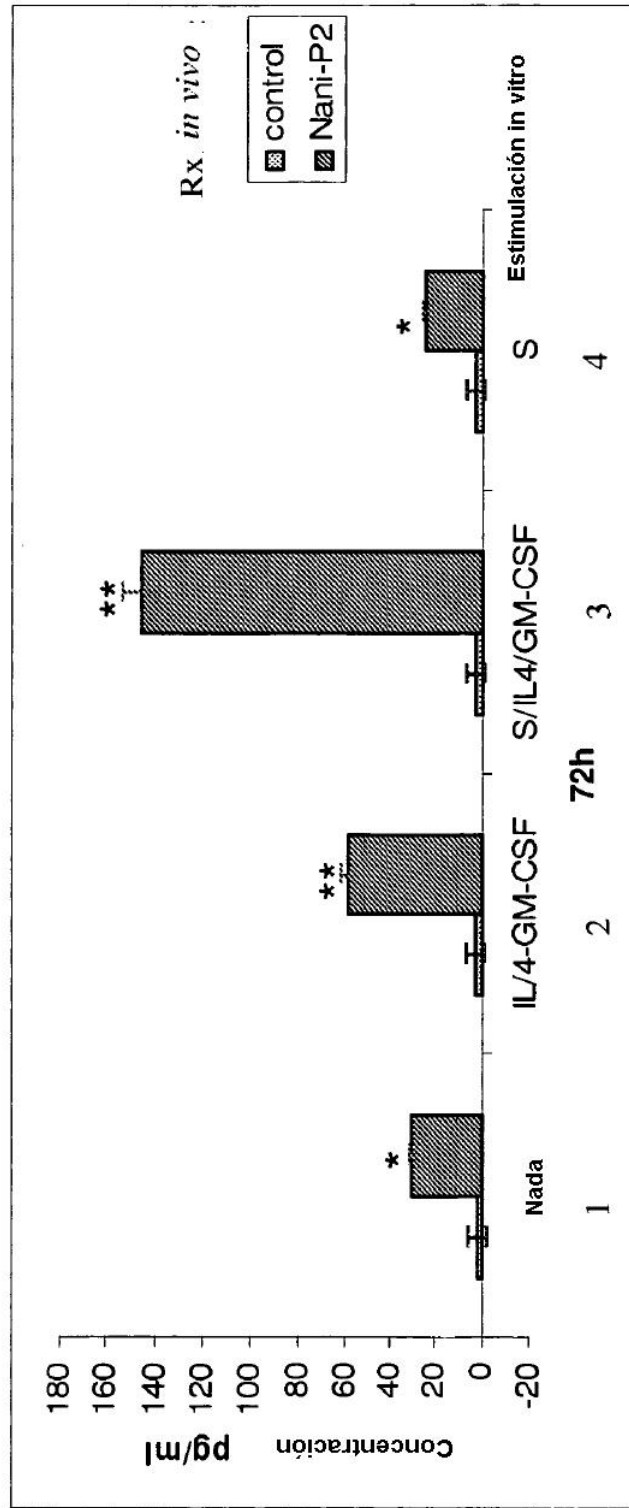


Figura 7

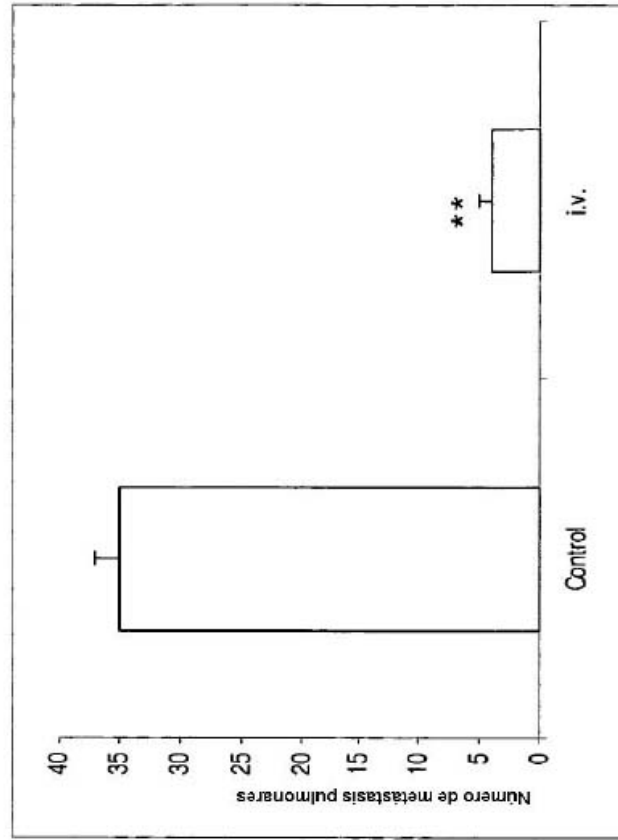


Figura 8B

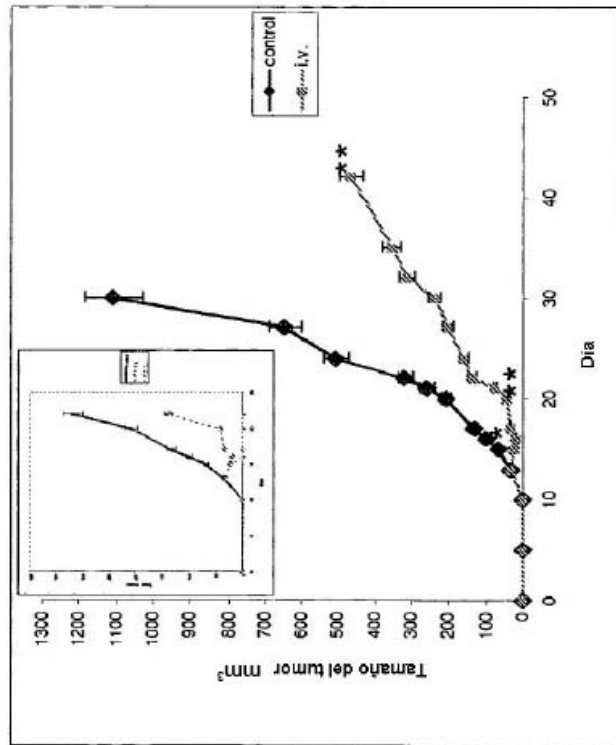
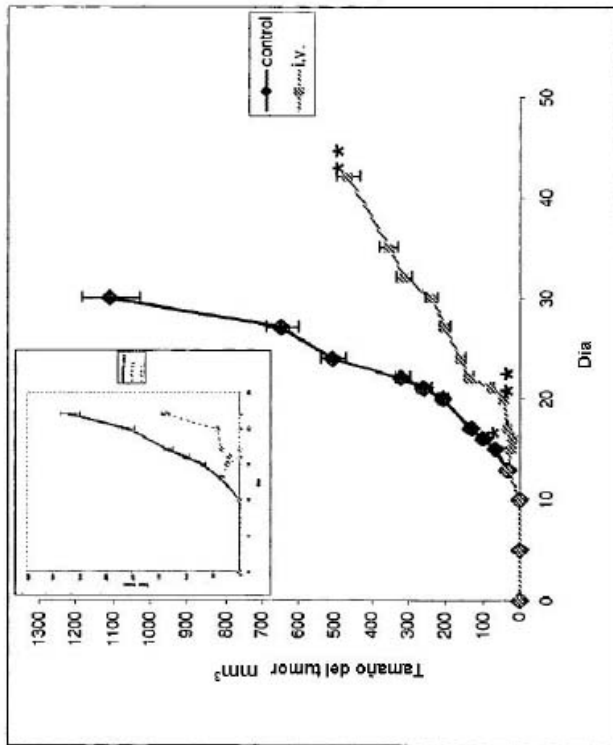


Figura 8A

Figura 8C



Tamaño del tumor y metástasis pulmonares

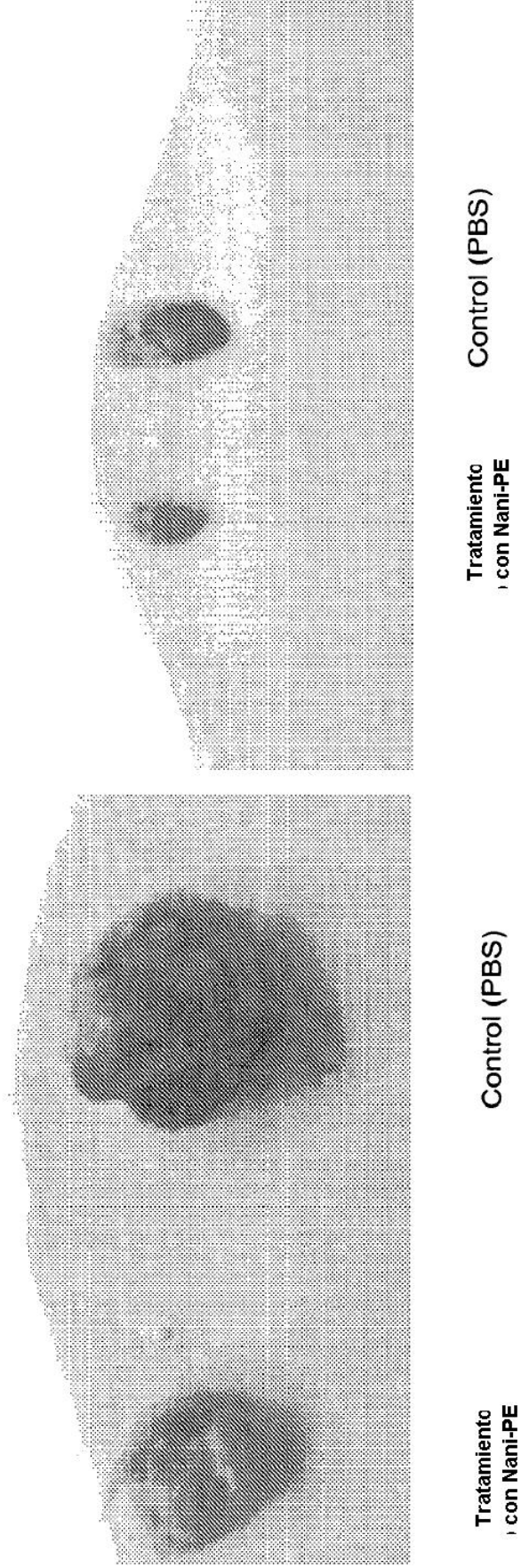


Figura 9

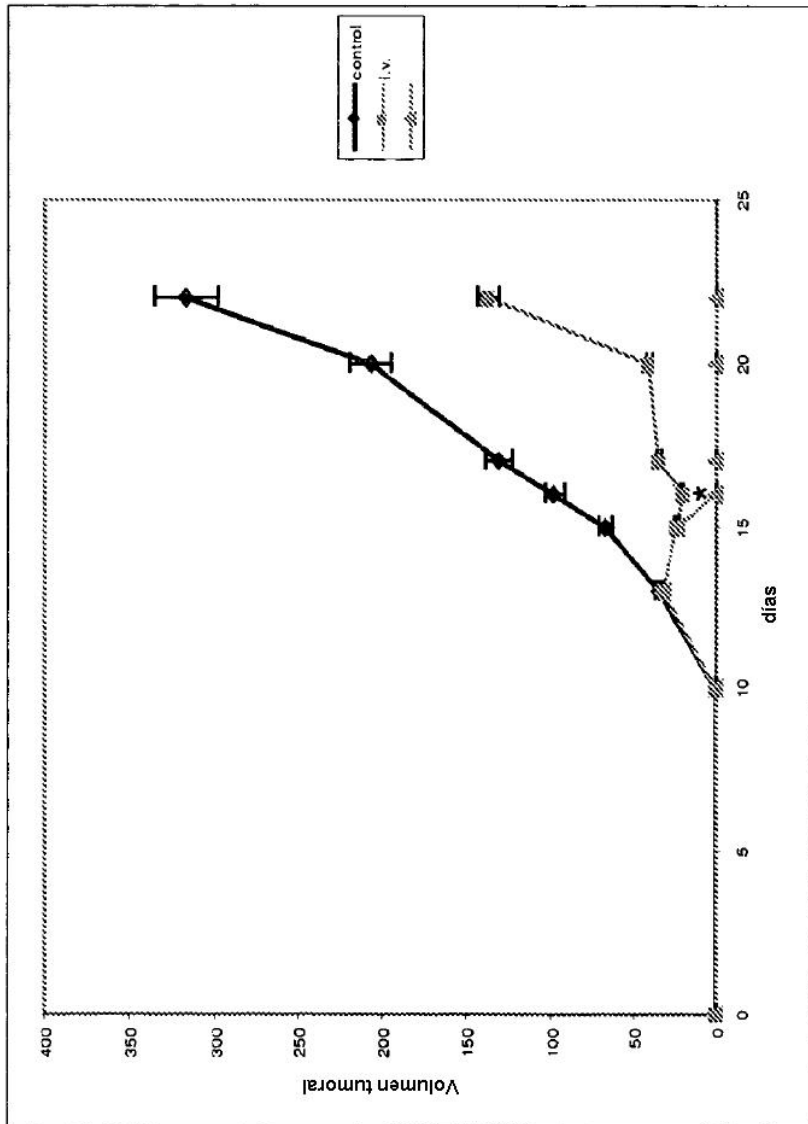


Figura 10

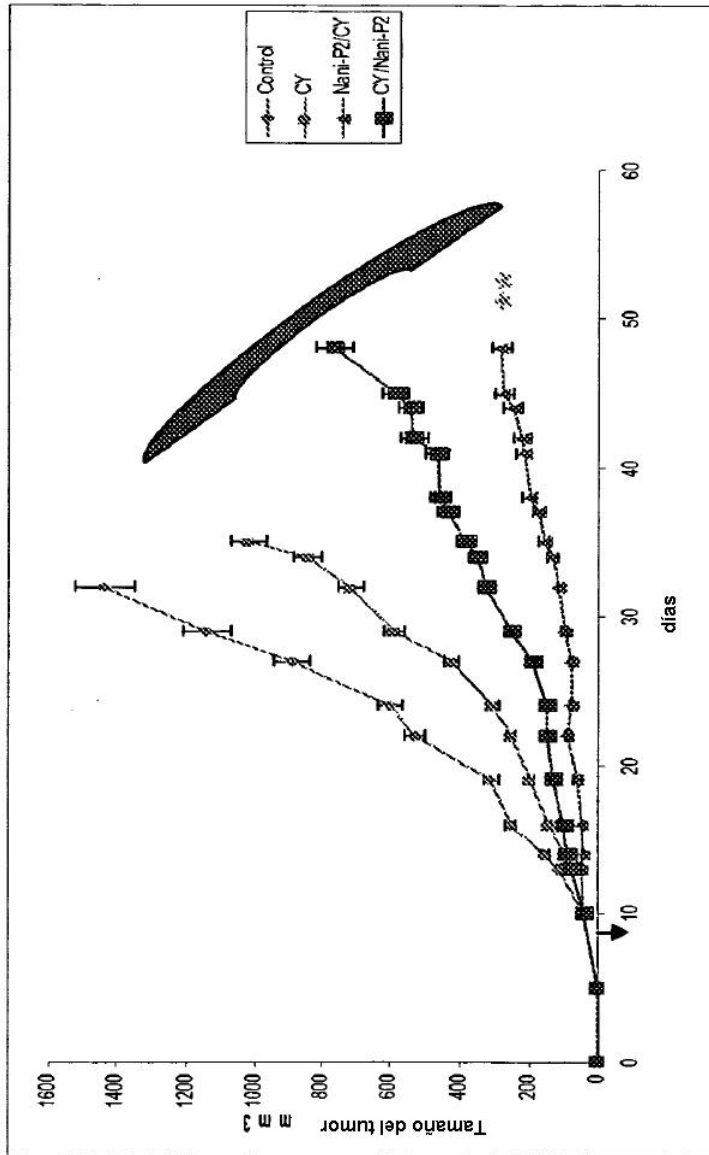
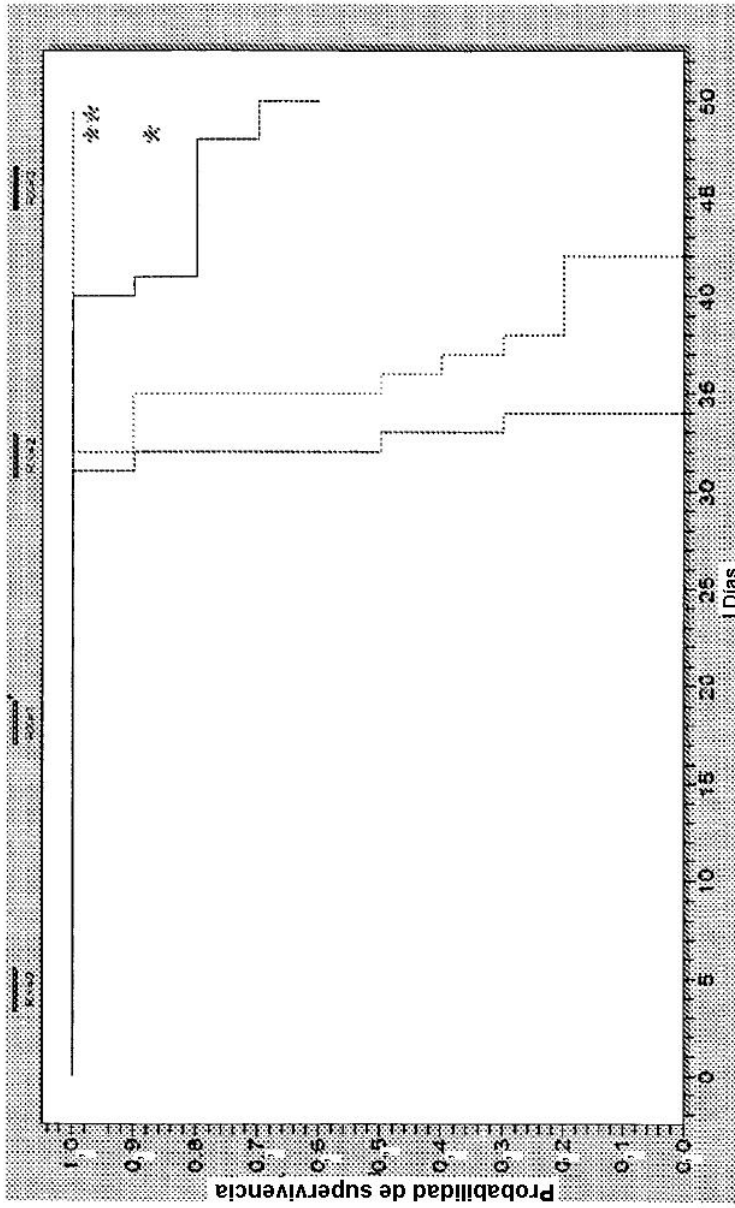


Figura 11



Control
CY sola
CY/Nani-P2
Nani-P2/CY

Figura 12