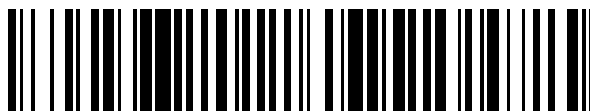


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 640**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2009 E 09712807 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2247301**

54 Título: **Uso de péptidos de fusión terapéuticos para el tratamiento y la prevención del cáncer**

30 Prioridad:

20.02.2008 US 30021

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

30.09.2014

73 Titular/es:

**ARIZONA CANCER THERAPEUTICS, LLC
(100.0%)**

**5540 E. Paseo Cimarron
Tucson, AZ 85750, US**

72 Inventor/es:

SCHROEDER, JOYCE A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 500 640 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

Uso de péptidos de fusión terapéuticos para el tratamiento y la prevención del cáncer

5 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se relaciona con el área de la terapéutica y la profilaxis del cáncer. En particular, se relaciona con métodos de inhibición, retraso y reducción del riesgo del inicio, el crecimiento y la invasión del cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

La MUC1 (DF3, CD227, episialina, POEM) es una proteína heterodimérica altamente O-glicosilada de >300 kDa, que normalmente se expresa abundantemente sobre la superficie apical de los epitelios glandulares. En más del 90 % de los carcinomas de mama humanos y de las metástasis, se pierde la localización apical y la MUC1 se sobreexpresa (en más de 10 veces más) y se subglicosila (1, 2). Se encuentra también una expresión desregulada de MUC1 en otros muchos tipos de adenocarcinomas, incluyendo cánceres de pulmón, páncreas, ovario y próstata, además de estar altamente expresada en leucemias, mielomas y linfomas (3-5). Estudios tanto en modelos genéticos de ratones como en modelos de líneas celulares han demostrado que MUC1 es un oncogén. Un modelo de ratón transgénico que dirige la sobreexpresión de MUC1 (humana) hacia la glándula mamaria murina (MMTV-MUC1) da como resultado el desarrollo de cáncer de mama y va acompañado de un fallo de la glándula mamaria para experimentar una completa regresión poslactancia por apoptosis (6). La transfección de MUC1 en fibroblastos 3Y1 induce su transformación, y la transfección de MUC1 en células de cáncer de colon demuestra que la sobreexpresión de MUC1 inhibe la apoptosis inducida por fármacos (7).

25 El dominio citoplasmático de MUC1 contiene sitios para múltiples interacciones proteicas, aunque estas interacciones están en gran medida sin formar en el epitelio polarizado de la mama normal, ya que los compañeros de unión de MUC1 se encuentran normalmente sobre la membrana basolateral (revisado en (8) y (9, 10)). Durante la progresión del cáncer, cuando existe una pérdida de polarización celular, MUC1 se sobreexpresa e interacciona funcionalmente con src, GSK3 β , el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la β -catenina, entre otros (9, 11, 12). Se ha hecho el mapa de los sitios para la interacción entre MUC1 y estas proteínas en distintos dominios dentro de la cola citoplasmática de 72 aminoácidos de MUC1 (11, 13-15). Tanto EGFR como src pueden fosforilar a MUC1 sobre una unidad YEKV, y esta fosforilación da lugar a una mayor unión de MUC1 a la β -catenina a través de un dominio SAGNGGSSLS (11). La evidencia reciente demuestra que la interacción entre MUC1 y EGFR puede modular significativamente la biología de EGFR y afectar a la transformación dependiente de EGFR {Pochampalli, 2007 #537; Pochampalli, 2007 #527}.

La familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) de las tirosina kinasas está frecuentemente desregulada en el cáncer y comúnmente amplificada y/o sobreexpresada en el carcinoma invasivo [revisado en (16)]. La familia está constituida por cuatro receptores de tirosina kinasa de tipo 1 homólogos (incluyendo EGFR, her2/neu/erbB2, erbB3 y erbB4) y múltiples ligandos relacionados [incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), entre otros]. La homo- o heterodimerización de receptores inducida por ligandos da lugar a activación de la tirosina kinasa y a transfosforilación de los restos de tirosina en el dominio citoplásmico. Esto da lugar al reclutamiento de varias proteínas efectoras, incluyendo Src, PI 3-kinasa, Shc, PLC γ , STATs, Grb2 y cbl, para obtener como resultado la proliferación, la migración, la inhibición de la apoptosis, la diferenciación o la degradación de los receptores que han sufrido endocitosis (17-20).

Se ha establecido tanto en líneas celulares de cáncer de mama humano como en ratones transgénicos que sobreexpresan MUC1 (MMTV-MUC1) que MUC1 y EGFR interaccionan bioquímicamente, para dar como resultado la potenciación de la activación de ERK p42/44 dependiente de EGF durante la lactancia (11, 21). Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión de MUC1 inhibe la ubiquitinación mediada por ligando y la degradación de EGFR aumentando al mismo tiempo su interiorización y reciclaje (Pochampalli *et al.* 2007). Para evaluar el papel de Muc1 en la transformación, generamos además ratones WAP-TGF α en un fondo nulo para Muc1 que revelaron que la expresión de Muc1 tiene un efecto dominante sobre la transformación dependiente de TGF α de la mama, promoviendo tanto la aparición como la progresión (Pochampalli *et al.* 2007b).

55 Aunque está ahora establecido que EGFR resulta potentemente regulado por la expresión de MUC1, los modelos de ratones transgénicos han implicado también a la proteína de adhesión celular, la β -catenina, en la señalización de EGFR y MUC1. En un estudio del modelo transgénico WAP-TGF α , se vio que Wnt1 y Wnt3 se activaban selectivamente en los tumores de mama más agresivos (22). Los Wnt son glicoproteínas segregadas que se unen al receptor frizzled de transmembrana, para dar como resultado una cascada de señalización que inactiva el mecanismo para la degradación de la β -catenina y da lugar a transformación (23-28). Adicionalmente, en ratones transgénicos MMTV-Wnt1, se vio que EGFR interaccionaba con la β -catenina y la fosforilaba de un modo específico de tumores (Schroeder *et al.*, 2002). Estos estudios demuestran que la β -catenina y el EGFR pueden afectar a sus rutas respectivas para promover la transformación. Finalmente, MUC1 está también implicada en la transformación dependiente de β -catenina, lo que indica que estas tres proteínas tienen la capacidad de promover

cooperativamente la progresión del cáncer. En modelos de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 cruzados sobre un fondo nulo para Muc1, la pérdida de Muc1 se corresponde con una significativa reducción en la progresión tumoral (Schroeder *et al.*, 2003). Adicionalmente, se vio que las interacciones entre la MUC1 y la β -catenina estaban muy aumentadas en muestras de tumores de mama metastáticos humanos, lo que indica que estas interacciones son clínicamente relevantes (Schroeder *et al.*, 2003).

En conjunto, estos estudios demuestran el fuerte potencial para que MUC1, EGFR y β -catenina se afecten entre sí durante la transformación, incluyendo su llamativa corregulación a más durante la transformación y la metástasis. MUC1 puede inhibir la regulación a menos de EGFR y promover la capacidad transformante tanto del EGFR como de la β -catenina, y modelos de ratones derivados genéticamente implican a MUC1 en la transformación y la metástasis dependientes de EGFR y de β -catenina. Es interesante el hecho de que los sitios de interacción sobre MUC1 para EGFR y β -catenina se sitúan en tándem sobre el dominio citoplásmico de MUC1.

Existe una continua necesidad en la técnica de desarrollar tratamientos que sean efectivos en la prevención y el tratamiento de cánceres. WO2006/113667 enseña el uso de un péptido de fusión que interrumpe la interacción entre MUC1 y β -catenina y puede ser usado para tratar un cáncer establecido. WO2004/092339 enseña composiciones y métodos para inhibir la unión del extremo carboxi de MUC1 a dominios PD2 y para aumentar la sensibilidad de las células cancerosas que expresan MUC1 a los agentes quimioterapéuticos.

Resumen de la invención

Según un aspecto de la invención, se proporciona un péptido de fusión según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un humano que tiene un riesgo elevado de cáncer identificado. Se reduce así la probabilidad de iniciación del cáncer.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido de fusión según la reivindicación 6 y un inhibidor de EGFR para uso en el tratamiento de un humano al que se ha practicado una resección de un tumor. Se reduce así la probabilidad de recurrencia o de metástasis del tumor.

Según aún otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido de fusión según la reivindicación 10 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer de piel. Se reduce o retrasa así la invasividad o el crecimiento del cáncer.

Estos y otros aspectos que resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la memoria descriptiva dotan a la técnica de nuevos métodos para el tratamiento o la prevención de cánceres.

Breve descripción de los dibujos

Figs. 1A-1F. Un péptido mimético de MUC1 (PMIP) puede entrar eficazmente en las células, promover la degradación del EGFR e inhibir la interacción de la MUC1 y de la β -catenina. Fig. 1A) secuencia de aminoácidos citoplásmicos de la MUC1 humana (MUC1CT; N° ID. SEC.: 15), que incluye un sitio de fosforilación de EGFR/src (subrayado; N° ID. SEC.: 15, restos 46-49) y un sitio de unión a β -catenina (doble subrayado; N° ID. SEC.: 15, restos 50-59). Se generaron el PTD4 (10 ng/ml) o sin (-S, sin suero) y lisados de proteínas y se separaron en una SDS-PAGE. Se sometieron los lisados a inmunoelectrotransferencia (IB) para EGFR (1005) y β -actina (AC-15). Figs. 1D-F) Se trataron células MDA-MB-468 con EGF (10 ng/ml) y o bien (Fig. 1D) hPMIP (10 μ M), o bien (Fig. 1E) PTD4 (10 μ M), o bien (Fig. 1F) PBS durante la noche. Se fijaron las células, se sondearon en cuanto a MUC1 (Rojo Texas) y β -catenina (FITC) y se examinaron en un microscopio confocal (400x). Se realizó el análisis de colocalización (flechas) usando Image Pro Plus y se le designa con píxeles blancos.

Figs. 2A-2C. PMIP inhibe la proliferación celular y la invasión de las células del cáncer de mama *in vitro*. Fig. 2A) Se cultivaron células BT20 en una placa de 96 pocillos (10⁴ células/pocillo) y se las trató diariamente durante 6 días con hPMIP (10 μ M) o con PTD4 (10 μ M) en RPMI 1640/1 % de FBS. Se realizó un ensayo MTT para cuantificar el número de células tras completarse el tratamiento (***, $p < 0,0001$). Las barras de error representan el error estándar. Se trataron líneas celulares Fig. 2B) MDA-MB-231 y Fig. 2C) BT20 con hPMIP (50 μ M), PTD4 (50 μ M) o PBS durante la noche, se marcaron con Calceína AM, se dejó que invadieran a través de una inserción Transwell (8,0 μ M) un gel de colágeno de Tipo I y las células invadidas se midieron con fluorescencia. (ANOVA, * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0001$, # $p = 0,007$, ## $p = 0,007$). Las barras de error representan la desviación estándar.

Figs. 3A-3E. PMIP inhibe significativamente el crecimiento y la recidiva tumoral *in vivo*. Fig. 3A) Se inyectaron células MDA-MB-231 en Matrigel en la almohadilla adiposa mamaria de ratones *scid* y se inició el tratamiento diario con el péptido (50 μ g/g de peso corporal de hPMIP o PTD4) cuando los tumores alcanzaron 100 mm³ (PTD4 y hPMIP $n = 8$), y se valoró el crecimiento del tumor primario (*, $p = 0,028$). Fig. 3B) Después de finalizar el tratamiento, se midió la cantidad de tiempo que tardaron los tumores en progresar hasta 1.000 mm³ (ANOVA, **, $p = 0,03$). Fig. 3C) Tras la resección, se observó a los ratones en cuanto a recrecimiento tumoral en el sitio primario o en las glándulas mamarias secundarias (PTD4 $n = 8$ y hPMIP $n = 7$). Fig. 3D) Se inyectaron células MDA-MB-231 en Matrigel en la almohadilla adiposa mamaria de ratones *scid* y se inició el tratamiento diario con el péptido (50 μ g/g de hPMIP o

PTD4) cuando los tumores alcanzaron 500 mm³ (PTD4 n=4 y hPMIP n=6), y se valoró el crecimiento tumoral primario. Fig. 3E) Después de 21 días de tratamiento, se hizo inmediatamente una resección de los tumores y se monitorizó el recrecimiento tumoral en el sitio primario y la diseminación a las glándulas mamarias secundarias (PTD4 n=4 y hPMIP n=4). Las barras de error representan el error estándar.

Figs. 4A-4D. PMIP ralentiza significativamente la progresión de tumores de glándula mamaria inducidos por MMTV-pyV mT. Fig. 4A) Se inyectó a ratones transgénicos MMTV-pyV mT con FITC-msPMIP (50 µg/g de peso corporal), se les sacrificó cuatro horas después y se visualizaron diversos tejidos usando microscopía de fluorescencia. Se muestra la localización de FITC-msPMIP en los tumores de glándula mamaria de los ratones (2,5x y 8x). Fig. 4B) Se dejó que se desarrollaran los tumores de glándula mamaria (>0,5 cm de diámetro) y se inyectó a los ratones diariamente (50 µg/g de peso corporal, 21 días de tratamiento, inyección i.p., 1X al día) con msPMIP (7 ratones) o PTD4 (6 ratones). Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se prepararon lisados de proteínas de los tumores para posterior análisis. En el curso del tratamiento, el crecimiento tumoral total para todos los sitios tumorales (msPMIP n=70, PTD4 n=60) era significativamente menor en los ratones tratados con msPMIP que en los ratones tratados con PTD4 (193,8 % ± 77,7 % frente a 589,5 % ± 283,6 %, *ANOVA p=0,039). Fig. 4C) Los tumores de glándula mamaria de los ratones tratados con msPMIP crecieron a un ritmo significativamente más lento que el de los tumores tratados con PTD4 (ANOVA p=0,0076). Fig. 4D) La distribución del tamaño tumoral para los ratones transgénicos tratados con msPMIP o PTD4 reveló que un 47 % (28 de 60 posibles sitios tumorales) de los tumores tratados con PTD4 eran mayores de 100 mm³, en comparación con un 27 % (19 de 70 posibles sitios tumorales) de los tumores tratados con msPMIP. Los números que aparecen sobre los datos son el número de tumores que cumplen con los criterios de tamaño con respecto al total de los sitios tumorales potenciales.

Figs. 5A-5B. Los tumores MMTV-pyV mT tienen una respuesta diferencial a msPMIP. Fig. 5A) Se trató el crecimiento individual de cada sitio tumoral (cada barra es una almohadilla adiposa mamaria/sitio tumoral de un ratón) de los animales descritos en la Fig. 3 diariamente con msPMIP (gris oscuro) o PTD4 (gris claro) a 50 µg/g de peso corporal durante 21 días. Se observó la progresión tumoral cada tres días durante los 21 días de tratamiento (PTD4, n=60 y PMIP, n=70). En cuatro casos (*), hubo una regresión completa de los tumores tratados con msPMIP; sin embargo, ninguno de los tumores tratados con el control (PTD4) experimentó regresión. AAM=almohadilla adiposa mamaria. Fig. 5B) Se seccionaron (3 µm) los tumores de ratones tratados con msPMIP (1, 2 paneles de la izquierda) y PTD4 (2, 2 paneles de la derecha) y se usaron a continuación para tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica con caspasa-3 escindida (200x).

Figs. 6A-6B. PMIP se asocia a una reducida expresión de Muc1. Fig. 6A) Se inyectó a un ratón MMTV-pyV mT tratado con msPMIP (P) representativo y a un ratón PTD4 (C) 30 minutos antes del sacrificio factor de crecimiento epidérmico (1 µg/g de peso corporal) y péptido. Después del sacrificio, se recogieron los tumores y se generaron lisados de proteína. Se separó la proteína (50 µg) por SDS-PAGE, se transfirió y se sometió a inmunoelectrotransferencia para la expresión de fosfotirosina (PY99), EGFR (1005), Muc1 (CT2) y β-actina (AC-15). Fig. 6B) Se analizaron de forma similar lisados de tumores de xenoinjertos MDA-MD-231 (no tratados con EGF; descritos en Fig. 2) para determinar los niveles de expresión de EGFR y de proteína MUC1. Se midieron los niveles de proteína relativos de Muc1 por densitometría y se representaron en un gráfico (Muc1/β-actina, ANOVA, *p=0,014). Los pesos moleculares son mostrados a la derecha. IB = inmunoelectrotransferencia. Las líneas blancas a través de los blots indican mismo gel y misma exposición, pero no contiguos.

Descripción detallada de la invención

Es un descubrimiento que subyace a la presente invención que los péptidos miméticos de MUC1 son selectivamente retenidos en los tumores de la glándula mamaria, en el colon y en la piel tras administración sistémica. Más aún, los péptidos miméticos de MUC1 reducen la iniciación tumoral. Además, los péptidos miméticos de MUC1 pueden ser usados conjuntamente con otros tratamientos anti-EGFR en el contexto de adyuvantes, es decir, tras cirugía.

El péptido de fusión para uso según la invención tiene la estructura A-B-C o C-B-A, donde A es un dominio de transducción de proteína que aumenta la translocación de macromoléculas unidas a través de las membranas celulares, seleccionado entre el grupo consistente en los N^o ID. SEC. 3-6. B es un espaciador de 0-5 restos de aminoácido. C es un polipéptido de 6-15 restos de aminoácido. C comprende todo o una porción de PYEKVSAGNGGSSLS (N^o ID. SEC.: 1). La porción de C comprende GGSSLS (N^o ID. SEC.: 2). Como alternativa, al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está conservadoramente substituido, de tal forma que un aminoácido polar no cargado reemplaza a un aminoácido polar no cargado, o que un aminoácido no polar reemplaza a un residuo de aminoácido no polar, o que un aminoácido ácido reemplaza a un aminoácido ácido, o donde uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo A.

Se puede usar cualquier dominio de transducción de proteína (DTP) en proteínas de fusión. Éstos incluyen cualquiera de los dominios que han sido previamente identificados y utilizados para la transducción proteica. Véase, por ejemplo, la amplia Tabla 1 de Dietz y Bahr, Molecular and Cellular Neuroscience, 27 (2004) 85-131. Se muestran algunos de dichos dominios en los N^o ID. SEC.: 3, 4, 5 y 6. Se pueden usar otros DTP, inclusive sintéticos. Estos dominios facilitan la captación por las células de los péptidos unidos.

Los espaciadores para su uso en proteínas de fusión son restos de aminoácido adicionales que se utilizan en proteínas de fusión normalmente para facilitar la fabricación o la síntesis. Éstos pueden ser relativamente inocuos y tienen una longitud de 0 a 5 restos. Los conectores pueden ser restos monótonos o mixtos. Los restos pueden ser aleatorios o secuencias obtenidas de otras proteínas o estar diseñados para una propiedad particular, por ejemplo, física, química o biológica.

Péptidos del dominio citoplásmico MUC1 tales como el N° ID. SEC.: 14 aumentan la invasión de las células del cáncer de mama. Schroeder, 2003. Sorprendentemente, porciones más cortas de dichos péptidos tienen realmente el efecto opuesto. Estos péptidos comprenden de 6 a 15 restos de aminoácido contiguos seleccionados entre el N° ID. SEC.: 1 e incluyen la secuencia de aminoácidos mostrada en el N° ID. SEC.: 2. Se pueden usar ligeras desviaciones con respecto a la secuencia precisa para optimizar la actividad, tal como por sustitución de uno, dos o tres restos para producir cambios conservadores o por sustitución con alanina. Los cambios conservadores substituyen restos por otros similares, tal como un residuo polar no cargado por uno polar no cargado, o un residuo no polar por uno no polar, o un residuo ácido por uno ácido. Así, los restos G o S pueden ser substituidos con G, S, T, C, Y, N y Q. Los restos L pueden ser substituidos con A, V, I, P, F, W y M. Los restos A, V y P pueden ser substituidos con restos A, V, L, I, P, F, W y M. Los restos Y o N pueden ser substituidos con restos G, S, T, C, Y, N y Q. Los restos E pueden ser substituidos con un residuo D. Los restos K pueden ser substituidos con un residuo R o H. Cualquier residuo puede ser substituido con un residuo de alanina, a menos que dicha sustitución resulte destruir la actividad inhibitoria de la invasión y de la metástasis. Dichos péptidos substituidos pueden ser fácilmente estudiados, por ejemplo, usando ensayos de invasión, ensayos de crecimiento tumoral, ensayos de iniciación tumoral, etc..

Las células cancerosas, *in vitro* o *in vivo*, pueden ser puestas en contacto con, o se les pueden suministrar, los péptidos de fusión de la presente invención. Éstos pueden ser directamente suministrados como péptidos o pueden ser endógenamente producidos suministrando a las células vectores de ácidos nucleicos que expresan y producen los péptidos de fusión en las células. Para la administración *in vivo*, se puede usar cualquier técnica de suministro conocida en este campo, incluyendo, aunque sin limitación, la inyección intratumoral directa, la inyección intramuscular, la inyección intravascular, la inyección subcutánea, la inyección intraperitoneal, etc. Se puede realizar el suministro *in vitro*, por ejemplo, simplemente suministrando el péptido de fusión al medio de cultivo.

Como cánceres y células cancerosas que pueden ser tratados, se incluyen los de mama, piel, colon, ovario, próstata, cervical, colorrectal, pulmón, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, riñón e hígado. El efecto que se observa tras la administración es un grado reducido o un ritmo retardado de iniciación, crecimiento, invasión y metástasis. Se describen ensayos adecuados para medir estos procesos en los ejemplos. También se pueden utilizar otros ensayos conocidos en la técnica.

Se pueden formular o modificar péptidos de fusión como es sabido en la técnica. Esto puede conllevar modificaciones covalentes, tales como rematado o PEGilación, o combinación con micelas o liposomas. Dichas modificaciones y formulaciones pueden aumentar la estabilidad en el organismo y, por lo tanto, permitir que mayores porcentajes de la dosificación aportada alcancen el cáncer diana. Las proteínas de fusión pueden ser también utilizadas conjuntamente con otros tratamientos, incluyendo, aunque sin limitación, inhibidores de EGFR. Los tratamientos pueden ser administrados simultánea o seriadamente. Otros tratamientos adecuados para tratar cánceres incluyen administración o infusión de fármacos quimioterapéuticos, anticuerpos antitumorales, anticuerpos antirreceptores, tratamiento de radiación, fármacos radiomarcados y cirugía. El uso de dos modalidades que actúan de diferentes formas puede aportar un mayor beneficio al paciente. Pueden ser inhibidores de EGFR adecuados anticuerpos o inhibidores de kinasas, tales como panitumumab, cetuximab, gefitinib y erlotinib.

Se puede obtener un efecto inhibitorio similar sobre la unión de MUC1 a β -catenina suministrando anticuerpos a la célula o al paciente de cáncer. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo, monoclonales o policlonales, de una sola cadena o de múltiples cadenas. Los anticuerpos pueden ser producidos en un mamífero hospedador, en cultivo celular o en células recombinantes. Los anticuerpos se unen a un epitopo contenido en el N° ID. SEC.: 1. Los anticuerpos pueden ser producidos usando un péptido según el N° ID. SEC.: 1 como inmunógeno, por ejemplo, o usando proteínas de fusión según la invención como inmunógenos, o usando otras proteínas de fusión como inmunógenos.

Los vectores para el suministro de ácidos nucleicos codificantes de las proteínas de fusión de la presente invención pueden ser cualesquiera que sean conocidos en la técnica. Los vectores adenovíricos y los vectores adenoasociados son bien conocidos y ampliamente utilizados. También se pueden usar vectores no víricos, tales como nanopartículas, liposomas y micelas. Se pueden usar vectores retrovíricos en algunas realizaciones. El experto en la técnica puede seleccionar un vector que sea adecuado para sus fines. De forma similar, el experto en la técnica puede seleccionar un sistema de vector y célula huésped para la fabricación recombinante de las proteínas de fusión de la invención en cultivo.

Una persona identificada como poseedora de genes heredados asociados al cáncer tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer. Dichas personas pueden ser tratadas para reducir su riesgo de iniciación del cáncer. De forma similar, quienes hayan estado expuestos a riesgos medioambientales, tales como la caída de bombas atómicas, desechos de combustibles nucleares y otros contaminantes, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer. Como genes que pueden estar mutados y trastornos dominantes autosómicos causados por éstos, se incluyen, aunque sin limitación, BRCA1: cáncer de mama, BRCA2: cáncer de mama, APC: cáncer de colon, HN-PCC: cáncer de colon, CDKN2: melanoma. Otros riesgos de cáncer heredado dominante autosómico incluyen el síndrome del nevo de células basales, la neurofibromatosis de tipo 2, el síndrome de Carney, la osteocondromatosis, múltiple, el cordoma, familiar, el paraganglioma, familiar, el síndrome de Cowden, el síndrome de Peutz-Jeghers, el cáncer esofágico con tilosis, el cáncer de próstata, el cáncer gástrico, familiar, el cáncer renal, familiar, el síndrome de Li-Fraumeni, el retinoblastoma, la neoplasia endocrina múltiple de tipo 1, la esclerosis tuberosa, la neoplasia endocrina múltiple de tipo 2, la enfermedad de von Hippel-Lindau, la neurofibromatosis de tipo 1 y el tumor de Wilms. Como trastornos recesivos autosómicos que predisponen al cáncer, se incluyen la ataxiatelangiectasia, el síndrome de Rothmund-Thomson, el síndrome de Bloom, la xeroderma pigmentosa, el síndrome de Werner y la anemia de Fanconi.

Los péptidos miméticos de MUC1 (MIP) unidos a un dominio de transducción de proteína (DTP) pueden entrar libremente en células transformadas e inhibir su invasión *in vitro*. Estos mismos péptidos pueden inhibir el crecimiento tumoral primario, la diseminación del tumor y la recidiva de tumores tras su resección, por ejemplo, en un modelo de cáncer de mama ortotópicamente implantado. Los péptidos miméticos PMIP, tales como los N^o ID. SEC.: 17 y 18, pueden sobrevivir en circulación con retención específica de tejidos y sin toxicidad detectable. Es importante el hecho de que PMIP puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral, por ejemplo, en un modelo murino espontáneo que imita el cáncer de mama humano. En cuanto al mecanismo, este efecto inhibitorio de tumores está estrechamente asociado a una reducción en la expresión de EGFR y MUC1. Conjuntamente, estos datos demuestran que estos fármacos intracelulares basados en péptidos muestran una potente eficacia como tratamiento no tóxico para cánceres.

La sobreexpresión de la MUC1 humana en glándulas mamarias de ratones promueve la transformación, y la pérdida de MUC1 en varios modelos transgénicos puede retrasar significativamente la aparición de tumores (6, 10, 12). Esto puede ser debido al número de compañeros oncogénicos con los que se ha demostrado que interacciona MUC1, a saber, β -catenina, src y EGFR [revisado en (8)]. Este péptido mimético está diseñado para bloquear las interacciones entre MUC1, β -catenina y EGFR, y hemos demostrado que el tratamiento con PMIP ciertamente bloquea las interacciones de MUC1 con estas proteínas. Además, observamos una pérdida de expresión de MUC1 en respuesta al tratamiento con PMIP bajo determinadas condiciones, lo cual puede ser el resultado de una regulación a menos de EGFR. Es tentador especular que, en presencia de PMIP, MUC1 y EGFR trafican alternativamente y entran en la ruta de degradación lisosómica, lo que conduce a su mayor degradación. El tratamiento con PMIP de células MDA-MB-231 que sobreexpresan MUC1 bajo un promotor de CMV durante sólo 3 horas en cultivo induce una pérdida de sobreexpresión de MUC1, lo que indica que el efecto no está transcripcionalmente regulado (datos no mostrados).

Una observación importante es la falta de toxicidad asociada al tratamiento con PMIP (no hay pérdida de peso, signos de distrés o fallo de órganos). Aunque éste no es un resultado inesperado con el uso de un péptido endógeno, el mismo apunta a un nivel potencialmente bajo de toxicidad en pacientes. También hemos examinado la posibilidad de que PMIP haya activado una respuesta inmune en los animales transgénicos MMTVpyV mT con inmunidad intacta. Al examinar infiltrados leucocitarios usando los niveles proteicos de CD45 como marcador, no encontramos ningún aumento en aquellos tumores tratados con PMIP frente al control ((337); datos no mostrados). Adicionalmente, estudios por grupos que investigan la actividad adyuvante potencial del dominio de transducción de proteína han descubierto que el dominio de transducción de proteína TAT no es inmunogénico (38).

Hemos demostrado recientemente que MUC1 inhibe la degradación dependiente de ligando de EGFR, para dar como resultado una mayor estabilidad del receptor (9). Además, hemos demostrado que esta interacción promueve las propiedades oncogénicas de EGFR (10). Ninguno de los modelos murinos usados en estos experimentos mostraron previamente ser dependientes de EGFR para la progresión, y sin embargo PMIP es significativamente efectivo en cada modelo. Esto indica que PMIP puede tener amplias aplicaciones contra tumores que sobreexpresan MUC1, lo que incluye la mayoría de las neoplasias epiteliales (39). Además, PMIP puede servir como una importante terapia adyuvante con tratamientos anti-EGFR [revisado en (40)], que se incorpora expresamente con este fin]. Nuestros datos indican que MUC1 induce la interiorización, el tráfico alterado y la mayor señalización de EGFR (9). Por lo tanto, si PMIP bloquea estas interacciones, se podría potenciar la terapia anti-EGFR que se basa en la localización superficial de EGFR por cosuministro de PMIP.

Hemos demostrado la eficacia de fármacos basados en péptidos unidos a DTP y el valor de dianas dirigidas a MUC1 en el cáncer, especialmente en el cáncer de mama. Es importante el hecho de que estos datos indican que PMIP es un potente fármaco que es activo en todas las etapas de la progresión tumoral: inhibición de la iniciación, inhibición del crecimiento, inducción de la regresión e inhibición de la diseminación metastática.

EJEMPLO 1 -- Métodos

Cultivo celular. Se obtuvieron células de las líneas celulares de cáncer de mama metastático MDA-MD-231 y BT20 de la American Tissue Culture Collection. Se cultivaron estas líneas celulares con un 10 % de Suero Bovino Fetal (Cellgro, Herndon, VA), un 1 % de Penicilina-Estreptomocina-Glutamina (Invitrogen, Eugene, OR) y medio RPMI 1640 (Cellgro) a 37°C con un 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada.

Ensayo de invasión. Se vertió matriz de colágeno (0,9 mg/ml de colágeno de cola de rata de tipo I (BD Biosciences, Billerica, MA), 83,0 % (v/v) de medio M-199 (Life Technologies) y 0,18 % de NaHCO₃ (Fisher, Hampton, NH)) en una placa de 24 pocillos. Antes de la polimerización del colágeno, se puso una inserción Transwell de 0,8 µm de poro (Coming Inc., Corning, NY) encima de la matriz. Se rehidrató el colágeno polimerizado usando un quimioatrayente (FBS 20 %/RPMI 1640 con 100 ng/ml de EGF). Se trataron las células MDA-MB-231 con 50 µM de péptido en medio RPMI 1640 libre de suero durante 17 horas. Antes de cargar las células en las inserciones Transwell, se las marcó fluorescentemente con Calceína-AM (Invitrogen) durante 30 minutos y se las lavó después con PBS. Las células fueron entonces resuspendidas en un medio libre de suero péptido 50 µM/RPMI 1640 y cargadas en las inserciones de cada pocillo (266.000 células/pocillo). Se dejó que las células invadieran la matriz durante 12 h a 37°C con un 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada. Después de las 12 h, se trató la matriz de colágeno con un 0,25 % de colagenasa en FBS 40 %/PBS y se retiraron las inserciones (Calbiochem, San Diego, CA). Se midió el número de células fluorescentemente marcadas que habían invadido el colágeno usando un espectrofotómetro de Molecular Devices (Ex: 485, Em: 538 y Corte: 530).

Inmunoprecipitación e inmunoelectrotransferencia. Se trató la proteína como se describe en (9).

Densitometría. Se realizó el análisis de inmunoelectrotransferencia como en (9).

Anticuerpos y factores de crecimiento. Se compró CT2 (anti-cola citoplásmica de MUC1) a Neomarkers Inc. (Fremont, CA). Se compraron los anticuerpos contra la tirosina fosforilada (PY99) y EGFR/erbB1 (1005) todos ellos a Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). El anticuerpo para la β-actina era de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Se adquirieron anticuerpos secundarios conjugados con HRP de Molecular Probes (Invitrogen) y se compró el anticuerpo antihámster conjugado con HRP a Jackson Labs (West Grove, PA). Se guardó el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a -20°C a una concentración de 100 ng/µl (Invitrogen).

Inmunofluorescencia. Se trataron células BT20 durante 2 horas con hPMIP 200 µM marcado con FITC y se fijaron en paraformaldehído al 4 %/PBS. Se lavaron las células fijadas 3 veces con NaN₃ 0,02 %/PBS y se incubaron con reactivo antidesvanecedor *Slowfade* Gold con DAPI (Invitrogen). Se visualizaron las células con un microscopio compuesto DMLB Leica de fluorescencia.

Síntesis peptídica. Se sintetizaron los polipéptidos hPMIP (Nº ID. SEC.: 17), FITC-hPMIP, msPMIP (Nº ID. SEC.: 18), FITC-msPMIP y PTD4 (Nº ID. SEC.: 16) mediante GenScript (Scotch Plains, NJ) y se suministraron liofilizados. Se resuspendieron los péptidos a una concentración de 500 µM en PBS y se guardaron a -80°C en alícuotas para un solo uso.

Xenoinjertos de tumor de mama humano. Se estudiaron ratones inmunocomprometidos (*scid*) (Taconic, Rockville, MD) en cuanto a la presencia de IgG en suero y se vio que tenían <20 µg/ml de IgG. Se inyectaron a ratones hembra (de cuatro a seis semanas de edad) 1x10⁷ células embebidas en Matri-gel (BD Biosciences) en la almohadilla adiposa mamaria y se dejó que crecieran hasta 100 mm³ o hasta 500 mm³, basándose en la fórmula $a^2 \times b/2$, donde a es el diámetro menor y b es el diámetro mayor. Se inyectaron a los ratones intraperitonealmente (i.p.) 50 µg/g de peso corporal de PMIP o de péptido control PTD4 durante 21 días y se hizo una medición con calibre cada dos días. Bien al final de los 21 días, bien después de que el tumor hubiese alcanzado 800 mm³, se hizo una resección de los tumores inyectando a los ratones buprenorfina (2,5 mg/kg de peso corporal, Infusion Solutions, Totowa, NJ) al menos una hora antes de la resección y anestesiando a los ratones con isoflurano (Abbott, Abbott Park, IL). Después de la cirugía, los ratones fueron tratados con buprenorfina (2,5 mg/kg de peso corporal) 8 y 16 h poscirugía. Se hizo entonces un seguimiento de los animales durante 10 días para examinar el recrecimiento en el sitio tumoral primario o en las glándulas mamarias secundarias y luego fueron sacrificados.

Ratones transgénicos. Se estudió a ratones MMTV- pyV mT (33), obtenidos de Jackson Laboratories), tras el desarrollo de tumores que medían ≥ 0,5 cm en al menos un diámetro. Sólo se incluyó en el estudio a ratones mayores de siete semanas de edad y se excluyó a los ratones que desarrollaron quistes de líquido. Los animales fueron inyectados i.p. con 50 µg/g de peso corporal de msPMIP o PTD4 una vez al día durante 21 días. Se midió cada una de diez glándulas mamarias usando un calibre cada dos días y se usaron las mediciones para determinar el volumen tumoral basándose en la fórmula $a^2 \times b/2$, siendo a el diámetro menor y siendo b el diámetro mayor. Después del tratamiento durante 21 días, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ y se hizo una resección de los tejidos. Varios ratones tratados con msPMIP fueron inyectados con FITC-msPMIP (50 µg/g de peso corporal) una o cuatro horas antes del sacrificio y se visualizaron los tejidos intactos usando un microscopio de disección MZFLIII Leica de fluorescencia.

Los estudios tanto de xenoinjertos como de ratones transgénicos fueron realizados por los Experimental Mouse Shared Services (Universidad de Arizona, Tucson) según protocolos aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Arizona.

5 *Análisis estadístico.* Todas las estadísticas fueron realizadas en Excel (Microsoft).

EJEMPLO 2 -

PMIP es retenido por las células, reduce la fosforilación de EGFR e inhibe las interacciones de MUC1 y β -catenina.

10 El dominio citoplásmico de MUC1 está compuesto por 72 aminoácidos, dentro de los cuales se encuentra un dominio de 15 aminoácidos que contiene sitios de fosforilación de EGFR (humano=YEKV y murino=YEEV) y unión de β -catenina (humano=SAGNGGSSLS (Nº ID. SEC.: 9) y murino=SAGNGSSLS (Nº ID. SEC.: 19), Fig. 1A) (11, 29). Sintetizamos un péptido de 15 aminoácidos para determinar si éste podría actuar de un modo negativo dominante para bloquear interacciones entre la MUC1 endógena y EGFR/ β -catenina/src. Para permitir la entrada de este péptido en la célula, lo sintetizamos en tándem con un dominio de transducción de proteína [PTD4, Fig. 1A (30),
15 revisado en (31)]. Se vio que las células pulsadas *in vitro* con un PTD4 marcado con FITC conjugado con péptidos MIP (FITC-hPMIP) contenían el péptido fluorescente y que éste quedaba retenido a lo largo del tiempo (Fig. 1B).

20 Como las interacciones de la MUC1 con la β -catenina aumentan durante la progresión metastática, examinamos a continuación los efectos *in vitro* del tratamiento con hPMIP sobre estas interacciones en la línea celular BT20 (12, 32).

EJEMPLO 3 -

25 *PMIP inhibe la invasión.* Se seleccionaron estas células, ya que representan modelos de alta y baja expresión de MUC1, respectivamente (datos no mostrados). Vimos que el tratamiento con PMIP inhibía significativamente la capacidad de las células para invadir un filtro de 8,0 μ M y una matriz de colágeno de Tipo I en comparación con células tratadas con péptido de control (PTD4) o PBS (Figs. 1C y D). Para determinar si hPMIP también podría afectar a la proliferación y/o apoptosis, realizamos una cuantificación de Anexina V y del número de células en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Se vio que el tratamiento con hPMIP no tenía efectos detectables sobre la apoptosis o el crecimiento celular cuando se cultivaron las células sobre plástico (datos no mostrados).

EJEMPLO 4 -

35 *PMIP inhibe el crecimiento tumoral e inhibe la recidiva en un modelo de cáncer de mama de xenoinjerto.* Como hPMIP inhibía potentemente la invasión celular *in vitro*, evaluamos a continuación la capacidad de hPMIP para suprimir la recidiva y la metástasis tumoral *in vivo*. Examinamos si hPMIP podría alterar el potencial metastático de células de cáncer de mama MDA-MB-231 implantadas en la almohadilla adiposa mamaria de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (*scid*). Vimos que el tratamiento con hPMIP daba una inhibición substancial del
40 recrecimiento tumoral y de la diseminación a las glándulas mamarias secundarias tras la resección del tumor primario (Fig. 2B y 2E). Además, vimos que el tratamiento con hPMIP también ralentizaba el crecimiento del tumor primario (Fig. 2C).

45 En el primer experimento (Figs. 2A y 2B), se dejó que las células establecieran una gran masa tumoral (500 mm³) y se inyectó a los ratones (i.p.) durante 21 días hPMIP o péptido de control (PTD4) (Fig. 2A). Al final del tratamiento, se hizo una resección de los tumores de mama primarios y se hizo un seguimiento de los animales para examinar los índices de recrecimiento tumoral y/o metástasis a las glándulas mamarias secundarias. Aunque se observaron recrecimiento y tumores en las glándulas mamarias secundarias en igual número para ambos grupos de tratamiento,
50 el volumen tumoral para los animales tratados con el control era de un promedio de 760 mm³, mientras que para los tratados con PMIP era de un promedio de sólo 73 mm³ (Fig. 2B). Obsérvese que los ratones no fueron tratados con fármaco durante los 10 días en los que se hizo un seguimiento del recrecimiento. También observamos una reducción en el tamaño tumoral en los animales tratados con hPMIP en comparación con el control, y a continuación diseñamos un experimento que nos permitiría determinar si hPMIP afectaba al índice de crecimiento tumoral en este
55 modelo.

Para determinar los efectos potenciales de hPMIP sobre el crecimiento tumoral primario, repetimos el experimento del xenoinjerto de MDA-MB-231 (21 días de tratamiento con fármaco), pero comenzamos el tratamiento con un tamaño tumoral menor (100 mm³) (Figs. 2C-2E). Dejamos que los tumores continuaran creciendo después de 21 días de tratamiento con fármaco y realizamos una resección quirúrgica de los tumores primarios cuando alcanzaron un volumen de 800 mm³, lo que nos permitió evaluar también la diseminación del tumor en este experimento (Fig. 2D). El tratamiento con hPMIP dio como resultado una reducción significativa en el tamaño del tumor en comparación con los animales tratados con el control (Fig. 2C, p=0,028). Esto se correspondía con un aumento significativo en el período de tiempo necesario para que los ratones tratados con hPMIP alcanzaran el tamaño de resección de 800 mm³ (Fig. 2D, p=0,03). Aunque el tratamiento finalizó aproximadamente 20 días antes de la
65

resección, observamos que el tratamiento con hPMIP reducía substancialmente la cantidad de recrecimiento y diseminación tumoral 10 días después de la resección (Fig. 2E). En conjunto, estos datos demostraban que el tratamiento con hPMIP puede inhibir el crecimiento, la diseminación y la recidiva tumoral en un modelo de cáncer de mama altamente metastático.

EJEMPLO 5

PMIP inhibe el crecimiento tumoral e induce regresión en el cáncer de mama espontáneo. Aunque el modelo del xenoinjerto demostraba el efecto del tratamiento con hPMIP sobre el crecimiento y la progresión de líneas celulares establecidas, quisimos determinar cómo afectaría msPMIP a la iniciación y progresión tumoral en un modelo murino que recapitula mejor el cáncer de mama humano. El modelo del ratón transgénico MMTV-pyV mT del cáncer de mama se parece mucho al cáncer de mama humano por activación de múltiples vías de señalización, incluyendo AKT, src y shc (33, 34). Estudios han demostrado que el cáncer de mama resultante imita patológica y molecularmente la progresión completa de la hiperplasia, del carcinoma ductal *in situ* y de los adenocarcinomas observados en la enfermedad humana (35, 36). Para determinar si se podría suministrar el péptido a las glándulas mamarias y tumores de estos animales, inyectamos msPMIP marcado con FITC y analizamos la retención del péptido (Fig. 3A). Una hora después de la inyección, se detectó FITC por toda la cavidad corporal de los animales, incluyendo todos los órganos (datos no mostrados). Después de cuatro horas, se vio que FITC-msPMIP quedaba retenido selectivamente en el tumor de la glándula mamaria y en el colon y la piel (Fig. 3A y datos no mostrados).

Para determinar los efectos de msPMIP sobre la progresión del cáncer de mama espontáneo, se trató a ratones MMTV-pyV mT portadores de tumores de glándula mamaria de >0,5 cm de diámetro durante 21 días con msPMIP o con el péptido de control PTD4. El tratamiento tuvo un efecto dramático sobre el crecimiento tumoral, ya que msPMIP ralentizaba significativamente el crecimiento tumoral total de ~590 % a ~194 % a lo largo de los 21 días de tratamiento ($p=0,039$; Fig. 3B). Adicionalmente, el tratamiento con msPMIP redujo significativamente el índice de crecimiento tumoral a sólo 25 mm³/día en comparación con 69 mm³/día en los tumores tratados con el control (PTD4) ($p=0,007$; Fig. 3C). Obsérvese que el tratamiento de ratones MMTV-pyV mT con hPMIP (en oposición a msPMIP) no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral, lo cual resalta la especificidad de aminoácidos de PMIP.

Analizamos a continuación el tamaño general de tumores que surgieron a lo largo del estudio. Este análisis demuestra que, mientras que un 13 % de los tumores en el grupo control (PTD4) crecieron a más de 500 mm³ hacia el final del estudio, sólo un 1 % de los tumores en el grupo tratado con msPMIP alcanzó ese tamaño (Fig. 3D). Como este modelo transgénico tenía una expresión continuada del transgén T medio del poliovirus que dirige la tumorigénesis a lo largo de todo el estudio, examinamos a continuación los efectos del tratamiento con fármaco sobre la formación de nuevos tumores. Aunque tanto el grupo de msPMIP como el control (PTD4) tenían un número similar de tumores de 100-300 mm³ de tamaño al comienzo del tratamiento, este número se duplicó al final del tratamiento en el grupo control, pero permaneció igual en el grupo de msPMIP (Fig. 3D). Estos datos indicaban que el tratamiento con msPMIP inhibe la iniciación tumoral en este modelo. Para analizar aún más la iniciación tumoral, evaluamos el porcentaje de tumores que se iniciaron durante el tratamiento con fármaco (la iniciación es igual al porcentaje de transiciones tumorales de 0 mm³ a 100 mm³). Este análisis demuestra que en el grupo de msPMIP hubo una reducción significativa ($p=0,0045$; Fig. 3E) de la iniciación tumoral durante el estudio.

Aunque se observaron reducciones altamente significativas en la formación y el crecimiento de tumores con el tratamiento de ratones MMTV-pyV mT portadores de tumores con msPMIP, no todos los tumores del estudio respondieron al tratamiento (Fig. 4). El análisis de cada glándula mamaria demuestra que, aunque la mayoría de los índices de crecimiento tumoral se ralentizaron substancialmente en respuesta a msPMIP, una serie de tumores continuaron creciendo, lo cual es indicativo de la activación de la ruta estocástica en este modelo. Es importante el hecho de que un subgrupo de tumores establecidos tratados con msPMIP (cuatro tumores) sufrieron una regresión completa bajo el tratamiento, aunque esto no ocurrió con ninguno de los tumores tratados con el control (Fig. 4, *).

EJEMPLO 6 -

El tratamiento con msPMIP da lugar a una reducción de los niveles de EGFR y Muc1. Previamente, observamos que la expresión de MUC1 inhibe la degradación dependiente de ligando de EGFR, mientras que otros demostraron que la secuencia SAGNGGSSLS facilita las interacciones MUC1/ β -catenina (9, 11). Para determinar si msPMIP afectaba a la degradación dependiente de EGF de EGFR, generamos lisados de proteínas a partir de tumores de animales MMTV-pyV mT a los que se habían inyectado EGF y péptido 30 minutos antes del sacrificio de los animales (tras un tratamiento estándar con fármaco de 21 días). Observamos una reducción llamativa en la expresión de EGFR y en la correspondiente fosfotirosina en el ratón tratado con msPMIP en comparación con el animal tratado con el control (Fig. 5A). Obsérvese que en este ratón no quedaban tumores francos tras el tratamiento de 21 días con msPMIP, mientras que obtuvimos seis tumores de más de 400 mm³ de los animales tratados con el control.

Para determinar si msPMIP bloqueaba la interacción entre Muc1 y β -catenina, comenzamos por establecer niveles de expresión de la proteína Muc1 en los lisados de tumores. Es interesante el hecho de que vimos que el tratamiento con msPMIP inducía una pérdida de expresión de la proteína Muc1 tanto en el modelo MMTV-pyV mT

(Figs. 5A y 5B) como en el modelo del xenoinjerto MDA-MB-231 (Figs. 5C y 5D). Aunque el mecanismo de esta pérdida es desconocido, ciertamente daría lugar a una pérdida de señalización oncogénica dependiente de Muc1.

Referencias

5

1. Hilkens, J., Vos, H.L., Wesseling, J., Boer, M., Storm, J., van der Valk, S., Calafat, J., y Patriarca, C. 1995. Is episialin/MUC1 involved in breast cancer progression? *Cancer Lett* 90:27-33.

10

2. Zotter, S., Hageman, P.C., Lossnitzer, A., Mooi, W.J., y Hilgers, J. 1988. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Reviews* 11-12:55-101.

15

3. Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grunebach, F., Wirths, S., Kanz, L., Buhning, H.J., y Brugger, W. 2001. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 61:6846-6850.

20

4. Takahashi, T., Makiguchi, Y., Hinoda, Y., Kakiuchi, H., Nakagawa, N., Imai, K., y Yachi, A. 1994. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol* 153:2102-2109.

25

5. Teruya-Feldstein, J., Donnelly, G.B., Goy, A., Hegde, A., Nanjangud, G., Qin, J., Thaler, H., Gilles, F., Dyomin, V.G., Lloyd, K.O., *et al.* 2003. MUC-1 mucin protein expression in B-cell lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:28-32.

30

6. Schroeder, J.A., Masri, A.A., Adriance, M.C., Tessier, J.C., Kotlarczyk, K.L., Thompson, M.C., y Gendler, S.J. 2004. MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene* 23:5739-5747.

35

7. Ren, J., Agata, N., Chen, D., Li, Y., Yu, W.H., Huang, L., Raina, D., Chen, W., Kharbanda, S., y Kufe, D. 2004. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* 5:163-175.

40

8. Hollingsworth, M.A., y Swanson, B.J. 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4:45-60.

45

9. Pochampalli, M.R., el Bejjani, R.M., y Schroeder, J.A. 2007. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene* 26:1693-1701.

50

10. Pochampalli, M.R., Bitler, B.G., y Schroeder, J.A. 2007. Transforming Growth Factor alpha-Dependent Cancer Progression is Modulated by Muc1 *Cancer Research* 67.

55

11. Li, Y., Ren, J., Yu, W., Li, Q., Kuwahara, H., Yin, L., Carraway, K.L., 3rd, y Kufe, D. 2001. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c- Src and beta-catenin. *J Biol Chem* 276:35239-35242.

60

12. Schroeder, J.A., Adriance, M.C., Thompson, M.C., Camenisch, T.D., y Gendler, S.J. 2003. MUC1 alters β -catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene* 22:1324-1332.

65

13. Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., y Kufe, D. 1997. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 272:12492-12494.

14. Li, Y., Bharti, A., Chen, D., Gong, J., y Kufe, D. 1998. Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 18:7216-7224.

15. Li, Y., Kuwahara, H., Ren, J., Wen, G., y Kufe, D. 2001. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin. *J Biol Chem* 276:6061-6064.

16. Schroeder, J.A., y Lee, D.C. 1997. Transgenic mice reveal roles for TGFalpha and EGF receptor in mammary gland development and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:119-129.

17. Alroy, I., y Yarden, Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410:83-86.

18. Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B., y Hynes, N.E. 1998. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18:5042-5051.

19. Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M., y Hynes, N.E. 1999. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274:17209-17218.
- 5 20. Carpenter, G. 2000. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 22:697-707.
21. Schroeder, J.A., Thompson, M.C., Gardner, M.M., y Gendler, S.J. 2001. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogenactivated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* 276:13057-13064.
- 10 22. Schroeder, J.A., Troyer, K.L., y Lee, D.C. 2000. Cooperative induction of mammary tumorigenesis by TGFalpha and Wnts. *Oncogene* 19:3193-3199.
23. Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-1851.
- 15 24. He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., y Kinzler, K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-1512.
25. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., y Ben-Ze'ev, A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the betacatenin/ LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5522-5527.
- 20 26. Tetsu, O., y McCormick, F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426.
27. Tsukamoto, A.S., Grosschedl, R., Guzman, R.C., Parslow, T., y Varmus, H.E. 1988. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 55:619-625.
- 25 28. Michaelson, J.S., y Leder, P. 2001. beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* 20:5093-5099.
- 30 29. Spicer, A.P., Duhig, T., Chilton, B.S., y Gendler, S.J. 1995. Analysis of mammalian MUC1 genes reveals potential functionally important domains. *Mamm Genome* 6:885-888.
- 35 30. Ho, A., Schwarze, S.R., Mermelstein, S.J., Waksman, G., y Dowdy, S.F. 2001. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61:474-477.
31. Wadia, J.S., y Dowdy, S.F. 2005. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TATmediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 57:579-596.
- 40 32. Schroeder, J.A., Adriance, M.C., McConnell, E.J., Thompson, M.C., Pockaj, B.A., y Gendler, S.J. 2002. ErbB/beta -catenin complexes are associated with human infiltrating ductal breast and MMTV-Wnt-1 and MMTV-c-neu transgenic carcinomas. *J Biol Chem* 277:22692-22698.
- 45 33. Guy, C.T., Cardiff, R.D., y Muller, W.J. 1992. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 12:954-961.
- 50 34. Webster, M.A., Hutchinson, J.N., Rauh, M.J., Muthuswamy, S.K., Anton, M., Tortorice, C.G., Cardiff, R.D., Graham, F.L., Hassell, J.A., y Muller, W.J. 1998. Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 18:2344-2359.
35. Maglione, J.E., Moghanaki, D., Young, L.J., Manner, C.K., Ellies, L.G., Joseph, S.O., Nicholson, B., Cardiff, R.D., y MacLeod, C.L. 2001. Transgenic Polyoma middle-T mice model premalignant mammary disease. *Cancer Res* 61:8298-8305.
- 55 36. Lin, E.Y., Jones, J.G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K.D., Muller, W.J., y Pollard, J.W. 2003. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 163:2113-2126.
- 60 37. Trivedi, P., Cuomo, L., Christensson, B., Hu, L.F., Morrone, S., Frati, L., Faggioni, A., Winberg, G., y Klein, G. 2000. Augmentation of leukocyte infiltration in murine tumors expressing B-cell derived but not nasopharyngeal carcinoma derived EBV membrane protein LMP1. *J Med Virol* 60:417-424.
- 65 38. Kittiworakam, J., Lecoq, A., Moine, G., Thai, R., Lajeunesse, E., Drevet, P., Vidaud, C., Menez, A., y Leonetti, M. 2005. HIV-1 Tat Raises an Adjuvant- free Humoral Immune Response Controlled by its Core Region and its Ability to Form Cysteine-mediated Oligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 281:3105-3115.

39. Packer, L.M., Williams, S.J., Callaghan, S., Gotley, D.C., y McGuckin, M.A. 2004. Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas. *Int J Oncol* 25:1119-1126.
- 5 40. Dassonville, O., Bozec, A., Fischel, J.L., y Milano, G. 2007. EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences. *Crit Rev Oncol Hematol* 62:53-61.
41. Schroeder, J. *et al.*, Solicitud de Patente Estadunidense US-2006-0293234-A1.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de fusión que tiene una estructura:

5 A-B-C o C-B-A

para su uso en el tratamiento de un ser humano que tiene un riesgo elevado identificado de cáncer, donde A es un dominio de transducción de proteína seleccionado entre el grupo consistente en los N° ID. SEC.: 3 a 6, que aumenta la translocación de macromoléculas unidas a través de membranas celulares;

10 donde B es un espaciador de 0-5 restos de aminoácido;

donde C es un polipéptido de 6-15 restos de aminoácido, donde C comprende todo o una porción de PYEKVSAGNGGSSLS (N° ID. SEC.: 1), y donde la porción de C comprende GGSSLS (N° ID. SEC.: 2), o donde al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo de aminoácido de alanina, siempre que se mantenga la actividad inhibidora de la invasión y de la metástasis.

15

2. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 1, donde:

- (1) el riesgo elevado identificado se debe a una predisposición genética;
- (2) el riesgo elevado identificado se debe a una exposición medioambiental; o
- (3) el riesgo elevado identificado se debe a una exposición ocupacional.

20

3. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 1, donde:

- (1) el humano tiene un riesgo elevado debido a una predisposición genética al cáncer de mama;
- (2) el humano tiene un riesgo elevado debido a una predisposición genética al cáncer de colon; o
- (3) el humano tiene un riesgo elevado debido a una predisposición genética al cáncer de piel.

25

4. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 1, donde al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo de aminoácido de alanina.

30

5. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 1, donde C comprende PYEKVSAGNGGSSLS (N° ID. SEC.: 1).

6. Un péptido de fusión que tiene una estructura:

35

A-B-C o C-B-A

y un inhibidor de EGFR, para su uso en el tratamiento de un ser humano que ha sufrido una resección de un tumor, donde A es un dominio de transducción de proteína seleccionado entre el grupo que consiste en los N° ID. SEC.: 3 a 6, que aumenta la translocación de macromoléculas unidas a través de membranas celulares;

40

donde B es un espaciador de 0-5 restos de aminoácido;

donde C es un polipéptido de 6-15 restos de aminoácido, donde C comprende todo o una porción de PYEKVSAGNGGSSLS (N° ID. SEC.: 1), y donde la porción de C comprende GGSSLS (N° ID. SEC.: 2), o donde al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo de aminoácido de alanina, siempre que se mantenga la actividad inhibidora de la invasión y de la metástasis.

45

7. La proteína de fusión y el inhibidor de EGFR para su uso según la reivindicación 6, donde al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo de aminoácido de alanina.

50

8. La proteína de fusión y el inhibidor de EGFR para su uso según la reivindicación 6, donde el inhibidor de EGFR es panitumumab, cetuximab, gefitinib o erlotinib.

9. La proteína de fusión y el inhibidor de EGFR para su uso según la reivindicación 6, donde C comprende PYEKVSAGNGGSSLS (N° ID. SEC.: 1).

55

10. Un péptido de fusión que tiene una estructura:

A-B-C o C-B-A

60

para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer de piel,

donde A es un dominio de transducción de proteína seleccionado entre el grupo que consiste en los N° ID. SEC.: 3 a 6, que aumenta la translocación de macromoléculas unidas a través de membranas celulares;

donde B es un espaciador de 0-5 restos de aminoácido;

donde C es un polipéptido de 6-15 restos de aminoácido, donde C comprende todo o una porción de PYEKVSAGNGGSSLS (N° ID. SEC.: 1), y donde la porción de C comprende GGSSLS (N° ID. SEC.: 2), o donde al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo de aminoácido de alanina, siempre

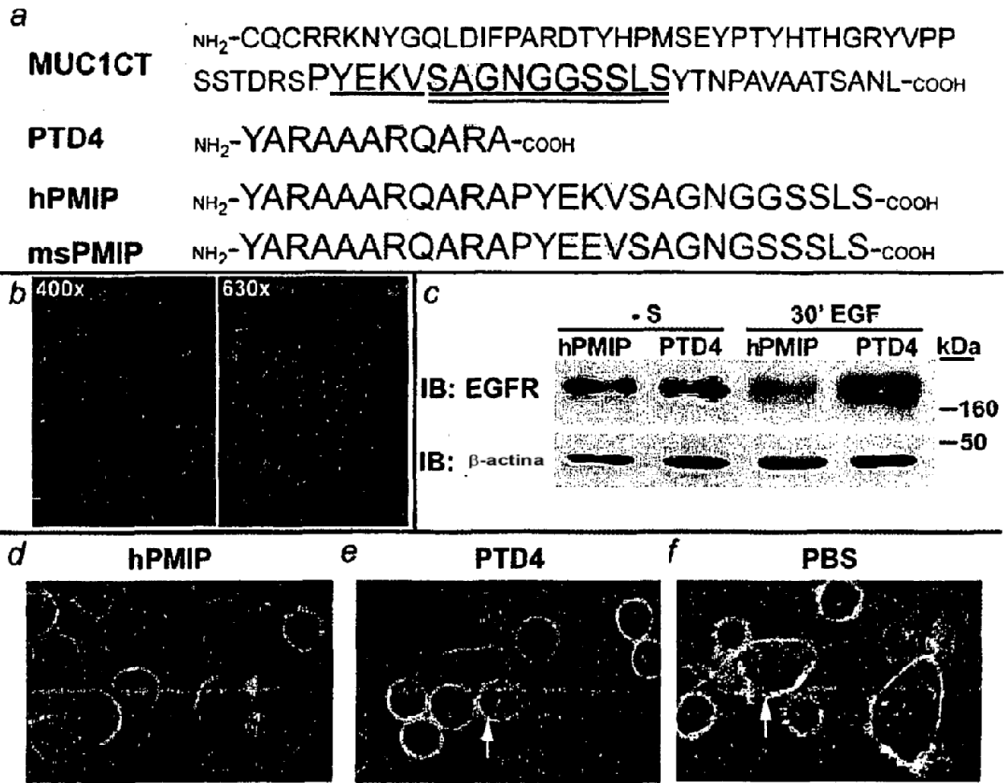
65

que se mantenga la actividad inhibidora de la invasión y de la metástasis.

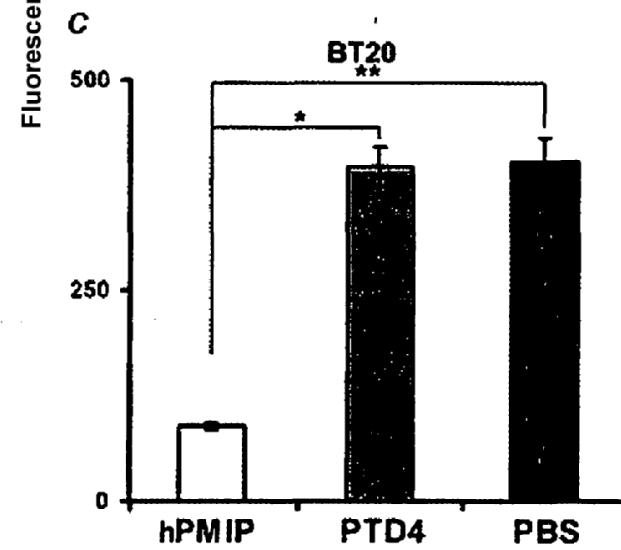
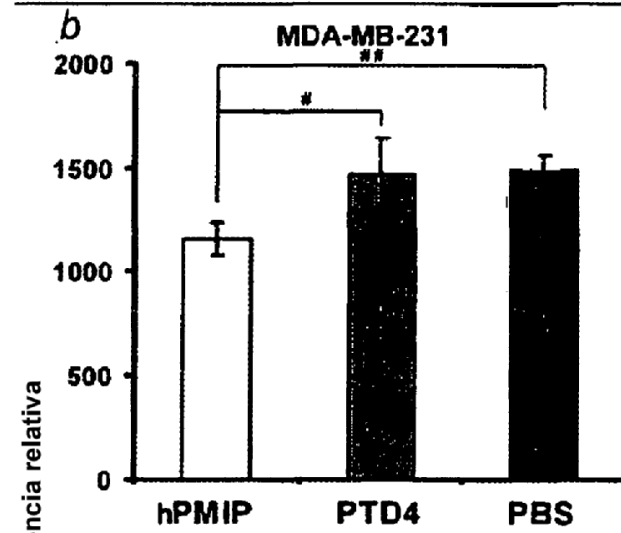
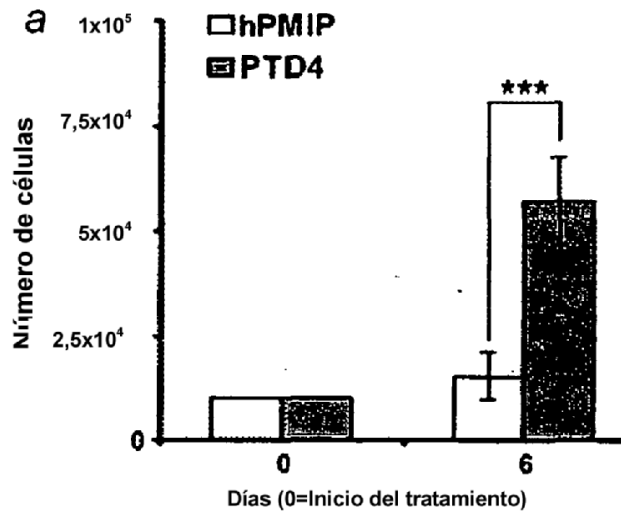
11. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 10, donde:

- 5 (1) al menos uno de dichos 6-15 restos de aminoácido está substituido con un residuo de aminoácido de alanina;
 0
 (2) C comprende PYEKVSAGNGGSSLS (Nº ID. SEC.: 1).

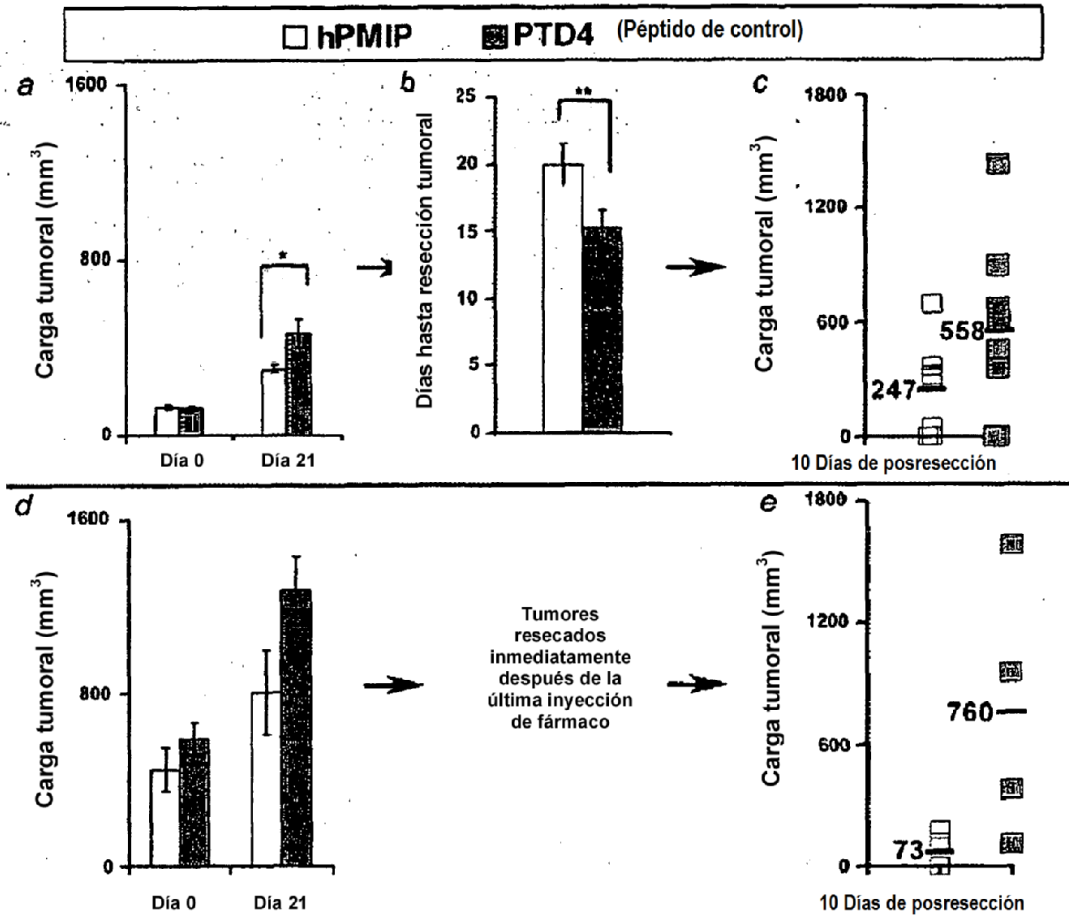
Figs. 1A-1F



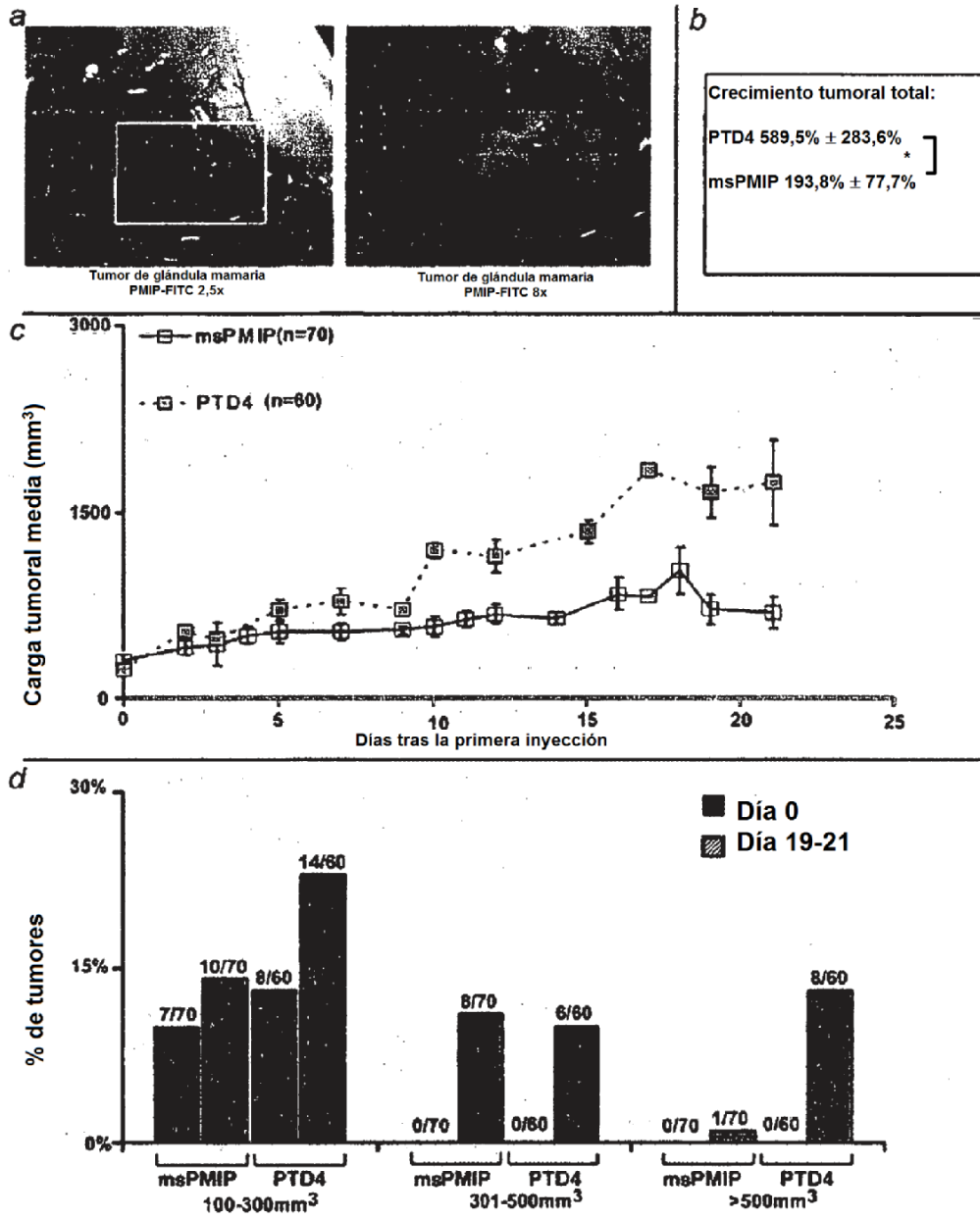
Figs. 2A-2C



Figs. 3A-3E



Figs. 4A-4D



Figs. 5A-5B

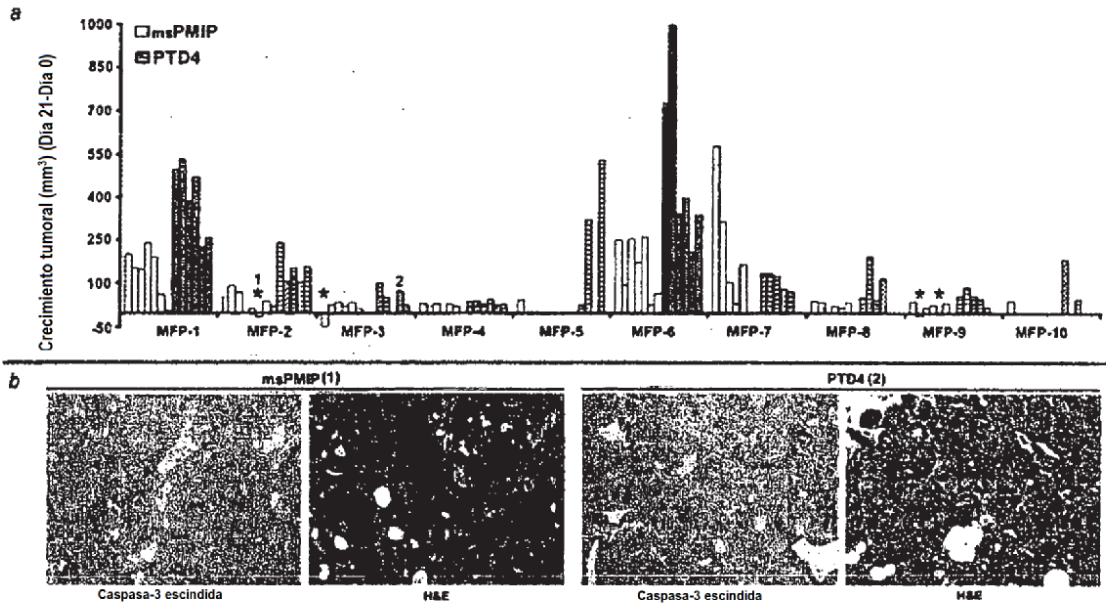


Fig. 6A-6B

