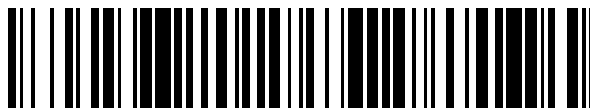


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 365**

21 Número de solicitud: 201330136

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.11.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070086

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (85.0%)

C/Pedro Cerbuna, 12

50009 Zaragoza ES y

**FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA
INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAIID)**

(15.0%)

72 Inventor/es:

ANEL BERNAL , Luis Alberto;

APORTA CLEMENTE , Adriana;

PARDO JIMENO , Julián;

CONDE GUERRI , Blanca y

MARTÍNEZ LOSTAO, Luís

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Uso de la granulisina para el tratamiento de tumores sólidos**

57 Resumen:

Uso de la granulisina para el tratamiento de tumores sólidos.

La presente invención se refiere al uso de la granulisina o de una molécula de ácido nucleico que codifique para la granulisina, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor sólido canceroso, en el que la composición farmacéutica se administra localmente, más concretamente intratumoralmente. Adicionalmente, la presente invención se enfrenta al problema de producir cantidades suficientes de granulisina activa y correctamente plegada que permitan su uso como composición farmacéutica en mamíferos, preferiblemente en humanos.

ES 2 521 365 A1

DESCRIPCIÓN

5 Usos de la granulisin para el tratamiento de tumores sólidos.

Campo técnico de la invención

10 Esta invención pertenece al campo médico, más concretamente al uso de la granulisin o de una molécula de ácido nucleico que codifique para la granulisin, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor sólido canceroso.

Antecedentes de la invención

15 La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente para ayudar al lector a comprender la invención y no se reconoce que describa o constituya técnica anterior de la presente invención.

20 La granulisin es una proteína contenida en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK que posee potencial citolítico sobre células tumorales aunque su función más relevante parece ser la lisis directa de bacterias intracelulares como M. tuberculosis. Los autores de la presente invención han dedicado una gran cantidad de esfuerzos con el objetivo de dilucidar el mecanismo a través del cual la granulisin ejerce su acción antitumoral. En este sentido, han mostrado que dicho mecanismo de inducción de muerte en células tumorales depende de la activación de la vía apoptótica mitocondrial y, en especial del factor inductor de apoptosis (AIF), pero no tanto de las caspasas, constituyendo un nuevo mecanismo en la citotoxicidad inducida por las células efectoras del sistema inmune.

30 El hecho de que el mecanismo de inducción de muerte sea diferente del mecanismo clásico de la apoptosis, dependiente de caspasas, hace que la granulisin pueda ser una alternativa a los tratamientos anti-tumorales convencionales. Así, la introducción directa de esta proteína o de un gen que codifique para dicha proteína en células malignas in vivo o la introducción directa de esta proteína en la zona donde esté localizado el tumor, puede proporcionar un tratamiento efectivo de tumores localizados, tales como los tumores sólidos. En este sentido, varias modalidades de tratamientos similares utilizando otras proteínas o genes terapéuticos se han intentado hasta el momento. Por ejemplo, proporcionando genes normales supresores tumorales y/o inhibidores de oncogenes activados en células tumorales; o bien, potenciando la inmunogenicidad de las células tumorales in vivo mediante la introducción de genes de citoquina; ó también, introduciendo genes que codifican enzimas capaces de conferir a las células tumorales sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. No obstante, la técnica anterior sigue mostrándose deficiente en la falta de una técnica terapéutica eficiente para el tratamiento de tumores sólidos.

45 Así, una posible técnica terapéutica eficiente para el tratamiento de tumores supondría la introducción de la granulisin directamente en un tumor localizado, tal y como un tumor sólido, ó directamente en las células tumorales de dicho tumor a través de la utilización de herramientas de terapia génica. No obstante, podría ser que la granulisin, al ser inyectada de forma intratumoral produjera la destrucción de la epidermis, ya que se ha demostrado que la granulisin está implicada en el síndrome de Steven-Johnson, una reacción exacerbada del sistema inmunitario contra determinados fármacos o productos químicos, que produce, entre otras cosas, la muerte de los queratinocitos y la necrosis de la epidermis (Chung, W.H., Hung, S.I., Yang, J.Y., Su, S.C., Huang, S.P., Wei, C.Y., Chin, S.W., Chiou, C.C., Chu, S.C.,

Ho, H.C., et al. “*Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis*”. Nature Med. 14: 1343, 2008). Este hecho impediría la utilización de esta proteína como terapia antitumoral en tumores localizados, tales como los tumores sólidos.

5

Por lo tanto, así, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar medios para un tratamiento eficaz de los tumores sólidos cancerosos.

Breve descripción de la invención

10

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar medios para un tratamiento eficaz de los tumores sólidos cancerosos, resolviendo dicho problema a través del uso de la granulicina o de una molécula de ácido nucleico que codifique para la granulicina, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor sólido canceroso, en el que la composición farmacéutica se administra localmente, más concretamente intratumoralmente. Adicionalmente, la presente invención se enfrenta al problema de producir cantidades suficientes de granulicina activa y correctamente plegada que permitan su uso como composición farmacéutica en mamíferos, preferiblemente en humanos.

20

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de granulicina recombinante que comprende los siguientes pasos:

25

a) Clonar un polinucleótido que codifica para el polipéptido granulicina en una molécula de ácido nucleico, donde dicha molécula comprende una secuencia de polihistidina que, tras el clonaje, queda unida al extremo N-terminal de la granulicina;

b) Transformar o transducir bacterias competentes con la molécula de ácido nucleico de la etapa a);

30

c) Inducir la expresión de la granulicina en un medio de cultivo que comprenda las bacterias competentes transformadas o transducidas de la etapa b);

d) Obtener el sobrenadante, tras la lisis celular, del medio de cultivo de la etapa c) y adicionar dicho sobrenadante, o una alícuota de dicho sobrenadante, a una resina que comprenda un catión divalente unido a un agente quelante capaz de unirse a la secuencia de polihistidina del extremo N-terminal de la granulicina;

35

e) Lavar la resina con una solución tampón desnaturizante capaz de eliminar uniones inespecíficas;

f) Evitar agregaciones del polipéptido adicionando al producto de la etapa e) una solución tampón que comprenda un detergente capaz de evitar dichas agregaciones;

40

g) Eliminar el detergente de la etapa f) con una solución tampón que comprenda metil-β-ciclodextrina; y

h) Eluir el polipéptido de la resina con una solución tampón de lavado.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el polipéptido granulicina comprende o consiste en la SEQ ID No 1.

45

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la solución tampón desnaturizante comprende cloruro de guanidinio (presentando un pH de aproximadamente 7.5) y la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0).

50

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100. Preferiblemente, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100, la solución tampón

desnaturalizante comprende cloruro de guanidinio (presentando un pH de aproximadamente 7.5) y la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0).

- 5 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el catión divalente es níquel y éste está unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitrilotriacético).

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100, la solución tampón desnaturalizante comprende cloruro de guanidinio, (presentando un pH de aproximadamente 7.5); la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0); el catión divalente es níquel y éste está unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitrilotriacético) y el polipéptido granulisina comprende o consiste en la SEQ ID No 1.

- 15 En aún otra realización preferida del primer aspecto de invención, la molécula de ácido nucleico de la etapa a) es el plásmido pEt-28^o(+) (ver figura 2).

En todavía otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100, la solución tampón desnaturalizante comprende cloruro de guanidinio (presentando un pH de aproximadamente 7.5); la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0); el catión divalente es níquel y éste está unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitrilotriacético); el polipéptido granulisina comprende o consiste en la SEQ ID No 1 y la molécula de ácido nucleico de la etapa a) es el plásmido pEt-28^o(+) (ver figura 2).

25 Otra realización de la presente invención se refiere a la granulisina recombinante obtenible por el método del primer aspecto de la invención.

Un segundo aspecto de la invención, se refiere a una composición que comprende granulisina, ó sales farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para su uso en el tratamiento de un tumor sólido canceroso, donde la composición se administra intratumoralmente. Alternativamente, este segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende granulisina, ó sales farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un tumor sólido canceroso, donde dicho medicamento se administra intratumoralmente.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la granulisina es la granulisina humana que comprende o consiste en la SEQ ID No 1.

- 40 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la granulisina es la granulisina recombinante obtenible por el método del primer aspecto de la invención.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, el tumor sólido canceroso se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, prostático, mamario, pulmonar, dérmico, hepático, óseo, pancreático, ovárico, testicular, de la vejiga, renal, cerebral, de cabeza o de cuello. Preferiblemente el tumor sólido canceroso es cáncer mamario o un melanoma.

En aún otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la granulisina está contenida en una disolución que se puede administrar mediante una jeringa. Preferiblemente

dicha composición además comprende una aguja y una jeringa para la administración intratumoral de la granulisinina.

5 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la composición se utiliza en la administración intratumoral repetida de granulisinina. Adicionalmente, dicha composición del segundo aspecto de la invención se puede administrar simultanea, alternativa o sucesivamente a otro agente antitumoral.

Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1.** Citotoxicidad de la granulisinina recombinante sobre líneas de mieloma múltiple humano. En los paneles de la izquierda se muestran diagramas de puntos de células control o tratadas con 50 μM granulisinina (+Gr) durante 4h. Se analiza mediante citometría de flujo la exposición de fosfatidil-serina en la membrana de las células, evento característico de la muerte celular por apoptosis, por tinción con anexina-V marcada con FITC y, al mismo tiempo, la pérdida de la integridad de la membrana por tinción nuclear con 7-amino actinomicina D (7-AAD). En la gráfica de la derecha se resumen todos los experimentos realizados sobre los diferentes tipos celulares, mostrando la media \pm SD de los porcentajes de células que son positivos sólo para anexina y los porcentajes de células que son positivos tanto para anexina como para 7-AAD.

20 **Figura 2.** Esquema del plásmido pET-28a(+).

25 **Figura 3.** Formación del complejo de coordinación entre dos histidinas de una proteína y el Ni^{++} del agente quelante NiTA.

30 **Figura 4.** Citotoxicidad de la granulisinina recombinante sobre las células MDA-MB-231. Se muestra el porcentaje de células que son positivos para anexina-V-FITC en las células control y tras la incubación con 75 μM de granulisinina recombinante durante 4h o 24h.

35 **Figura 5.** Volumen de los tumores en los 10 ratones participantes en el experimento en función del tiempo. El volumen está expresado en cm^3 .

40 **Figura 6.** Media \pm SD del volumen de los tumores en función del tiempo en el grupo de 5 ratones control comparado con el grupo de los 5 ratones tratados con granulisinina. El volumen está expresado en cm^3 .

45 **Figura 7.** Media \pm SD del volumen de los tumores en el grupo control y en el grupo tratado con granulisinina al final del experimento. El volumen está expresado en cm^3 .

Figura 8. Media \pm SD del volumen de los tumores en el grupo control y en el grupo tratado con granulisinina a lo largo del experimento. El volumen está expresado en mm^3 .

Figura 9. Aspecto de un ratón control, inyectado con PBS (panel superior), y de un ratón tras las cinco inyecciones con granulisinina recombinante (panel inferior)

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere al uso de la proteína granulisinina o de una molécula de ácido nucleico que codifique para la granulisinina, para la preparación de una composición

farmacéutica para el tratamiento de un tumor sólido canceroso, en el que la composición farmacéutica se administra localmente, más concretamente intratumoralmente.

5 En este sentido, se ha descubierto que sorprendentemente la aplicación intratumoral de la granulisinina recombinante en tumores sólidos cancerosos, tal y como el tumor sólido de mama, induce un retraso significativo del crecimiento tumoral. Más sorprendentemente, la aplicación intratumoral de dicha proteína no induce los efectos secundarios graves observados y publicados con anterioridad. Es decir, la inyección intratumoral no produce una reacción exacerbada del sistema inmune provocada por el síndrome de Steven-Johnson.

10 Sin embargo, para llevar a cabo la experimentación necesaria que demuestra la eficacia de la granulisinina como terapia anti-tumoral de tumores sólidos comentada anteriormente, los autores de la presente invención se encontraron con el problema de que la producción de esta proteína recombinante a partir de cultivos bacterianos en cantidades suficientes para realizar la experimentación in vivo planteaba problemas. Principalmente debido a la tendencia de esta proteína a agregarse si se intentaba producir en cantidades elevadas. Con el objeto de solventar este problema y tras un trabajo de varios años, los autores de la presente invención idearon un nuevo método de producción de granulisinina recombinante que permite obtener la cantidad necesaria para poder realizar experimentación *in vivo*. Este método se basa esencialmente en la purificación de la proteína desnaturalizada mediante la formación de un complejo de coordinación entre una cola de histidinas que posee la proteína recombinante y una columna que contiene Ni^{++} ; posteriormente, se procede al plegado de la proteína en la misma columna de purificación, mediante una técnica de plegado en columna.

25 La técnica de producción y purificación de la proteína recombinante se describe en detalle en el ejemplo 1. Este método consigue producciones de granulisinina activa y correctamente plegada de más de 1 mg por lote de bacterias, cantidad que ha permitido la realización de la experimentación *in vivo* que se detalla a continuación.

30 Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de granulisinina recombinante que comprende los siguientes pasos:

- a) Clonar un polinucleótido que codifica para el polipéptido granulisinina en una molécula de ácido nucleico, donde dicha molécula comprende una secuencia de polihistidina que, tras el clonaje, queda unida al extremo N-terminal de la granulisinina;
- 35 b) Transformar o transducir bacterias competentes con la molécula de ácido nucleico de la etapa a);
- c) Inducir la expresión de la granulisinina en un medio de cultivo que comprenda las bacterias competentes transformadas o transducidas de la etapa b);
- d) Obtener el sobrenadante del medio de cultivo de la etapa c) y adicionar dicho sobrenadante, o una alícuota de dicho sobrenadante, a una resina que comprenda un catión divalente unido a un agente quelante capaz de unirse a la secuencia de polihistidina del extremo N-terminal de la granulisinina;
- 40 e) Lavar la resina con una solución tampón desnaturalizante capaz de eliminar uniones inespecíficas;
- 45 f) Evitar agregaciones del polipéptido adicionando al producto de la etapa e) una solución tampón que comprenda un detergente capaz de evitar dichas agregaciones;
- g) Eliminar el detergente de la etapa f) con una solución tampón que comprenda metil- β -ciclodextrina; y
- 50 h) Eluir el polipéptido de la resina con una solución tampón de lavado.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el polipéptido granulisinina comprende o consiste en la SEQ ID No 1.

5 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la solución tampón desnaturizante comprende cloruro de guanidinio (presentando un pH de aproximadamente 7.5) y la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0).

10 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100. Preferiblemente, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100, la solución tampón desnaturizante comprende cloruro de guanidinio (presentando un pH de aproximadamente 7.5) y la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0).

15 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el catión divalente es níquel y éste está unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitritotriacético).

20 En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100, la solución tampón desnaturizante comprende cloruro de guanidinio, (presentando un pH de aproximadamente 7.5); la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0); el catión divalente es níquel y éste está unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitritotriacético) y el polipéptido granulisinina comprende o consiste en la SEQ ID No 1.

25 En aún otra realización preferida del primer aspecto de invención, la molécula de ácido nucleico de la etapa a) es el plásmido pEt-28^o(+) (ver figura 2).

30 En todavía otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el detergente de la etapa f) es Tritón X-100, la solución tampón desnaturizante comprende cloruro de guanidinio (presentando un pH de aproximadamente 7.5); la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl (presentando un pH de aproximadamente 8.0); el catión divalente es níquel y éste está unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitritotriacético); el polipéptido granulisinina comprende o consiste en la SEQ ID No 1 y la molécula de ácido nucleico de la etapa a) es el plásmido pEt-28^o(+) (ver figura 2).

35 Una vez solucionado el problema de la producción de cantidades suficientes para realizar la experimentación *in vivo* los autores de la presente invención llevaron a cabo la siguiente experimentación. En primer lugar, consiguieron la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231Lucif, una línea especialmente agresiva, seleccionada por su gran poder metastático.
40 De hecho, la inyección subcutánea de 10 millones de estas células en ratones atímicos producía tumores sólidos cancerosos detectables en tan solo dos semanas, lo cual hace de estas células excelentes candidatos para realizar la experimentación que se describe a continuación.

45 Antes de proceder a realizar las correspondientes pruebas *in vivo*, se ensayó la toxicidad *in vitro* de la granulisinina sobre estas células. Sorprendentemente no se obtuvo una elevada citotoxicidad a tiempos de cuatro horas y concentraciones de 50 μ M. Se procedió entonces a aumentar la concentración de granulisinina hasta 75 μ M y utilizar tiempos de incubación de 4 y 24h. En estas condiciones, tal y como se muestra en la Figura 4, se alcanzó una toxicidad de
50 hasta el 20%, toxicidad que se sigue considerando baja.

No obstante, aún cuando esta toxicidad *in vitro* no es muy alta y requiere concentraciones y tiempos de incubación elevados, se procedió a realizar los experimentos *in vivo* usando esta línea celular, estos experimentos se detallan en los ejemplos 2 y 3.

5 Los resultados obtenidos en este modelo *in vivo* de desarrollo tumoral ante un tumor tan agresivo capaz de desarrollarse en tan solo 15 días en prácticamente todos los ratones de experimentación (se ha probado en 60 ratones y en todos ellos ha generado tumor), son ciertamente esperanzadores ya que tal y como se puede observar en la Figura 8, a partir de la
10 el grupo control el crecimiento del tumor continúa de forma exponencial. De hecho, el volumen de los tumores antes del sacrificio (5^a inyección) fue de 590 ± 194 en el grupo control vs. 341.5 ± 71 en el grupo tratado con granulisin. Es decir, según estos datos, como media, la granulisin inhibiría alrededor del 50% del crecimiento de este tumor en estas condiciones experimentales.

15 Estos resultados son especialmente sorprendentes habida cuenta además de que la citotoxicidad *in vitro* de la granulisin sobre este tumor no era excesivamente elevada (de hecho la citotoxicidad se podía considerar baja). Además sorprende el hecho que la administración subcutánea de granulisin recombinante no produjese los graves efectos secundarios asociados a esta vía de administración. En este sentido, se realizaron una serie de
20 experimentos de inyección de la granulisin siguiendo el mismo protocolo detallado en el ejemplo 3, pero en ausencia de tumores, y se siguió la evolución de los ratones o más concretamente, de las zonas de la dermis y epidermis donde se realizaban las inyecciones. Esta observación está facilitada en los tipos de ratones atímicos utilizados ya que éstos carecen de pelo. Como se puede observar en las fotografías de la Figura 9, no se visualizó
25 ningún tipo de acción deletérea de la granulisin sobre estos tejidos tras las cinco inyecciones, ni sobre su peso, temperatura o comportamiento.

Por lo tanto, un segundo aspecto de la invención, se refiere a una composición que comprende
30 granulisin, ó sales farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para su uso en el tratamiento de un tumor sólido canceroso, donde la composición se administra intratumoralmente. Alternativamente, este segundo aspecto de la invención se refiere al uso una composición que comprende granulisin, ó sales farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un tumor
35 sólido canceroso, donde dicho medicamento se administra intratumoralmente.

El polipéptido granulisin puede ser de cualquier organismo que produce tal polipéptido, preferiblemente de mamíferos, más preferiblemente de humanos. En una realización particularmente preferida, el polipéptido granulisin es humano y comprende ó consiste en la
40 SEQ ID No 1.

En un aspecto preferido de la presente invención, la granulisin a la que se refiere el segundo aspecto de la invención es la granulisin recombinante producida de acuerdo al método de producción descrito en el primer aspecto de la invención.

45 En el contexto de la presente invención, la expresión “administrada intratumoralmente” significa que la granulisin se administra directamente en el tumor, es decir, en las células tumorales que se dividen activamente y que rodean la parte central necrótica del tumor sólido canceroso. El término “tumor sólido canceroso” en este contexto se refiere a aquellas masas
50 anormales de tejido que, por lo general, no contienen áreas con quistes o líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos cancerosos reciben su nombre por el tipo de células que

los forman. Los sarcomas, los carcinomas y los linfomas son ejemplos de tumores sólidos cancerosos. Otros ejemplos de tales tumores son los carcinomas (colon, mama, pulmón, pancreático, escamoso, cabeza y cuello, adenocarcinoma, células renales, etc.) y sarcomas (fibrosarcoma, osteosarcoma, Ewing, Kaposi, etc.) y mastocitoma, carcinoma basocelular, hemangioma, etc. Preferiblemente el tumor sólido canceroso se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, prostático, mamario, pulmonar, dérmico, hepático, óseo, pancreático, ovárico, testicular, de la vejiga, renal, cerebral, de cabeza o de cuello. Más preferiblemente el tumor sólido canceroso es cáncer mamario o un melanoma.

En este sentido, en una realización particularmente preferida, el tumor es un melanoma. El melanoma representa una entidad tumoral con una incidencia creciente (Dennis et al., Arch. Dermatol. 135 (1999), 275-280). La prognosis de la enfermedad depende en general del grosor del tumor primario en el momento del diagnóstico. Cuando se diagnostica en estadios iniciales, la escisión con un margen de seguridad puede ser curativa. Sin embargo, una vez metastatizado, no se ha demostrado hasta la fecha que ninguna terapia induzca la erradicación del tumor.

Los medios apropiados para la administración intratumoral son, p.ej., inyección, instrumentos balísticos, electroporación, electroinserción, formación de heridas, raspado, instrumentos de inserción presurizada, inyectores a chorro, etc. En una realización preferida, la administración intratumoral se lleva a cabo mediante inyección, preferiblemente mediante una aguja y una jeringa. En este caso, la granulisina está contenida en una disolución que se puede administrar mediante una jeringa. Una disolución adecuada a este respecto es, p.ej., solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón citrato, tampón Tris-HCl o cualquier tampón fisiológico.

Preferiblemente, la granulisina se administra más de una vez. En particular, puede ser ventajoso administrar la granulisina mediante administración intratumoral repetidamente, p.ej. al menos dos o tres veces, en los días 1, 3 y/o 5. Cuando la administración se lleva a cabo mediante inyección, se prefiere más de una inyección (p.ej. cinco a seis inyecciones). Además, la aguja preferiblemente se inserta tangencialmente al tumor. Así, el tratamiento puede consistir en uno, dos o más ciclos. La cantidad de proteína a administrar depende, p.ej. del peso corporal del organismo a tratar y del tamaño del tumor.

En otra realización preferida de la presente invención, la administración intratumoral de granulisina se combina con la administración de otro agente antitumoral. De esta forma se puede aumentar el efecto antitumoral de la granulisina. La administración de otro agente se puede conseguir, p.ej., administrando una molécula de ácido nucleico que codifica el agente suplementario en el supuesto que este sea una proteína, o administrando el propio agente directamente. En este sentido, dicha composición que comprende granulisina se puede administrar simultánea, alternativa o sucesivamente a otro agente antitumoral.

Adicionalmente, un tercer aspecto de la presente invención de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifique para el polipéptido granulisina de SEQ ID No 1, para su uso en el tratamiento de un tumor sólido canceroso, en el que dicha composición farmacéutica se administra intratumoralmente.

La expresión “molécula de ácido nucleico” se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico posible que comprende un polinucleótido que codifica para el polipéptido granulisina, p.ej. ARN o ADN, lineal o circular, monocatenaria o bicatenaria, modificada o sin modificar.

El polipéptido granulisina puede ser de cualquier organismo que produce tal polipéptido, preferiblemente de mamíferos, más preferiblemente de humanos. En una realización particularmente preferida, el polipéptido granulisina es humano y comprende la SEQ ID No 1.

5

En el contexto de la presente invención, la expresión “administrada intratumoralmente” significa que la molécula de ácido nucleico se administra directamente en las células tumorales que se dividen activamente y que rodean la parte central necrótica del tumor sólido canceroso. El término “tumor sólido canceroso” en este contexto se refiere a aquellas masas anormales de tejido que, por lo general, no contienen áreas con quistes o líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos cancerosos reciben su nombre por el tipo de células que los forman. Los linfomas son un ejemplo de tumores sólidos cancerosos. Otros ejemplos de tales tumores son los carcinomas (colon, mama, pulmón, pancreático, escamoso, cabeza y cuello, adenocarcinoma, células renales, etc.) y sarcomas (fibrosarcoma, osteosarcoma, Ewing, Kaposi, etc.) y mastocitoma, carcinoma basocelular, hemangioma, etc.

10
15

En una realización particularmente preferida, el tumor es un melanoma. El melanoma representa una entidad tumoral con una incidencia creciente (Dennis et al., Arch. Dermatol. 135 (1999), 275-280). La prognosis de la enfermedad depende en general del grosor del tumor primario en el momento del diagnóstico. Cuando se diagnostica en estadios iniciales, la escisión con un margen de seguridad puede ser curativa. Sin embargo, una vez metastatizado, no se ha demostrado hasta la fecha que ninguna terapia induzca la erradicación del tumor.

20

Los medios apropiados para la administración intratumoral son, p.ej., inyección, instrumentos balísticos, electroporación, electroinserción, formación de heridas, raspado, instrumentos de inserción presurizada, inyectores a chorro, etc. En una realización preferida, la administración intratumoral se lleva a cabo mediante inyección, preferiblemente mediante una aguja y una jeringa. En este caso, la granulisina está contenida en una disolución que se puede administrar mediante una jeringa. Una disolución adecuada a este respecto es, p.ej., solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón citrato, tampón Tris-HCl o cualquier tampón fisiológico.

25

30

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico que codifica granulisina se administra más de una vez. En particular, puede ser ventajoso administrar la molécula de ácido nucleico mediante administración intratumoral repetidamente, p.ej. al menos dos o tres veces, en los días 1, 3 y/o 5. Cuando la administración se lleva a cabo mediante inyección, se prefiere más de una inyección (p.ej. cinco a seis inyecciones). Además, la aguja preferiblemente se inserta tangencialmente al tumor y no apunta al centro del tumor. La cantidad de molécula de ácido nucleico a administrar depende, p.ej., de la longitud de la molécula de ácido nucleico, del peso corporal del organismo a tratar y del tamaño del tumor. Se prefiere particularmente que se administre una predosis de la molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido granulisina alrededor de 14 días antes de que el verdadero tratamiento comience.

35

40

En otra realización preferida de la presente invención, la administración intratumoral de una molécula de ácido nucleico que codifica granulisina se combina con la administración de una citocina. De esta forma se puede aumentar el efecto antitumoral de la granulisina. La administración de la citocina se puede conseguir, p.ej., administrando una molécula de ácido nucleico que codifica la citocina respectiva, o administrando la propia citocina respectiva.

45

En una realización preferida, la otra citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-15, IL-2, IP-10, GM-CSF, IFN- (interferón), TNF (factor de necrosis tumoral) y PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno).

5 En una realización adicionalmente preferida, la administración intratumoral de una molécula de ácido nucleico que codifica granulisina se combina con la administración de un antígeno asociado a tumor (AAT). La administración del AAT se puede conseguir, p.ej., administrando una molécula de ácido nucleico que codifica el AAT respectivo o administrando el propio AAT respectivo. El AAT es preferiblemente un AAT que está asociado al tumor a tratar. Los
 10 ejemplos de AATs y los tipos correspondientes de tumores se muestran en la siguiente lista: melanoma: gp100, tirosinasa, MAGE-1, MAGE-3, MART, BAGE, TRP-1; cáncer de estómago: CEA (antígeno carcinoembrionario), CA 19-9, CA 50, CA 72-4; cáncer de colon: CEA, CA 19-9, Muc-1; carcinoma de páncreas: CA 19-9, CA 50, CEA; cáncer de pulmón de células pequeñas: CEA, NSE (enolasa específica de neurona), receptor de EGF; cáncer de
 15 pulmón: CEA; carcinoma hepático: fetoproteína (AFP); cáncer de próstata: PSA; cáncer de vesícula biliar: CA 19-9; carcinoma escamoso: SCC (antígeno de carcinoma escamoso), CEA; carcinoma mamario: CA 15-3, CEA, BRCA-1, BRCA-2, Muc-1, receptor Her2/Neu; cáncer de testículos: AFP, hCG; carcinoma ovárico: CA 125, CEA, CA 15-3, AFP, TAG-72; linfoma de células B: CD20, CD21

20 Adicionalmente, la composición farmacéutica preparada según el tercer aspecto de la invención se puede aplicar en combinación con un tratamiento de quimioterapia. En este sentido, dicha composición que comprende granulisina se puede administrar simultánea, alternativa o sucesivamente a otro agente antitumoral.

25 Finalmente, los autores de la presente invención han comprobado el efecto de la granulisina sobre líneas de mieloma múltiple in vitro, estudiando el efecto citotóxico de la granulisina recombinante sobre células de mieloma múltiple humano, la neoplasia hematológica de peor pronóstico. Los resultados se muestran en la Figura 1. Estos datos sugieren el efecto anti-
 30 tumoral de este fármaco no sólo en tumores sólidos sino también en neoplasias de tipo hematológicas.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de la granulisina recombinante.

40 El gen de la granulisina fue clonado en el plásmido pET28a(+) (ver figura 2) en los sitios de restricción NdeI/EcoRI. Este plásmido presenta el promotor T7 que responde a IPTG y contiene un gen resistencia a kanamicina. También posee una secuencia de polihistidina que, tras el clonaje, queda unida al extremo N-terminal de la granulisina, facilitando así su posterior purificación.

45 El método utilizado para la preparación de bacterias competentes se basa en la apertura de poros en la membrana con CaCl₂ a baja temperatura. Para ello se sembraron células E. coli en un falcon de 50ml con 10ml de medio líquido LB y se dejaron crecer toda la noche a 37°C con una agitación de 200rpm. A la mañana siguiente, una alícuota de 200µl de este cultivo se diluyó en 20 ml de LB fresco y se dejó crecer de nuevo en las mismas condiciones hasta que
 50 se alcanzó una absorbancia de aproximadamente 0.3-0.4 a 600 nm (equivalente a 5-10x10⁷ bacterias/ml).

Este cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos para detener su crecimiento y se centrifugó 8 minutos a 4°C y 8000 xg. Tras lavarlas una vez con agua estéril, las células se incubaron en 10ml de CaCl₂ 50mM frío durante 15 minutos y se volvieron a centrifugar a 3000 xg para resuspenderlas finalmente en 4ml de CaCl₂ 50 mM. Para conservarlas, se les añadió 15% de glicerol y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

- Composición del medio LB (1l) : 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl

10 Para transformar las bacterias competentes, éstas se descongelaron incubándolas en hielo. A continuación, se añadieron 50ng del DNA plasmídico sobre una alícuota de 200µl de bacterias. Esta suspensión se incubó en hielo durante 30 minutos, se introdujo en un baño a 42° C durante 1 minuto y medio y, finalmente, se volvió a incubar 2 minutos en hielo. Para que las membranas celulares volvieran a sellarse, se añadió la suspensión anterior a 1ml de LB y este nuevo cultivo se agitó a 37°C durante 2h.

20 Por último, se procedió a la selección de aquellas bacterias que habían incorporado el plásmido. Para ello se sembraron 100µl de las células transformadas en una placa de agar sólido (1.5%) con kanamicina (30µg/µl) y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Se sembró también un control negativo con células competentes sometidas a todos los pasos anteriores pero en ausencia del plásmidos (bacterias no transformadas). Tras la incubación, las únicas bacterias capaces de crecer y formar colonias son aquellas que han incorporado el plásmido, ya que éste contiene un gen de resistencia a kanamicina. Se eligieron varias de estas colonias al azar y cada una se incubó en 10ml de LB con kanamicina (30µg/ml) a 37°C con 200rpm de agitación durante toda la noche. Para seleccionar aquellas colonias con mayores niveles de sobreexpresión de granulisina, se sembró 1ml de los cultivos obtenidos en el apartado anterior en un falcon de 50ml con 10ml de LB y se realizó una inducción a pequeña escala.

30 Antes y después de la inducción con IPTG se recogieron alícuotas de 1ml, se centrifugaron y se resuspendieron en 200µl de PBS. Estas muestras se corrieron geesl de policrilamida al 16% según lo explicado en los apartados y se analizó la sobreexpresión de granulisina mediante inmunoblot y mediante tinción con Coomasi. La colonia seleccionada se expandió y se guardó alicuotada con 15% glicerol a -80 °C hasta su utilización.

35 Se sembraron 2µl de los gliceroles anteriormente seleccionados en falcon de 50ml con 10ml de LB y kanamicina 30µg/ml. Se incubaron estas bacterias toda la noche a 37°C con 200 rpm de agitación y, a la mañana siguiente, se diluyeron 100 veces en LB (10ml en 1litro de LB en un erlenmeyer de 2litros de capacidad). Estos cultivos se volvieron a dejar crecer en las mismas condiciones hasta que la absorbancia a 600nm alcanzó un valor entre 0.7-0.9, momento en que estas bacterias se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. En este momento se indujo la sobreexpresión de nuestra proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 1mM. Tras 3 horas en agitación a 37°C, las bacterias se centrifugaron a 3000xg, se descartó el sobrenadante y se congeló el precipitado a -4°C. Se recogió siempre una alícuota de 1ml antes y después de la inducción para una posterior comprobación de la sobreexpresión en un gel de poliacrilamida.

50 Para la purificación de la granulisina recombinante se aprovechó el hecho de que ésta estaba unida en su extremo N-terminal a una cola de 6 histidinas, capaz de unirse a un catión divalente (níquel en este caso) inmovilizado en una resina mediante el agente quelante NiTA (Ácido Nitritriacético), como se muestra en la Figura 3.

Para la purificación y plegamiento de la granulicina en columna, la proteína desnaturizada y ya unida a la columna de afinidad, se pone en contacto con un detergente para evitar plegamientos incorrectos. A continuación, la columna se lava con ciclodextrina, la cual retira lentamente el detergente permitiendo el plegamiento lento y correcto de la proteína. Para purificar la granulicina por este método se descogelaron las bacterias provenientes 10-12 litros de cultivo y se lisaron en 50 ml de un tampón desnaturizante durante 24 horas agitándose suavemente a temperatura ambiente. Este lisado se centrifugó a 10000 xg durante 30 minutos para eliminar todo el material insoluble (DNA, membranas, etc.) Se recogió el sobrenadante y se dividió en dos falcons de 50 ml con volúmenes iguales. Se añadieron en cada falcon 2ml de la resina de cobalto (disolución 50% Ni-TA + 50% disolvente) y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave. Al día siguiente se trasvasó el contenido de cada falcon a una columna y se dejó reposar hasta que la resina quedó depositada en el fondo. Se descartó entonces el líquido de la columna y ésta se lavó con 10 volúmenes del tampón desnaturizante que contenía imidazol 20mM para eliminar uniones no específicas y β -mercaptoheptanol 10 μ M para reducir los grupos SH-.

A continuación, se pasan por la columna 10 volúmenes del tampón A al que se le ha añadido β -mercaptoheptanol 10 μ M y 0.1% del detergente Tritón X-100, para evitar agregaciones. Este detergente se elimina lavando la columna con 10 volúmenes del tampón A, conteniendo esta vez metil- β -ciclodextrina a una concentración final de 5 mM, permitiendo de este modo el plegamiento de la proteína. Finalmente, se lava la columna con 20 volúmenes de tampón de lavado y se eluye la proteína pasando tampón A con una concentración 300 μ M de imidazol. Se recogen fracciones de 0.5- 1ml y se mide la absorción en el espectrofotómetro para seleccionar aquellas fracciones con mayor concentración de proteína. Dichas fracciones se juntan, se pasan por una columna de desalinización siguiendo las indicaciones del fabricante y se recupera la proteína en PBS.

Finalmente, la proteína se concentra en membranas de centrifugación a alta velocidad (4000xg) hasta alcanzar una concentración aproximada de 1000 - 500 μ M, se esteriliza haciéndola pasar por un filtro de baja adherencia proteica de 0.2 μ m y se guarda a 4°C.

- Composición de los tampones utilizados:

- Desnaturizante : 6M cloruro de guanidinio, pH 7.5
- Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl
- Tampón de lavado: mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl

Ejemplo 2: Ensayo in vivo del efecto de la granulicina sobre el desarrollo del tumor MDA-MB-231

A día 0, se inyectó subcutáneamente un grupo de 10 ratones con 10 millones de células MDAMB-231Lucif cada uno. El desarrollo tumoral se controló cada dos días, y si el tumor era detectado, se procedía a partir de ese momento a la medición de su diámetro utilizando un calibre electrónico. A partir de estos datos, se calculó el volumen del tumor en función del tiempo. 15 días después de la inyección, los tumores eran detectables en la mayor parte de los ratones y éstos se dividieron en dos grupos, de forma que ambos grupos tuvieran ratones con volúmenes similares en ese momento. En un grupo de 5 ratones, los tumores fueron tratados por inyección intratumoral de 44 μ g de granulicina en 60 μ l de PBS estéril (concentración de 67 μ M), que se repitieron cuatro veces más (total de cinco inyecciones) cada tres días. Tras la

última inyección, se esperaron tres días más y los ratones fueron sacrificados. En el grupo control de 5 ratones, se realizaron las mismas inyecciones intra-tumorales pero en ausencia de granulisina, sólo con 60 µl de PBS estéril.

- 5 En la Figura 5 se muestra la evolución del volumen de los tumores en función del tiempo. En uno de los ratones del grupo control (Ctrl5), se produjo un crecimiento muy rápido del tumor, y tuvo que ser sacrificado 27 días después de la inyección, antes de que terminara el experimento, para cumplir con las normas de experimentación animal. El volumen del tumor en este ratón el día del sacrificio se considera en los cálculos y gráficas que se muestran.
- 10 Como se puede observar, hay una cierta tendencia a que el crecimiento tumoral se vea frenado en aquellos ratones tratados con granulisina.

15 En la Figura 6 se muestra la media±SD de los volúmenes de los tumores en función del tiempo en cada grupo, en el grupo control y en el grupo tratado con granulisina. Como se puede observar, la media de los valores de cada grupo indica que el crecimiento de los tumores en los ratones tratados con granulisina es menor.

20 En la Figura 7 se muestra la media±SD del volumen de los tumores al final del experimento en los dos grupos experimentales, siendo de 2.78 ± 1.8 en el grupo control vs. 1.15 ± 0.5 en el grupo tratado con granulisina. Es decir, según estos datos, como media, la granulisina inhibiría un 59% el crecimiento de este tumor tan agresivo. Si se realiza un test t de Student para determinar si estas diferencias son significativas, en primer lugar es necesario determinar si se puede considerar que los datos obtenidos en cada grupo tienen la misma varianza o no, y para ello se aplicó el test F, que dió un valor de 0.03, por lo cual, al ser menor que 0.05, se

25 tiene que considerar que los valores no tienen la misma varianza. Aplicando el test t de Student en estas condiciones, se obtiene que $P = 0.12$, por lo cual, al ser mayor que 0.05, no se puede considerar que las diferencias sean significativas. No obstante, se observó que en uno de los ratones pertenecientes al grupo control el crecimiento del tumor había sido muy reducido, incluso por debajo de los tumores que menos volumen habían alcanzado tras el

30 tratamiento con granulisina (er Fig 5, Ctrl4). Al ser este comportamiento un tanto anómalo, se consideró eliminar los datos obtenidos en este ratón a la hora de hacer los cálculos estadísticos. En este caso, se obtiene que la media del grupo control es 3.35 ± 1.5 vs. 1.15 ± 0.5 en el grupo tratado, es decir una reducción del 66%. Al hacer el test F sobre estos valores, se obtiene una valor de 0.06, que indica que se puede considerar que los datos obtenidos en

35 ambos grupos tienen la misma varianza. Aplicando el test t de Student en estas condiciones, se obtiene una $P = 0.019$, indicando que las diferencias entre ambos grupos es significativa, claramente inferior a 0.05.

40 **Ejemplo 3: Segundo ensayo in vivo del efecto de la granulisina sobre el desarrollo del tumor MDA-MB-231**

Dado que el resultado parecía indicar una clara tendencia anti-tumoral de la granulisina, a pesar de que la significación estadística no era concluyente, se decidió hacer un segundo

45 experimento con este mismo tumor, cambiando algunos aspectos del protocolo de experimentación:

- i) Se inyectaron 1 millón de células en lugar de 10 millones, para que el crecimiento tumoral no fuera tan rápido y no se viera exacerbado
- 50 ii) Se comenzaron los tratamientos cuando el tumor había alcanzado un tamaño de alrededor de 100 mm³ en todos los casos

iii) Los tratamientos se llevaron a cabo con menos espaciado temporal entre ellos: una vez iniciados los tratamientos, se realizaron 5 inyecciones de la misma dosis de granulisina que en el primer experimento, esperando solamente un día entre cada inyección.

5

Como se puede observar en la Figura 8, a partir de la tercera inyección la granulisina es capaz de detener el crecimiento del tumor, mientras que en el grupo control el crecimiento del tumor continúa de forma exponencial. El volumen de los tumores antes del sacrificio (5ª inyección) fue de 590 ± 194 en el grupo control vs. 341.5 ± 71 en el grupo tratado con granulisina. Es decir, según estos datos, como media, la granulisina inhibiría alrededor del 50% del crecimiento de este tumor en estas condiciones experimentales. El test F sobre estos valores dio un valor de 0.077, que, al ser mayor que 0.05, indica que se puede considerar que los valores tienen la misma varianza al aplicar el test t de Student. Aplicando el test t de Student en estas condiciones, se obtuvo un valor de 0.027, claramente menor que 0.05, luego se puede considerar que las diferencias son significativas.

10
15

Los resultados expuestos a lo largo de los ejemplos demuestran la factibilidad de usar la proteína granulisina o una molécula de ácido nucleico que codifique para dicho polipéptido, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor sólido canceroso, en el que la composición farmacéutica se administra localmente, más concretamente intratumoralmente.

20

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a la misma. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de realizaciones preferidas, son ilustrativos, y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención.

25

Será fácilmente evidente para un experto en la materia que se pueden hacer diferentes sustituciones y modificaciones de la invención descrita en el presente documento sin salirse del alcance y espíritu de la invención.

30

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son representativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Todas las publicaciones se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida como si se indicara que cada publicación individual se incorpora específica e individualmente por referencia.

35

La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento se puede llevar a la práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en el presente documento. Los términos y expresiones que se han usado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no se pretende que el uso de dichos términos y expresiones excluya cualquiera de los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diferentes modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se ha descrito específicamente por las realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos descritos en el presente documento, y dichas modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta invención como se define en las reivindicaciones adjunta.

40

45

50

5

SECUENCIA DE LA GRANULISINA

SEQ ID NO 1:

10

GRDYRTCLTIVQKLKKMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDVCNFMRRYQSR
VIQGVAGETAQQICE DLR

15

20

25

30

35

40

45

50

Reivindicaciones

1. Método de producción de granulicina recombinante que comprende los siguientes pasos:
- 5 a) Clonar un polinucleótido que codifica para el polipéptido granulicina en una molécula de ácido nucleico, donde dicha molécula comprende una secuencia de polihistidina que, tras el clonaje, queda unida al extremo N-terminal de la granulicina;
 - b) Transformar o transducir bacterias competentes con la molécula de ácido nucleico de la etapa a);
 - 10 c) Inducir la expresión de la granulicina en un medio de cultivo que comprenda las bacterias competentes transformadas o transducidas de la etapa b);
 - d) Obtener el sobrenadante, tras la lisis de las células competentes, del medio de cultivo de la etapa c) y adicionar dicho sobrenadante, o una alícuota de dicho sobrenadante, a una resina que comprenda un catión divalente unido a un agente quelante capaz de unirse a la secuencia de polihistidina del extremo N-terminal de la granulicina;
 - 15 e) Lavar la resina con una solución tampón desnaturalizante capaz de eliminar uniones inespecíficas;
 - f) Evitar agregaciones del polipéptido adicionando al producto de la etapa e) una solución tampón que comprenda un detergente capaz de evitar dichas agregaciones;
 - 20 g) Eliminar el detergente de la etapa f) con una solución tampón que comprenda metil-β-ciclodextrina; y
 - h) Eluir el polipéptido de la resina con una solución tampón de lavado.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, donde el polipéptido granulicina consiste en la SEQ ID No 1.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el catión divalente es níquel y esté unido al agente quelante NiTA (Ácido Nitrotriacético).
- 30 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la solución tampón desnaturalizante comprende cloruro de guanidinio y la solución tampón de las etapas f) y g) comprende Tris-HCl y NaCl.
- 35 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el detergente de la etapa f) es Tritón X-100.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la molécula de ácido nucleico de la etapa a) es el plásmido pEt-28^o(+).
- 40 7. Composición que comprende granulicina, ó sales farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para su uso en el tratamiento de un tumor sólido canceroso, donde la composición se administra intratumoralmente.
- 45 8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, donde la granulicina es la granulicina humana que comprende la SEQ ID No 1.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde el tumor sólido canceroso se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, prostático, mamario, pulmonar, dérmico (melanoma), hepático, óseo, pancreático, ovárico, testicular, de la vejiga, renal, cerebral, de cabeza o de cuello.
- 50

10. Composición según la reivindicación 9, donde el tumor sólido canceroso es cáncer mamario ó melanoma.

5 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la granulisina está contenida en una disolución que se puede administrar mediante una jeringa.

10 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde dicha composición además comprende una aguja y una jeringa para la administración intratumoral de la granulisina.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7a 12, para su uso en la administración intratumoral repetida de granulisina.

15 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde dicha composición comprendiendo la granulisina se administra simultanea, alternativa o sucesivamente a otro agente antitumoral.

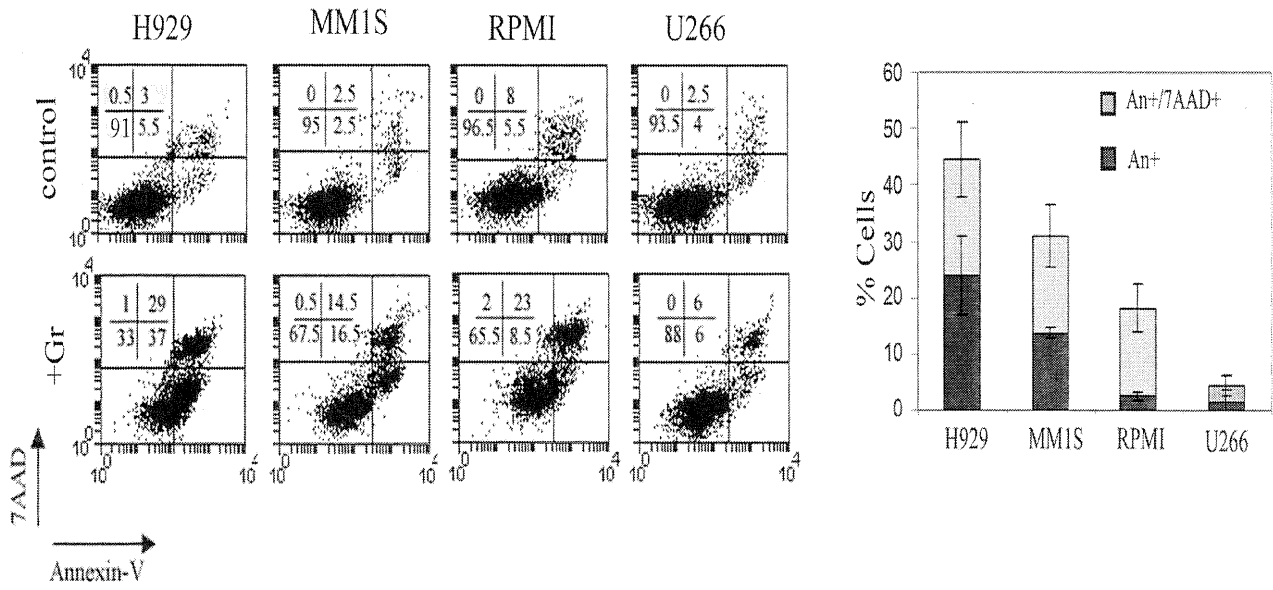


Fig. 1

Plásmido pEt-28^a(+)

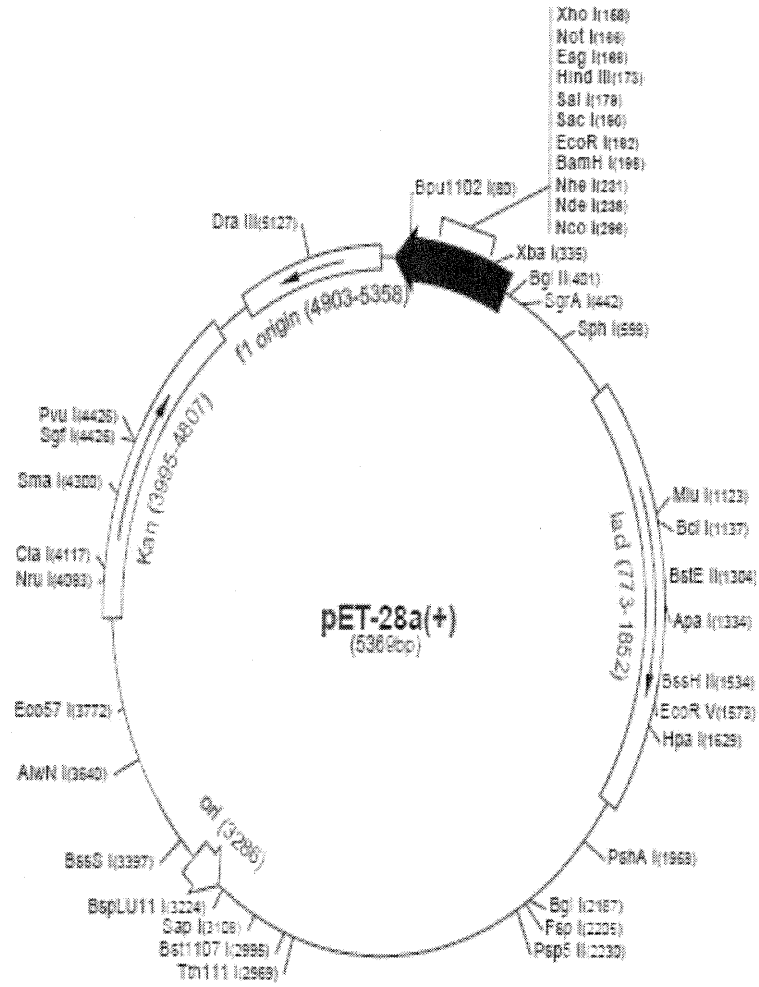


Figura 2. Esquema del plásmido pET-28a(+)

Fig. 2

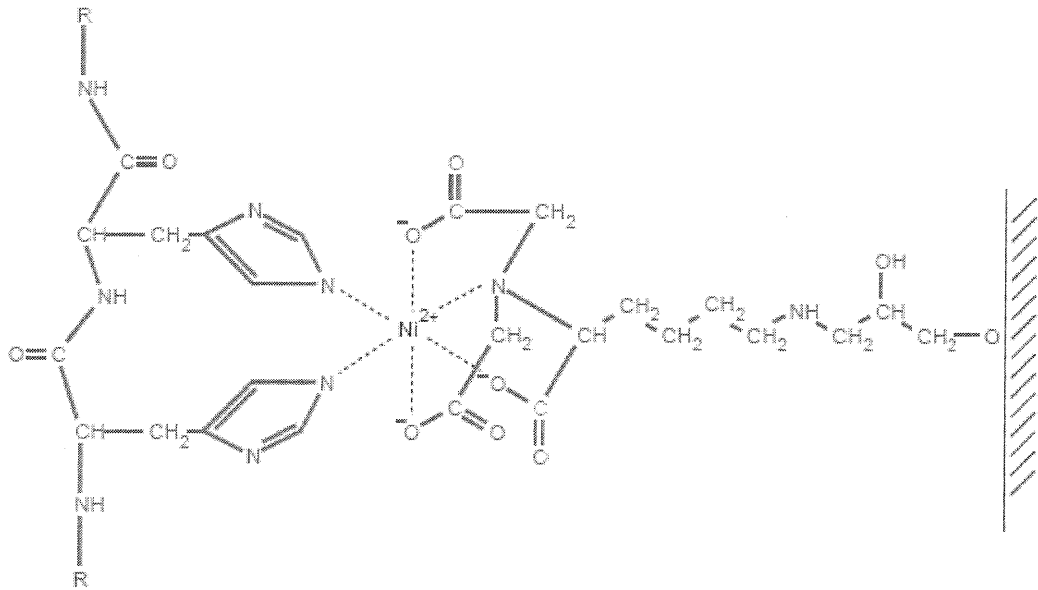


Fig. 3

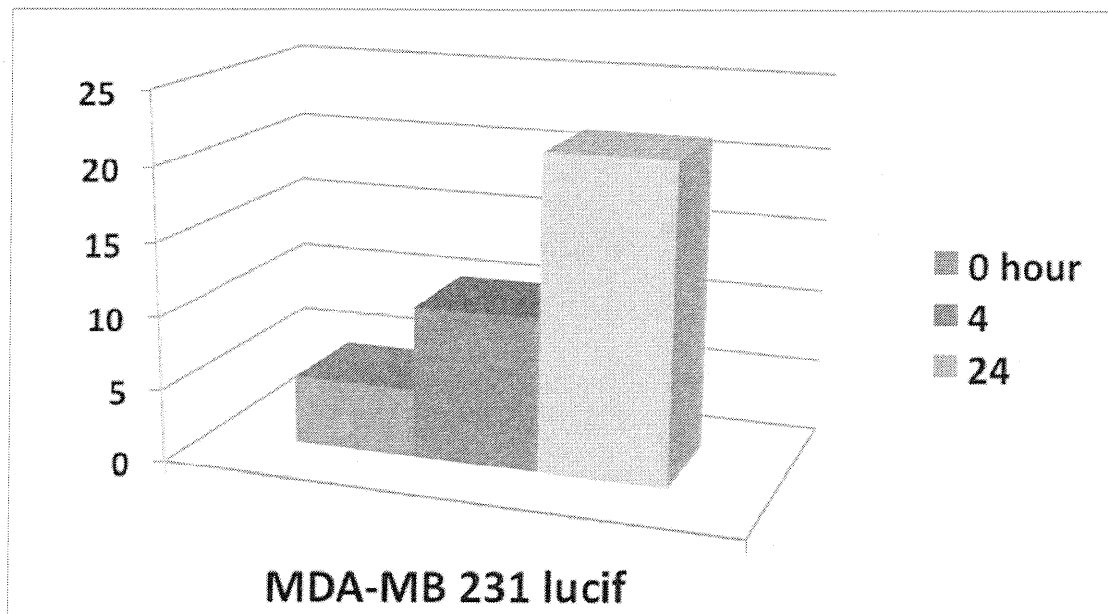


Fig. 4

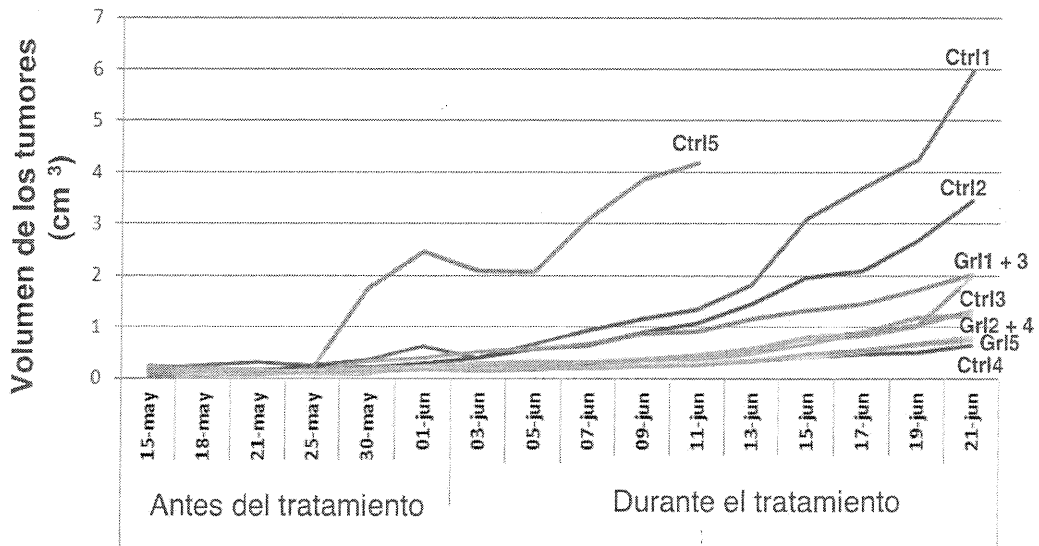


Fig. 5

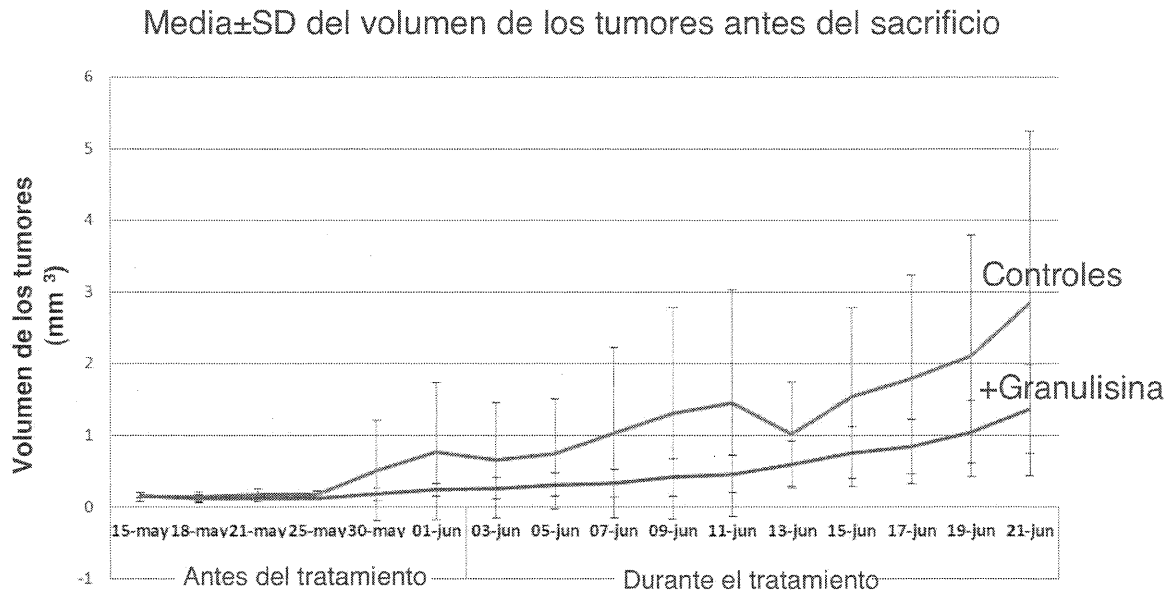


Fig. 6

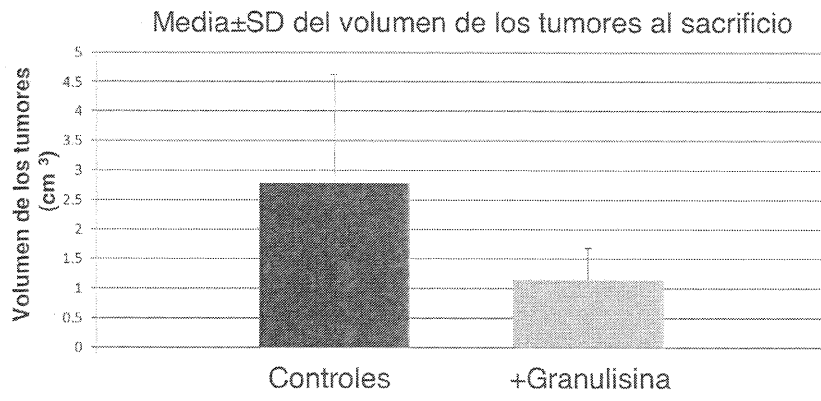


Fig. 7

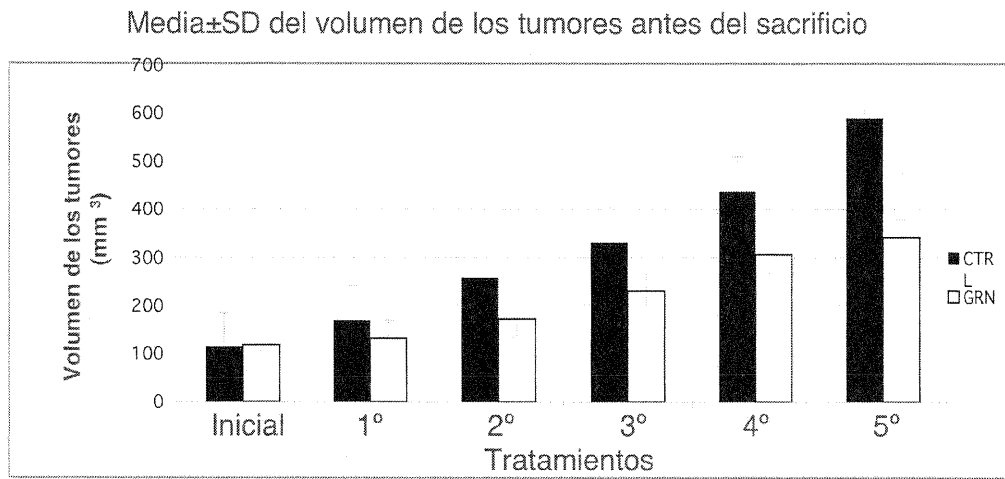


Fig. 8

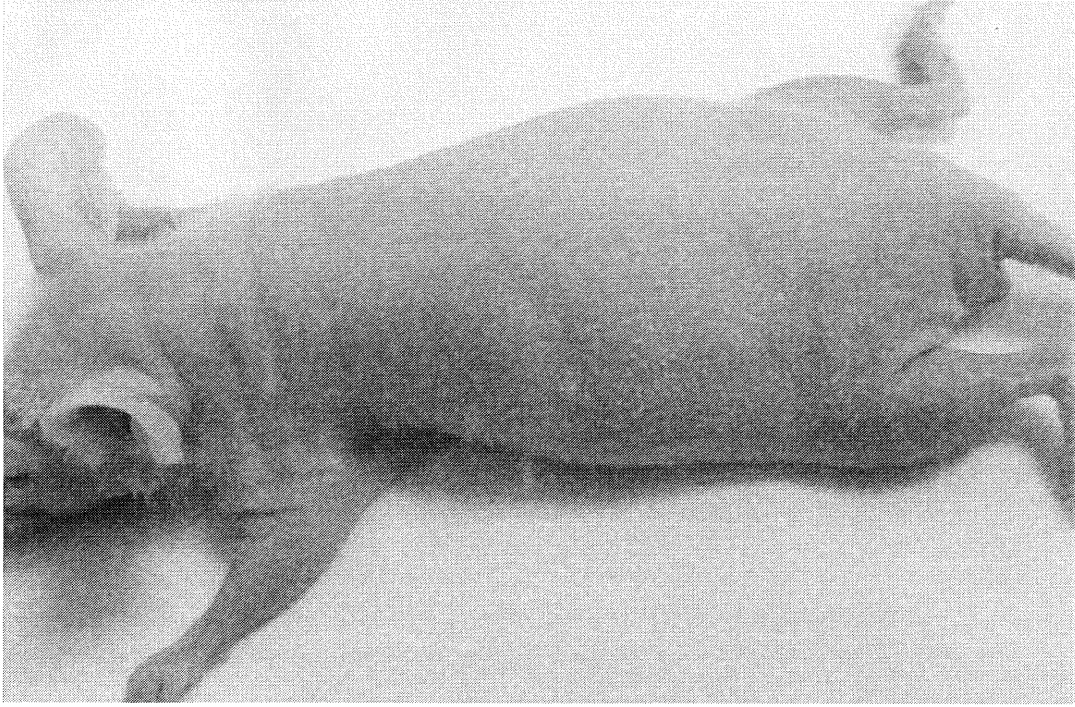


Fig. 9

SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Zaragoza

<120> Uso de la granulicina para el tratamiento de tumores sólidos.

<130> 161193

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(73)

<223> Secuencia aminoacídica de la granulicina humana

<400> 1

Gly Arg Asp Tyr Arg Thr Cys Leu Thr Ile Val Gln Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Met Val Asp Lys Pro Thr Gln Arg Ser Val Ser Asn Ala Ala Thr Arg
 20 25 30

Val Cys Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe
 35 40 45

Met Arg Arg Tyr Gln Ser Arg Val Ile Gln Gly Val Ala Gly Glu Thr
 50 55 60

Ala Gln Gln Ile Cys Glu Asp Leu Arg
65 70