

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 091**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2009 E 09721272 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2268665**

54 Título: **Composiciones peptídicas para el tratamiento del cáncer por la inhibición de la actividad del canal de calcio TRPV6**

30 Prioridad:

**19.03.2008 US 37903**

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

**26.02.2015**

73 Titular/es:

**SORICIMED BIOPHARMA INC. (100.0%)  
95C Queens Road  
Sackville, New Brunswick E4L 4H2, CA**

72 Inventor/es:

**STEWART, JOHN M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 530 091 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

Composiciones peptídicas para el tratamiento del cáncer por la inhibición de la actividad del canal de calcio TRPV6

**Campo de la invención**

La invención se refiere a péptidos para ser usados en la reducción de la proliferación celular y el tratamiento del  
5 cáncer, incluido el cáncer metastásico.

**Antecedentes de la invención**

Un péptido paralizante de 54 aminoácidos denominado soricidina (n.º de acceso del NCBI P0C2C6) se descubrió y aisló de la glándula salival submaxilar de la musaraña colicorta septentrional (*Blarina brevicauda*). Una patente anterior sobre el uso de la soricidina para tratar el dolor (patente de los EE. UU. n.º 7.119.168 dio a conocer datos  
10 que demostraban que este péptido de 54 restos ocasionaba la parálisis e inhibía la captación de calcio en dos líneas celulares de cáncer de ovario (patente de los EE. UU. n.º 7.273.850). Se siguen necesitando antineoplásicos que no tengan actividad paralizante.

Un grupo de canales de iones de calcio implicados en el cáncer son los canales de potencial receptor transitorio (TRP, por su nombre en inglés) que se encuentran en los invertebrados y en los vertebrados. Un miembro de la  
15 superfamilia de los TRP recibió su nombre después de descubrirse que se activaba en presencia de vainilloides (la capsaicina de los pimientos picantes, por ejemplo) y se denominó potencial receptor transitorio por vainilloides. Los primeros cuatro receptores que se comprobó que eran de este tipo (TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4) respondían a la capsaicina y también eran responsables de detectar cambios de temperatura. Los otros dos de la subfamilia de los TRPV, TRPV5 y TRPV6, se encontraron predominantemente en los tejidos de tipo epitelial y eran responsables  
20 de la entrada de los iones de calcio. Se identificó que TRPV5/6 era responsable de la importación del calcio en los tejidos epiteliales del intestino y, por lo tanto, de la captación del calcio de la dieta. También se demostró que estos canales están presentes en una serie de tejidos distintos en diferentes cantidades, pero en más cantidad en las células epiteliales intestinales, riñón, placenta y páncreas. Se midió la expresión de TRPV6 y resultó muy elevada en los cánceres humanos de ovario, próstata y mama, tumores de tiroides y de colon, y en algunas líneas celulares  
25 conocidas de cáncer de próstata. En el cáncer de próstata, el TRPV6 estaba muy inducido en los carcinomas que habían traspasado la pared del tejido y habían comenzado a formar metástasis (Zhuang et al., 2002). Por lo tanto, el TRPV6 es una posible diana para el tratamiento del cáncer. En consecuencia, hay una enorme necesidad de compuestos que bloqueen la actividad de los canales de TRPV6 sobreabundantes en las células cancerosas.

Más recientemente se ha sugerido que la implicación de TRPV6 en el cáncer activa una vía  
30 prosupervivencia/antiapoptósica en dos líneas celulares cancerosas con sobreexpresión de TRPV6. En la línea celular de cáncer de próstata (LnCaP), la concentración intracelular de calcio, incrementada por la gran cantidad de TRPV6, activa el factor nuclear de los linfocitos T activados (NFAT; Lehen'kyi et al. 2007). Bolanz et al. (2008) también han demostrado la implicación del NFAT activado por calcio en el cambio de los genes antiapoptósicos en una línea celular del cáncer de mama humano (T 47-D). Bolanz et al. demostraron que la reducción de la producción  
35 de TRPV6 por ARN interferentes parecía aliviar el bloqueo apoptósico. Estos resultados acentúan aún más la necesidad de inhibidores de TRPV6 para el tratamiento del cáncer.

**Compendio de la invención**

Los inventores han sintetizado péptidos aislados que tienen actividad inhibidora del canal de calcio y, en particular, actividad inhibidora del canal de calcio de TRPV6. Los péptidos son útiles para tratar el cáncer, incluido el cáncer  
40 metastásico. Sorprendentemente, estos compuestos tienen una identidad de secuencia con una cadena continua de aminoácidos de la soricidina, aunque tienen la actividad inhibidora del canal de calcio *sin* la actividad paralizante. No había constancia de que la estructura de la soricidina que tenía actividad inhibidora del canal de calcio estuviera separada de la estructura que ocasionaba la actividad paralizante. Los péptidos de la invención tienen, opcionalmente, la mitad de la longitud de la soricidina, o son más pequeños. Los péptidos de la invención también  
45 tienen inesperadamente más actividad inhibidora del canal de calcio que la soricidina en algunas células. También se determinó que la actividad inhibidora se incrementaba en algunas células a medida que la longitud de los péptidos disminuía.

Los péptidos de la invención tienen otras propiedades inesperadas en comparación con la soricidina de longitud completa, tal como mayor solubilidad, mayor vida útil y menor capacidad antigénica. En un realización, la invención  
50 se refiere a un péptido aislado que comprende toda o parte de la secuencia de aminoácidos

**EGKLSSNDTEGGLCKEFLHP SKVDLPR** (SEQ ID n.º 1), en donde el péptido inhibe la actividad del canal de calcio y carece de actividad paralizante. El péptido es opcionalmente **KEFLHPSKVD LPR** o **HP SKVDLPR**. Otro aspecto se refiere a los péptidos de la invención para uso en un procedimiento de inhibición de la captación de calcio en una célula cancerosa, inducir la apoptosis celular y/o prevenir o tratar el cáncer, que comprende administrar a la  
55 célula todo o parte de un péptido de la invención, en donde el péptido inhibe la captación de calcio en la célula

cancerosa. El cáncer comprende opcionalmente cáncer de mama, cáncer de ovario, neoplasia hemática, cáncer cerebral, cáncer de retina, cáncer hepático, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de próstata o cáncer de endometrio. Los péptidos de la invención inhiben la actividad del canal de calcio sin actividad paralizante, tal como la actividad del canal de calcio de TRPV6. El cáncer comprende opcionalmente un cáncer metastásico, tal como un  
5 cáncer metastásico localizado en un ganglio linfático, tejido pulmonar, tejido renal o tejido hepático.

Otra realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención y un vehículo. La invención incluye péptidos de la invención para ser usados en la preparación de un medicamento para inhibir los canales de calcio en una célula, inducir la apoptosis de una célula cancerosa y/o el  
10 tratamiento del cáncer. La invención también incluye péptidos de la invención para ser usados en la inhibición de los canales de calcio de una célula, la inducción de la apoptosis de una célula cancerosa y/o el tratamiento del cáncer.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. No obstante, hay que saber que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, solo se ofrecen a modo de ilustración, ya que a partir de la descripción  
15 detallada resultarán evidentes a los expertos en la técnica diferentes cambios y modificaciones dentro del espíritu y del alcance de la invención.

### Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención se describirán en relación con los dibujos, en los que:

En la figura 1 se muestra el cambio promedio neto de la corriente de calcio ( $I_{SOC}$ ) a través de los canales de TRPV6 en función de la concentración de péptido (panel A). SorC13 está representado mediante círculos huecos y una línea  
20 discontinua. SorC27 está representado mediante cuadrados huecos y una línea continua. Obsérvese que los números positivos indican la inhibición (corriente neta) del flujo de corriente de calcio al interior de la célula. En el panel B se muestra el porcentaje de inhibición máxima de la corriente de calcio ( $I_{SOC}$ ) a través de los canales de TRPV6 en función de la concentración de péptido. SorC13 está representado por círculos huecos y línea discontinua. SorC27 está representado por cuadrados huecos y una línea continua.

25 En la figura 2 se muestra el efecto de SorC27 sobre una línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3, panel A) y una línea celular de cáncer de mama (MCF 7, panel B).

En la figura 3 se muestra el efecto de SorC13 sobre una línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3, panel A) y una línea celular de cáncer de mama (T 47D, panel B).

30 En la figura 4 se muestra una comparación de la inducción de la apoptosis mediante el paclitaxel (10  $\mu$ M) y SorC13 (10  $\mu$ M) en las T 47D (panel A). En el panel B se muestra una comparación del paclitaxel (10  $\mu$ M) y SorC27 (10  $\mu$ M) en las MCF 7.

En la figura 5 se muestra una comparación de la proporción de tratamiento con CAT: control de CAT (sin CAT) con la proporción de tratamiento con SorC13:control de SorC13 (sin SorC13) y tratamiento con SorC27:control de SorC27 (sin SorC27) sobre las SKOV3 (panel A). En el panel B se muestra la comparación de los tratamientos con CAT y  
35 con SorC13 sobre las CaOV3. La concentración de SorC13 era de 100  $\mu$ M; la de SorC27 era de 10  $\mu$ M. CAT = paclitaxel (10  $\mu$ M) más carboplatino (20 mM). El dato de cada punto corresponde a la media de cuatro mediciones de la inducción de la apoptosis. La línea punteada es una proporción de 1:1 obtenida para la ausencia de efecto.

40 En la figura 6 se muestra una comparación de la proporción de tratamiento con CAT:control de CAT (sin CAT) con la proporción de tratamiento con SorC27:control de SorC27 (sin SorC27) sobre las OVCAR3. Las concentraciones de SorC27 eran 10  $\mu$ M (cuadrado relleno) y 100  $\mu$ M (cuadrado vacío). CAT = paclitaxel (10  $\mu$ M) más carboplatino (20 mM). El dato de cada punto corresponde a la media de cuatro mediciones de la inducción de la apoptosis. La línea punteada es una proporción de 1:1 obtenida para la ausencia de efecto.

La figura 7 es un dibujo lineal que muestra la localización de los ganglios linfáticos en el ratón. La acumulación significativa de SorC13-Cy5.5 y SorC27-Cy5.5 cuatro horas después de la inyección i.v. de 100  $\mu$ g de cada uno de  
45 los péptidos marcados en ratones CD1 se observó en los siguientes ganglios linfáticos marcados en la figura 7: 1, ganglios cervicales superficiales; 4, ganglios axilares; 5, ganglios branquiales; 8, ganglios mesentéricos; y 9, ganglios inguinales.

En la figura 8 se muestra la distribución de SorC13 marcado con Cy5.5 en los ratones CD1, 4 horas después de la inyección i.v. El eje Y es el porcentaje de la fluorescencia total medida en todos los tejidos.

50 En la figura 9 se muestra la distribución de SorC27 marcado con Cy5.5 en los ratones CD1, 4 horas después de la inyección i.v. El eje Y es la fluorescencia total medida en cada tejido.

En la figura 10 se muestra la distribución de SorC27 marcado con Cy5.5 en los ratones CD1 después de la inyección i.v. a lo largo del tiempo después de la perfusión para quitar los líquidos. El eje Y es el porcentaje de fluorescencia

total medida en todos los tejidos. El porcentaje de captación más alto (de fluorescencia total) de SorC27 se observó en hígado, pulmón y riñón. No se muestra el ganglio linfático porque la perfusión quita la linfa. En el panel A se muestra la distribución 4 horas después de la inyección i. v y en el panel B, 24 horas después de la inyección i.v.

5 En la figura 11 se muestra la degradación de SorC27 en el plasma sanguíneo humano a partir del análisis por HPLC de 100  $\mu$ l de plasma diluido en 100  $\mu$ l de KCl a 2 M, inyección de 94  $\mu$ l. El eje Y indica la cantidad ( $\mu$ g) de SorC27 en el plasma antes de la dilución con KCl, semivida = 20,0 min,  $r = 0,87$ ,  $p < 0,05$ . Los datos son media  $\pm$  EEM,  $n = 6$ .

10 En la figura 12 se muestran los resultados de un experimento *in vivo* con ratones NOD/SCID xenoinjertados con tumores de cáncer de ovario SKOV3 de humano. A los ratones se les inyectó solución salina de control, SorC27 o bien una mezcla de paclitaxel y carboplatino (CAT). SorC27 redujo significativamente el volumen tumoral ( $p < 0,05$ ) cuando se comparó con una inyección de disolución salina de control y no se diferenciaba de los ratones tratados con CAT durante 12 días cuando el tamaño tumoral se normalizó por la masa corporal.

### Descripción detallada de la invención

15 Los inventores han fabricado péptidos aislados que tienen actividad inhibitora del canal de calcio sin actividad paralizante. En particular, los péptidos tienen actividad inhibitora del canal de calcio de TRPV6 y bloquean el funcionamiento de TRPV6 en las células cancerosas que tienen el TRPV6 sobreexpresado. Los péptidos son útiles en los procedimientos de tratamiento del cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, neoplasia hemática (leucemia), cáncer cerebral, cáncer de retina, cáncer hepático, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de endometrio.

20 Los péptidos también son útiles para el tratamiento del cáncer metastásico que se ha originado en un primer tejido y que se extiende a un sitio secundario, tal como un ganglio linfático, hígado, pulmón o tejido renal.

25 En una realización, el péptido de la invención tiene la secuencia de aminoácidos: **HPSKVDLPR** (denominada «SorC9»; aminoácidos n.º 19-27 de la SEQ ID n.º 1). En otra realización, el compuesto tiene la secuencia de aminoácidos **KEFLHPSKVDLPR** (denominada «SorC13»; aminoácidos n.º 15-27 de la SEQ ID n.º 1). En otra realización, el compuesto comprende toda o parte de la secuencia de aminoácidos **EGKLSSNDEGGLCKEFLHPSKVDLPR** (denominada «SorC27»; SEQ ID n.º 1).

La invención también describe un ácido nucleico aislado que codifica un péptido de la invención, tal como un ácido nucleico que codifica la SEQ ID n.º 1 o uno de sus fragmentos descritos en la presente memoria. La invención también describe anticuerpos aislados contra un péptido de la invención. El anticuerpo opcional y selectivamente se fija a un péptido de la invención, pero no se fija a la soricidina.

30 Sorprendentemente, los compuestos de la invención tienen identidad de secuencia con parte de la soricidina, pero tienen actividad inhibitora del canal de calcio sin actividad paralizante. Anteriormente no se sabía que la soricidina tuviera dos dominios funcionales en su estructura. Tampoco se sabía que se podían preparar péptidos que separasen la actividad inhibitora del canal de calcio de la actividad paralizante. Los péptidos de la invención tienen opcionalmente la mitad de la longitud de la soricidina o son más pequeños. Los péptidos de la invención no sólo 35 aíslan y conservan la actividad inhibitora del canal de calcio, sino que inesperadamente tienen una mayor actividad inhibitora del canal de calcio que la soricidina en determinadas líneas celulares, tales como la OV 2008. En algunas líneas celulares también se incrementaba la actividad de inhibición a medida que disminuía la longitud del péptido.

40 La naturaleza sorprendente de esta invención se acentúa al considerar que, mientras las enzimas y proteínas grandes y bifuncionales son frecuentes en los sistemas biológicos, la bifuncionalidad inherente es un fenómeno muy raro en los péptidos pequeños. Los resultados publicados sobre la bifuncionalidad han sido típicamente el resultado de una producción artificial, por ejemplo, cuando dos péptidos diferentes se han fusionado químicamente (Anes et al. 2006; Yamamoto et al. 2008). El inventor determinó que el extremo amino de la soricidina tiene una función paralizante y que el extremo carboxilo tiene una función inhibitora del canal de calcio. El truncamiento de la soricidina por el extremo amino produjo con éxito péptidos que conservaban la actividad inhibitora del canal de 45 calcio sin actividad paralizante.

50 Los péptidos de la invención tienen otras propiedades inesperadas en comparación con la soricidina de longitud completa. Por ejemplo, los péptidos de la invención son más solubles, lo que permite que se administren dosis más pequeñas para conseguir una concentración peptídica deseada en el plasma sanguíneo. Sobre la base de las solubilidades relativas, el volumen de la dosis de los péptidos de la invención para conseguir una concentración sanguínea deseada podría ser al menos 10 veces más pequeña que la de la soricidina.

Adicionalmente, los péptidos tienen una mayor estabilidad de almacenamiento y en solución debido a la presencia de menos puentes disulfuro sensibles (la soricidina tiene 3 puentes disulfuro). Los péptidos de la invención no tienen opcionalmente puentes disulfuro. Una ausencia de puentes disulfuro proporciona un periodo de almacenamiento muy largo cuando se conserva con una refrigeración mínima o a temperatura ambiente como un sólido.

Adicionalmente, cuando los péptidos de la invención sin puentes disulfuro se disuelven en agua, no se pueden escindir los puentes disulfuro. Tal escisión, en la soricidina de longitud completa, puede hacer que el péptido sea menos activo y más propenso a formar puentes disulfuro intermoleculares. La formación de puentes disulfuro interpeptídicos también da lugar a la precipitación de la soricidina. Los péptidos de la invención, tales como SorC13 y SorC27, son típicamente estables en solución acuosa a 8 °C durante al menos 3 semanas sin ningún cambio de pureza, según se midió por HPLC.

Los péptidos de la invención también esquivan uno de los principales efectos adversos de las sustancias farmacéuticas relacionado con la capacidad para atravesar la barrera protectora del sistema nervioso central: la barrera hematoencefálica. Que los péptidos de la invención sean incapaces de atravesar esta barrera protectora elimina la posible toxicidad en el sistema nervioso central.

Los péptidos de la invención tienen ventajosamente poca toxicidad. Tal y como se demuestra en el ejemplo 23, después de la inyección i.v. *in vivo* en los ratones CD1, SorC27 no hizo cambiar la tensión arterial ni en la frecuencia cardíaca durante un periodo de medición de 1 hora. Tampoco se observó ningún cambio neurológico/conductual durante 72 horas. Después de la inyección i.v. *in vivo* en los ratones CD1, SorC13 ocasionó un pequeño pico (aproximadamente del 25%) de la tensión arterial en los primeros 15 min que desapareció al cabo de 1 hora. No se observaron cambios neurológicos/conductuales en los ratones durante 72 horas. La inyección intravenosa única de SorC13 o SorC27 en los ratones CD1 en dosis de 10 mg/kg, 100 mg/kg y 500 mg/kg no produjo acontecimientos adversos durante un periodo de observación tras la inyección de 5 días. La autopsia tampoco mostró cambios significativos en los principales sistemas de órganos. Además, una dosis múltiple de SorC27 a 400 mg/kg (i.p.) cada día durante 12 días en los ratones no mostró ninguna indicación de toxicidad.

Los péptidos de la invención, en particular los péptidos más pequeños, tal como SorC13, tienen típicamente menos capacidad antigénica que la soricidina. Los péptidos que tienen un número de aminoácidos igual o menor al umbral empírico para la antigenicidad (típicamente se considera que es de 13 aminoácidos para los péptidos en general) no poseen capacidad antigénica.

Como se observó más arriba, un péptido de la invención tendrá actividad de canal de calcio (a saber, la capacidad para inhibir parcial o totalmente la actividad de canal) sin actividad paralizante. Los péptidos que tienen tal actividad se identifican con facilidad con cualquier ensayo conocido adecuado que mida i) el bloqueo del canal de calcio y ii) la ausencia de actividad paralizante. Por ejemplo, en una realización, un péptido que tiene actividad inhibitoria del canal de calcio se identifica opcionalmente mediante la determinación de que el péptido reduce la actividad del canal de calcio al reducir (a saber, inhibir parcial o totalmente) el flujo del calcio a través de los canales de calcio.

La actividad inhibitoria del canal de calcio se identifica opcionalmente mediante una línea celular fácilmente disponible (p. ej., líneas celulares de riñón embrionario humano, HEK, célula del cáncer de próstata del ganglio linfático, LnCaP) transfectadas con un vector de expresión para TRPV6. Tales células transfectadas se distribuyen en alícuotas fácilmente y se conservan (típicamente a -80 °C) hasta que se necesiten. Esto proporciona una preparación de células transfectadas estándares para ensayar la inhibición de la captación de los iones de calcio en las células. El análisis del movimiento del calcio en las líneas celulares para identificar los péptidos de la invención que proporcionan una reducción de la actividad de canal de calcio se realiza opcionalmente mediante mediciones fluorimétricas (sonda de iones de calcio FURA internalizada) o mediante un protocolo electrofisiológico que implica el pinzamiento zonal de las células y medir la corriente de calcio en presencia o ausencia de un péptido. Opcionalmente, los péptidos tienen una constante de inhibición en equilibrio de menos de: 1000 nM, 150 nM o 100 nM en un modelo de células LnCaP al mismo tiempo que no alteran la transmisión por el nervio ciático de un potencial de acción en un modelo de nervio ciático de rata (a saber, sin actividad paralizante). Por ejemplo, la constante de disociación en equilibrio (Kd) para SorC27 es de 140 nM y la de SorC13 es de 100 nM en el modelo de LnCaP (figura 6). Basándose en una relación lineal con el número de aminoácidos, la Kd de SorC9 se espera que sea aproximadamente de 90 nM.

Los péptidos aislados son útiles para una serie de propósitos. Una realización incluye péptidos de la invención para ser usados en procedimientos de reducción de la proliferación celular administrando un péptido de la invención a una célula, tal como una célula cancerosa. La reducción de la proliferación celular se determina con facilidad al poner en contacto un péptido con una célula en proliferación, tal como una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*, y determinar si el péptido reduce (a saber, inhibe completa o parcialmente) la proliferación celular. En particular, la invención describe procedimientos de inducción de la apoptosis de una célula, tal como una célula cancerosa, mediante la administración de un péptido de la invención a la célula. La reducción de la proliferación celular se determina con facilidad al poner en contacto un péptido con una célula, tal como una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*, y determinar si el péptido induce la apoptosis.

Tal y como se indicó más arriba, los péptidos aislados son útiles para tratar el cáncer. La invención describe procedimientos para tratar el cáncer en un mamífero, tal como un humano, mediante la administración de un péptido aislado de la invención al mamífero. Notablemente, en los ensayos independientes y comparativos directos contra el fármaco contra el cáncer bien conocido, el paclitaxel, y el cóctel de fármacos contra el cáncer, paclitaxel y carboplatino («cóctel CAT»), los dos péptidos de la invención, SorC13 y SorC27, proporcionaron una inducción más

rápida y más activa de la apoptosis en determinadas líneas celulares. Se ha demostrado que este efecto es mejor tanto contra el cáncer de mama como contra el cáncer de ovario. Un tratamiento típico contra el cáncer de mama es el paclitaxel y un tratamiento típico contra los cánceres de ovario es el cóctel CAT. En otras líneas celulares, el funcionamiento de SorC13 y SorC27 era comparable al de CAT.

5 También se ha demostrado que el péptido aislado SorC27 es útil para tratar el cáncer en un modelo de cáncer de ratón con xenoinjerto *in vivo*. Tal y como se muestra en el ejemplo 14 y en la figura 12, en los ratones NOD/SCID xenoinjertados con tumores de cáncer de ovario humano, SorC27 redujo el volumen tumoral significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando se comparó con la situación de control (inyección de disolución salina) y no se diferenciaba de los ratones tratados con CAT, durante 12 días, cuando el tamaño tumoral se normalizó por la masa corporal.

10 Sin pretender comprometerse con la teoría sobre la causa del efecto antineoplásico, el inventor ha determinado, mediante experimentos con SorC27 y SorC13, que los péptidos de la invención activan la cascada apoptótica a través de la caspasa 3 y/o 7 en diez líneas celulares cancerosas diferentes, pero no en dos líneas celulares no cancerosas.

Así pues, un péptido de la invención se identifica opcionalmente por tener actividad contra el cáncer si provoca la inducción de las enzimas caspasa 3 y caspasa 7 por encima de los niveles de la caspasa 3 y de la caspasa 7 en las células de control. Una vez que estas enzimas se activan, se producirá la muerte celular. La actividad de las enzimas caspasas en las células tratadas se mide con facilidad y se compara con las células sin tratar de control.

Además, tal y como se muestra en la tabla 9 y en el ejemplo 25, la presencia del ARNm de TRPV6 en una línea celular se corresponde con las líneas celulares que muestran un efecto apoptótico en respuesta a los péptidos de la presente invención.

#### Cáncer metastásico

Los péptidos de la invención tienen actividad antineoplásica contra una célula cancerosa en un sitio de tumor primario o una célula cancerosa que hace metástasis en un sitio de cáncer secundario. Los péptidos se localizan predominantemente en los ganglios linfáticos, pero también en pulmón, hígado y riñón, que son los sitios habituales en los que se localiza el cáncer metastásico (figura 7).

Los péptidos de la presente aplicación son útiles para el tratamiento del cáncer metastásico, entre ellos un cáncer que se ha diseminado a pulmón, cerebro, hígado, riñón, bazo y médula ósea. Los péptidos se pueden usar solos o en una composición farmacéutica que comprende un segundo fármaco contra el cáncer.

Los péptidos de la presente solicitud son particularmente útiles para tratar las metástasis en los ganglios linfáticos. «Metástasis en los ganglios linfáticos» incluye opcionalmente cáncer de pulmón (Mujoomdar et al., 2007), cáncer gástrico, carcinoma cervical (Lyshchik et al., 2007), carcinoma vulvar (Vernooij et al., 2007), cáncer de endometrio (Aalders et al., 2007), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Veness et al., 2007), cáncer de esófago y garganta, carcinoma nasofaríngeo (Ma et al., 2007), cáncer digestivo (Wind et al., 2006), cáncer de vesícula biliar, cáncer de cerebro (Mujoomdar et al., 2007), cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer colorrectal. Así pues, los péptidos de la invención son útiles para tratar el cáncer en un mamífero en cualquiera de los estadios del cáncer I, II, III o IV.

#### Péptidos de la invención

Los péptidos aislados que comprenden toda o cualquier parte de la SEQ ID n.º 1 y que tienen actividad inhibitoria del canal de calcio (actividad inhibitoria de TRPV6), sin actividad paralizante, son péptidos útiles para el tratamiento del cáncer. Se pueden añadir aminoácidos a los péptidos de la invención, pero los péptidos aislados, con aminoácidos, son típicamente de 35 o 30 aminoácidos o menos, opcionalmente menos de: 27, 25, 20, 15 o 13 aminoácidos de longitud, incluso opcionalmente al menos 9 aminoácidos de longitud. Se pueden fabricar con facilidad los péptidos más largos mediante la adición de una serie de aminoácidos adicionales a la secuencia de SorC27 para fabricar un péptido que pudiera tener, por ejemplo, hasta 30, 35, 40 o 45 aminoácidos de longitud (p. ej., los aminoácidos adicionales que corresponden a la secuencia de aminoácidos de la soricidina, tal como uno o más de los aminoácidos del extremo carboxilo (**SILARPAELNTETCILEC** SEQ ID n.º 2), una secuencia de direccionamiento u otros aminoácidos).

El péptido comprende opcionalmente, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos:

**HPSKVDLPR** (aminoácidos n.º 19-27 de la SEQ ID n.º 1), **KEFLHPSKVDLPR** (aminoácidos n.º 15-27 de la SEQ ID n.º 1) o **EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR** (SEQ ID n.º 1). Opcionalmente, el péptido comprende al menos: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de la SEQ ID n.º 1. Opcionalmente, el péptido aislado comprende al menos: 9, 10, 11, 15 o 18 aminoácidos de la SEQ ID n.º 1. Opcionalmente, el péptido comprende un fragmento de 9-13, 10-15, 15-20, 20-25 o 20-27 aminoácidos de la SEQ ID n.º 1, en donde el péptido inhibe los canales de calcio, reduce la proliferación celular y no tiene actividad paralizante.

Los péptidos de la invención también incluyen opcionalmente análogos de los péptidos arriba mencionados. Los análogos de la proteína de la invención incluyen opcionalmente, pero sin limitarse a ellos, una secuencia de aminoácidos que contiene sustituciones, inserciones, deleciones y/o mutaciones de uno o más aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser de una naturaleza conservativa o no conservativa. Las sustituciones conservativas de aminoácidos implican reemplazar uno o más aminoácidos de los péptidos de la invención con aminoácidos de carga, tamaño y/o características de hidrofobia similares. Cuando se hacen sólo sustituciones conservativas, el análogo resultante debe ser funcionalmente equivalente. Las sustituciones no conservativas implican reemplazar uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos por uno o más aminoácidos que poseen una carga, tamaño y/o características de hidrofobia diferentes. El análogo es opcionalmente un peptido, que es una poliglicina N-sustituida con grupos aminoácídicos R unidos al átomo N.

Se introducen opcionalmente una o más inserciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de la invención. Las inserciones de aminoácidos consisten en un único resto aminoácídico o aminoácidos secuenciales que oscilan, por ejemplo, de 2 a 15 aminoácidos de longitud.

Las deleciones consisten de la retirada de uno o más aminoácidos, o porciones aisladas de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los aminoácidos eliminados pueden ser contiguos o pueden no serlo.

Los péptidos de la invención se preparan con facilidad mediante síntesis química con técnicas bien conocidas en la química de las proteínas, tales como la síntesis de fase sólida (Merrifield, 1964, *J. Am. Chem. Assoc.* 85: 2149-2154) o la síntesis en solución homogénea (Houbenweil, 1987, *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch, vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart).

Los análogos de una proteína de la invención se preparan opcionalmente mediante la introducción de mutaciones en una secuencia nucleotídica que codifica el péptido. Las mutaciones en las secuencias nucleotídicas construidas para la expresión de análogos de una proteína de la invención conservan el marco de lectura de las secuencias codificantes. Además, las mutaciones no crearán preferiblemente regiones de complementariedad que pudieran hibridarse para producir estructuras secundarias en el ARNm, tales como bucles u horquillas, que podrían afectar adversamente a la traducción del ARNm.

Las mutaciones se introducen opcionalmente en locus particulares mediante la síntesis de los oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueados por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o deleción de aminoácidos deseada.

Alternativamente, se emplean procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótidos para proporcionar un gen alterado que tiene determinados codones alterados de acuerdo con la sustitución, deleción o inserción requerida. La deleción o truncamiento de un péptido de la invención también se consigue con facilidad utilizando sitios de endonucleasas de restricción oportunos adyacentes a la deleción deseada. Tras la restricción, se pueden rellenar los extremos protuberantes y religar el ADN. Los procedimientos de ejemplo para fabricar las alteraciones presentadas anteriormente los describen Sambrook et al. (Sambrook J et al., 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Además, los análogos de una proteína de la invención se preparan con facilidad por síntesis química con las técnicas bien conocidas en la química de proteínas, tales como la síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964, *J. Am. Chem. Assoc.* 85: 2149-2154) o la síntesis en solución homogénea (Houbenweil, 1987, *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch, vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart). Los péptidos de la invención también incluyen péptidos que tienen una identidad de secuencia con un péptido de la invención, péptidos mutados y/o truncamientos de los mismos, como se describe en la presente memoria. Tales péptidos tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas (véase la discusión de las condiciones de hibridación rigurosa en la presente memoria) con una sonda utilizada para obtener un péptido de la invención. Los péptidos que tienen la misma secuencia a menudo tendrán las regiones que son características de la proteína.

Otros péptidos útiles de la invención comprenden opcionalmente, consisten esencialmente en o consisten en una secuencia de aminoácidos con al menos: una identidad de secuencia del 80%, 90% o 95% con toda o parte de la SEQ ID n.º 1 descrita en la presente memoria, en donde el péptido tiene actividad inhibidora del canal de calcio y ninguna actividad paralizante, y es útil para el tratamiento del cáncer. La identidad de secuencia se evalúa típicamente mediante la búsqueda avanzada con el programa BLAST versión 2.1 (parámetros como más arriba; Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) «Basic local alignment search tool». *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). BLAST es una serie de programas que están disponibles en línea a través del Centro Nacional de los EE. UU. para la Información de Biotecnología (edificio 38A de la National Library of Medicine, Bethesda, MD 20894). La búsqueda avanzada con BLAST se ajusta con los parámetros de defecto. Las referencias para los programas de BLAST incluyen: Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) «Basic local alignment search tool». *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; Gish, W. y States, D. J. (1993) «Identification of protein coding regions by database similarity search». *Nature Genet.* 3: 266-272; Madden, T. L., Tatusov, R. L. y Zhang, J. (1996)

«Applications of network BLAST server» *Meth. Enzymol.* 266: 131-141; Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997) «Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs». *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402; Zhang, J. y Madden, T. L. (1997) «PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation». *Genome Res.* 7: 649-656).

La presente invención también describe una proteína de la invención conjugada con una proteína seleccionada o una proteína marcadora seleccionable para producir proteínas de fusión.

#### Procedimientos terapéuticos

Los péptidos de la invención, tales como toda o parte de la SEQ ID n.º 1 descrita en la presente memoria, son útiles para reducir la proliferación celular, inducir la apoptosis celular y prevenir o tratar el cáncer mediante la administración del péptido a un humano.

La frase «reducir la proliferación celular» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a enlentecer la velocidad de proliferación de una célula en comparación con la velocidad de proliferación de una célula en ausencia de la sustancia.

La frase «inducir la apoptosis celular», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a incrementar la velocidad de la apoptosis de las células en comparación con la velocidad de la apoptosis de las células en ausencia de la sustancia.

La terminología «cantidad eficaz» tal y como se utiliza en la presente memoria significa una cantidad eficaz y en dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado (p. ej., opcionalmente, bloquear la actividad del canal de calcio, reducir la proliferación celular, inducir la apoptosis y/o prevenir o tratar el cáncer).

Administrar un péptido o sustancia a un mamífero incluye administraciones tanto *in vivo* como *ex vivo*.

La terminología «una célula», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye una sola célula así como una pluralidad o población de células. La administración de un péptido o de una sustancia a una célula incluye administraciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

La frase «reduce la actividad del canal de calcio», tal y como se utiliza en la presente memoria, significa que la sustancia puede dar lugar a una disminución de la actividad del canal de calcio en comparación con la actividad del canal de calcio en ausencia de la sustancia.

Los péptidos de la invención inhiben fuertemente la captación del calcio en las células cancerosas, en particular las células cancerosas en las que el canal de captación de calcio de TRPV6 tiene incrementada la expresión, tal como en el cáncer de mama, cáncer de ovario, neoplasia hemática, cáncer cerebral, cáncer de retina, cáncer hepático, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de endometrio. Los péptidos de la invención, al reducir la captación de calcio, alteran el calcio intracelular esencial para la proliferación de células normales y cancerosas. Por consiguiente, la invención incluye el uso de un péptido de la invención para reducir la proliferación celular, inducir la apoptosis y/o prevenir o tratar tumores y el cáncer en los mamíferos (p. ej., humanos) mediante la administración del péptido al mamífero.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, y como se sabe bien en la técnica, «tratar» o «tratamiento» es una estrategia para obtener unos resultados beneficiosos o deseados, entre ellos los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (a saber, que no empeora) de la enfermedad o trastorno, prevención de la diseminación de la enfermedad o trastorno, retraso o enlentecimiento de la progresión de la enfermedad o trastorno, mejora o paliación del estado de la enfermedad o trastorno, y remisión (tanto si es parcial como total), tanto si es detectable como indetectable. «Tratamiento» también puede significar prolongar la supervivencia en comparación a la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

#### 45 Composiciones farmacéuticas

La invención también incluye el uso de los péptidos de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer. Los péptidos aislados de la invención se formulan opcionalmente en una composición farmacéutica para la administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. Con «forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*» se quiere hacer referencia a una forma de la sustancia a administrar en la que cualquier efecto tóxico tiene menos peso que los efectos terapéuticos. Las sustancias se pueden administrar a organismos vivos, entre ellos humanos y animales.

La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, en unas dosis y durante periodos de tiempo necesarios para



conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad que tiene la sustancia para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Las posologías de la dosis se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar  
5 varias dosis independientes al día o la dosis se puede reducir proporcionalmente como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

El péptido de la invención se combina preferiblemente con otros componentes, tales como un vehículo en una composición, tal como una composición farmacéutica. Las composiciones son útiles cuando se administran para el tratamiento farmacológico o la prevención del cáncer.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a humanos o animales mediante una serie de procedimientos, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, la administración tópica, la administración oral, la administración en aerosol, la instilación intratraqueal, la inyección intraperitoneal, la inyección en el líquido cefalorraquídeo, la inyección intravenosa y la inyección subcutánea. Las dosis a administrar dependen de las necesidades del paciente, el efecto deseado y la vía de administración elegida. Las moléculas de ácido nucleico y  
15 los péptidos se pueden introducir en las células con vehículos de administración *in vivo* tales como liposomas. También se pueden introducir en estas células mediante técnicas físicas tales como la microinyección y la electroporación, o procedimientos químicos tales como la coprecipitación, pegilación o mediante liposomas.

Las composiciones farmacéuticas se preparan mediante procedimientos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a los pacientes, y de tal forma que una  
20 cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico o péptido se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE. UU.) o *Handbook of Pharmaceutical Additives* (compilado por Michael e Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, Inglaterra (1995)). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias en  
25 asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y pueden estar contenidas en soluciones tamponadas con un pH adecuado y/o ser isoosmóticas con los líquidos fisiológicos. En este sentido, se puede hacer referencia a la patente de los EE. UU. n.º 5.843.456.

Sobre esta base, las composiciones farmacéuticas incluyen opcionalmente un compuesto o sustancia activa, tal como un péptido o molécula de ácido nucleico, en asociación con uno o más vehículos o diluyentes  
30 farmacéuticamente aceptables, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmóticas con los líquidos fisiológicos. Los procedimientos para combinar las moléculas activas con los vehículos o combinarlas con diluyentes los conocen bien los expertos en la técnica. La composición opcionalmente incluye un agente de acción selectiva para el transporte del compuesto activo a los sitios especificados dentro del tejido.

#### Preparación de anticuerpos

35 Los anticuerpos contra el péptido son útiles para identificar la presencia del péptido en una muestra problema. Cualquier procedimiento para marcar el anticuerpo que informe de la densidad/localización del péptido resultaría útil (p. ej., péptido marcado radiactivamente o péptido etiquetado con fluorescencia). El anticuerpo es típicamente un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Los anticuerpos son también valiosos para la inmunopurificación de los péptidos. Por ejemplo, se puede poner en contacto una muestra biológica con el anticuerpo en las  
40 condiciones que permiten la formación de un complejo inmunitario entre el anticuerpo y un péptido reconocido por el anticuerpo, y detectar en la muestra la presencia o la ausencia del complejo inmunológico por medio del cual se detecta la presencia del péptido de la invención. La invención también describe composiciones que incluyen preferiblemente el anticuerpo, un medio adecuado para la formación de un complejo inmunitario entre el anticuerpo y un péptido reconocido por el anticuerpo, y un reactivo capaz de detectar el complejo inmunitario para comprobar la  
45 presencia de los péptidos de la invención.

Para reconocer los péptidos de la invención se pueden generar anticuerpos contra un abanico de epítomos únicos a lo largo de los péptidos.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales se preparan de acuerdo con la descripción en esta solicitud y los métodos conocidos en la técnica. Para ejemplos de procedimientos de preparación y usos de los anticuerpos  
50 monoclonales, véanse las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.688.681, 5.688.657, 5.683.693, 5.667.781, 5.665.356, 5.591.628, 5.510.241, 5.503.987, 5.501.988, 5.500.345 y 5.496.705. Ejemplos de la preparación y usos de los anticuerpos policlonales se describen en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.512.282, 4.828.985, 5.225.331 y 5.124.147.

La terminología «anticuerpo», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye fragmentos del mismo que  
55 también reaccionan específicamente con un péptido de la invención. Los anticuerpos se pueden fragmentar con las técnicas convencionales y se puede escrutar la utilidad de los fragmentos de la misma manera que se describe más arriba. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> al tratar el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub>

resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir los fragmentos Fab'.

- La invención también describe procedimientos de uso de los anticuerpos, tales como para la detección de los receptores que se fijan a los péptidos de la invención. Por ejemplo, la invención incluye un procedimiento para detectar la presencia de un péptido de la invención, en donde: a) se pone en contacto una muestra que contiene uno o más péptidos con un anticuerpo de la invención en las condiciones adecuadas para la que se dé la fijación del anticuerpo a los péptido con los cuales reacciona específicamente; b) se separan del anticuerpo los péptidos sin fijar; y c) se detecta el anticuerpo que permanece fijado a uno o más de los péptidos en la muestra.

#### Herramienta de búsqueda

- Los péptidos de la invención son útiles en los protocolos de búsqueda para explorar la unión neuromuscular y los canales iónicos. La capacidad para alterar selectivamente determinados canales iónicos o clases de canales iónicos proporciona otra herramienta con la cual alterar la sinapsis neuromuscular de una manera predecible. Esto identifica la función de las dianas peptídicas sensibles en las funciones y procesos neuromusculares. La invención incluye un procedimiento para determinar la respuesta de un canal iónico a un péptido paralizante, que comprende poner en contacto un canal o células que comprenden un canal con un péptido de la invención o un derivado del mismo y determinar si los canales transportan iones o si se ha reducido el transporte de iones (p. ej.,  $Ca^{2+}$ ).

- Los péptidos de la invención inhiben los canales de TRPV6 y se etiquetan con facilidad con una marcación (marcación fluorescente, marcación radioactiva, marcación de biotina, etc.) de identificación del canal de TRPV6 en una célula o tejido, o de marcación de células o tejidos que expresan una gran cantidad de canales de calcio. En consecuencia, la invención se refiere a los procedimientos para identificar un canal de TRPV6 en una célula o tejido, que comprende poner en contacto la célula o tejido con un péptido de la invención que se ha etiquetado con una marcación detectable y detectar el péptido fijado al canal de TRPV6 en la célula o tejido.

#### Ácidos nucleicos

- Los péptidos de la invención (que incluyen truncamientos, análogos, etc.) se pueden preparar mediante síntesis química o mediante procedimientos de ADN recombinante. En consecuencia, la invención describe moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia que codifica un péptido de la invención. Estas secuencias se incorporan con facilidad de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica en un vector de expresión adecuado que asegura la buena expresión del péptido. Los vectores de expresión incluyen, pero sin limitarse a ellos, cósmidos, plásmidos o virus modificados (p. ej., retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con replicación defectuosa), siempre y cuando el vector sea compatible con la célula hospedadora utilizada. La expresión «vectores adecuados para la transformación de una célula hospedadora» significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras a utilizar para la expresión, que están operativamente unidas a la molécula de ácido nucleico.

«Operativamente unido» significa que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

- Así pues, la invención describe un vector de expresión recombinante de la invención que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento del mismo, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de péptido insertada. Las secuencias reguladoras adecuadas proceden opcionalmente de distintas fuentes, entre ellas genes bacterianos, fúngicos o víricos (por ejemplo, véanse las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185*, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). La selección de secuencias reguladoras adecuadas depende de la célula hospedadora elegida y un experto en la técnica la puede llevar a cabo con facilidad. Ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor y potenciador transcripcional o secuencia de fijación para una ARN polimerasa, una secuencia de fijación ribosómica, que incluye una señal de inicio de la traducción. Adicionalmente, según la célula hospedadora elegida y el vector empleado, se pueden incorporar en el vector de expresión otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción del ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de transcripción. También se puede apreciar que las secuencias reguladoras necesarias pueden ser proporcionadas por el compuesto nativo y/ sus regiones flanqueantes.

- La invención describe además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Estos vectores son sistemas experimentales útiles para estudiar los péptidos de la invención o sus variantes, o para ensayar antídotos. Los péptidos pueden ser tóxicos, o pueden no serlo, para las células hospedadoras. También son útiles para producir grandes cantidades del péptido.

- Los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria pueden también contener un gen marcador de selección que facilita la selección de las células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Los ejemplos de genes marcadores de selección son genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confieren resistencia a determinados fármacos,  $\beta$ -galactosidasa,

cloranfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga. La transcripción del marcador de selección se sigue mediante los cambios de concentración de la proteína del marcador de selección, tal como  $\beta$ -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador de selección codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos, tal como resistencia a la neomicina, las células transformantes se pueden seleccionar con G418. Las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células morirán. Esto hace posible visualizar y ensayar la expresión de vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación sobre la expresión y el fenotipo. Se apreciará que se pueden introducir marcadores de selección en un vector independiente a partir del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinantes pueden también contener genes que codifican una parte para fusión que hace incrementar la expresión de la proteína recombinante; hace incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y ayuda a purificar una proteína recombinante deseada al actuar como ligando en la purificación por afinidad. Por ejemplo, se puede añadir un sitio de escisión proteolítico a la proteína recombinante deseada para que la proteína recombinante se pueda separar del resto de fusión tras la purificación de la proteína de fusión.

Los vectores de expresión recombinantes pueden introducirse en las células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformada. Estas células son sistemas experimentales útiles. En consecuencia, la invención describe una célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante. La terminología «célula hospedadora transformada» pretende incluir células procarióticas y eucarióticas que se han transformado o transfectado con un vector de expresión recombinante de la invención. Las células procariotas pueden transformarse con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada con cloruro de calcio. El ácido nucleico se puede introducir en las células de mamíferos mediante técnicas convencionales tales como coprecipitación con fosfato de calcio o con cloruro de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Los procedimientos adecuados para transformar y transfectar las células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook et al (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press) y otros, tales como libros de texto de laboratorio.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen una amplia variedad de células hospedadoras procariotas y eucariotas. Por ejemplo, los péptidos de la invención se pueden expresar en las células bacterianas tales como *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, células de insecto (mediante *baculovirus*), células de levadura o células de mamífero. Se pueden encontrar otras células hospedadoras adecuadas en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185*, Academic Press, San Diego, Calif. (1991).

Como ejemplo, para producir péptidos de manera recombinante, por ejemplo, se puede utilizar *E. coli* con el sistema ARN polimerasa/promotor de T7 que utiliza dos plásmidos o mediante la marcación de las proteínas codificadas por el plásmido, o mediante la expresión por infección con el fago M13 mGPI-2. También se pueden utilizar vectores de *E. coli* con secuencias reguladoras del fago  $\lambda$ , mediante vectores con proteína de fusión (p. ej., lacZ y trpE), mediante fusiones a proteínas de fijación a la maltosa y mediante proteínas de fusión a la glutatión-S-transferasa.

Alternativamente, se puede expresar un péptido en las células de insecto mediante vectores de baculovirus, o en células de mamífero mediante virus de la variolovacuna. Para la expresión en las células de mamífero, la secuencia del ADNc se puede ligar a promotores heterólogos e introducirla en las células, tales como las células COS, para conseguir la expresión transitoria o a largo plazo. La integración estable de la construcción quimérica del gen se puede mantener en las células de mamífero mediante la selección bioquímica, tales como neomicina y ácido micofenólico.

La secuencia del ADN se puede alterar con procedimientos tales como la digestión con enzimas de restricción, el rellenado con ADN polimerasa, la delección con exonucleasas, la extensión mediante la desoxinucleótido transferasa terminal, la ligación de secuencias de ADN sintéticas o clonadas, la alteración de la secuencia específica de sitio con el uso de oligonucleótidos específicos junto con la PCR. Por ejemplo, se pueden retirar o mutar de uno a cinco o de cinco a diez aminoácidos o más.

La secuencia del ADN o porciones del mismo, o un mini gen que consiste en un ADN con un intrón y su propio promotor, se introduce en los vectores de expresión eucariotas mediante las técnicas convencionales. Estos vectores permiten la transcripción del ADN en las células eucariotas al proporcionar secuencias reguladoras que inician y realizan la transcripción del ADN, y aseguran su ajuste y poliadenilación adecuados. También se puede utilizar el promotor del gen endógeno. Diferentes promotores dentro de los vectores tienen diferentes actividades que alteran el nivel de la expresión del ADNc. Además, algunos promotores también pueden modular el funcionamiento, tal como el promotor que responde a glucocorticoides a partir del virus del tumor de mama de ratón.

Algunos de los vectores enumerados contienen marcadores de selección o genes *neo* bacterianos que permiten el aislamiento de las células por selección química. Los vectores se pueden mantener estables a largo plazo en las células como entidades episómicas que se replican libremente mediante los elementos reguladores de virus. También se pueden producir líneas celulares que tienen integrado el vector en el ADN genómico. De esta manera, el producto génico se produce de manera continua.

Los vectores se introducen en las células destinatarias por diferentes procedimientos, entre ellos el fosfato de calcio, el fosfato de estroncio, la electroporación, la lipofección, el DEAE-dextrano, la microinyección o mediante la fusión de protoplastos. Otra alternativa es que el ADNc se puede introducir mediante la infección con vectores víricos.

5 Los péptidos de la invención se aíslan con facilidad a partir de células o tejidos, entre ellos las células o tejidos de mamífero, en los que el péptido se expresa.

El péptido se purifica con facilidad mediante procedimientos de purificación convencionales conocidos por los expertos en la técnica, tales como procedimientos de cromatografía, procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución o precipitación.

10 Por ejemplo, un anticuerpo antipéptido (como se describe en la presente memoria) se utiliza con facilidad para aislar un péptido que luego se purifica mediante procedimientos estándares.

Los péptidos aislados de la invención también se preparan con facilidad mediante síntesis química con las técnicas bien conocidas en la química de las proteínas, tales como la síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964, *J. Am. Chem. Assoc.* 85: 2149-2154) o la síntesis en solución homogénea (Houbenwely, 1987, *Methods of Organic Chemistry*, de. E. Wansch, vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart).

## 15 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la invención y no limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Separación de la secuencia de aminoácidos del inhibidor del canal de calcio de la soricidina

20 Se sintetizaron las secuencias de aminoácidos de la región del extremo carboxilo de la soricidina. Estos segmentos se han denominado SorC13 (que tiene una secuencia idéntica a la de los 13 aminoácidos del extremo carboxilo de la soricidina) y SorC27 (que tiene una secuencia idéntica a la de los 27 aminoácidos del extremo carboxilo de la soricidina). La secuencia aminoacídica de SorC13 y SorC27, así como algunas de sus propiedades físicas y fisiológicas, se describen en la tabla 1. Las semividas de SorC13 y SorC27 (tal y como se muestra en el ejemplo 22) eran menores que la semivida de Sor54.

Tabla 1: Resumen de la comparación de SorC54, SorC27 y SorC13

Propiedad	SorC54	SorC27	SorC13
N.º de aminoácidos	54	27	13
Masa molecular	5806 (3 puentes disulfuro)	2957 (ningún puente disulfuro)	1566 (ningún puente disulfuro)
Secuencia	N.º de acceso del NCBI P0C2C6	EGKLSSNDTEGGLCKEF LHPSKVDLPR (SEQ ID n.º 1)	KEFLHPSKVDLPR
pI	4,3 (medido)	-5,6 (calculado)	-8,3 (calculado)
Aspecto físico	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco
Solubilidad (acuosa)	< 20 mg/ml	> 200 mg/ml	> 200 mg/ml
Pureza	≥ 95%	≥ 95%	≥ 95%
Estabilidad en solución acuosa a 20 °C	Estable	Muy estable	Muy estable
Estabilidad del sólido a 20 °C	Estable	Muy estable	Muy estable
Estabilidad del sólido a temperatura ambiente	Inestable	Muy estable	Muy estable

Propiedad	SorC54	SorC27	SorC13
Límite de detección por HPLC directa	~200 ng	~200 ng	~200 ng
Fisiología			
Vía de eliminación en los ratones con i.v. de 5 mg/kg	Por determinar	Rápida por el riñón	Rápida por el riñón
Diana celular	Canales ionótopos de sodio y TRPV6	TRPV6	TRPV6
Efectos fisiológicos <i>in vivo</i> (gusano de la harina); 5 mg/kg	paralizante	No paralizante	No paralizante
Efectos fisiológicos <i>in vivo</i> (ratones) a 5 mg/kg	No ensayado	No se observa ninguno durante 72 horas	Pico de TA del 15% a los 15 min, se estabiliza en 1 h, ningún efecto observado en 72 h
Semivida en plasma de rata	> 30 h; se fija a las proteínas plasmáticas	21 min; no se fija a las proteínas plasmáticas	58 min; no se fija a las proteínas plasmáticas
Semivida en plasma humano	> 30 h; se fija a las proteínas plasmáticas	20 min; no se fija a las proteínas plasmáticas	56,6 min; no se fija a las proteínas plasmáticas
Dosis máxima tolerada en los ratones CD-1 mediante una dosis única i.v., con dosis de 10, 100 y 500 mg/kg	No ensayado	Ningún efecto tóxico	Ningún efecto tóxico
Repetición de la dosis en los ratones NOD/SCID a 400 mg/g, inyección i.p. diaria durante 12 días	No ensayado	Sin pérdida de masa corporal en comparación con los controles, no se observan efectos tóxicos	Sin pérdida de masa corporal en comparación con los controles, no se observan efectos tóxicos

«Muy estable» en la tabla anterior significa que no hubo ninguna degradación observable de los péptidos sólidos durante 6 meses. Como solución en agua estéril, los péptidos son típicamente estables durante al menos 3 semanas a 8 °C y a -20 °C se espera que sean estables durante más de 1 año.

- 5 SorC27 y SorC13 no muestran actividad paralizante. Para demostrarlo, se utilizó el bioensayo paralizante del gusano de la harina descrito anteriormente (patente de los EE. UU. n.º 7.119.168). Los animales de una colonia de gusanos de la harina se seleccionaron arbitrariamente y se colocaron en grupos (tratamiento y control). Se pesaron los animales para permitir el cálculo de las dosis equivalentes. El tratamiento fue con SorC13 o bien SorC27 disuelto en una solución de Ringer tamponada para insecto. El control de inyección era de un volumen equivalente de la solución de Ringer para insecto (NaCl, 10,40 g; KCl, 0,32 g; CaCl<sub>2</sub>, 0,48 g; NaHCO<sub>3</sub>, 0,32 g; disueltos en 1 l de agua estéril de Millipore, pH 7,4). Las formulaciones peptídicas eran: soluciones de SorC27, preparadas a 1,0 mg/100 µl de la solución de Ringer para insecto (10 µg/µl, 3,4 µM, MM = 2957); y SorC13, preparado a 0,5 mg/100 µl (5 µg/µl, 3,4 µM, MM = 1566). Las dosis eran de 50 µg de SorC27 por 100 mg de la masa animal y de 25 µg de SorC13 por 100 mg de masa animal. Las soluciones peptídicas y la disolución salina de control se inyectaron dorsalmente en el cuarto segmento desde la cabeza, justo bajo el tegumento. A los animales se les pellizó la cola con suavidad con fórceps para desencadenar la reacción del reflejo de escape y se puntuaron por el tiempo para el efecto, la duración del efecto y la intensidad del efecto. Ninguno de los animales tratados con SorC13 o SorC27 mostraron ningún efecto destacable, mientras que los animales tratados con soricidina mostraron una parálisis profunda.

La tabla 2 muestra la comparación del número de larvas paralizadas mediante la inyección de los péptidos C en

comparación con la soricidina y la inyección de disolución salina de control. El péptido de la musaraña (soricidina) es profundamente paralizante en el modelo de gusano de la harina. Cuando los péptidos SorC27 y SorC13 se inyectaron en las larvas a dosis molares equivalentes (20 nmol/100 mg de larva), no hubo indicios de parálisis.

5 Tabla 2. Comparación de la actividad paralizante de la soricidina de musaraña con respecto a SorC13 y SorC27 procedentes de ella. A los animales se les dosificaron 20 nmol/100 mg de masa.

Tiempo (min)	Control (disolución salina)	Soricidina	SorC13	SorC27
0	0/4	4/4	0/4	0/4
2	0/4	4/4	0/4	0/4
30	0/4	4/4	0/4	0/4

Ejemplo 2: SorC13 y SorC27 inhiben fuertemente la captación de iones de calcio a través del potencial receptor transitorio (por vainilloides) seis (TRPV6)

10 Un vector de expresión (pCAGS-IRES-hTRPV6b) (Bodding et al., 2003) que contiene el código nucleotídico para el TRPV6b humano se transfectó en células de cáncer de próstata recogidas de ganglio linfático (LnCaP, ATCC CRL-1740) y se expresó en ellas. El pinzamiento zonal con medida de corriente de toda la célula se utilizó para medir la corriente de calcio a través de este canal. Se trataron las células y la corriente operada por la reserva de calcio ( $I_{SOC}$ ) se midió con SorC13 (n = 90) o bien con SorC27 (n = 30) en una perfusión de circuito cerrado durante 3 min en cada concentración acumulada de 0 (basal), 100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. La perfusión de lavado se hizo a 2 ml/min durante 3 min. El control positivo utilizado era MRS-1845, un inhibidor del canal operado por reserva (SOC) conocido (N-propargilnitrendipeno; disponible de Sigma Aldrich) a 5  $\mu$ M y, en este sistema, demostró la inhibición de la corriente de calcio. En la figura 1 se muestra un resumen de los efectos de SorC13 y SorC27. Está claro que ambos péptidos C inhibieron fuertemente el flujo de calcio a través del canal de TRPV6. El ajuste de los datos a una función hiperbólica permitió calcular la concentración que proporciona un 50% de inhibición de SOC, para SorC13 ( $I_{SOC-50} = 0,10 \mu$ M) y SorC27 ( $I_{SOC-50} = 0,14 \mu$ M). Además, ambos péptidos C inhiben con mucha fuerza la corriente de calcio a través del canal de TRPV6, con unas constantes de inhibición en el intervalo de 100 nM.

Ejemplo 3: SorC13 y SorC27 inducen la apoptosis en las líneas celulares humanas de cáncer de mama y de cáncer de ovario, en particular en las líneas celulares de cáncer con TRPV6

25 Los péptidos de la invención son útiles para inducir la apoptosis en las células *in vitro* e *in vivo*, en particular en las células cancerosas, tales como las líneas celulares recogidas en la tabla 3. Las líneas celulares utilizadas de modelo para el cáncer de mama humano y el cáncer de ovario humano se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se hicieron crecer en las condiciones recomendadas y en los medios de cultivo recomendados por la ATCC.

Cultivo de líneas celulares de cáncer

30 Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%. Los medios de cultivo utilizados se recogen a continuación para cada línea celular:

T 47D se cultivó en el medio RPMI (Sigma-Aldrich) modificado con suero bovino fetal al 15%, L-glutamina a 2 mM, piruvato de sodio a 1 mM, insulina bovina a 0,1 mg/ml y una mezcla de penicilina más estreptomomicina (a 50  $\mu$ g/ml cada uno).

35 MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-415, MDA-MB-468 se hicieron crecer en DMEM modificado con suero bovino fetal al 10% (v/v), L-glutamina a 2 mM, y estreptomomicina y penicilina a 50  $\mu$ g/ml cada uno.

MCF-10A, MCF-12A se cultivaron en DMEM al 50% más F12 de Ham al 50% modificado con L-glutamina a 2 mM, piruvato de sodio a 1 mM, insulina bovina a 0,1 mg/ml, hidrocortisona a 500 ng/ml, y 50  $\mu$ g/ml de penicilina y estreptomomicina. El medio combinado se complementó con suero bovino fetal al 5% (v/v).

40 OVCAR-3 se cultivó en el medio RPMI 1640 complementado con piruvato de sodio a 1,0 mM, insulina a 0,01 mg/ml y suero bovino fetal al 10% (v/v).

SKOV-3 se cultivó en el medio de McCoy %A complementado con L-glutamina a 1,5 mM, bicarbonato de sodio a 2,2 g/l y suero bovino fetal al 10% (v/v).

## ES 2 530 091 T3

CAOV-3 se cultivó en medio de Eagle modificado de Dulbecco (glucosa a 4,5 g/l) con L-glutamina a 4 mM, bicarbonato de sodio a 1,5 g/l y suero bovino fetal al 10% (v/v).

OV-90 se cultivó en una mezcla 1:1 de medio MCDB 105 y medio 199 complementado con suero bovino fetal al 15% (v/v).

- 5 HeyC2 se cultivó en el medio RPMI 1640 complementado con piruvato de sodio a 1,0 mM, insulina a 0,01 mg/ml y suero bovino fetal al 10% (v/v).

Tabla 3: Lista de líneas celulares de cáncer de ovario y de cáncer de mama humanos en las que se analizó la inducción de la apoptosis mediante SorC13 y/o SorC27.

Línea celular	Número de ATCC	Descripción
<i>Líneas de cáncer de mama humano</i>		
MCF 7	HTB-22	Adenocarcinoma epitelial no invasivo de la glándula mamaria
MDA-MB-231	HTB-26	Adenocarcinoma epitelial mamario invasivo
MDA-MB-415	HTB-128	Adenocarcinoma de la glándula mamaria humana
MDA-MB-468	HTB-132	Adenocarcinoma de la glándula mamaria humana
T 47D	HTP-133	Carcinoma canalicular de la glándula mamaria humana
<i>Líneas celulares no cancerosas de mama humana</i>		
MCF-10A	CRL-10317	Epitelio no neoplásico de la glándula mamaria
MCF-12A	CRL-10782	Epitelio de la glándula mamaria humana, inmortalización espontánea
<i>Líneas celulares del cáncer de ovario humano</i>		
CaOV-3	HTB-75	Adenocarcinoma de ovario humano
OVCAR-3	HTB-161	Adenocarcinoma epitelial de ovario humano
OV-90	CRL-11732	Adenocarcinoma seroso papilar maligno de ovario humano
SKOV-3	HTB-77	Adenocarcinoma de ovario humano
HEY C-2		Cáncer epitelial de ovario humano

- 10 A las líneas MCF-7, MDA-MB-468, MCF-10A, MCF-12A y OVCAR-3 se les analizó la inducción de la apoptosis con SorC13 y con SorC27. A las líneas T 47D y CaOV-3 se les analizó la inducción de la apoptosis con SorC13. A las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-415 se les analizó la inducción de la apoptosis con SorC27. Las otras líneas celulares se analizaron con SorC13 y SorC27 con una metodología similar para demostrar que los péptidos C inducen la apoptosis.

Seguimiento de la inducción de la apoptosis y la viabilidad celular

Los niveles de inducción apoptótica y la viabilidad celular se determinaron multiplexando las mediciones para muestras únicas. Los sistemas de ensayo de Promega CellTiter Blue y APO-ONE permiten la determinación de la viabilidad celular correlacionada con el número de células, y la inducción de la apoptosis. Este protocolo utiliza un péptido fluorógeno que contiene una secuencia peptídica de reconocimiento para la caspasa 3 y para la caspasa 7, lo que inicia las enzimas proteolíticas de la cascada de la apoptosis. El reactivo CellTiter Blue se añadió a los pocillos en una placa de 96 pocillos que contenía las células a analizar, inmediatamente después de añadir la solución peptídica o el vehículo. El día anterior se sembraron en los pocillos aproximadamente 5000 células. En el momento elegido (día 1, día 2, etc.), la fluorescencia se midió a 590 nm (emisión) tras la excitación a 560 nm. Se midió la actividad de las caspasas 3 y 7 (excitación a 485 nm/emisión a 527 nm) en los mismos pocillos tras añadir 120 µl del reactivo Apo-ONE, lisar por congelación a -80 °C durante 1 h e incubación durante 1 h a temperatura ambiente.

Para este trabajo, las concentraciones de SorC13 y SorC27 utilizadas fueron 0 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM. Los experimentos abarcaron un periodo de tiempo de 5 a 7 días. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado y se utilizaron para corregir las mediciones de prueba tanto un blanco (sin células) como un control (vehículo, sin péptido). Los datos de respuesta en función del tiempo y de respuesta en función de la dosis se representaron en un gráfico como medias ± el error estándar de la media. Todas las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba de la t de Student o mediante análisis ANOVA durante el transcurso de la dosis. El nivel de significación estadística se consideró que era el intervalo de confianza del 95% (a saber,  $P \leq 0,05$ ).

En la viabilidad celular se observó la inducción de la apoptosis y la disminución que la acompaña en las líneas celulares del cáncer de mama y de cáncer de ovario. Los efectos de SorC27 en una línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3) y de cáncer de mama (MCF 7) se muestran en la figura 2. De igual forma, el efecto de SorC13 sobre las líneas celulares de cáncer de ovario y de cáncer de mama se muestra en la figura 3. A partir del gran incremento de actividad de las caspasas 3 y 7, está claro que en la inducción de la apoptosis hay un efecto dependiente del tiempo y un efecto dependiente de la dosis.

La observación de los efectos de SorC13 sobre las líneas celulares de cáncer de mama se resumen en la tabla 4 y muestran que:

- SorC13 indujo la apoptosis y disminuyó la viabilidad celular en tres de las cuatro líneas celulares cancerosas con un valor estadísticamente significativo.
- SorC13 indujo la apoptosis en T 47D (tabla 4, figura 3B) con un valor estadísticamente significativo.
- SorC13 no indujo la apoptosis en los dos controles de líneas celulares no cancerosas (MCA-10A y MCA-12A).

La observación de estos efectos de SorC13 sobre las líneas celulares del cáncer de ovario se resumen en la tabla 5 y muestran que:

- El tratamiento de 3 líneas celulares del cáncer de ovario indujo la cascada apoptótica significativamente por encima del control 'sin tratamiento' (positivo: CaOV3, OVCAR3, SKOV3).

Tabla 4: El efecto de SorC13 sobre la inducción de la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama humano. En la tabla se muestra un índice apoptótico (IA = respuesta al tratamiento/respuesta al control; IA = 1 cuando no hay efecto). También se muestra una indicación de si la viabilidad celular disminuyó (+) o no (-). Se incluyeron dos líneas celulares no cancerosas de mama para la comparación (MCF 10A y 12A).

Línea celular de cáncer de mama	Concentración de SorC13 (µM)	Índice apoptótico (1 = ningún efecto)	Significación estadística	Descenso de la viabilidad celular
MB 468	1	2,7	P < 0,05	+
	10	3,3	P < 0,05	+
	100	2,7	P < 0,05	+
T 47D	1	2,0	P < 0,05	+



Línea celular de cáncer de mama	Concentración de SorC13 (µM)	Índice apoptótico (1 = ningún efecto)	Significación estadística	Descenso de la viabilidad celular
	10	2,8	P < 0,05	+
	100	4,3	P < 0,05	+
MCF 7	1	1,2	P > 0,05	-
	10	1,1	P > 0,05	-
	100	2,4	P < 0,001	+
MCF 10A	100	1,0	-	-
MCF 12A	100	1,0	-	-

Tabla 5: El efecto de SorC13 sobre la inducción de la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de ovario humano. En la tabla se muestra un índice apoptótico (IA = respuesta al tratamiento/respuesta al control; IA = 1 cuando no hay efecto). También se muestra una indicación de si la viabilidad celular disminuyó (+) o no (-).

Línea celular de cáncer de ovario	Concentración de SorC13 (µM)	Índice apoptótico (1 = ningún efecto)	Significación estadística	Disminución de la viabilidad celular
CaOV3				
Día 5	100	2,7	P < 0,05	+
OVCAR3				
Día 4	100	1,4	P > 0,05	
Día 5	100	1,7	P < 0,05	+
SKOV3				
Día 4	100	2,2	P > 0,05	
Día 5	100	2,7	P < 0,05	+

5

La observación de los efectos de SorC27 sobre las líneas celulares de cáncer de mama se resumen en la tabla 6 y muestran que:

- 4 líneas celulares cancerosas de cáncer de mama tratadas con SorC27 mostraron una respuesta apoptótica significativa en respuesta a la exposición a SorC27 (positivo: MB 416, MB 468, MB 231, MCF 7).
- Las líneas celulares no cancerosas de mama (MCA 10A y MCA 12A) no se veían afectadas por SorC27.

Las observaciones de los efectos de SorC27 sobre las líneas celulares de cáncer de ovario se resumen en la tabla 7 y muestran que:

- 4 líneas celulares de cáncer de ovario (OV90, OVCAR3, SKOV3, HEYC2) indujeron la apoptosis después del tratamiento con SorC27. Los efectos oscilaban de 1,9 veces a 6,3 veces mayores que la condición de control sin ningún tratamiento.

10 Tabla 6: El efecto de SorC27 en una serie de líneas celulares de cáncer de mama humano. La tabla muestra un índice apoptótico (IA = respuesta al tratamiento/respuesta al control; IA = 1 cuando no hay efecto). También se muestra una indicación de si la viabilidad celular disminuyó (+) o no (-). Se incluyen dos líneas celulares de mama no cancerosas para la comparación (MCF 10A y 12A).

Línea celular de adenocarcinoma de mama	Concentración de SorC27 (µM)	Índice apoptótico (1 = ningún efecto)	Significación estadística	Disminución de la viabilidad celular
MB 231				+
Día 3	10	1,5	P < 0,05	
	100	1,7	P < 0,01	
MCF 7				+
Día 2	10	1,0	P > 0,05	
	100	2,8	P < 0,001	
Día 3	10	2,9	P < 0,05	
	100	4,6	P < 0,001	
MB 415	10	1,3	P < 0,05	+
	100	1,5	P < 0,01	
MB 468				+
Día 3	10	1,1	P = 0,07	
	100	1,2	P < 0,01	
MCF 10A	100	1,0	-	-
MCF 12A	100	1,0	-	-

15 Tabla 7: El efecto de SorC27 en una serie de líneas celulares del cáncer de ovario humano. La tabla muestra un índice apoptótico (IA = respuesta al tratamiento/respuesta al control; IA = 1 cuando no hay efecto). También se muestra una indicación de si la viabilidad celular disminuyó (+) o no (-).

Línea celular de cáncer de ovario	de	Concentración de SorC27 ( $\mu\text{M}$ )	de	Índice apoptótico (1 = ningún efecto)	Significación estadística	Disminución de la viabilidad celular
HEY C2						+
Día 6		100 $\mu\text{M}$		1,4	P < 0,05	
Día 7		10 $\mu\text{M}$		2,2	P < 0,05	
		100 $\mu\text{M}$		2,8	P < 0,05	
OV90						+
Día 2		100 $\mu\text{M}$		1,8	P = 0,003	
Día 3		1 $\mu\text{M}$		1,2	P = 0,026	
		10 $\mu\text{M}$		1,9	P = 0,001	
		100 $\mu\text{M}$		1,9	P = 0,001	
OVCAR3						+
Día 3		10 $\mu\text{M}$		2,2	P = 0,0026	
		100 $\mu\text{M}$		2,2	P = 0,003	
Día 5		10 $\mu\text{M}$		4,1	P < 0,0001	
		100 $\mu\text{M}$		6,3	P < 0,0001	
SKOV3						+
Día 2		10 $\mu\text{M}$		2,7	P = 0,0008	
		100 $\mu\text{M}$		1,5	P = 0,09	
Día 3		1 $\mu\text{M}$		1,7	P = 0,0012	
		10 $\mu\text{M}$		2,4	P < 0,0001	
		100 $\mu\text{M}$		2,7	P < 0,0001	

Ejemplo 4: Análisis de SorC13 y SorC27 frente al paclitaxel a la hora de inducir la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama humano metastásico

- 5 Para evaluar el efecto de los dos péptidos de tipo C por comparación con el tratamiento de referencia utilizado actualmente contra el cáncer de mama (paclitaxel), se compararon SorC13, SorC27 y paclitaxel (10  $\mu\text{M}$ ). Los ensayos APO-ONE (Promega) y el CellTiter Blue se utilizaron con el panel de líneas celulares de cáncer de mama. Se compararon los datos directamente en términos de respuesta media y se analizaron en busca de una diferencia significativa.
- 10 Las líneas celulares utilizadas fueron T 47D y MCF7, que se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se hicieron crecer en las condiciones recomendadas y en los medios de cultivo recomendados por la

ATCC. Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%, con el medio de cultivo que se comentó anteriormente.

Los péptidos de SorC tenían un profundo efecto cuando se compararon con el paclitaxel. Tal y como se ilustra en la figura 4, SorC13 era, en todos los casos, más eficaz a la hora de inducir una respuesta apoptótica más rápida y más intensa y, tomando esto como referencia, más eficaz que el paclitaxel. SorC27 también era, en todos los casos, más eficaz a la hora de inducir una cascada apoptótica más rápida y más intensa que el paclitaxel. Debido a los hallazgos recientes de que el flujo del calcio a través de TRPV6 puede iniciar una respuesta antiapoptótica en las células cancerosas, lo que se comunica a través del circuito del factor de transcripción NFAT (Lehen'kyi et al., 2007) y que la reducción de la cantidad de TRPV6 en la línea celular del cáncer de mama T 47D realza el efecto del tamoxifeno, un taxol (Bolanz et al., 2008), el cotratamiento de alguno de los péptidos C (o una combinación de ellos) con cualquiera de los taxoles daría lugar a una potenciación del tratamiento contra el cáncer.

En la figura 4 se ilustra la comparación de SorC13 y el paclitaxel en la línea celular del cáncer de mama humano T 47D y la comparación de SorC27 y paclitaxel en la línea celular del cáncer de mama humano MCF7. La apoptosis se indujo con más rapidez mediante los péptidos SorC en estas dos líneas celulares, y la cascada apoptótica era más intensa. En MB 468 y MB231 se observaron efectos similares de un inicio más precoz y más intenso de la cascada apoptótica mediante los dos péptidos SorC.

Ejemplo 5: Análisis de SorC13 y SorC27 con paclitaxel a la hora de realzar la inducción de la apoptosis en las líneas celulares del cáncer de mama humano metastásico

Para evaluar el efecto de ambos péptidos de tipo C por comparación con un tratamiento de referencia actualmente utilizado contra el cáncer de mama (paclitaxel), las combinaciones de SorC13 (10 y 100 µM), SorC27 (10 y 100 µM) y paclitaxel (10 µM) se comparan en las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 (de la ATCC HTB-22 y T 47D (de la ATCC HTB-133). Las líneas celulares se preparan conforme a los procedimientos de la ATCC. Tanto el ensayo APO-ONE (Promega) como el CellTiter Blue se utilizan con el panel de líneas celulares de cáncer de mama. Los grupos de tratamiento son como sigue:

(n = 8 por tratamiento)

- 1) Sin tratamiento (control)
- 2) Tratar con paclitaxel (10 µM)
- 3) Tratar con 2 dosis de SorC13 (10, 100 µM)
- 4) Tratar con 2 dosis de SorC27 (10, 100 µM)
- 5) Tratar con una dosis única de paclitaxel (10 µM) y 2 dosis de SorC13 (10, 100 µM)
- 6) Tratar con una dosis única de paclitaxel (10 µM) y 2 dosis de SorC27 (10, 100 µM)

Los datos se comparan directamente en términos de respuesta media y se analizan en busca de una diferencia significativa.

La politerapia de SorC27 o SorC13 con el paclitaxel tiene un mayor efecto de inducción de la apoptosis en las líneas celulares del cáncer de mama que cualquiera de los tratamientos monoterápicos. Estos resultados se miden como un índice apoptótico (IA = respuesta al tratamiento/respuesta al control; IA = 1 cuando no hay ningún efecto) y se determina si la viabilidad celular disminuyó (+) o no (-).

Ejemplo 6: Análisis de SorC13 y SorC27 frente al cóctel de paclitaxel/carboplatino a la hora de inducir la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de ovario humano

Para comparar el efecto de los dos péptidos de SorC frente al tratamiento de referencia para los cánceres de ovario, se comparó SorC13 o SorC27 con el tratamiento mediante un cóctel de carboplatino y taxol (CAT) (paclitaxel a 10 µM, carboplatino a 20 nM) con el ensayo APO-ONE, que mide las actividades combinadas de la caspasa 3 y la caspasa 7. Debido al tratamiento mixto (CAT), los efectos se compararon en términos de la proporción de tratamiento:control. Si no se notaba ningún efecto, entonces la proporción era igual a 1. Las comparaciones de las proporciones tratamiento:control se examinaron con la prueba de la *t* de Student con un intervalo de confianza del 95%. Las proporciones más grandes que un valor de unidad indicaban un efecto positivo. Los efectos se ilustran en la figura 5. En la figura 6 se presenta un efecto de concentración de SorC27 en una de las líneas celulares de ovario. Estas figuras ilustran que:

- SorC27 (10 µM y 100 µM) provocó la apoptosis más temprana y con más intensidad que el cóctel CAT en las SKOV3 y OVCAR3, y era similar al CAT en CaOV3 y OV90.

- SorC13 produjo una cascada apoptósica más precoz y más intensa que el cóctel CAT para SKOV3, CaOV3, OVCa3 y OV90.

Ejemplo 7: Análisis de SorC13 o SorC27 con el cóctel paclitaxel/carboplatino a la hora de realzar la inducción de la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de ovario humano metastásico

- 5 Para comparar el efecto de los dos péptidos C frente al tratamiento de referencia para los cánceres de ovario, se comparan SorC13 y SorC27 con el tratamiento mediante un cóctel de carboplatino y taxol (CAT) (paclitaxel a 10  $\mu$ M, carboplatino a 20  $\mu$ M) con el ensayo APO-ONE. Se utilizan y preparan según los procedimientos de la ATCC dos líneas celulares de tumor de adenocarcinoma de ovario humano, SKOV3 (de la ATCC HTB-77) y NIH:OVCAR-3 (de ATCC HTB-161). Debido al tratamiento mixto (CAT), los efectos se comparan en términos de la proporción de tratamiento:control. Si no se nota ningún efecto, entonces la proporción es igual a 1. Se examinan las comparaciones de las proporciones tratamiento:control. Las proporciones por encima de uno indican un efecto positivo. Los grupos de tratamiento son los siguientes:

(n = 8 por tratamiento)

- 1) Sin tratamiento (control)
  - 15 2) Tratar con paclitaxel (10  $\mu$ M)
  - 3) Tratar con 2 dosis de SorC13 (10, 100  $\mu$ M)
  - 4) Tratar con 2 dosis de SorC27 (10, 100  $\mu$ M)
  - 5) Tratar con una dosis única de paclitaxel (10  $\mu$ M) y 2 dosis de SorC13 (10, 100  $\mu$ M)
  - 6) Tratar con una dosis única de paclitaxel (10  $\mu$ M) y 2 dosis de SorC27 (10, 100  $\mu$ M)
- 20 Los datos se comparan directamente en términos de respuesta media. Los efectos de la combinación de SorC27 + paclitaxel y de SorC13 + paclitaxel en una de las líneas celulares de ovario muestran que:
- SorC27 (10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) en politerapia con el cóctel CAT potencia la apoptosis más pronto y con más intensidad que cualquier tratamiento monoterápico en las líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 y NIH:OVCAR-3.
  - 25 • SorC13 (10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) en politerapia con el cóctel CAT potencia la apoptosis más pronto y con más intensidad que cualquier tratamiento monoterápico en las líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 y NIH:OVCAR-3.

Estos resultados se miden como un índice apoptósico (IA = respuesta al tratamiento/respuesta al control; AI = 1 cuando no hay efecto) y determinando si la viabilidad celular disminuye (+) o no (-).

- 30 Ejemplo 8: Distribución tisular de SorC13 y SorC27

SorC13 y SorC27 se marcaron con la sonda del infrarrojo cercano Cy5.5. SorC13 se marcó en la lisina 1 y en la lisina 8 con la sonda fluorescente infrarroja cy5.5 a través de la reacción con el procedimiento activado por éster de NHS de Cy5.5. SorC27 se marcó en su único tiol de cisteína con la reacción activada por maleamida de Cy5.5. Los péptidos marcados se purificaron con una combinación de cromatografía de exclusión por tamaños y HPLC. La marcación, Cy5.5, emite fluorescencia en la región infrarroja tras la excitación con un láser de barrido. El láser de energía baja es capaz de penetrar en el animal hasta aproximadamente 1 cm y de esta forma, mediante el barrido en las posiciones prono y supina, la presencia de los péptidos etiquetados se puede cuantificar en tres dimensiones.

- Los péptidos marcados con Cy5.5 se inyectaron por vía intravenosa en los ratones CD1 (4 para cada compuesto) a 100  $\mu$ g por animal en 100  $\mu$ l, y los animales se radiografiaron vivos con un sistema óptico de toma de imágenes, Optix eXplorer (GE Healthcare Systems) en diferentes puntos del tiempo (30 min, 90 min, 4 h). Se observaron algunos animales a las 24 horas después de la perfusión para retirar la sangre (y la linfa). La biodistribución de los péptidos marcados en diferentes órganos y tejidos se visualizaron y se cuantificaron relativamente mediante análisis con toma de imágenes ópticas. Este protocolo permite visualizar la localización de los péptidos marcados y cómo la localización cambia con el tiempo. En la figura 7 se muestra la localización de los ganglios linfáticos en el ratón. Los ganglios que acumulaban los péptidos marcados se señalan mediante la línea 1 (ganglios cervicales superficiales), la línea 4 (ganglios axilares), la línea 5 (ganglios branquiales), la línea 8 (ganglios mesentéricos) y la línea 9 (ganglios inguinales). En las figuras 8, 9 y 10 se muestran la cantidad de péptidos marcados en diferentes órganos *ex vivo*. El conjunto, estos experimentos demuestran que:

- Ninguno de los péptidos C atravesó la barrera hematoencefálica

- SorC13 y SorC27 marcados se localizan predominantemente en los ganglios linfáticos, pulmón, hígado y riñón.
  - SorC13 y SorC27 marcados seguían siendo detectables en estos tejidos después de la perfusión a las 24 horas.
- 5 • La medición de la vida útil de la fluorescencia en los diferentes órganos mostró que el metabolismo de los péptidos marcados aparece en el hígado y el riñón, ya que Cy5.5 tiene una vida útil más corta que los aductos péptido/Cy5.5.

Ejemplo 9: SorC13 y SorC27 inducen la apoptosis en las células tumorales del carcinoma de pulmón no microcítico humano (NSCLC, por su nombre en inglés)

- 10 Se estudian los efectos de los péptidos C sobre las células de carcinoma de pulmón humano. Los datos de distribución por tejidos descritos anteriormente indicaban que los péptidos C se acumulan en el pulmón y se localizan en los ganglios linfáticos. Se llevan a cabo estudios *in vitro* que emplean SorC13 y SorC27 en las líneas celulares procedentes de los ganglios linfáticos metastásicos para determinar su efecto sobre las líneas celulares del carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) humano H1437 (de la ATCC CRL-5872) y H2087 (de la ATCC CRL-5922).
- 15 5922). Ambas líneas celulares son adenocarcinomas procedentes del sitio metastásico (ganglio linfático) y del cáncer de pulmón NSCLC de estadio 1. Los ganglios linfáticos principales de interés que se tratan útilmente con los péptidos de la invención incluyen los ganglios cervicales superficiales, los ganglios axilares, los ganglios branquiales, los ganglios mesentéricos y los ganglios inguinales.

- 20 Para el estudio, las líneas celulares se hacen crecer en las condiciones recomendadas y en el medio de cultivo recomendado por la ATCC. Las líneas celulares se cultivan en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

Tanto el ensayo APO-ONE como el CellTiter Blue (Promega) se utilizan en las líneas celulares para evaluar la apoptosis y la viabilidad celular, respectivamente. Los grupos de tratamiento son los siguientes:

- 1) Sin tratamiento
- 25 2) Tratar con 2 dosis de SorC13 (10 y 100 µM)
- 3) Tratar con 2 dosis de SorC27 (10 y 100 µM)

Los datos se comparan directamente en términos de respuesta media. SorC27 y SorC13 inducen la apoptosis en las líneas de NSCLC metastásico humano.

Ejemplos 10-13: Los efectos de los péptidos C se evalúan en una serie de líneas celulares de cáncer humano

- 30 Se analizan *in vitro* los efectos del tratamiento con SorC13 y SorC27 en una serie de líneas celulares de cáncer. Como se describe más arriba, los péptidos C indujeron la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama y en las de cáncer de ovario. Los péptidos de C también son capaces de inducir la apoptosis y disminuir la viabilidad celular en otras células cancerosas *in vitro*. En los siguientes ejemplos 10-13 se valora la capacidad que tienen SorC13 y SorC27 para inducir la apoptosis en un conjunto seleccionado de líneas de cáncer humano. Incluyen: PC3,
- 35 leucemia mielógena crónica (LMC) humana, K-562, leucemia mielógena aguda (LMA) humana, MV-4-11, línea celular *Daudi* de linfoma de Burkitt.

- Para este trabajo, las concentraciones de SorC3 y SorC27 utilizadas son 0 µM, 10 µM y 100 µM. Los experimentos se extienden durante un periodo de 5 a 7 días. Todas las mediciones se realizan por cuadruplicado y para corregir las mediciones de prueba se utilizaron un blanco (sin células) y un control (vehículo, sin péptidos). Los datos de
- 40 respuesta en función del tiempo y los datos de respuesta en función de la dosis se representan gráficamente como medias ± el error estándar de la media.

Ejemplo 10: Los péptidos C inducen la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de próstata humano

- Las líneas celulares PC3 (de la ATCC CRL-1435) y el clon FGC de LnCaP (de la ATCC CRL-1740), se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se hicieron crecer en las condiciones recomendadas y en los
- 45 medios de cultivo recomendados por la ATCC. Las líneas celulares se cultivan en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

Se observa la inducción de la apoptosis y la disminución acompañante de la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer. A partir de los grandes incrementos de las actividades de las caspasas 3-7, está claro que la inducción de la apoptosis depende de un efecto dependiente del tiempo y de un efecto dependiente de la dosis.

- 50 Las observaciones de los efectos de SorC13 y SorC27 en la línea celular son:

- SorC27 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular;
- SorC13 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular.

Ejemplo 11: Los péptidos C inducen la apoptosis en las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano

5 La línea celular *Daudi* (de la ATCC CCL-213) se hace crecer en las condiciones recomendadas y en los medios de cultivo recomendados por la ATCC. Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

Se observa la inducción de la apoptosis y la disminución acompañante de la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer. A partir de los grandes incrementos de las actividades de las caspasas 3-7, está claro que la inducción de la apoptosis depende de un efecto dependiente del tiempo y de un efecto dependiente de la dosis.

10 Las observaciones de los efectos de SorC13 y SorC27 sobre la línea celular son:

- SorC27 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular.
- SorC13 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular.

Ejemplo 12: Los péptidos C inducen la apoptosis en la línea celular de la leucemia mielógena crónica (LMC) humana, K-562

15 La línea celular K-562 (de la ATCC CCL-243) se hace crecer en las condiciones recomendadas y en los medios de cultivo recomendados por la ATCC. Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

20 Se observa la inducción de la apoptosis y la disminución acompañante de la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer. A partir de los grandes incrementos de las actividades de las caspasas 3-7, está claro que la inducción de la apoptosis depende de un efecto dependiente del tiempo y de un efecto dependiente de la dosis.

Los efectos de SorC13 y SorC27 sobre la línea celular son:

- SorC27 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular;
- SorC13 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular.

25 Ejemplo 13: Los péptidos C inducen la apoptosis en la línea celular de leucemia mielógena aguda (LMA) humana, MV-4-11

La línea celular MV-4-11 (de la ATCC DRL-9591) se hace crecer en las condiciones recomendadas y en los medios de cultivo recomendados por la ATCC. Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estériles a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

30 Se observa la inducción de la apoptosis y la disminución acompañante de la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer. A partir de los grandes incrementos de las actividades de las caspasas 3-7, está claro que la inducción de la apoptosis depende de un efecto dependiente del tiempo y de un efecto dependiente de la dosis.

Las observaciones de los efectos de SorC13 y SorC27 sobre la línea celular son:

- SorC27 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular;
- SorC13 induce la apoptosis y disminuye la viabilidad celular.

35 Ejemplos 14-20: Los péptidos de SorC tienen actividad antitumoral *in vivo*

Los estudios *in vivo* (ejemplos 14-20) que emplean los péptidos C en un modelo de xenoinjerto se llevan a cabo para evaluar la respuesta al tratamiento que tienen los xenoinjertos de las líneas celulares de cáncer humano en un modelo de roedor (ratón). Los péptidos de SorC tienen actividad antitumoral *in vivo*.

40 Las líneas celulares utilizadas como modelo del cáncer de mama humano y del cáncer de ovario humano se obtienen de la American Type Culture Collection (ATCC), y se hacen crecer en las condiciones recomendadas y en los medios de cultivo recomendados por la ATCC. Los tipos celulares, el número de catálogo de la ATCC y la descripción de la línea celular se recogen en la tabla 8.

Tabla 8: Descripción de las líneas celulares de la ATCC

<p>NIH-OVCAR-3 (ATCC HTB-161)</p>	<p>La línea NIH:OVCAR-3 fue establecida en 1982 por T. C. Hamilton et al. a partir de ascitis malignas de una paciente con un adenocarcinoma de ovario progresivo.</p> <p>La línea celular es resistente a las concentraciones clínicamente relevantes de adriamicina, melfalán y cisplatino.</p> <p>Se han utilizado modelos de xenoinjerto para demostrar que el tratamiento con 17-<math>\beta</math>-estradiol induce los receptores de la progesterona en este carcinoma de ovario humano.</p> <p>NIH:OVCAR-3 es un sistema de modelo adecuado en el que estudiar la resistencia farmacológica en el cáncer de ovario, y la presencia de los receptores hormonales es útil para evaluar el tratamiento hormonal (de la ATCC HTB-161).</p> <p>El ARNm de TRPV6 se expresa (los genes <i>trpv6</i> están encendidos) en esta línea celular de ovario.</p>
<p>SKOV3 (ATCC HTB-77)</p>	<p>Las células SKOV3 de la ascitis maligna de una paciente con un adenocarcinoma de ovario progresivo.</p> <p>Esta línea celular es resistente al factor de la necrosis tumoral y a varios fármacos citotóxicos, entre ellos la toxina de la difteria, cisplatino y adriamicina (de la ATCC HTB-77).</p> <p>El ARNm de TRPV6 se expresa (los genes <i>trpv6</i> están encendidos) en esta línea celular de ovario.</p>
<p>Daudi: linfoma de Burkitt (ATCC CCL-213)</p>	<p>La línea Daudi la obtuvieron E. Klein y G. Klein en mayo de 1967 a partir de un varón de 16 años con linfoma de Burkitt.</p> <p>Las células no expresan la microglobulina <math>\beta 2</math>.</p> <p>Sí expresan EBNA, VCA e inmunoglobulina de superficie (slg+).</p> <p>Daudi es una línea celular de linfoblasto B bien caracterizada que se ha empleado extensivamente en los estudios de los mecanismos de la leucemio-genia (de la ATCC CCL-213).</p>
<p>Línea celular de la leucemia mielógena crónica (LMC) humana, K-562 (ATCC CCL-243)</p>	<p>La línea celular continua K-562 fue establecida por Lozzio y Lozzio a partir de la efusión pleural de una mujer de 53 años con leucemia mielógena crónica en crisis hemoblástica terminal [PubMed: 163658].</p> <p>Los estudios realizados por Anderson et al. sobre las propiedades de la superficie de la membrana mostraron que K-562 era una línea de eritroleucemia humana.</p> <p>La línea celular es oncógena en los ratones atímicos (los tumores se desarrollaron en menos de 21 días con una frecuencia del 100% (5/5) en los ratones atímicos inoculados por vía subcutánea con <math>10^7</math> células) (de la ATCC CCL-243).</p>
<p>Línea celular de la leucemia mielógena aguda (LMA) humana, MV-4-11 (ATCC CRL-9591)</p>	<p>La línea celular MV4-11 fue establecida por Rovera y colaboradores a partir de los blastocitos de un varón de 10 años con leucemia B-mielomonocítica bifenotípica.</p> <p>Esta línea se denominó primero ATCC HTB-189 (de la ATCC CRL-9591).</p>
<p>Clon FGC de LnCaP, cáncer de próstata humano (ATCC CRL-1740)</p>	<p>El clon FGC de LnCaP lo aislaron en 1977 J. S. Horoszewicz et al., a partir de una biopsia con aspiración con aguja del ganglio linfático supraclavicular izquierdo de un varón de raza blanca de 50 años (sangre de tipo B+) con diagnóstico confirmado de carcinoma de próstata metastásico.</p> <p>Se adhieren sólo ligeramente al sustrato, no se hacen confluentes y rápidamente acidifican el medio.</p> <p>El crecimiento es muy lento (de la ATCC CRL-1740).</p>



<p>Línea celular PC3 de adenocarcinoma de próstata humano (ATCC CRL-1435)</p>	<p>La PC-3 se inició a partir de una metástasis de hueso de un adenocarcinoma prostático de grado IV de un varón de raza blanca de 62 años.</p> <p>Los tumores se desarrollaron en menos de 21 días con una frecuencia del 100% (5/5) en los ratones atímicos inoculados por vía subcutánea con 10 (7) células.</p> <p>Las células muestran poca actividad de la fosfatasa ácida y de la testosterona-5-<math>\alpha</math> reductasa (de la ATCC CRL-1435).</p>
<p>Línea celular MCF7 de cáncer de mama humano (ATCC HTB-22)</p>	<p>Procede de un sitio metastásico como un derrame pleural.</p> <p>El tumor primario procedía de la mama en una paciente con un adenocarcinoma epitelial.</p> <p>La línea MCF7 conserva varias características del epitelio mamario diferenciado, entre ellas la capacidad para procesar el estradiol mediante los receptores de estrógenos citoplasmáticos y la capacidad para formar cúpulas.</p> <p>Las células expresan el oncogén WNT7B [PubMed: 8168088].</p> <p>Contiene el oncogén Tx-4.</p> <p>El crecimiento de las células MCF7 está inhibido por el factor <math>\alpha</math> de la necrosis tumoral (TNF <math>\alpha</math>). La secreción de IGFBP se puede modular mediante el tratamiento con antiestrógenos (ATCC n.º HTB-22).</p>
<p>Línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama humano (ATCC HTB-26)</p>	<p>Procede de un sitio metastásico como un derrame pleural.</p> <p>El tumor primario procedía de la mama de una paciente con adenocarcinoma epitelial. Las células expresan el oncogén WNT7B.</p> <p>Las células MDA-MB-231 expresan poca cantidad de HER2 (de la ATCC HTB-26).</p>

Ejemplo 14: Actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 en monoterapia y en politerapia con CAT (cóctel de carboplatino y paclitaxel) contra las células tumorales de adenocarcinoma de ovario humano en un modelo de xenoinjerto en ratón

- 5 Las líneas celulares de adenocarcinoma de ovario humano, SKOV3 (ATCC n.º HTB-77) y NIH:OVCAR-3 (ATCC n.º HTB-161) se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

Cultivos celulares

Línea celular SKOV3

- 10 El medio de base para la línea SKOV3 es el medio 5a de McCoy modificado formulado por la ATCC (n.º 30-2007 del catálogo de la ATCC). Para hacer el medio de crecimiento completo se le añaden los siguientes componentes al medio de base: suero bovino fetal a una concentración final del 10% a 37 °C (aire, 95%; dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 5%). Se sigue el protocolo de subcultivo de la ATCC para los cultivos de células SKOV3.

Línea celular NIH-OVCAR-3

- 15 El medio de base para la línea celular NIH-OVCAR-3 es el medio RPMI 1640 formulado por la ATCC (n.º 30-2001 del catálogo de la ATCC). Para hacer el medio de crecimiento completo se sigue el protocolo de propagación de la ATCC para los cultivos de células NIH-OVCAR-3.

Preparación de las células

- 20 Las células que se han criopreservado en nitrógeno líquido se descongelan rápidamente a 37 °C y se transfieren a un frasco para cultivo de tejidos que contiene el medio de crecimiento y luego se incuban a 37 °C en un incubador con CO<sub>2</sub> al 5%. Para propagar la línea celular, los cultivos se pasan 1:2 a una densidad de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml cada tres días mediante la adición de un volumen igual del medio de crecimiento recién preparado. Cuando los frascos alcanzan una densidad de aproximadamente 10 x 10<sup>6</sup> células/ml, el procedimiento de pase anterior se repite hasta que se obtienen suficientes células para la implantación en los ratones.

- 25 De 4 a 5 ratonas NOD/SCID de siete a ocho semanas de edad se alojaron por jaula en microaisladores, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h, se aclimataron durante al menos 1 semana antes de usarlas y se alimentaron con

pienso de laboratorio normal a voluntad. Se llevaron a cabo estudios con los animales que tenían entre 8 y 12 semanas de edad en el momento de la implantación de las células tumorales.

#### Procedimientos de formulación

##### SorC13/SorC27

- 5 Para formular SorC13 y SorC27, las soluciones madre del artículo problema se preparan por disolución de las cantidades adecuadas del compuesto en solución salina fisiológicamente tamponada (pH 7,0 a 7,4 a 25 °C) para comprender una solución final con la que administrar 10 y 100 mg/kg de ratón. Las soluciones madre se preparan semanalmente, se conservan a -20 °C y se diluyen nuevas cada día para la dosificación. Todas las soluciones se esterilizan por filtración con un filtro de 0,22 µm antes de la manipulación posterior. Las unidades esterilizadas por filtración se lavaron previamente con un volumen pequeño de agua destilada estéril.

##### Solución de referencia de carboplatino/paclitaxel (CAT)

Se preparan la soluciones madre con 20 mM y 10 µM de carboplatino y paclitaxel, respectivamente. El carboplatino y el paclitaxel se obtienen de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones se esterilizan por filtración con un filtro de 0,22 µm antes de la manipulación posterior.

#### 15 Procedimientos de implantación

- Opcionalmente, para implantar las células tumorales NIH-OVCAR-3 o SKOV3 en los ratones NOD/SCID, los cultivos celulares se centrifugan para sedimentar las células, se aspira el sobrenadante, se resuspende el sedimento celular en 10 ml del medio de crecimiento y se determina el número de células con un hemocitómetro. A continuación, se lavan las células en el medio adecuado y se resuspenden a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml en el medio.
- 20 Con una aguja de calibre 27 y una jeringuilla de 1 cm<sup>3</sup>, se inyectaron 0,1 ml de la suspensión celular por vía subcutánea en los costados de los ratones. A continuación se deja que los tumores se desarrollen *in vivo* hasta que la mayoría alcanza un volumen tumoral de 100 a 200 mm<sup>3</sup>, para lo que típicamente se necesitan de 1 a 2 semanas tras la implantación. Estos tumores se utilizan para producir implantes subcutáneos de tejido en los ratones NOD/SCID que, después de 2 días, se tratan con los péptidos problema o con CAT.

#### 25 Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 1) Ratones con implantes de tumor que reciben el vehículo;
- 2) Ratones con implantes de tumor que reciben el compuesto de referencia CAT;
- 3) Ratones con implantes de tumor que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 4) Ratones con implantes de tumor que reciben la dosis 1 de SorC27;
- 30 5) Ratones con implantes de tumor que reciben la dosis 1 de SorC13 y CAT;
- 6) Ratones con implantes de tumor que reciben la dosis 1 de SorC27 y CAT. GONZ

#### Mediciones

- Se descartan los animales con tumores oblongos, muy pequeños o grandes, y sólo se seleccionan para los estudios los animales portadores de tumores que mostraban una tasa de crecimiento repetitiva. El volumen de cada tumor (V) se calcula mediante la medición con calibre utilizando mediciones estándares de la anchura (A), la altura (H) y la longitud (L) de los tumores. Los animales se distribuyen al azar en los grupos de tratamiento, por lo que la mediana del volumen tumoral de cada grupo era similar al comienzo de la dosificación. Se determina el porcentaje de los valores de T/C, como una medición de la eficacia, donde C se refiere al volumen del tumor sin tratar o de control, y T se refiere al volumen del tumor tratado.

#### 40 Procedimientos del tratamiento

A los animales se les inyecta por vía intraperitoneal (i.p.) esta formulación a 10 ml/kg de masa corporal en una posología.

#### Resultados

- 45 El tratamiento con una dosis de 400 mg/kg de masa corporal de SorC13 y SorC27 disminuye sustancialmente la velocidad de crecimiento de las células NIH-OVCAR-3 y SKOV3 en los ratones NOD/SCID. Este efecto no está asociado a toxicidad, según demuestra la estabilidad de la masa corporal y la ausencia de síntomas de estrés (diarrea, jadeos, pelaje erizado).

Resultados experimentales con las células SKOV3 y SorC27

- Las células SKOV3 se obtuvieron de la ATCC, se cultivaron y se expandieron hasta una cantidad adecuada para establecer xenoinjertos en ratones, y a continuación se formularon en gránulos de gel y se injertaron bajo la cápsula suprarrenal de los ratones NOD/SCID de sustitución para establecer los tumores. A continuación, se deja que los tumores se desarrollen *in vivo* hasta que la mayoría alcanzan los 100-200 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral, lo que típicamente ocurre al cabo de 1 a 2 semanas tras la implantación. Una vez establecidos los xenoinjertos, se recogen y cortan en muchos trozos uniformes. Para la experimentación, se implantaron de dieciséis a dieciocho trozos por debajo de la piel en cada ratón NOD/SCID. Al cabo de 2 días, los animales se tratan con los péptidos problema o bien con CAT o bien con politerapias.
- 10 Los ratones que reciben implantes con células SKOV3 como se detalló más arriba recibieron solución salina (control), SorC27 (400 mg/kg), mediante inyección i.p. cada día durante 12 días, o inyecciones de CAT una vez a la semana. Cada día se midieron el volumen tumoral y la masa corporal. De igual forma, cada día se comprobó la salud general de los animales. Los resultados mostrados en la figura 12 se presentan en términos de carga tumoral normalizada por la masa corporal. Ambos tratamientos con SorC27 y CAT mostraron una enorme reducción del volumen tumoral y eran significativamente diferentes del control. El porcentaje de la proporción T/C (volumen tumoral medio de tratados/volumen tumoral medio de controles) era del 39,9%, lo que reflejaba una disminución del 60,1% del crecimiento tumoral. Hacia el día 12 no había una diferencia estadísticamente significativa entre CAT y SorC27 con esta dosis.

Ejemplo 15: actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 en monoterapia y en politerapia con el paclitaxel contra las células de cáncer de mama humano en un modelo de xenoinjerto en ratón

Las líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF7 (ATCC n.º HTB-22) y T 47D (ATCC n.º HTB-133) se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

Los cultivos celulares, la preparación de las células, los procedimientos con animales, los procedimientos de formulación de SorC13/SorC27, los procedimientos de implantación, las mediciones y los procedimientos de tratamiento son como se describe en el ejemplo 14.

Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 1) Ratones con implantes tumorales que reciben el vehículo;
- 2) Ratones con implantes tumorales que reciben paclitaxel, el compuesto de referencia;
- 3) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 30 4) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27;
- 5) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13 y paclitaxel;
- 6) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27 y paclitaxel.

Procedimientos de formulación

Solución de referencia con paclitaxel

35 Se preparan soluciones madre que contienen paclitaxel a 10 µM. El paclitaxel se obtiene de Sigma-Aldrich.

Resultados

El tratamiento con una dosis de SorC13 o SorC27, opcionalmente de 200 a 400 mg/kg de masa corporal, disminuye sustancialmente la tasa de crecimiento de las células MCF7 y T 47D en los ratones NOD/SCID, con un porcentaje del valor de T/C de menos del 100%. Este efecto no está asociado a la toxicidad, según demuestra lo reducido del porcentaje de T/C a lo largo del desarrollo del estudio.

Ejemplo 16: Actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 contra las células tumorales de leucemia mielógena crónica (LMC) humana, [K-562 (ATCC n.º CCL-243)], en un modelo de xenoinjerto en ratón

La línea celular de leucemia mielógena crónica (LMC) humana, K-562 (ATCC n.º CCL-243), se obtiene de la American Type Culture Collection. Las células se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

Cultivos celulares

El medio de base para la línea K-562 es el medio de Dulbecco modificado de Iscove formulado por la ATCC, n.º 30-

2005 del catálogo. Para fabricar el medio de crecimiento completo, se añaden los siguientes componentes al medio de base: suero bovino fetal a una concentración final del 10%. Para fabricar el medio de crecimiento completo, se sigue el protocolo de propagación de la ATCC para los cultivos de células K-562.

Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 5 1) Ratones con implantes tumorales que reciben el vehículo;
- 2) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 3) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27;

La preparación de las células, los procedimientos con animales, los procedimientos de formulación de SorC13/SorC27, los procedimientos de implantación, las mediciones y los procedimientos de tratamiento son como se describe en el ejemplo 14.

Resultados

El tratamiento con una dosis de SorC13 o SorC27, opcionalmente de 200 a 400 mg/kg de masa corporal, disminuye sustancialmente la tasa de crecimiento de las células K-562 en los ratones NOD/SCID, con un porcentaje del valor de T/C de menos de 100. Este efecto no está asociado a la toxicidad.

15 Ejemplo 17: Actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 contra las células tumorales de cáncer de próstata humano, clon FGC de LnCaP, en un modelo de xenoinjerto en ratón

La línea celular de cáncer de próstata humano, clon FGC de LnCaP (de la ATCC CRL-1740), se obtiene de la American Type Culture Collection. Las células se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

20 Cultivos celulares

El medio de base para la línea del clon FGC de LnCaP está formulado según la ATCC.

Procedimientos con animales

Tal y como se describe en el ejemplo 14

Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 25 1) Ratones con implantes tumorales que reciben el vehículo;
- 2) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 3) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27.

La preparación de las células, los procedimientos de formulación de SorC13/SorC27, los procedimientos de implantación, las mediciones y los procedimientos de tratamiento son como se describe en el ejemplo 14.

30 Resultados

El tratamiento con una dosis de SorC13 o de SorC27, opcionalmente de 200 a 400 mg/kg de masa corporal, disminuye sustancialmente la tasa de crecimiento de las células LnCaP en los ratones SCID, con un porcentaje del valor de T/C de menos de 100. Este efecto no está asociado a la toxicidad, según demuestra lo reducido del porcentaje de T/C a lo largo del desarrollo del estudio.

35 Ejemplo 18: Actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 contra las células tumorales de cáncer de mama humano, MCF7, en un modelo de xenoinjerto en ratón

La línea celular del cáncer de mama humano, MCF-7 (de la ATCC HTB-22), se obtiene de la American Type Culture Collection. Las células se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

40 Procedimientos con animales

Tal y como se describe en el ejemplo 14

Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 1) Ratones con implantes tumorales que reciben el vehículo;

- 2) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 3) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27;

El cultivo celular, la preparación de las células, los procedimientos de formulación de SorC13/SorC27, los procedimientos de implantación, las mediciones y los procedimientos de tratamiento son como se describe en el ejemplo 14.

#### Resultados

El tratamiento con una dosis de SorC13 o SorC27, opcionalmente de 200 a 400 mg/kg de masa corporal, disminuye sustancialmente la tasa de crecimiento de las células MCF7 en los ratones NOD/SCID, con un porcentaje del valor de T/C de menos de 100. Este efecto no está asociado a la toxicidad, según demuestra lo reducido del porcentaje de T/C a lo largo del desarrollo del estudio.

Ejemplo 19: Actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 contra las células tumorales de cáncer de mama humano, MDA-MB-231, en un modelo de xenoinjerto en ratón

La línea celular de cáncer de mama humano, MDA-MB-231 (de la ATCC HTB-26), se obtiene de la American Type Culture Collection. Las células se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

#### Cultivos celulares

El medio de base para la línea celular MDA-MB-231 es el medio L-15 de Leibovitz formulado por la ATCC, n.º 30-2008 del catálogo. Para fabricar el medio de crecimiento completo, se añaden los siguientes componentes al medio de base: suero bovino fetal a una concentración final del 10%. Para fabricar el medio de crecimiento completo, se sigue el protocolo de propagación de la ATCC para los cultivos de células MDA-MB-231.

#### Procedimientos con animales

Tal y como se describe en el ejemplo 14

Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 1) Ratones con implantes tumorales que reciben el vehículo;
- 2) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 3) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27;

La preparación de las células, los procedimientos de formulación de SorC13/SorC27, los procedimientos de implantación, las mediciones y los procedimientos del tratamiento son como se describen en el ejemplo 14.

#### Resultados

El tratamiento con una dosis de SorC13 o SorC27, opcionalmente de 200 a 400 mg/kg de masa corporal, disminuye sustancialmente la tasa de crecimiento de las células MDA-MB-231 en los ratones SCID, con un porcentaje del valor de T/C de menos de 100. Este efecto no está asociado a la toxicidad, según demuestra lo reducido del porcentaje de T/C a lo largo del desarrollo del estudio.

Ejemplo 20: Actividad antitumoral de SorC13 y SorC27 contra las células tumorales de leucemia mielógena aguda (LMA) humana, MV-4-11, en un modelo de xenoinjerto en ratón

La línea celular del cáncer de mama humano, MV-4-11 (de la ATCC CRL-9591), se obtiene de la American Type Culture Collection. Las células se cultivan en los medios de crecimiento preparados con el medio de crecimiento completo de la ATCC.

#### Cultivos celulares

El medio de base para la línea celular MV-4-11 es el medio de Dulbecco modificado de Iscove formulado según la ATCC, n.º 30-2005 del catálogo. Para fabricar el medio de crecimiento completo se añaden los siguientes componentes al medio de base: suero bovino fetal a una concentración final del 10%. Para fabricar el medio de crecimiento completo se sigue el protocolo de propagación de la ATCC para los cultivos celulares de MV-4-11.

Procedimientos con animales

Tal y como se describe en el ejemplo 14.

Se incluyen típicamente los siguientes grupos:

- 1) Ratones con implantes tumorales que reciben el vehículo;
- 5 2) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC13;
- 3) Ratones con implantes tumorales que reciben la dosis 1 de SorC27;

La preparación de las células, los procedimientos de formulación de SorC13/SorC27, los procedimientos de implantación, las mediciones y los procedimientos del tratamiento son como se describen en el ejemplo 14.

Resultados

- 10 El tratamiento con una dosis de SorC13 o SorC27, opcionalmente de 200 a 400 mg/kg de masa corporal, disminuye sustancialmente la tasa de crecimiento de las células MV-4-11 en los ratones SCID, con un porcentaje del valor de T/C de menos de 100. Este efecto no está asociado a la toxicidad, según demuestra lo reducido del porcentaje de T/C a lo largo del desarrollo del estudio.

Ejemplo 21: Detección y límites de detección de los péptidos C

- 15 Se utilizó la HPLC de fase inversa para detectar y cuantificar SorC13 y SorC27. Para los procedimientos analíticos se utilizó una columna Phenomenex Gemini, 5  $\mu$ , C-18, de fase inversa (250 x 4,60 mm). El sistema de solventes era un gradiente de acetonitrilo y agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v. Se llevó a cabo la HPLC a una temperatura de columna de 30,0 °C. El sistema de solventes era un gradiente de acetonitrilo del 10% al 60% (TFA al 0,1%) con agua del 90% al 40% (TFA al 0,1%) durante 40 minutos, a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. La
- 20 detección era a 224 nm. El tiempo de retención de los péptidos era de 11,5 min y 14,7 min para SorC13 y SorC27, respectivamente.

La cuantificación y los límites de detección de SorC13 y SorC27 en el agua se determinaron diluyendo secuencialmente soluciones que contienen masas conocidas de péptidos puros y sometiénolas a un análisis por HPLC. En el caso de cuantificar los dos péptidos C en plasma de rata o de humano, el procedimiento requirió el

- 25 tratamiento previo que elimina la actividad proteolítica de las muestras plasmáticas. Una combinación de la adición de 2  $\mu$ l de Pefabloc (Sigma-Aldrich; un inhibidor de proteasas) a 2 mM de Pefabloc por 100  $\mu$ l de solución y la centrifugación en un filtro de exclusión por tamaños Amicon YM-10 Centricon (MWCO 10 kDa) para retirar las enzimas proteolíticas proporcionó un medio de estabilidad peptídica. Todos los experimentos de cuantificación se realizaron por triplicado y se analizaron calculando la mejor ecuación de la recta en el intervalo de confianza del 95%.
- 30 Las curvas estándares de los tres medios se ajustaron a un modelo lineal dentro del intervalo de confianza del 95% (o mayor). El límite de detección inferior de SorC13 y SorC27 en todos los medios en estas condiciones fue de al menos 1  $\mu$ g en un volumen de inyección de muestra de 94  $\mu$ l. La disminución en los límites de detección para estos péptidos se consigue fácilmente con la derivación preanalítica para los procedimientos colorimétrico y fluorimétrico. Adicionalmente, la disminución de la longitud de onda de detección (p. ej., 204 nm) también disminuye el límite de
- 35 detección de los péptidos.

Ejemplo 22: Velocidad de degradación de los péptidos C en plasma de rata y de humano

Se obtuvo el plasma de rata de la sangre tomada de ratas sacrificadas (Sprague-Dawley) y se colocó en viales de vidrio heparinizados para impedir la coagulación. Se centrifugó la sangre completa a 8000xg durante 5 min para sedimentar las células y dejar el plasma en el sobrenadante. Las muestras de sangre completa humana de humanos

- 40 sanos se tomaron en tubos al vacío heparinizados y con litio. Las muestras se colocaron en tubos de microcentrifugación de 2,0 ml y se centrifugaron a 8000 xg durante 5 min. El plasma se separó cuidadosamente de los glóbulos rojos y se utilizó inmediatamente.
- 45 Para la determinación de la velocidad de degradación de los péptidos C se midió, con el protocolo de HPLC, la cantidad de SorC13 o bien de SorC27 en las muestras de plasma dosificado, transcurrido un tiempo. Los tubos de muestras (500  $\mu$ l) que contienen 2  $\mu$ l de Pefabloc a 2 mM se prepararon con anterioridad para la administración de la muestra. SorC13 (1,0 mg) o SorC27 (2,0 mg) se disolvieron en 1,0 ml de plasma recién preparado (37 °C) y se colocaron en un baño María para incubarlos a 37 °C. Se tomó inmediatamente una muestra (100  $\mu$ l) y se paró en tubos de muestra con 2  $\mu$ l de Pefabloc a 2 mM, se mezcló vigorosamente e inmediatamente se congeló a -80 °C. Esta muestra inicial representaba el tiempo cero del experimento. A intervalos de tiempo sucesivos de 5 minutos, se
- 50 extrajeron muestras a 100  $\mu$ l, se pararon en Pefabloc, se mezclaron y se congelaron a -80 °C hasta el análisis.

La velocidad de degradación del plasma de rata se determinó para el plasma de tres ratas diferentes, mientras que

para la velocidad de degradación del plasma humano se utilizaron seis muestras de plasma diferentes. Los datos utilizados eran las medias ( $\pm$  EEM) y se ajustaron a un modelo simple de descomposición exponencial de una fase para determinar la semivida de los dos péptidos. Esto también permitió calcular una velocidad de degradación estática. En la figura 11 se ilustra la velocidad a la que se degradó SorC27 en el plasma humano. Los análisis  
5 similares para los dos péptidos en ambos tipos de plasma mostraron:

- SorC27 se degradó con una semivida de 21 min en el plasma de rata y de 20 min en el plasma humano.
- SorC13 se degradó con una semivida de 58 min en el plasma de rata y de 56,6 min en el plasma humano.

Ejemplo 23: Estudios de toxicidad de SorC13 y SorC27

Toxicidad aguda de SorC13 y SorC27

10 Se realizó tal y como se describe a continuación un estudio de la toxicidad por inyección de una infusión intravenosa aguda en una sola dosis seguido de un periodo de observación de 5 días en los ratones CD-1. Se utilizaron tres dosis de cada uno de SorC13 y SorC27 (10, 100 y 500 mg/kg). Se realizaron exploraciones diarias al lado de la jaula durante 5 días con exploraciones a cada hora durante las primeras 4 horas tras la inyección. Como parte del análisis,  
15 se valoró lo siguiente: masa corporal antes de la dosificación y al final; se realizó una autopsia de todos los animales (que incluye una preparación de frotis de la médula ósea); se pesaron los órganos de todos los animales.

Tras la inyección i.v. *in vivo* en los ratones CD1, SorC27 no provocó ningún cambio de la tensión arterial ni de la frecuencia cardíaca durante un periodo de medición de 1 hora. Tampoco hubo cambios neurológicos/conductuales durante 72 horas. Después de la inyección i.v. *in vivo* en los ratones CD1, SorC13 ocasionó un pequeño pico (aproximadamente del 25%) de la tensión arterial en los primeros 15 min, que desapareció al cabo de 1 hora. No  
20 hubo cambios neurológicos/conductuales en los ratones durante 72 horas. La inyección intravenosa única de SorC13 o SorC27 en los ratones CD1 en dosis de 10 mg/kg, 100 mg/kg y 500 mg/kg no dio lugar a ningún efecto adverso durante un periodo de observación de 5 días tras la inyección. En este último experimento, la autopsia no mostró ningún cambio significativo en ningún sistema de órganos importante. De igual modo, una dosis múltiple de SorC27 a 400 mg/kg (i.p.) cada día durante 12 días en los ratones no mostró ninguna indicación de toxicidad.

25 Estudio de la toxicidad de las dosis repetidas

Para investigar la toxicidad de las dosis repetidas, se inyectó (i.p.) SorC27 a 400 mg/kg formulado en disolución salina a los ratones NOD/SCID cada día durante 12 días. Los animales se observaron cada día al lado de la jaula y se les exploró al final del periodo experimental. La comparación con ratones de control a los que se inyectó solo disolución salina no mostraron ningún efecto tóxico, ni pérdida de peso ni cambios en los órganos en la autopsia.

30 Ejemplo 24: Los perfiles farmacocinéticos (FC) de SorC13 y SorC27

Se realizó un estudio FC por inyección de la infusión intravenosa aguda de una sola dosis utilizando tres dosis de SorC13 y SorC27 (3 mg/kg, 30 mg/kg y 150 mg/kg) en al menos 3 ratones por grupo de dosificación. Se tomaron muestras de sangre en 6 puntos de tiempo: 5, 15 minutos, 1, 2 y 4 h tras la dosis. A continuación, en las muestras se analizó la presencia de SorC13 o SorC27.

35 Resultados

La combinación de la velocidad de eliminación desde el compartimento de la sangre más la degradación enzimática debido a las enzimas del plasma da lugar a que desaparezcan del compartimento de la sangre con una semivida de menos de 30 minutos.

40 Ejemplo 25: Comparación de la presencia del ARNm de TRPV6 con la actividad apoptótica de los péptidos C en diferentes líneas celulares

La presencia del ARNm de TRPV6 se comprobó por RT-PCR en cada una de las líneas celulares recogidas en la tabla 9. Los cebadores de TRPV6 (el tamaño del amplicón en un gel de agarosa es de aproximadamente 400 pb) utilizados fueron 5'-**CTGCCTATGGAGCAAGTTCTG** (cebador directo) y 5'-**TCAGATGTCATGGGCTCAAAG** (cebador inverso). El programa de termociclado utilizado para la reacción de amplificación fue: 94 °C durante 3 minutos; a continuación se repitió durante 30 ciclos: 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 min y 30 s; 72 °C durante 7 minutos. Las reacciones de amplificación se siguieron por electroforesis en gel de agarosa estándar.

Resultados

50 La tabla 9 muestra cierta correspondencia entre la capacidad que tienen los péptidos C para inducir la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama y de cáncer de ovario, y la presencia del ARNm de TRPV6. Está claro que las líneas celulares que expresan el gen *trpv6* son susceptibles a la apoptosis inducida por el péptido C.

Tabla 9: Comparación de la expresión del gen *trpv6* y la inducción de la apoptosis por SorC13 y Sorc27

Tipo de cáncer	Línea celular	ARNm de TRPV6 (RT-PCR)	Apoptosis inducida por los péptidos C
Mama			
	MB 231	(+)	(+)
	Mb 468	(+)	(+)
	T 47D	(+)	(+)
	HCC1954	(+)	(+)
	MCF7	(+)	(+)
	MCF 10A	(-)	(-)
	MCF 12A	(-)	(-)
Ovario			
	OVCAR3	(+)	(+)
	OV C13	(+)	Sin analizar
	SKOV-3	(+)	(+)
	OV 90	Sin analizar	(+)
	OV 2008	(+)	Sin analizar
	HEY C2	(+)	(+)

Otros péptidos SorC de la invención, tales como SorC9 (**HPSKVDLPR**), se analizan con facilidad con los protocolos descritos en los ejemplos anteriores y se demuestra que tienen actividad *in vitro* e *in vivo* que inhibe la actividad del calcio sin ninguna actividad paralizante. Los péptidos también son útiles para impedir la proliferación celular, inducir la apoptosis, y prevenir o tratar el cáncer.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, se debe saber que la invención no se limita a los ejemplos descritos. Al contrario, la invención pretende cubrir las diferentes modificaciones y los preparativos equivalentes incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.



## Referencias

- Agnes, R.S., Lee, Y.S., Davis, P., Ma, S.W., Badghisi, H., Porreca, F., Lai, J., y Hruby, V.J. 2006. Structure-activity relationships of bifunctional peptides based on overlapping pharmacophores and opioid and cholecystokinin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 2868-2875.
- Peng, J., Zhuang, L., Berger, U.V., Adam, R.M., Williams, B.J., Brown, E.M., Hediger, M.A. y Freeman, M.R. 2001. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. [nota: CaT1 se denomina ahora TRPV6]
- Pigozzi, D., Ducret, T., Tajeddine, N., Gala, J.L., Tombai, B y Gailly, P. 2006, Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 in LnCaP prostate cancer cell line. *Cell Calcium*, 39: 401-415.
- Yamamoto, T., Nair, P. Vagner, J., Largent-Milnes, T. Davis, P., Ma, S.W., Navratilova, E., Moye, S., Tumati, S., Lai, J., Yamamura, H.I., Vanderah, T.W., Porreca, F., y Hruby, V.J. 2008. A structure-activity relationship study of combinatorial synthetic approach of C-terminal modified bifunctional peptides that are delta/mu opioid receptor agonists and neurokinin 1 receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, epub, 12 de febrero
- Zhuang, L., Peng, J., Tou, L., Takanaga, H., Adam, R. M. Hediger, M.A. y Freeman, M.R. 2002. Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Laboratory Investigation*, 82: 1755-1764. [nota: CaT1 se denomina ahora TRPV6]
- Lyshchik A, Higashi T, Asato R, Tanaka S, Ito J, Hiraoka M, Insana MF, Brill AB, Saga T, Togashi K. Cervical lymph node metastases: diagnosis at sonoelastography--initial experience. *Radiology*. 2007 Apr;243(1):258-67. Epub 2007 9 de febrero
- Vernooij F, Sie-Go DM, Heintz AP. Lymph node recurrence following stage IA vulvar carcinoma: two cases and a short overview of literature. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Mar-Apr;17(2):517-20. Epub 2007 19 de febrero. Revisión
- Aalders JG, Thomas G. Endometrial cancer--revisiting the importance of pelvic and para aortic lymph nodes. *Gynecol Oncol*. 2007 Jan;104(1):222-31. Epub 2006 28 de noviembre. Revisión
- Veness MJ, Porceddu S, Palme CE, Morgan GJ. Cutaneous head and neck squamous cell carcinoma metastatic to parotid and cervical lymph nodes. *Head Neck*. 2007 Jul;29(7):621-31. Revisión
- Ma J, Liu L, Tang L, Zong J, Lin A, Lu T, Cui N, Cui C, Li L. Retropharyngeal lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma: prognostic value and staging categories. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1445-52.

Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, Raftopoulos H. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology*. 2007 Mar;242(3):882-8. Epub 2007 17 de enero

Wind J, Lagarde SM, Ten Kate FJ, Ubbink DT, Bemelman WA, van Lanschot JJ. A systematic review on the significance of extracapsular lymph node involvement in gastrointestinal malignancies. *Eur J Surg Oncol*. 2007 May;33(4):401-8. Epub 2006 15 de diciembre. Revisión

Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, Raftopoulos H. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology*. 2007 Mar;242(3):882-8. Epub 2007 17 de enero

Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*. 2007. 26: 7380-7385.

Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Molecular Cancer Therapy*. 2008. 7(2): 271-279.

Bodding M, Fecher-Trost C, Flockerzi V. Store-operated Ca<sup>2+</sup> Current and TRPV6 Channels in Lymph Node Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2003. 278 (51): 50872-50879.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> BioProspecting NB, Inc.  
Stewart, John M.
- 5 <120> Composiciones peptídicas para el tratamiento del cáncer
- <130> 15309-22
- 10 <150> US 61/037.903  
<151> 19-03-2008
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 27  
<212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223>
- 25 <400> 1  
Glu Gly Lys Leu Ser Ser Asn Asp Thr Glu Gly Gly Leu Cys Lys Glu  
1 5 10 15
- Phe Leu His Pro Ser Lys Val Asp Leu Pro Arg  
20 25
- <210> 2  
<211> 18  
<212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223>
- 35 <400> 2  
Ser Ile Leu Ala Arg Pro Ala Glu Leu Asn Thr Glu Thr Cys Ile Leu  
1 5 10 15
- Glu Cys

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido aislado que comprende:
  - a) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos KEFLHPSKVD LPR o EGKLSSNDTE GGLCKEFLHP SKVDLPR, o
- 5 b) al menos 11 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos: EGKLSSNDTE GGLCKEFLHP SKVDLPR en donde dicho péptido inhibe la actividad del canal de calcio sin actividad paralizante.
2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
  - a) la secuencia de aminoácidos HPSKVDLPR,
  - b) la secuencia de aminoácidos KEFLHPSKVDLPR, o
- 10 c) la secuencia de aminoácidos EGKLSSNDTE GGLCKEFLHP SKVDLPR.
3. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:
  - a) la secuencia de aminoácidos HPSKVDLPR,
  - b) la secuencia de aminoácidos KEFLHPSKVDLPR, o
  - c) la secuencia de aminoácidos EGKLSSNDTE GGLCKEFLHP SKVDLPR.
- 15 4. Péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el canal de calcio comprende un canal de calcio de potencial receptor transitorio por vainilloide-6 (TRPV6).
5. Péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido inhibe la captación de calcio en una célula cancerosa.
6. Péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el péptido induce la apoptosis en una célula cancerosa.
- 20 7. Péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para ser usado en tratamientos.
8. Péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para ser usado en el tratamiento del cáncer en un animal que lo necesita.
9. Péptido para ser usado en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer comprende cáncer de mama o cáncer de ovario.
- 25 10. Péptido para ser usado en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer comprende cáncer de mama, cáncer de ovario, neoplasia hemática, cáncer cerebral, cáncer de retina, cáncer hepático, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de endometrio o cáncer de cuello uterino.
- 30 11. Péptido para ser usado en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el cáncer comprende un cáncer metastásico.
12. Péptido para ser usado en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el cáncer metastásico está localizado en un ganglio linfático, tejido pulmonar, tejido renal, médula ósea o tejido hepático.
13. Péptido para ser usado en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde el animal es un humano.
- 35 14. Composición farmacéutica, que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo.
15. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, que además comprende un segundo agente contra el cáncer.
- 40 16. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el segundo agente contra el cáncer es un taxol.

17. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el segundo agente contra el cáncer es tamoxifeno.

18. Procedimiento para inhibir la captación de calcio en una célula cancerosa *in vitro*, que comprende administrar a la célula el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el péptido inhibe la captación de calcio en la célula cancerosa.

19. Procedimiento para inducir la apoptosis de una célula cancerosa *in vitro*, que comprende administrar a la célula el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el péptido induce la apoptosis en la célula cancerosa.

FIG. 1

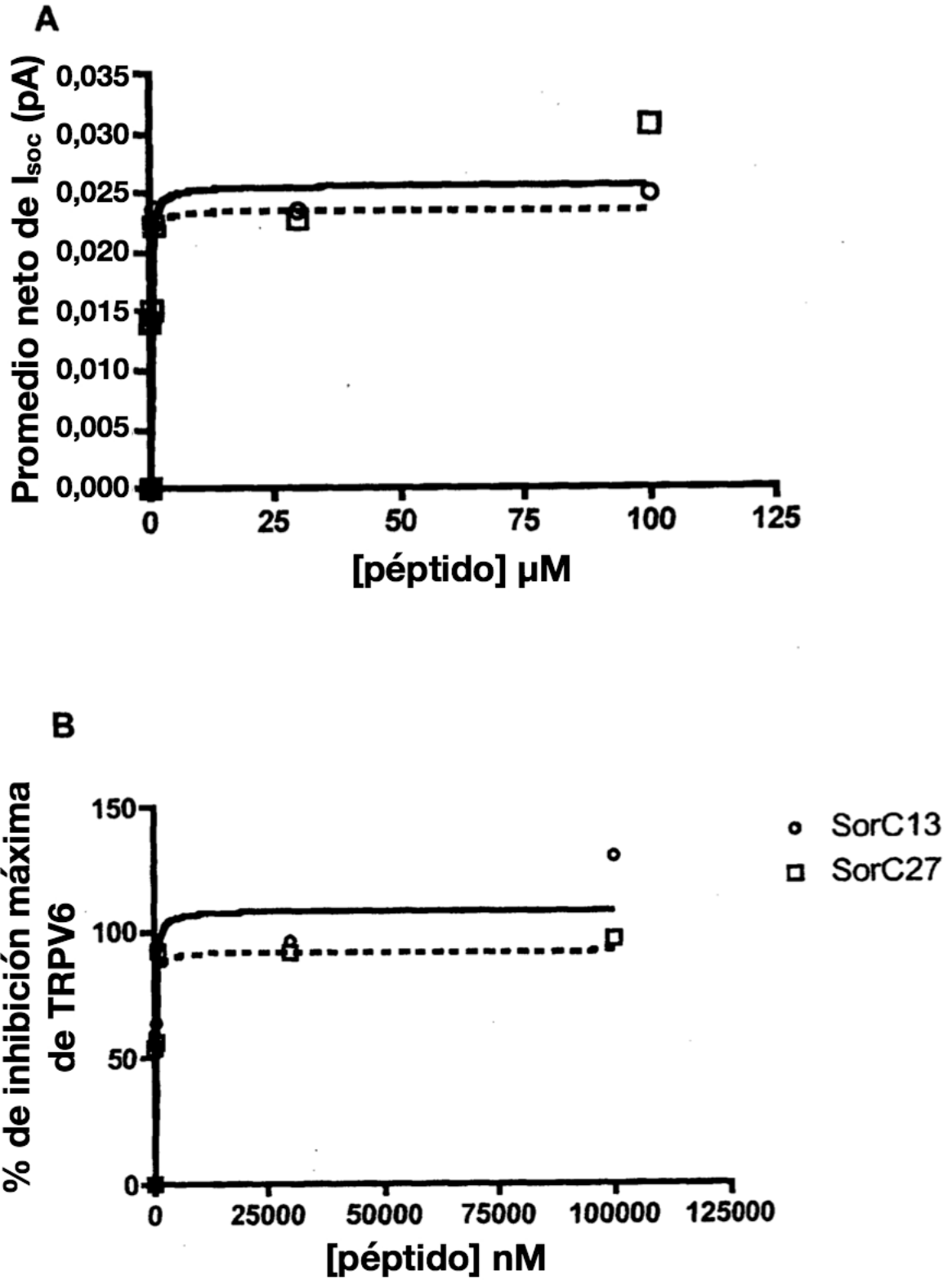


FIG. 2

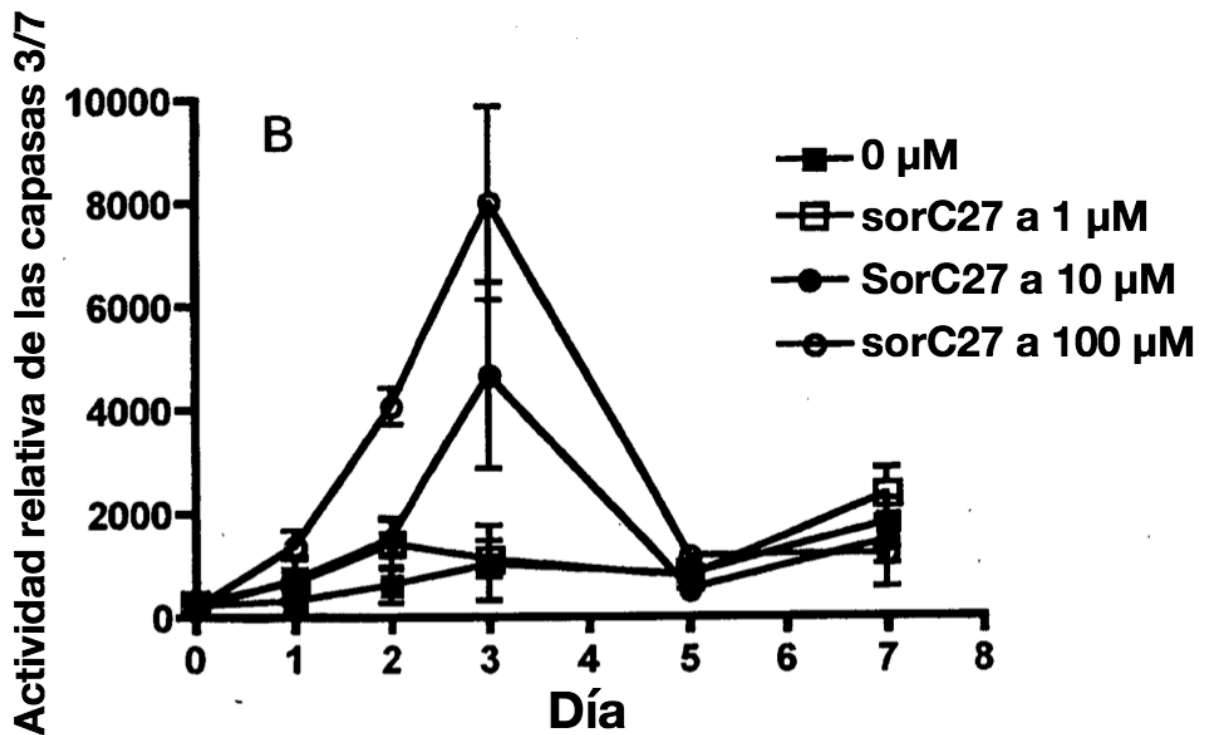
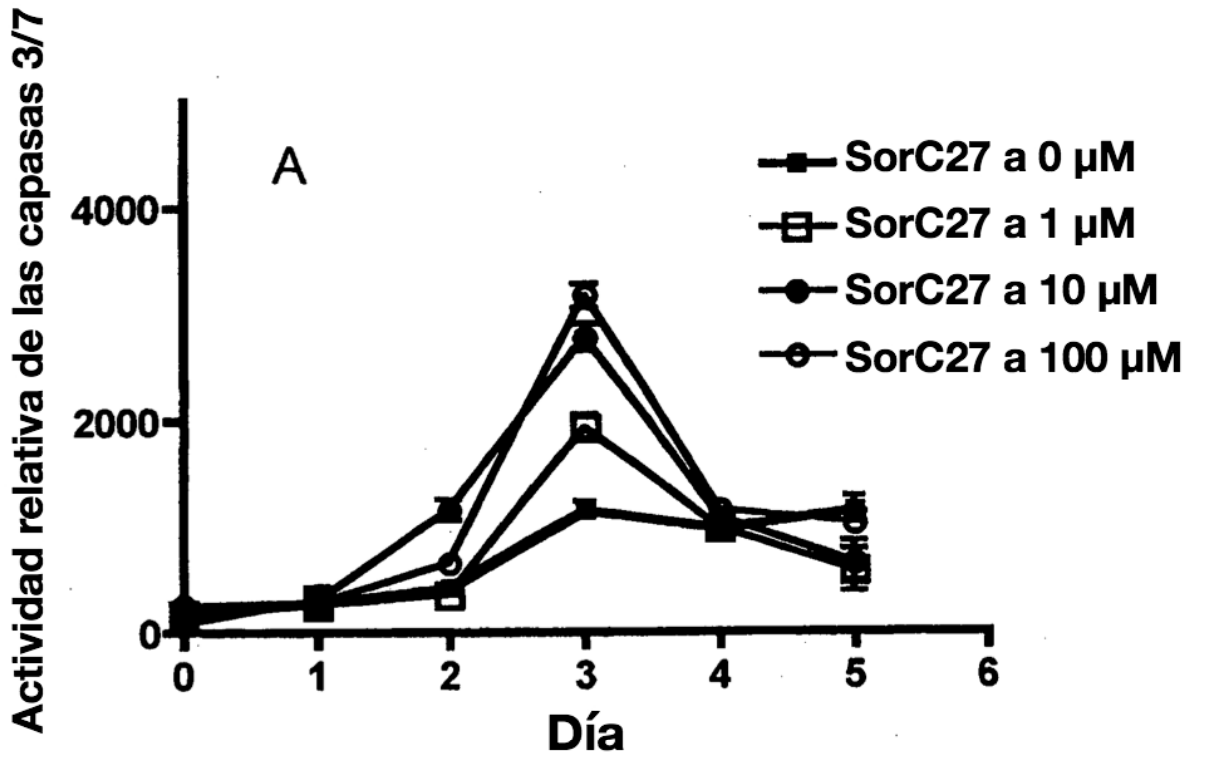
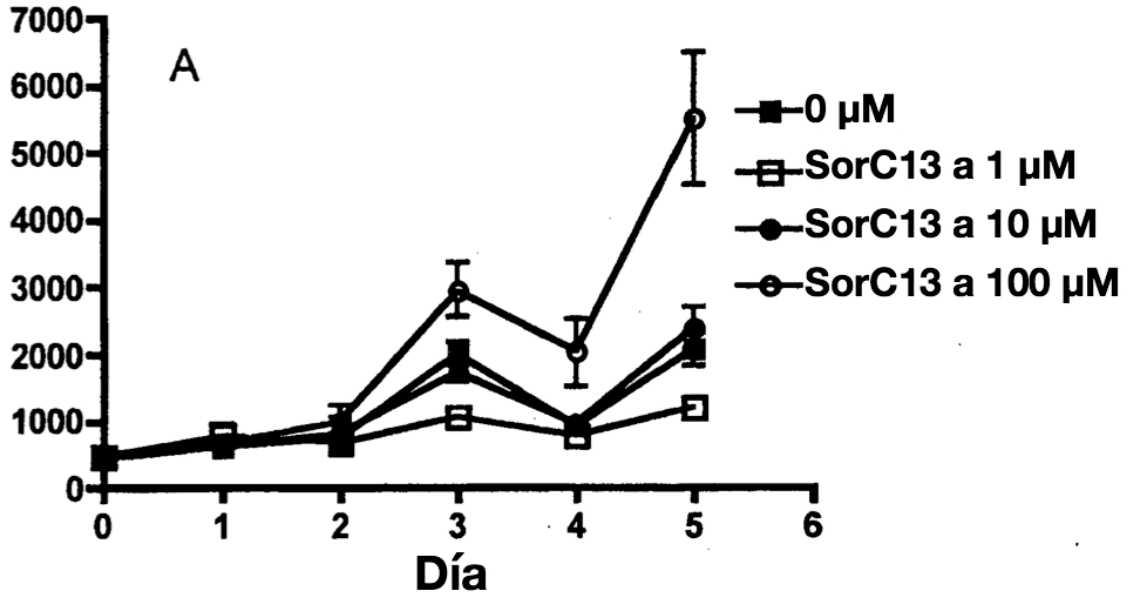


FIG. 3

Actividad relativa de las capas 3/7



Actividad relativa de las capas 3/7

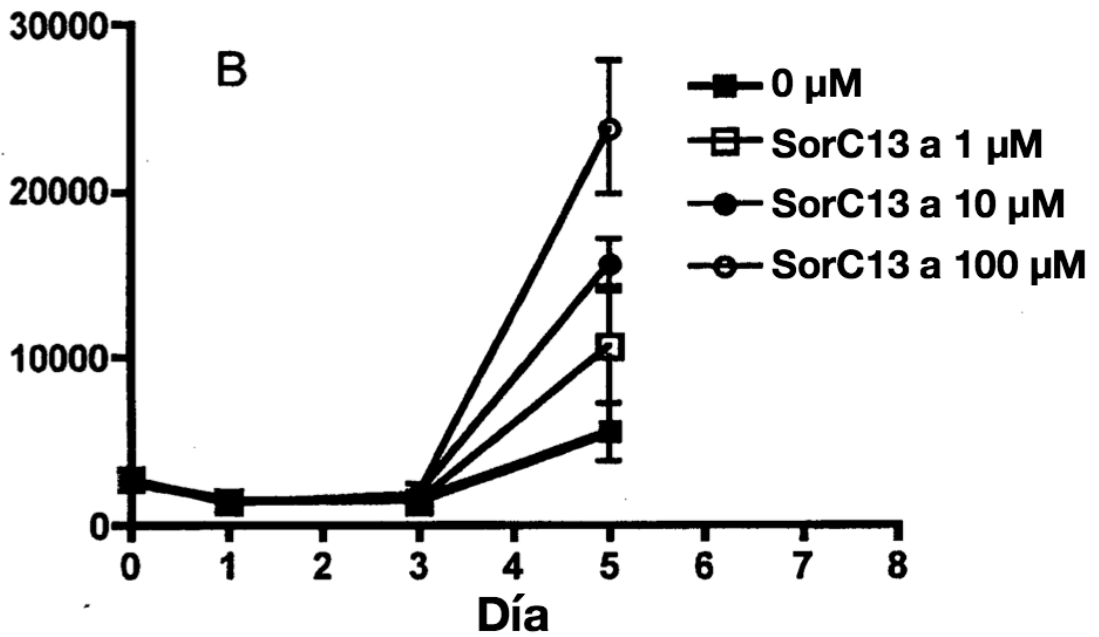




FIG. 4

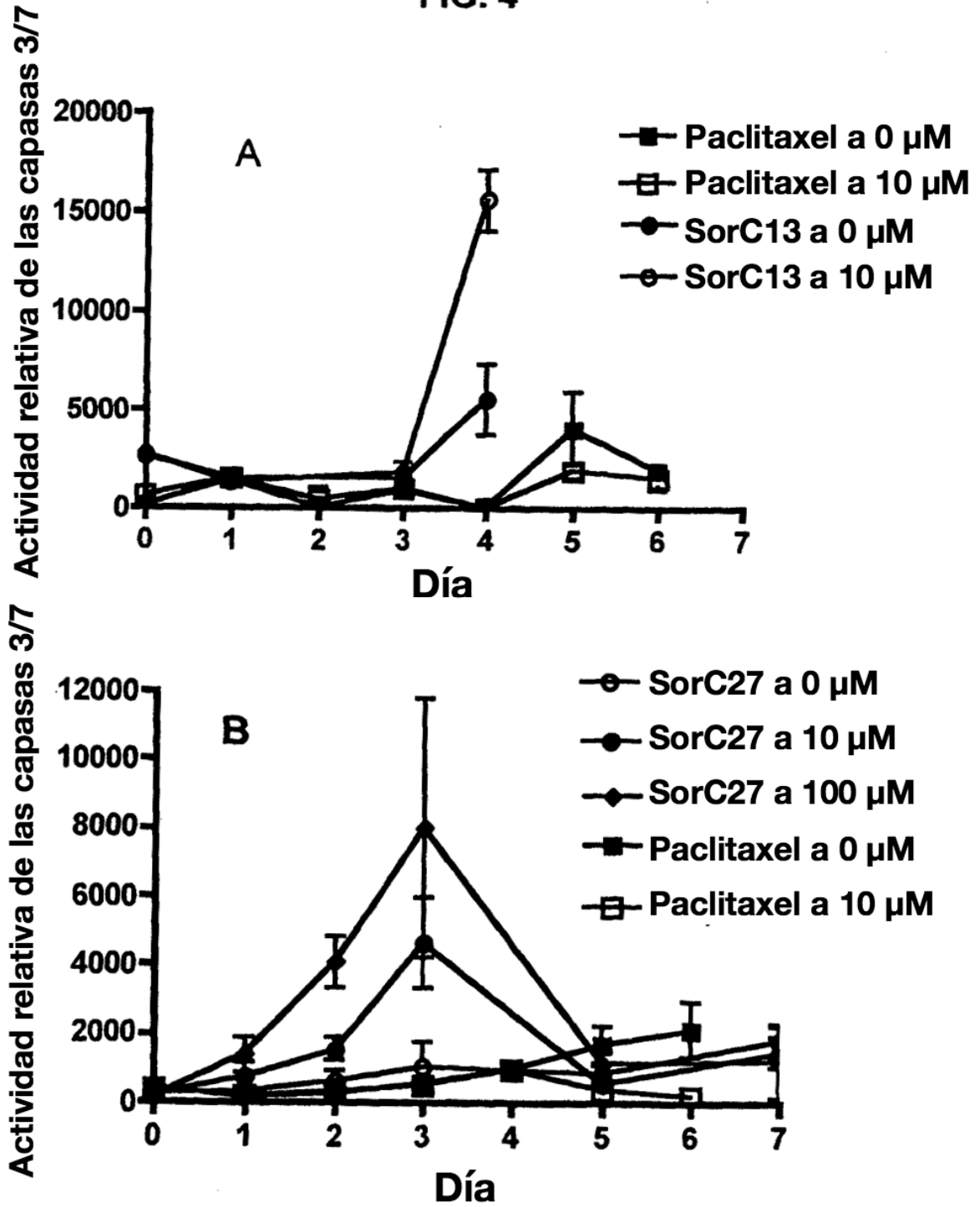


FIG. 5

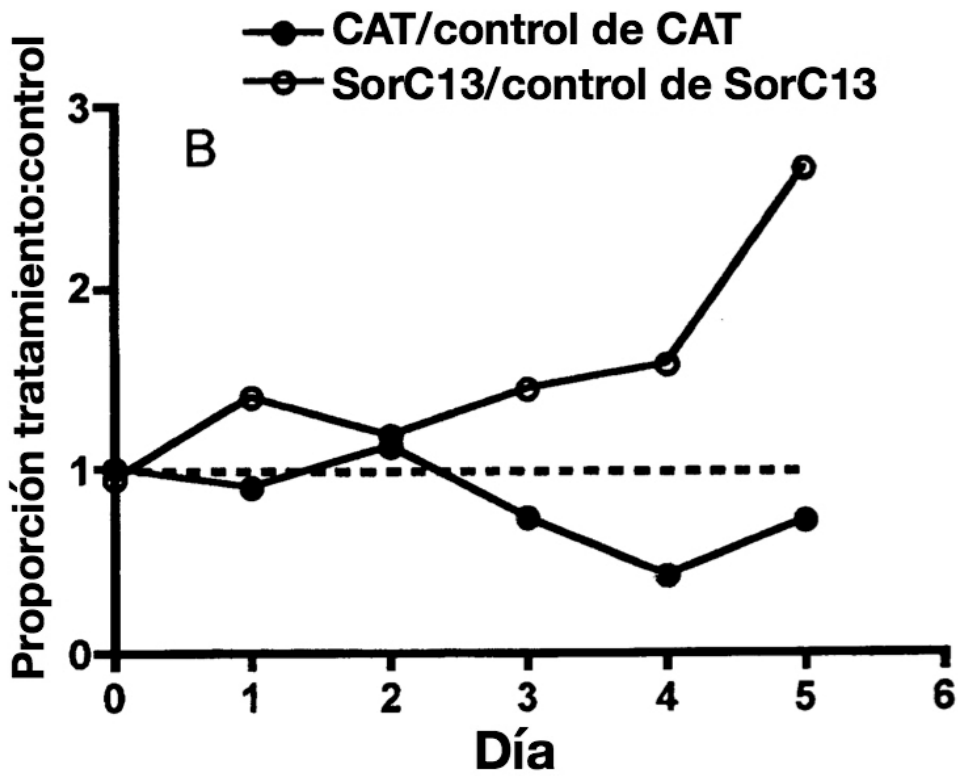
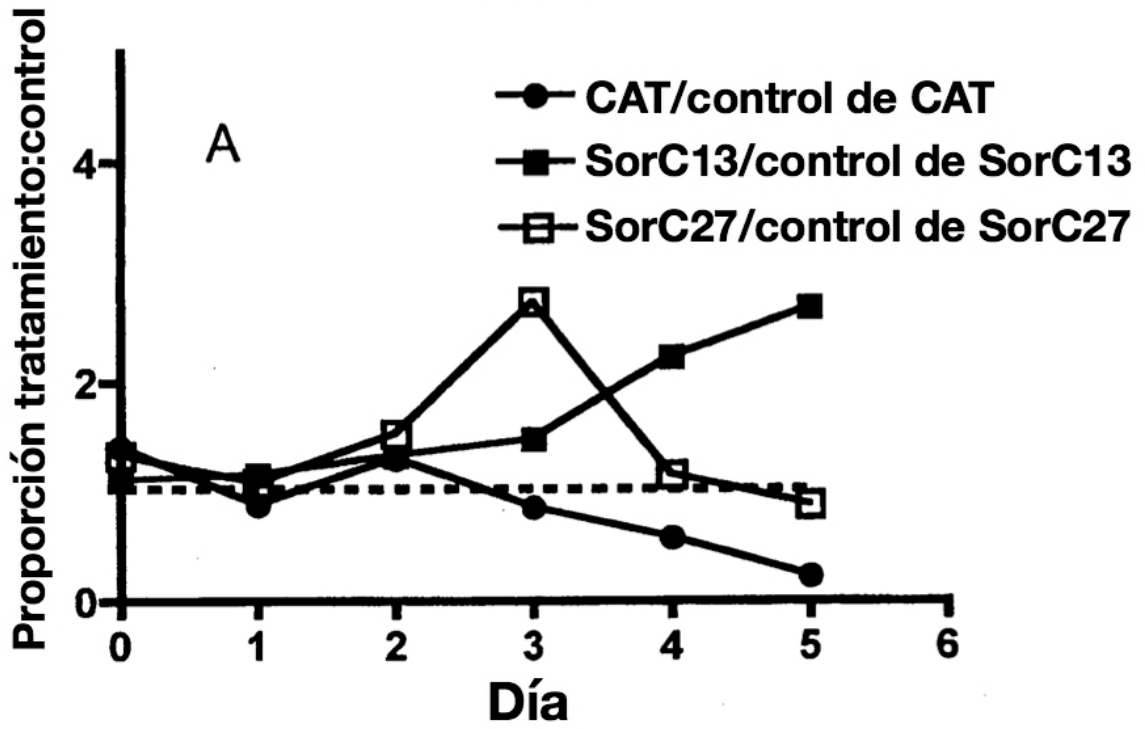
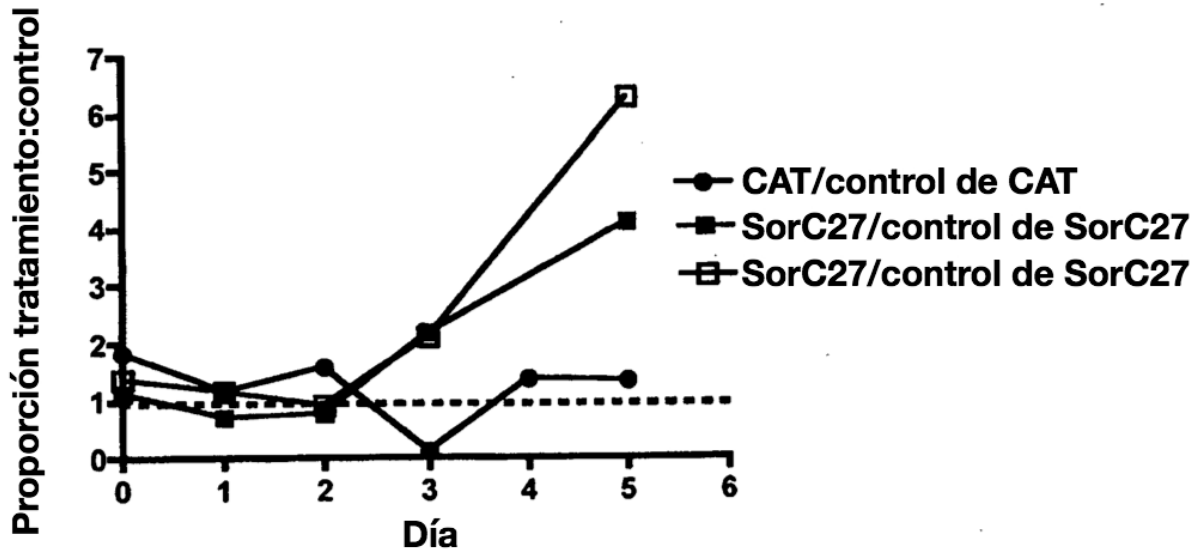
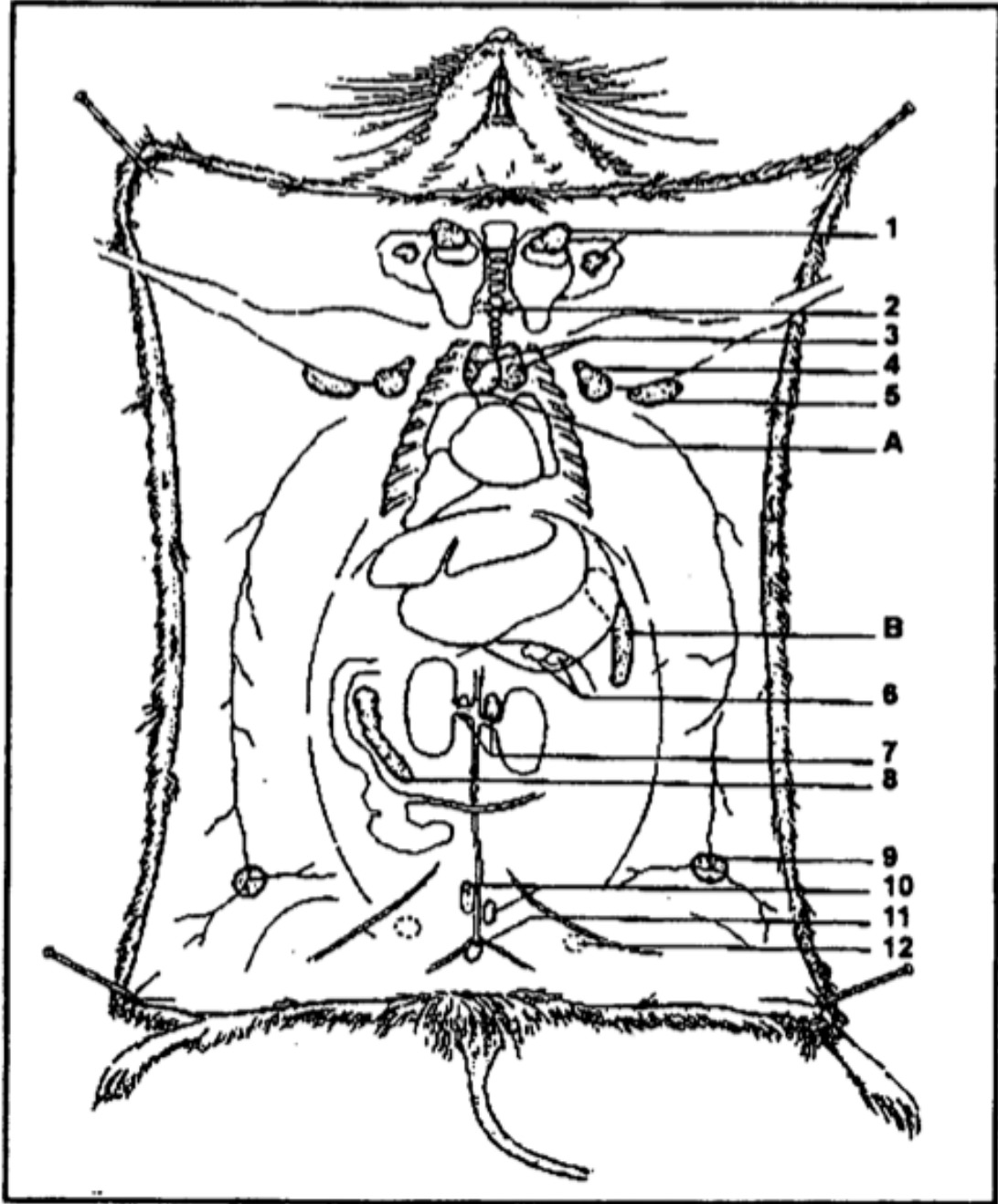


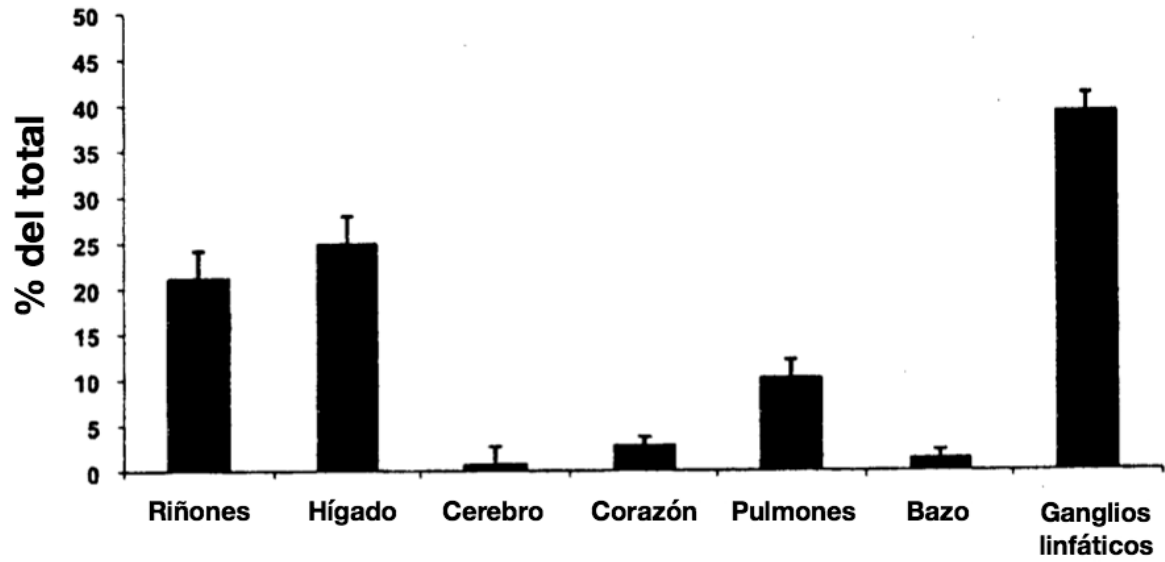
FIG. 6



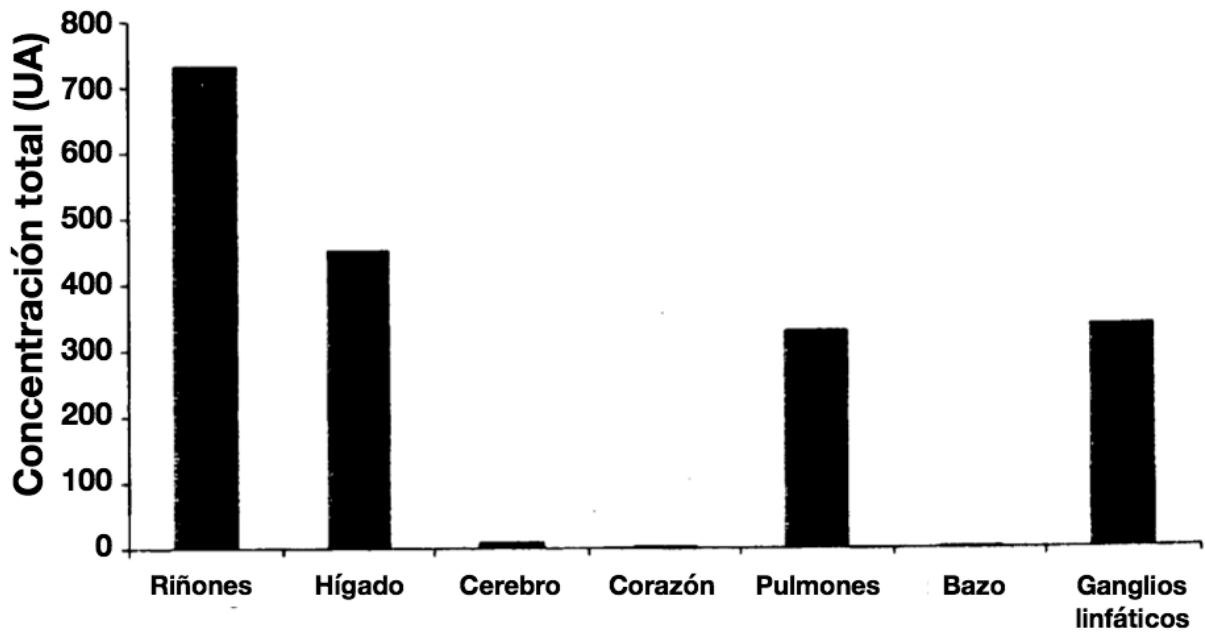
**FIG. 7**



**FIG. 8**

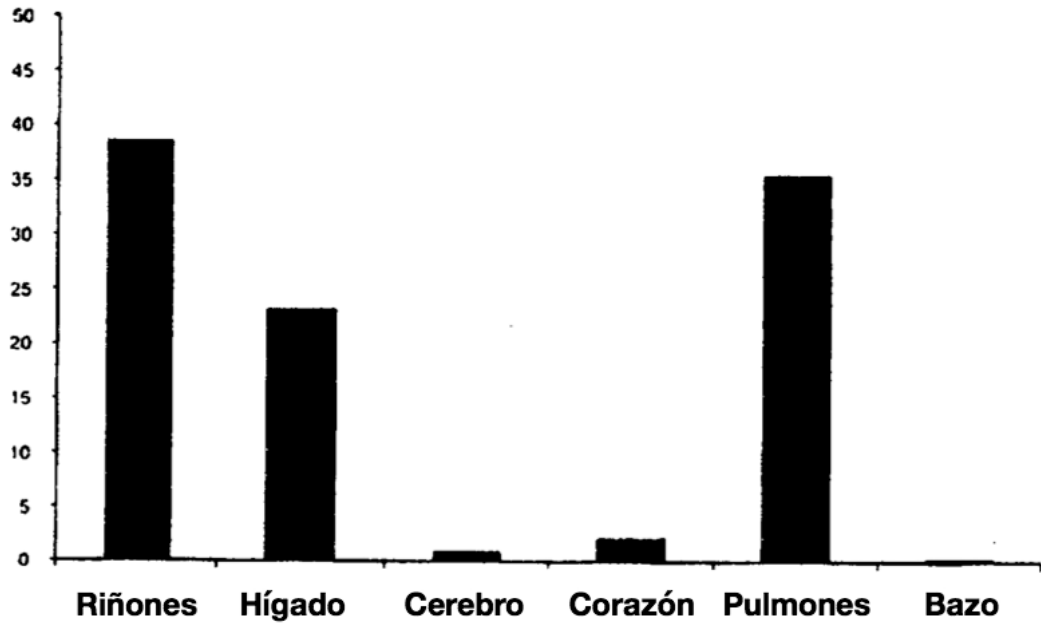


**FIG. 9**

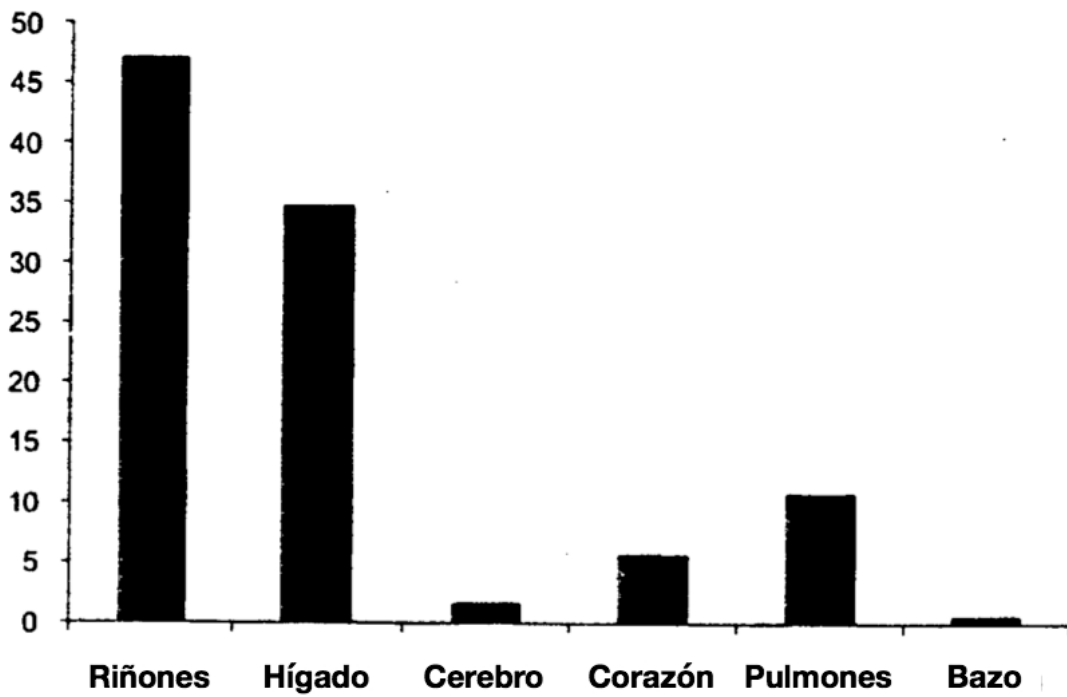


**FIG. 10**

**A**



**B**



**Fig. 11**

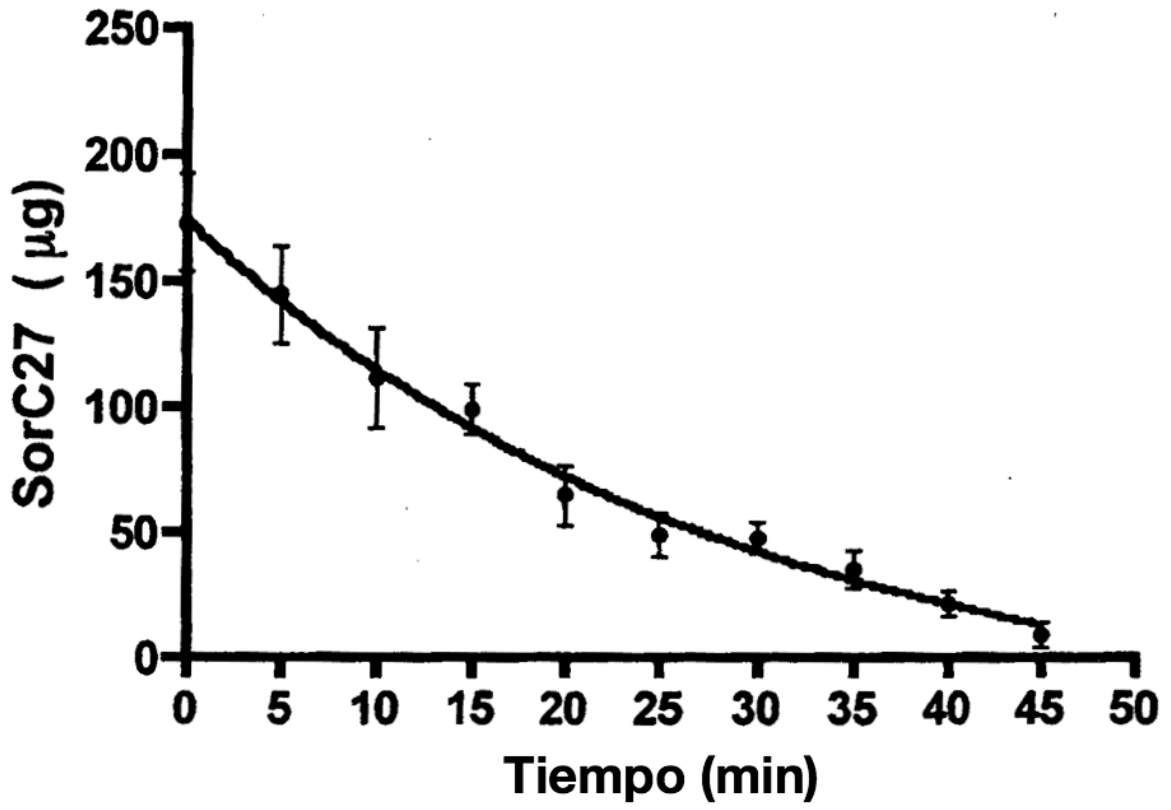


FIG. 12

