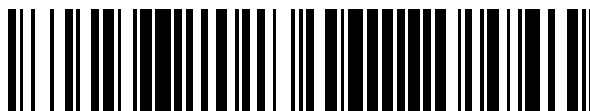


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 437**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)
A61K 38/10 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61N 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2011 E 11763563 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2552462**

54 Título: **Péptidos de CCN3 y análogos de los mismos para uso terapéutico**

30 Prioridad:

02.04.2010 US 341694 P

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

26.02.2016

73 Titular/es:

**ROSALIND FRANKLIN UNIVERSITY OF
MEDICINE AND SCIENCE (100.0%)
3333 Green Bay Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

RISER, BRUCE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 561 437 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de CCN3 y análogos de los mismos para uso terapéutico

Antecedentes de la invención:**Campo de la invención:**

5 La presente invención desvela en papel de CCN3 en enfermedades asociadas con la sobreexpresión de CCN2, que incluyen, aunque no se limitan a, fibrosis, cicatrización de heridas y cáncer. Más particularmente, la presente invención desvela péptidos de CCN3 y análogos diseñados para la función de proteínas CCN3 de longitud completa para su uso para conseguir actividad antifibrótica mejorada bloqueando de este modo la fibrosis y/o el desarrollo de cicatrices, y para tratar cáncer y otros procesos de enfermedad donde CCN3 y CCN2 son importantes. Los péptidos de CCN3 y análogos específicos aislados y purificados, o sintetizados son potencialmente útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades regulando la expresión y/o actividad de CCN2, CCN3 y otras proteínas relacionadas con CCN, así como colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular.

La familia CCN de genes y proteínas

15 La familia CCN de genes actualmente consiste en seis miembros distintos que codifican proteínas que participan en procesos biológicos fundamentales tales como proliferación, adhesión, migración, embriogénesis, diferenciación celular, cicatrización de heridas, angiogénesis y varias patologías, incluyendo fibrosis y oncogénesis. Las proteínas codificadas por los miembros de la familia de genes CCN son principalmente proteínas de 30-40 kDa y son extremadamente ricas en cisteína (10 % en masa) (Perbal B., NOV and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Molecular Pathology* 54: 57-79, 2001). Más recientemente, se ha descrito que algunas formas de las proteínas CCN (incluida CCN3) están en el intervalo de 35-55 kDa. Se denominan proteínas ricas en cisteína 61 (CYR-61), proteínas del factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), proteínas sobreexpresadas en nefroblastoma (NOV), proteínas secretadas inducidas por Wnt-1 (WISP-1), proteínas secretadas inducidas por Wnt-2 (WISP-2) y proteínas secretadas inducidas por Wnt-3 (WISP-3). Más recientemente, se ha propuesto una nueva nomenclatura para esta familia de genes y proteína (véase la tabla 1).

25 Tabla 1: Nombres propuestos y nombres usados actual y anteriormente para la familia CCN de genes y proteínas

Nombre propuesto	Nombres usados actual o anteriormente
CCN1	CYR61 (ser humano, ratón, Xenopus), CEF10 (pollo), IGFBP-rP4 (ser humano), β IG-M1 (ratón), CTGF-2, IGFBP10 (ser humano), angiopro
CCN2	CTGF (ser humano, ratón, pollo, Xenopus), β IG-M2 (ratón), FISP12 (ratón), IGFBP-rP2 (ser humano), Hsc24 (ser humano), IGFBP8 (ser humano), HBGF-0.8, ecogenina (ser humano)
CCN3	NOV (ser humano, rata, pollo, ratón, codorniz), IGFBP-rP3 (ser humano), IGFBP9 (ser humano), NOVH (ser humano), NOVm, mNOV (ratón), xNOV (Xenopus)
CCN4	WISP-1 (ser humano), ELM-1
CCN5	WISP-2 (ser humano), CTGF-L, CTGF-3, HICP, rCOP-1 (rata)
CCN6	WISP-3 (ser humano)

La figura 1 muestra la estructura modular de las proteínas CCN, de manera muy simple y lineal. Aunque éstas tienen una organización multimodular bastante conservada, con cuatro módulos que comparten identidad con proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP), Factor de Von Willebrand (VWC), trombospondina-1 (TSP1), y una familia de reguladores del crecimiento que contienen un nudo de cisteína (CT), las proteínas CCN tienen propiedades biológicas distintivas, son reguladas de forma diferencial, y no tienen homología 100 % completa entre sí cuando se comparan secuencias de aminoácidos. Su implicación se ha demostrado en sistemas de múltiples órganos. Un órgano que ha sido el foco de un gran número de estudios es el riñón. Los mecanismos de acción subyacentes de las proteínas CCN siguen sin ser entendidos completamente. Los intentos de identificar receptores de transducción de señales de alta afinidad específicos únicos han sido difíciles. (Brigstock D. R., Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor. *FEBS Letters* 327: 125-130, 2003). Sin embargo, una serie de receptores potenciales para señalar cada uno, quizás responsable de diferentes actividades o funciones, han sido identificados ahora provisionalmente (Mason, R., Connective tissue growth factor (CCN2), a pathogenic factor in diabetic nephropathy. What does it do? How does it do it? *J. Cell Commun. Signal* 3: 95-104, 2009).

Gen CCN2 y su proteína codificada

De todos los seis miembros de la familia CCN, CCN2 ha emergido como un actor importante en sus papeles en la regulación de ciertas funciones celulares importantes en el crecimiento esquelético y la angiogénesis placentaria, así como sus papeles en ciertas enfermedades incluyendo fibrosis (incluyendo fibrosis renal y asociada a diabetes), esclerosis vascular, aterosclerosis, osteopatía, resistencia vascular, oncogénesis y/o crecimiento de células cancerosas.

CCN2 ha demostrado ahora ser un factor causal en fibrosis renal, y parece actuar de manera similar en otras enfermedades fibróticas, incluyendo aunque sin limitarse a, las que se producen en el hígado, los pulmones, el corazón, la piel, la vasculatura y el peritoneo (Dean R.G., Balding L., Candido R., Burns W.C., Cao Z., Twigg S.M., Burrell L.M. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 53(10): 1245-56, 2005; Shi-wen X., Pennington D., Holmes A., Leask A., Bradham D., Beauchamp J.R., Fonseca C, du Bois R.M., Martin G.R., Black CM., Abraham D.J. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Experimental Cell Research*. 259(1): 213-24, 2000; Ozaki S., Sato Y., Yasoshima M., Harada K., Nakanuma Y. Diffuse expression of heparan sulfate proteoglycan and connective tissue growth factor in fibrous septa with many mast cells relate to unresolving hepatic fibrosis of congenital hepatic fibrosis. *Liver International*. 25(4): 817-28, 2005; Sakamoto N., Sugimura K., Kawashima H., Tsuchida K., Takemoto Y., Naganuma T., Tatsumi S., Nakatani T. Influence of glucose and inflammatory cytokines on TGF-beta1 and CTGF mRNA expressions in human peritoneal mesothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 15(6): 907-11, 2005; Zarrinkalam K.H., Stanley J.M., Gray J., Oliver N., Faull R.J. Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients. *Kidney International*. 64(1): 331-8, 2003.). Cuando se expresa en cantidades incrementadas, este CCN2 regulado positivamente, por ejemplo, por el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), concentraciones de glucosa elevadas, tensión mecánica, productos finales de glucosilación avanzada (AGE), induce (entre otras cosas) la sobreacumulación de, y algunas veces organizadas de forma inapropiada, moléculas de la matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, formas de colágeno, y trombospondina (TSP)). Esta ECM, cuando está organizada, constituye el espacio que separa células, e incluye membranas, tejido conjuntivo, e incluso hueso. Esta producción/acumulación/organización anormal de ECM da como resultado cicatrización patológica y fibrosis/esclerosis.

Estudios con el sistema renal han proporcionado pruebas del papel para CCN2 como un importante factor patógeno en fibrosis/esclerosis en una serie de modelos en nefropatía crónica (CKD). Informes anteriores habían sugerido un posible papel interactivo en CCN2 con TGF- β en fibrosis de piel y escleroderma (Bradham DM y col, Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to SCR-induced immediate early gene product CEF-10. *Journal of Cell Biology*, 114: 1285-1294, 1991).

La formación de esclerosis o fibrosis en el riñón es una respuesta habitual a formas graves o crónicas de lesión. En nefropatía crónica (CKD), parece haber tres factores causales predominantes: metabólicos, genéticos y hemodinámicos. Todos estos factores pueden interactuar, particularmente en nefropatía diabética (DN), para impulsar la progresión. CCN2 parece ahora ser un mediador central, corriente abajo de los efectos de estos tres elementos. Por ejemplo, la fuerza cortante o de estiramiento patológica que resulta de hipertensión intraglomerular parece estimular la producción de citosinas que incluyen CCN2. Esta misma fuerza parece ser responsable de permeabilidad vascular incrementada que causa tanto proteinuria como una producción incrementada de hormonas vasoactivas tales como angiotensina (AG) II y endotelina, que, a su vez, elevan también CCN2 y potencian adicionalmente la fuerza mecánica. La acumulación anormal de productos finales de glucosilación avanzada (AGE) que se produce con el metabolismo de glucosa alterado en DN también puede funcionar tanto para incrementar directamente la reticulación y acumulación de la matriz extracelular (ECM), así como para incrementar CCN2. El trasfondo genético del individuo puede influir en los elementos de hemodinámica y metabolismo y, a su vez, se describen las rutas resultantes. Adicionalmente, existe una probable influencia de la genética en la actividad de proteína quinasa C (PKC) y la producción de hormonas vasoactivas. En todos los casos, es probable que la regulación positiva crónica de actividad de CCN2 de cómo resultado renovación de ECM alterada y acumulación de ECM creciente, que producen fibrosis o esclerosis (En: *Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney*, CE Mogensen & P. Cortes (eds), Humana Academic Publishers, Totowa, NJ, junio de 2006, Riser, BL y col. CCN2 (CTGF) in the pathogenesis of diabetic renal disease: A target for therapeutic intervention). Estos descubrimientos apoyan el postulado de que CCN2 es un elemento corriente abajo fundamental en la progresión de fibrosis y, como tal, proporciona una diana razonable y novedosa para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos. Apoyo adicional para esto en fibrosis renal puede proceder de datos en seres humanos que muestran que el nivel de CCN2 renal, y/o que pasa a la orina puede medirse y usarse para predecir la aparición de nefropatía y/o fibrosis así como para graduar la progresión. Esto ha sido apoyado por una serie de informes que muestran que el nivel de CCN2 presente en los glomérulos del riñón, o incluso que pasa a la orina predice la futura aparición, y gradúa nefropatía (incluyendo fibrosis) (*Kidney International*, 64: 451-458, 2003. Riser, BL y col, CCN2 (CTGF): as a possible predictor of diabetic nephropathy: Preliminary report, *Cytokine*, 47, 1: 37-42 2009, F Tam, y col, Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and connective tissue growth factor (CCN2) as prognostic markers for progression of diabetic nephropathy).

CCN2 es inducible por estrógenos y se sobreexpresa en tumores de mama o uterinos dependientes de esteroides (Tsai y col., Expression and function of Cyr61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. *Cancer Research* 60: 5602-5607, 2000; Tsai y col, Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 21: 964-974, 2000; Sampath y col. Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 beta-estradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology* 142: 2540-2548, 2001; Sampath y col., Aberrant expression of Cyr 61, a member of the CCN family (i.e. CCN1), and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 1707-1715, 2001; Sampath y col, The angiogenic factor Cyr61 is induced by progesterin R5020 and is necessary for mammary adenocarcinoma cell growth. *Endocrine*, 18: 147-150, 2002; Xie y

col, Breast cancer, Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. Journal of Biological Chemistry, 276: 14187- 14194, 2001; Xie y col, Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. Cancer Research, 61: 8917-8923, 2002). CCN2 y otros miembros de la familia CCN son importantes mediadores corriente abajo del crecimiento celular mediado por estrógenos y progesterona. CCN2 y otras proteínas CCN también pueden afectar a otras rutas reguladoras del crecimiento en células de cáncer de mama. El CCN2 uterino es regulado tanto por estrógenos como por progesterona y parece ser importante para el mantenimiento o la remodelación de ECM estromal (Rageh y col., Steroidal regulation of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) synthesis in the mouse uterus. Molecular Pathology, 56: 80-85, 2001; Cheon y col, A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. Molecular Endocrinology, 16: 2853-2871, 2002). En el ovario, CCN2 es regulado por gonadotropinas o factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β) y está asociado con reclutamiento y mitosis de células tecales, y el mantenimiento del cuerpo lúteo (Wandji y col, Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. Kidney International, 60: 96-105, 2000; Slee y col, Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulose cells. Endocrinology, 142: 1082-1089, 2001; Harlow & Hillar, Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. Molecular and Cellular Endocrinology, 187: 23-27, 2002; Harlow y col., FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulose cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. Endocrinology, 143: 3316-3325, 2002; Liu y col, Gonodotrophins inhibit the expression of insulin-like growth binding protein-related protein-2 mRNA in cultured human granulose-luteal cells. Molecular Human Reproduction, 8: 136-141; 2002).

La patente de Estados Unidos 7.780.949 de Riser y DeNichilo desvela el papel de CCN2 en la producción de matriz extracelular (ECM), así como procedimientos para diagnosticar la presencia y el progreso de patologías caracterizadas por una acumulación de los componentes de la ECM midiendo el nivel de CCN2 en una muestra. El procedimiento pretende diagnosticar fibrosis renal y trastornos renales asociados, en particular, complicaciones asociadas con diabetes, hiperglucemia e hipertensión.

Gen CCN3 y sus proteínas codificadas

CCN3 es otro miembro de la familia de CCN. Se ha descrito que CCN3 existe en diversas formas. En un estudio para construir recombinantes aviares competentes retrovirales, se ha demostrado que la proteína CCN3 puede expresarse como una proteína de longitud completa con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa o una proteína truncada más pequeña, que es un fragmento de la proteína de longitud completa (Perbal B., J. Clin. Pathol: Mol Pathol. 54: 57-79, 2001). Otras formas de proteína CCN3 también se han descrito. Por ejemplo, una proteína relacionada con CCN3 ha sido detectada en la envuelta nuclear de las células NCI-H295R y otra proteína relacionada con CCN3 se une al promotor del inhibidor del activador del plasminógeno humano de tipo 2 (PAI-2) (Perbal B., J. Clin. Pathol: Mol Pathol, 54: 57-79, 2001). El anticuerpo K19M-AF dirigido contra péptido de 19 aminoácidos C-terminal de CCN3 reveló al menos dos estados conformacionales de la proteína CCN3 nativa (Kyurkchiev S. y col., Potential cellular conformations of the CCN3 (NOV) protein. Cellular Communication and Signaling, 2: 9-18, 2004). CCN3 citoplasmático y unido a la membrana celular tiene un extremo C expuesto mientras que CCN3 secretado tiene un extremo C secuestrado, que podría deberse a la interacción con otras proteínas o consigo mismo (dimerización).

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas CCN3 de longitud completa de diversas especies, incluyendo ser humano, han sido caracterizadas completamente y son desveladas por Li y col. (Li, C. L. y col., A role for CCN3 (NOV) in calcium signaling. Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology, 55: 250-261, 2002). Una proteína CCN3 de longitud completa tiene aproximadamente 357 aminoácidos.

La patente de Estados Unidos N.º 7.780.949 de Riser desvela que la molécula de CCN3 de longitud completa bloquea la fibrosis en un modelo in vitro de fibrosis renal actuando, al menos parcialmente, a través de su capacidad para regular negativamente la actividad profibrótica de CCN2. No se conocía previamente que CCN3 tuviera actividad en fibrosis o cicatrización de heridas/cicatrización patológica, como factor positivo o negativo y no se conocía que tuviera un efecto regulador sobre CCN2. La patente de Estados Unidos N.º 7.780.949 muestra que las proteínas CCN3 de longitud completa pueden funcionar para inhibir la producción y las acciones de CCN2 y, por lo tanto, la sobreproducción de matriz extracelular que caracteriza la fibrosis en muchos órganos. Ni la solicitud de patente anterior, ni otras patentes o bibliografía publicada, desvelan si una parte más pequeña de todo el CCN3, o un péptido, es capaz de inhibir esta actividad. Ahora se entiende que la fibrosis, aunque iniciada por diversas agresiones diferentes, una vez iniciada sigue una ruta común que aparentemente siempre implica uno, o ambos de TGF-beta y CCN2 como factores causales. Por lo tanto, habiendo demostrado que CCN3 puede usarse para prevenir y/o tratar fibrosis y producción/acumulación anormal de ECM, por ejemplo colágeno en células renales y nefropatía, se puede suponer razonablemente que será útil en dicha enfermedad en otros órganos, e incluso aquellas iniciadas por diferentes estímulos o agresiones. La patente de Estados Unidos N.º 7.780.949 desvela, además, la medición de niveles de CCN3 para diagnóstico y pronóstico de nefropatía.

El documento WO 2008/035024 reivindica secuencias peptídicas de CCN3 y derivados y fragmentos de las mismas para tratar tumores y como marcador clínico

La presente invención se refiere a aislar péptidos derivados de CCN3 recién descritos, recién producidos, específicos y eficaces, como sustituto para la proteína CCN3 de longitud completa, para conseguir actividad anti-CCN2 y antifibrótica igual o mejor, produciendo además novedosas ventajas de fabricación y suministro. En una forma preferida de la invención, se descubrió sorprendentemente que un pequeño número de péptidos que tienen catorce aminoácidos (CCNp37, CCNp38 (humano y de ratón) y versiones con cisteína sustituida de estos péptidos) eran eficaces en el tratamiento de patologías asociadas con la sobreacumulación, desregulación de renovación, o composición alterada, de proteínas de la matriz extracelular. Estos cortos péptidos son mucho más pequeños que la proteína CCN3 de longitud completa y es probable que sean sintetizados y formulados más fácilmente para suministro a un paciente que lo necesita. Estos y otros aspectos y atributos de la presente invención se describirán con referencia a los siguientes dibujos y la memoria descriptiva adjunta.

Breve descripción de los dibujos:

La figura 1 muestra de una manera muy simple, la estructura multimodular general de las proteínas CCN. CT, nudo de cisteína que contiene la familia del dominio similar a reguladores del crecimiento; IGFBP, dominio similar a proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina; TSP1, dominio similar a trombospondina; y VWC, dominio similar a factor de Von Willebrand;

La figura 2 muestra una secuencia de CCN3 de ratón publicada (SEC. ID. N.º 41) usada para el diseño de péptidos (secuencia superior), y la secuencia modificada de los inventores (SEC. ID. N.º 42) con la sustitución de cisteínas por serinas, que no existe en la naturaleza (secuencia inferior);

La figura 3 muestra secuencias de CCN3 específicas (péptidos 1-40 desveladas como SEC. ID. N.º 1-40) usadas a continuación para generar péptidos pequeños cuya actividad se ensayó;

La figura 4 muestra la estructura global y el alineamiento de secuencia de CCN humano (hCCN), que muestra tanto hCCN2 (SEC. ID. N.º 43) como hCCN3 (SEC. ID. N.º 44) tal como las alineó el ordenador, con un diagrama esquemático de los cuatro módulos descritos mostrados en la parte superior de la figura, incluyendo IGF-BD, VWF, TSP y el elemento de repetición c-terminal. La parte inferior de la figura muestra el alineamiento de secuencia (marcado mediante asteriscos) de las dos moléculas (hCCN2 y hCCN3), en este caso con las cisteínas intactas;

La figura 5 muestra la posición de los péptidos CCN sintetizados (CCNp) en secuencia de CCN3 de ratón (SEC. ID. N.º 42) que muestra las 35 secuencias solapantes construidas (CCNp 1-35) que comienzan en el extremo n-terminal y que discurren hasta el extremo c-terminal en negro así como los 5 péptidos diseñados específicamente CCNp 36-40 en negrita (todas también en este caso con las cisteínas sustituidas por serinas);

La figura 6 muestra las secuencias de CCN3 seleccionadas para diseño de péptidos que estaban dirigidas basándose en su posición en la molécula y la homología de secuencia con CCN2. Finalmente, las cisteínas se sustituyeron por serina para evitar la potencial formación de estructuras circulares producidas por la carga de la cisteína y, por lo tanto, la obliteración de la función normal, o dirigida que estaban buscando los inventores. Sin embargo, tampoco se sabía si este cambio daría como resultado la completa pérdida de las funciones buscadas. Estos péptidos se seleccionaron al mismo tiempo también por su elevada homología entre humano y murino, de modo que se esperaba que cualquier secuencia ensayada en y que demostró ser eficaz en modelos murinos proporcione un mismo nivel de eficacia en seres humanos. La figura 6 desvela las SEC. ID. N.º 45-49, respectivamente, por orden de aparición.

La figura 7A muestra los péptidos CCN3p37 (SEC. ID. N.º 37) y CCN3p38 (SEC. ID. N.º 38) específicos que se sintetizaron y se ensayaron teniendo los residuos de cisteína sustituidos por residuos de serina.

La figura 7B es una comparación que muestra el grado de homología entre secuencias naturales murina y humana a partir de las cuales se derivaron CCN3p37 y CCN3p38. CCNp37 es idéntico entre ser humano (SEC. ID. N.º 50) y ratón (SEC. ID. N.º 48). El péptido CCN3p38 tiene solamente una diferencia de aminoácidos entre ser humano (SEC. ID. N.º 51) y ratón (SEC. ID. N.º 49).

La figura 7C muestra una comparación de secuencias de CCN2 y CCN3 humanas de origen natural en regiones seleccionadas para CCN3p37 y CCN3p38. Para la secuencia de CCNp37 seleccionada, tanto CCN2 como CCN3 tienen una homología elevada inusual a lo largo de estas secuencias en regiones, con solamente una diferencia de aminoácidos de catorce. De forma muy diferente, para la secuencia de CCN3p38 seleccionada, CCN2 y CCN3 tienen una homología de aminoácidos inusualmente baja con solamente cuatro de catorce aminoácidos parecidos. La figura 7C desvela las SEC. ID. N.º 52, 50, 53 y 51, respectivamente, por orden de aparición.

La figura 7D muestra una comparación de secuencias de CCN2 y CCN3 murinas de origen natural en regiones CCN3p37 y CCN3p38. Para CCN3p37 no existe ninguna diferencia respecto a lo que se mostró en 7C anteriormente, dado que no hay ninguna diferencia entre ser humano y ratón. Para CCN3p38, hay 4 de 14 aminoácidos que coinciden con la secuencia de CCN2 en las secuencias de origen natural. La figura 7D desvela las SEC. ID. N.º 54, 48, 55 y 49, respectivamente, por orden de aparición.

La figura 8 muestra que CCN3p37 y CCN3p38 reducen la estimulación del promotor de colágeno por TGF- β . El péptido 38 (TOP) era capaz de inhibir la actividad del promotor de colágeno a 500 ng/ml. El péptido 37 demostró una capacidad de bloquear totalmente la actividad del promotor de colágeno estimulada por TGF- β cuando se añadía justo antes de TGF- β (3 barras de la derecha en la figura inferior). Esta actividad inhibitoria también estaba presente (aunque a un nivel inferior) incluso cuando se añadía 24 horas antes que el TGF- β . Ninguno de los otros 38 péptidos fabricado y ensayado mostró actividad en este ensayo, así que los datos no se muestran. El eje Y en la figura superior es el nivel de activación del promotor de colágeno (en unidades arbitrarias), con base en un control de la eficiencia de transfección (activación del promotor de CMV), como también se muestra en la figura inferior.

La figura 9 muestra CCN3p37 y CCN3p38 que bloquean de manera dependiente de la dosis la adhesión celular a placas revestidas con CCN2. Placas de control muestran la adhesión de células mesangiales a placas solamente de plástico (sin revestir). "CTGF" o CCN2, la segunda barra desde la izquierda, muestra la marcada adhesión incrementada mediada por la unión del receptor a placas revestidas con CCN2, en oposición a la que se produce en el plástico sin revestir. CCN3 de longitud completa (NOV) humano (27 nM) añadido justo antes del tratamiento con TGF- β , proporcionó cierta inhibición de esta unión tal como se esperaba. Sin embargo, los péptidos CCNp37 y CCNp38 bloqueaban de forma dependiente de la dosis la unión mediada del receptor a CCN2, proporcionando aproximadamente del 60 % al 70 % inhibición a la concentración más elevada ensayada (500 nM). Esto indica que los dos péptidos son capaces de interactuar en el sitio de unión. Ninguno de los otros 38 péptidos ensayados (solamente p35, p36, p37 y p40 de esos mostrados aquí por consideraciones de espacio) fueron capaces de bloquear significativamente la unión. La actividad específica mostrada para péptidos CCNp37 y CCNp38 en este ensayo demuestra una capacidad de bloquear los receptores en las células que se unirían a CCN2, y se requerirían para ciertas actividades específicas.

La figura 10A muestra inmunolocalización de CCN2 (reactividad con anticuerpo específico de proteína) y el efecto inhibitorio del péptido CCN3p37. Mostrado en el presente documento, el tratamiento con TGF- β da como resultado una dramática pérdida (secreción) del CCN2 ya fabricado localizado en la membrana celular (marrón rojizo oscuro) pero también inicia la síntesis de nuevo CCN2, vista ahora en el citoplasma (marrón rojizo oscuro). Junto con esto, hay un cambio del fenotipo a una célula similar a fibroblasto angular, más alargada, característica de la observada en fibrosis. El tratamiento con CCN3p37 a 50 nM bloquea esta transición fenotípica y reduce en gran medida la expulsión de CCN2 y la nueva síntesis de nuevo CCN2.

La figura 10B muestra inmunolocalización de CCN2 y el efecto inhibitorio del péptido CCNp38. Las células de control no tratadas muestran CCN2 extensivo (marrón) en los bordes celulares. El tratamiento con TGF- β da como resultado una dramática pérdida (secreción) de CCN2 en la membrana celular y el inicio de nueva síntesis observada ahora en todo el citoplasma. Junto con esto hay un cambio de fenotipo a lo que parece ser una célula de tipo fibroblasto, característica de fibrosis. El tratamiento con CCN3p38 bloquea esta transición fenotípica, la expulsión de CCN2, y la nueva síntesis de CCN2. El efecto óptimo parece ser a 50 nM, con un efecto de respuesta a la dosis que se produce con concentración más baja. Otros péptidos no produjeron este efecto (no mostrado).

La figura 11A muestra inmunolocalización de colágeno I y el efecto inhibitorio del péptido CCNp37. El tratamiento con TGF- β (un potente estimulador de la acumulación de colágeno y fibrosis) da como resultado una dramática pérdida o secreción del abundante colágeno I en la membrana celular (mostrada en el marco de control como marrón o marrón rojizo) y el inicio de cierta nueva síntesis observada en todo el citoplasma (tratado con TGF). Junto con esto hay un cambio de fenotipo a lo que parece ser una célula de tipo fibroblasto, menos cuboidal, alargada, característica de fibrosis. El tratamiento con CCNp37 a una baja concentración de 0,5 nM bloquea esta transición fenotípica, la expulsión de CCN2 y la nueva síntesis de CCN2. Dosis más elevadas muestran el mismo o un efecto similar. Otros péptidos no mostraban este efecto (no mostrado).

La figura 11B muestra inmunolocalización de colágeno I y el efecto inhibitorio del péptido CCNp38. El tratamiento con TGF- β (un conocido agente profibrótico) da como resultado una dramática pérdida (secreción) del abundante colágeno I en la membrana celular (mostrada en el marco de control) y el inicio de cierta nueva síntesis observada en todo el citoplasma (tratado con TGF). Junto con esto hay un cambio de fenotipo a lo que parece ser una célula de tipo fibroblasto, menos cuboidal, alargada. El tratamiento con CCN3p38 a la baja concentración de 0,5 nM tiene poco efecto. Sin embargo, a dosis de 5-50 nM existe un bloqueo de la transición fenotípica, la expulsión de parte del colágeno fabricado previamente y nueva síntesis de colágeno que se produce en respuesta a TGF- β . Otros péptidos no demostraban este efecto (no mostrado).

La figura 12 muestra un diagrama de barras de la proliferación celular de leucemia mielógena crónica humana en células no tratadas (Control) y en comparación con las preincubadas con cantidades de un CCN3 recombinante comercial (rCCN3c), proteína CCN3 de longitud completa fabricada en el laboratorio de los inventores rCCN3 8, rCCN3 9, rCCN3 10, rCCN3 11 o CCN3p37 o CCN3p38. Se permitió crecer a células CML, a continuación la proliferación se midió mediante el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo® con células no tratadas de control o células. Éste último es un procedimiento homogéneo de determinación del número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células

metabólicamente activas. El CCN3 de longitud completa producido de forma comercial CCN3 produce una reducción aproximada del 35 % del crecimiento y/o la viabilidad durante el periodo ensayado. CCN3p37 produce una inhibición del 15-20 % y CCN3p38 una inhibición de aproximadamente el 40 %.

Descripción detallada de la invención

5 Aunque la presente invención es susceptible de realizaciones en muchas formas diferentes, en las figuras se muestran, y se describirán en el presente documento en detalle, realizaciones específicas de la misma con la comprensión de que la presente divulgación debe considerarse una ejemplificación de los principios de la invención y no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas ilustradas.

Selección de los péptidos de CCN3

10 La presente invención desvela un papel de péptidos derivados de CCN3 en enfermedades asociadas con la sobreacumulación, desregulación de la renovación, o composición alterada de moléculas de la matriz extracelular en un sujeto humano, que puede causar fibrosis, cicatrización de heridas y crecimiento de células/tumores cancerosos. Ciertos péptidos de CCN3 de la presente invención pueden usarse como sustituto de proteína CCN3 de longitud completa, para conseguir una actividad antifibrótica igual o mayor. El término "fibrosis" usado en la presente
15 divulgación se usa de forma intercambiable con el término "esclerosis" y la formación de cicatrices, dado que son procesos similares implicados en el sobrecrecimiento de tejido fibroso o similar a fibrosis y/o la deposición y/o ensamblaje/organización anormal incrementada de moléculas de la matriz extracelular tales como colágeno, y todas han demostrado tener CCN2 como al menos un factor causal.

20 Para aislar los péptidos de CCN3, se generaron una serie de 36 secuencias peptídicas solapantes cortas, que comienzan en, y definidas por, la región n-terminal y que funcionan hasta el extremo c-terminal del CCN3. Secuencias solapantes cortas se definen en el presente documento como secuencias que varían en tamaño entre aproximadamente 10 y 18 aminoácidos y más preferentemente de 12 a 17 aminoácidos, aún más preferentemente 13-15 aminoácidos y de la forma más preferente 14 aminoácidos (o cualquier intervalo o combinación de intervalos en su interior) y se solapan entre sí en la secuencia de la proteína de longitud completa en aproximadamente 3 a 7
25 aminoácidos. Se usaron modelos murinos de fibrosis para verificar la actividad fibrótica, por lo tanto se usaron secuencias de CCN3 murinas. En la técnica es bien conocido que CCN3 humano tiene una fuerte homología con el murino. De hecho, las secuencias de ratón y humana para la región seleccionada para el péptido CCN3p37 son idénticas, mientras que para CCN3p38 solamente hay una diferente de un único aminoácido entre el ser humano y el ratón. La figura 2 muestra la secuencia de CCN3 de ratón publicada y la ubicación de los residuos de cisteína que fueron sustituidos por residuos de serina, para ayudar potencialmente a la prevención de circularización de los péptidos, y pérdida de actividad. En el lado negativo, esta sustitución también podría tener el potencial de eliminar toda la actividad biológica atribuida a CCN3, especialmente dado que es conocido que es una "molécula rica en cisteína" y su función conocida podría ser, por lo tanto, dependiente de la presencia de cisteínas. El efecto de este cambio no podía predecirse antes del trabajo de los inventores. Las secuencias peptídicas modificadas con serina se denominarán algunas veces análogos o análogos con serina de las secuencias peptídicas de CCN3. La figura 3
35 muestra la secuencia de los péptidos solapantes que se sintetizaron y se ensayaron (péptidos 1-35).

Dado que CCN2 y CCN3 son miembros de la misma familia, pero poseen diferentes funciones biológicas evidentes (en el caso del efecto sobre el colágeno, se descubrieron actividades opuestas), esto sugirió a los inventores que al menos un mecanismo para la actividad de bloqueo de CCN2 observada (y la posterior producción de colágeno) podría deberse a competición del receptor. Es decir, CCN3 podría interactuar con un receptor de CCN2 impidiendo la señalización mediada por CCN2. CCN3 podría poseer una secuencia que es reconocida por el receptor de CCN2, pero cuando se uniera no permitiría la señalización para incrementar la producción o acumulación de la matriz, es decir, podría actuar como un competidor natural. Sin embargo, esto no era obvio, dado que los inventores descubrieron también que CCN3 también inhibía en gran medida la síntesis de CCN2, así que seguía siendo posible que la actividad no se debiera a un bloqueo del receptor, sino que se debiera en su lugar a una inhibición de la producción de CCN2. No obstante, las dos proteínas, CCN3 y CCN2, fueron examinadas en busca de similitudes y diferencias en la secuencia de aminoácidos (estructura), después de producir un alineamiento de "mejor ajuste" generado por ordenador, tal como se muestra en la figura 4 comenzando con la secuencia humana. Por las razones formuladas como hipótesis anteriormente, cuatro regiones con complementariedad muy elevada en secuencias de aminoácidos (es decir, entre CCN2 y CCN3) se seleccionaron tanto para el elemento similar a TSP (denominadas CCN3p39, CCN3p40 y CCN3p36) como para el módulo C-terminal (denominada CCN3p37) (figuras 4 y 5). También se seleccionó una región dentro del dominio de unión al factor de crecimiento similar a insulina de CCN3, denominada CCNp38, donde se observó que CCN3 y CCN2 tenían una complementariedad inusualmente baja (10 %) a lo largo de una región relativamente grande (mostrada en las figuras 4 y 5). Era posible que esta única diferencia descubierta pudiera ser responsable de las diferentes acciones de CCN2 frente a CCN3. Todas las secuencias peptídicas, concretamente CCN3p39, CCN3p40, CCN3p36, CCN3p 37 y CCN3p38, se redujeron adicionalmente sustituyendo cualesquiera residuos de cisteína por residuos de serina. En consecuencia, dichas secuencias peptídicas modificadas con serina son análogas de las secuencias peptídicas de CCN3 y podrían posiblemente poseer actividad antifibrótica similar, como los inventores observaron con la proteína de longitud completa. También se contempla que los residuos de cisteína también podrían sustituirse por alanina, glicina, cisteína S-metilada o combinaciones de las mismas (incluyendo serina).
60

La presente invención contempla que las secuencias peptídicas de CCN3 y sus análogos descubiertos tienen la misma, similar o mayor actividad inhibitoria de CCN2 que la proteína de longitud completa. Tal como se describe con más detalle a continuación, a los inventores les sorprendió descubrir que dos péptidos cortos, CCN3p37 y CCN3p38, demostraban actividad inhibitoria de CCN2 significativa, mientras que los otros 38 péptidos cribados no eran eficaces en inhibir la expresión de CCN2. Por lo tanto, estos péptidos son útiles en el tratamiento de patologías asociadas con la sobreacumulación, desregulación de renovación, o composición alterada de moléculas de la matriz extracelular en el sujeto.

La figura 6 muestra las secuencias seleccionadas para los 4 péptidos diseñados y fabricados específicamente (36-40) y expone la homología aproximada con la mejor coincidencia de la secuencia de CCN2. Tres se seleccionaron por su elevada homología (p37, 39, 40) respecto a secuencias de CCN2, uno por su baja homología (p38), y uno por su homología media (50 %) (p36). Más particularmente, la figura 7A muestra secuencias peptídicas CCN3p37 y CCN3p38 que se seleccionaron y se sintetizaron sustituyendo los residuos de cisteína por serina para prevenir posiblemente la circularización de la molécula y la pérdida de actividad. Tal como se ha descrito anteriormente, se seleccionaron péptidos murinos para ensayar, debido a su alto grado de homología con humanos que se ilustra en la figura 7B, y el uso de modelos murinos para demostrar eficacia, prediciendo la respuesta humana. Finalmente, la figura 7C y la figura 7D demuestran que, aunque existe una fuerte homología entre CCN2 y CCN3 en la secuencia peptídica de CCNp37, la misma homología no existe en la secuencia peptídica de CCNp38.

Resultados del cribado de péptidos de CCN3 seleccionados Los péptidos seleccionados anteriormente, y mostrados en la figura 5, se sintetizaron y se pusieron a prueba en tres ensayos in vitro diferentes para modelizar fibrosis, o patología relacionado con fibrosis in vivo para actividad antifibrótica. Estos ensayos han sido usados ampliamente por los inventores y otros, y son altamente predictivos de respuestas relacionadas in vivo, incluyendo las que se producen en seres humanos. Se usó un ensayo in vitro, es decir, de adhesión celular in vitro. Existe un requisito de adhesión en cicatrización de heridas y fibrosis, con células que responden a la unión de CCN2 a sus receptores para otras actividades críticas. Además la alteración de la adhesión celular y unión al receptor está implicada en otras enfermedades no fibróticas, nombradas previamente en la presente solicitud. Para este ensayo de adhesión, un pocillo de una placa de cultivo se revistió con proteína CCN2 y a continuación se añadieron células mesangiales de rata durante un periodo definido. Dado que las células mesangiales poseen receptores de CCN2, se unen estrechamente a la placa mediante el receptor específico y, por lo tanto, la adhesión mediante este receptor puede medirse. Después de un periodo convencional de incubación, las células se lavan para retirar células no adheridas. Estas células adherentes se retiran y se cuentan a continuación para determinar el porcentaje de las células totales que se adhirieron. La capacidad de cada péptido para bloquear esta unión se examinó preincubando células con el péptido de interés. Se usaron controles para comparación sin revestimiento de CCN2. En un segundo ensayo, se ensayó la capacidad del péptido para bloquear la estimulación del promotor de colágeno de tipo I mediante TGF-beta. La regulación positiva del colágeno de tipo I es un rasgo característico de la fibrosis y a menudo se usa como determinación del criterio de valoración. TGF-beta es un factor profibrótico bien establecido de citosina al que responden las células mesangiales y otras células en la respuesta fibrótica regulando positivamente la producción y acumulación de colágeno y otras moléculas de la matriz. Varias nuevas terapias antifibróticas están en desarrollo que están dirigidas a la actividad de TGF-beta. Para los ensayos usados en relación con la presente invención, la actividad del promotor de colágeno se midió como un indicador rápido y temprano de actividad fibrótica relacionada con colágeno. Las células en cultivo eran sin estimular o estimuladas mediante TGF-beta, tanto en presencia como en ausencia de los péptidos seleccionados. Si los péptidos tienen actividad inhibitoria, la actividad del promotor con estimulación mediante TGF-beta se reduciría a cierto valor que se acerca a las células no tratadas con TGF-beta de control. El ensayo de promotor de colágeno se basa en la transfección de células mesangiales con un promotor COL la2 enlazado a luciferasa. Por lo tanto, cuando el promotor es estimulado, puede medirse como unidades de luciferasa (Riser y col, CCN3 is a negative regulator of CCN2 and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease, American J Pathology, 174, 5, 2009). El nivel de activación del promotor de colágeno (en unidades arbitrarias), se basa en un control de la eficiencia de transfección (activación del promotor de CMV), tal como se muestra también en la figura inferior.

En un tercer ensayo, se desarrolló una tinción inmunológica que permitió medir cambios celulares en respuesta a la estimulación mediante TGF-beta tanto en la cantidad como en la distribución de CCN2 así como colágeno de tipo I (una molécula de la ECM prototípica alterada en fibrosis, aterosclerosis, calcificación vascular, osteopatía, y otras enfermedades relacionadas). Este ensayo permite también determinar si existe un cambio en el fenotipo de las células, particularmente a una célula más similar a fibroblástica. Este cambio es característico en la fibrosis, no solamente en célula mesangial en fibrosis renal, sino también en otros tipos celulares, puede causar fibrosis. Este ensayo es, por lo tanto aplicable para ensayar el efecto de péptidos sintetizados (Riser y col, CCN3 is a negative regulator of CCN2 and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease, American J Pathology, 174, 5, 2009).

Los resultados de los cribados de péptidos no mostraron inhibición significativa de unión mediada por CCN2 o de actividad inhibitoria del promotor de colágeno para cualquiera de los 36 péptidos solapantes en el promotor de colágeno o el ensayo de adhesión mediado por CCN2. Para el péptido 37 (CCN3p37) diseñado para una región específica en el módulo c-terminal con elevada (cerca del 100 %) complementariedad, se descubrió tanto la inhibición de la actividad del promotor de colágeno estimulada por TGF-beta (figura 8), así como la inhibición de la unión al receptor (adhesión a CCN2) (figura 9). CCN3p37 parecía ser más potente que CCN3p38 en la inhibición de

la actividad promotora de colágeno, y el tratamiento inmediatamente antes de TGF-beta era el más eficaz, sin embargo, incluso una exposición 24 horas antes era capaz de producir cierta actividad. CCN3p37 y p38 presentaban una eficacia similar en la inhibición de la adhesión estimulada por TGF a CCN2. Ninguno de los otros péptidos solapantes o aquellos péptidos diseñados específicamente mostró ninguna actividad inhibitoria consistente. Se observó que algunos péptidos potencian la actividad inhibitoria. CCN3p38 tiene una marcadamente baja complementariedad con CCN2 y se encuentra en el dominio IGFBD. Este efecto positivo de CCN3p37 y CCN3p38 también se descubrió cuando se examinó durante el ensayo de tinción inmunohistoquímica. CCN3p37 (figura 10A) y CCN3p38 (figura 10B) fueron capaces de bloquear la redistribución y la nueva síntesis de CCN2 de una manera de respuesta a la dosis, lo que indica un efecto tanto sobre la producción como sobre la actividad, y parecían bloquear también la transición a una célula de tipo fibroblasto, un importante factor en la transición de células a un fenotipo que se cree que es importante en la generación y la progresión de fibrosis en sistemas con muchos órganos. Se observó un efecto similar sobre colágeno de tipo I y se produjo tanto con CCNp37 (figura 11 A) como con CCNp38 (figura 11B). La presente invención demuestra, por lo tanto, por primera vez, un procedimiento para bloquear la síntesis y la actividad de CCN2, la unión o adhesión celular a CCN2, la acumulación de colágeno, la transición de células mesangiales a una célula de tipo fibroblasto y, por lo tanto, la fibrosis, usando péptidos pequeños únicos de regiones selectivas muy limitadas de la proteína CCN3 de longitud completa. En consecuencia, el péptido de CCN3 de la presente invención también puede usarse para bloquear la estimulación mediada por CCN2 del crecimiento de células cancerosas y para promover la cicatrización de heridas con cicatrización patológica mínima. Dado que CCN2 es bien conocido como un factor clave en la progresión de una serie de enfermedades, la capacidad de bloquear este factor mediante dichos péptidos tiene aplicaciones terapéuticas de largo alcance. Fue un descubrimiento inesperado que una región con complementariedad casi total y una región con poca o ninguna complementariedad eran ambas eficaces para bloquear la adhesión, la actividad de CCN2, la adhesión y actividad de colágeno. Esto no podía predecirse.

Uno de los usos potenciales del procedimiento en la presente invención es para el tratamiento de la fibrosis. El término "fibrosis" usado en la presente divulgación incluye fibrosis y/o esclerosis y cicatrización patológica, dado que son procesos similares y todos han demostrado tener CCN2 como al menos un factor causal. En la presente divulgación, "fibrosis", "esclerosis" y "cicatrización patológica" pueden usarse de forma intercambiable. La fibrosis puede asociarse con cualquier órgano capaz de formar fibrosis, tal como (aunque no se limitan a) riñón, corazón, hígado, pulmones, vasculatura (incluyendo escleroderma, arterias coronarias), piel, cuello uterino, ojo, encías, cerebro y el peritoneo. La fibrosis también puede ser el resultado de una de las afecciones patológicas tales como (aunque no se limitan a) nefropatías, diálisis peritoneal, degeneración macular, enfermedad periodontal, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular e isquemia relacionada y lesión por reperfusión, procedimientos de intervención quirúrgica y médica (por ejemplo, angioplastia con balón, inserción de endoprótesis vasculares (*stents*), catéteres, injertos (incluyendo fistulas arteriales y venosas) y trasplantes de órganos) y adhesiones y cicatrización patológica de tejidos u órganos postquirúrgicas no deseadas. La fibrosis también puede asociarse con proliferación celular incrementada, por ejemplo, enfermedad proliferativa glomerular y rigidez vascular causada por la proliferación celular, calcificación medial e intimal. Otras indicaciones están asociadas con proliferación celular anormal, por ejemplo, cáncer, particularmente cuando el crecimiento o la metástasis está relacionado con la regulación positiva de la expresión de CCN2, aterosclerosis, osteopatía, osteoporosis, osteodistrofia renal, osteocondrodisplasia, osteitis fibrosa, enfermedad de osteoclastogénesis, resistencia vascular, calcificación vascular, oncogénesis, y desregulación de la matriz extracelular. La patología puede ser secundaria a, la producción/secreción y/o actividad incrementada de TGF- β , cicatrización de heridas, nefropatía crónica, hipertensión intraglomerular, crecimiento de células cancerosas, diabetes, hiperglucemia, hipertensión, nefropatía proliferativa, enfermedad de desregulación de la matriz extracelular o enfermedad de tejido conjuntivo.

Resultados de un estudio del efecto de péptidos de CCN3 sobre el crecimiento de células de leucemia mielógena crónica humana

La figura 12 muestra un diagrama de barras de la proliferación celular de células de leucemia mielógena crónica humana (K562) como un porcentaje del crecimiento del control no tratado. En las células no tratadas (Control) y a aquellas preincubadas con cantidades de un CCN3 recombinante comercial (rCCN3c), o CCN3 de longitud completa fabricado en el laboratorio de los inventores, representado mediante varias preparaciones rCCN3 8, rCCN3 9, rCCN3 10, rCCN3 11, o los péptidos CCN p37 o CCN p38 se les permitió crecer, a continuación la proliferación se midió mediante el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo® con células no tratadas de control o células (McCallum, L y col, CCN3: a key growth regulator in Chronic Myeloid Leukaemia, J Cell Commun Signal. Junio de 2009; 3(2): 115-124.). Éste último es un procedimiento homogéneo de determinación del número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas. Los resultados de los inventores mostraban que el CCN3 de longitud completa producido de forma comercial produce una reducción aproximada del 35 % del crecimiento y/o la viabilidad durante el periodo ensayado. En comparación, CCN3p37 produce un 15-20 % de inhibición y CCN3p38 aproximadamente un 40 % de inhibición del crecimiento celular. Por lo tanto, la actividad era mayor que para el CCN3 de longitud completa.

Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una o más formulaciones farmacéuticas para administración de péptidos de CCN3 a un paciente, envasadas de una manera que facilita su uso para administración a sujetos. En una realización, dicho kit incluye una formulación farmacéutica descrita en el presente

documento (por ejemplo, una composición un péptido de CCN3), envasada en un recipiente, tal como un frasco o
receptáculo cerrado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto
o la composición en la puesta en práctica del procedimiento. En una realización, la formulación farmacéutica está
5 envasada en el recipiente de modo que la cantidad de espacio libre superior en el recipiente (por ejemplo, la
cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del recipiente) es muy pequeña. Preferentemente, la
cantidad de espacio libre superior es despreciable (es decir, casi ninguna). En una realización, el kit contiene un
primer recipiente que tiene la composición del péptido de CCN3 y un segundo recipiente que tiene una solución de
reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición. En un aspecto, la formulación farmacéutica está
10 envasada en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir, además, un dispositivo adecuado para
administrar la formulación farmacéutica de acuerdo con una vía de administración específica. Preferentemente, el kit
contiene una etiqueta que describe el uso de las formulaciones farmacéuticas.

La presente invención proporciona además el uso de los péptidos de CCN3 en un sujeto humano a través de una vía
de administración que incluye intravenosa, intramuscular, nasal, tópica, vaginal, anal, transdérmica, por inhalación,
15 oral, bucal, intraperitoneal, intraósea y combinaciones de las mismas. La vía de administración transdérmica incluye
parche transdérmico o electroforesis transdérmica. Debe entenderse también que el péptido de CCN3 puede
modificarse adhiriendo una molécula o entidad portadora, tal como es bien conocido en la técnica, para proteger al
péptido de la degradación, para dirigir al péptido a una ubicación deseada en el ser humano, para controlar la
velocidad de administración. Las moléculas portadoras adecuadas incluyen, aunque no se limitan a, grupos glicol,
20 polietilenglicol (PEG), proteínas, incluyendo proteínas de suero. La presente invención contempla usar excipientes
que se han usado en la industria farmacéutica para las vías de administración prescritas indicadas anteriormente. La
presente invención contempla modificar el péptido de CCN3 para incrementar su estabilidad, periodo de validez,
semivida in vivo, dirección dentro del cuerpo, para mejorar su adhesión a una célula de interés o entrada en la célula
de interés.

En una forma de la invención, los péptidos de CCN3 pueden usarse en formulaciones de tratamiento de células
25 madre añadiendo los péptidos a aislados de sangre del cordón umbilical o médula ósea para generar células madre
terapéuticas ex vivo.

La presente invención permite suministrar una cantidad eficaz de los péptidos de CCN3 que puede determinarse
mediante procedimientos tales como titulación de la dosis u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia y
30 pueden incluir dosis en el intervalo de 0,1 nanomolar a 1 micromolar o aproximadamente 0,1 nanogramos por
mililitro a 1 microgramo por mililitro. También pueden requerirse cantidades concentradas, dependiendo de la forma
de administración usada.

La puesta en práctica de la presente invención empleará e incorporará, a menos que se indique lo contrario, técnicas
convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ingeniería genética e
35 inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Aunque la presente invención se describe en relación con
lo que actualmente se considera que son las realizaciones más prácticas y preferidas, debe apreciarse que la
invención no está limitada a las realizaciones desveladas, y se pretende cubrir diversas modificaciones y
disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones. Pueden realizarse
modificaciones y variaciones en la presente invención sin alejarse de los aspectos novedosos de la invención, tal
40 como se define en las reivindicaciones. Las reivindicaciones adjuntas deben interpretarse en sentido amplio y de
manera coherente con el espíritu y el alcance de la invención en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de CCN3 para su uso como un medicamento, en el que el péptido de CCN3 tiene una secuencia de aminoácidos identificada como CCN3p37, CCN3p38 (humano), CCN3p38 (ratón), un CCN3p37 con cisteína sustituida, CCN3p38 con cisteína sustituida (humano) o un CCN3p38 con cisteína sustituida (ratón).
- 5 2. El péptido de CCN3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CCN3p37 con cisteína sustituida comprende una secuencia de CCN3p37 con los aminoácidos cisteína sustituidos por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en serina, alanina, glicina, cisteína S-metilada o una combinación de los mismos.
3. El péptido de CCN3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CCN3p37 con cisteína sustituida comprende la secuencia de CCN3p37 con los aminoácidos cisteína sustituidos por serina.
- 10 4. El péptido de CCN3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CCN3p38 con cisteína sustituida (humano) comprende una secuencia de CCN3p38 (humano) con los aminoácidos cisteína sustituidos por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en serina, alanina, glicina, cisteína S-metilada o una combinación de los mismos.
- 15 5. El péptido de CCN3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CCN3p38 con cisteína sustituida (humano) comprende la secuencia de CCN3p38 (humano) con los aminoácidos cisteína sustituidos por serina.
6. El péptido de CCN3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CC3p38 con cisteína sustituida (ratón) comprende una secuencia de CCN3p38 (ratón) con los aminoácidos cisteína sustituidos por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en serina, alanina, glicina, cisteína S-metilada o una combinación de los mismos.
- 20 7. El péptido de CCN3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CCN3p38 con cisteína sustituida (ratón) comprende la secuencia de CCN3p38 (ratón) con los aminoácidos cisteína sustituidos por serina.
8. Un péptido de CCN3 para su uso en el tratamiento de fibrosis, cáncer o heridas, en el que el péptido de CCN3 tiene una secuencia de aminoácidos identificada como CCN3p37, CCN3p38 (humano), CCN3p38 (ratón), un CCN3p37 con cisteína sustituida, CCN3p38 con cisteína sustituida (humano) o un CCN3p38 con cisteína sustituida (ratón).
- 25 9. Un kit para formar una solución para su uso en el tratamiento de fibrosis, cáncer o heridas que comprende:
 - un vial que contiene un péptido de CCN3 que tiene una secuencia de aminoácidos identificada como CCN3p37, CCN3p38 (humano), CCN3p38 (ratón), un CCN3p37 con cisteína sustituida, CCN3p38 con cisteína sustituida (humano) o un CCN3p38 con cisteína sustituida (ratón); y
 - 30 una etiqueta que describe el uso del péptido de CCN3.
10. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el péptido de CCN3 está liofilizado y el kit comprende, además, un vial que contiene un diluyente para reconstituir el péptido de CCN3 liofilizado.
11. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el péptido de CCN3 está en una formulación líquida.
- 35 12. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además un dispositivo para suministrar el péptido de CCN3 a un sujeto humano que lo necesita.

FIG. 1

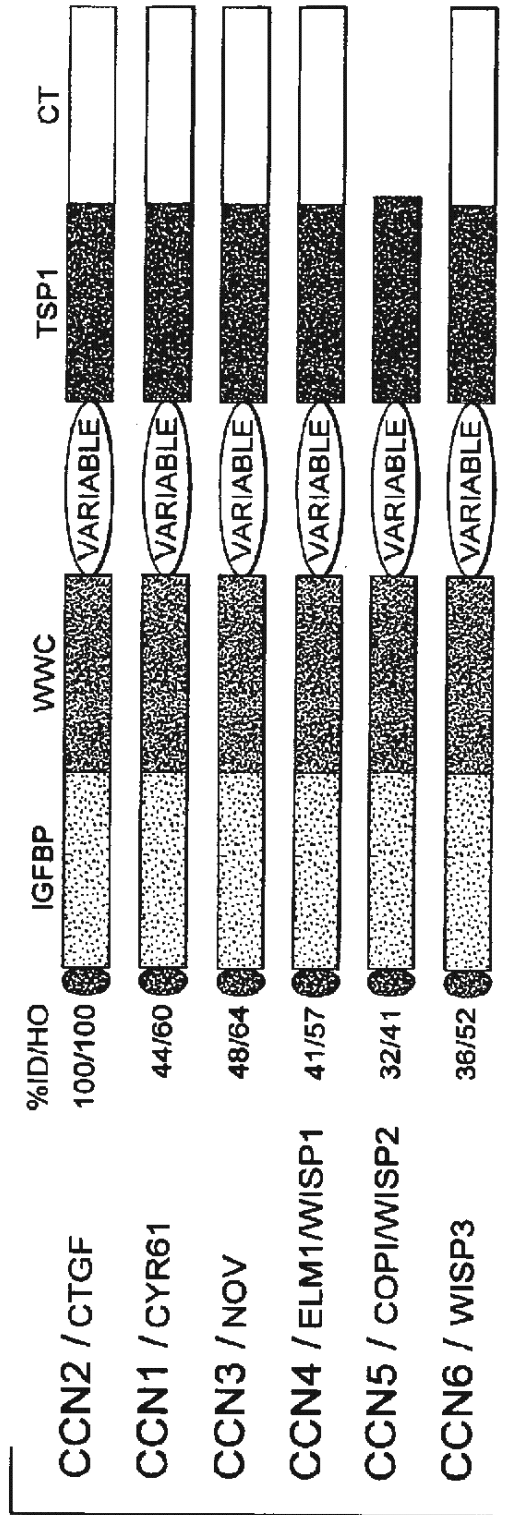


FIG. 2

SECUENCIA ORIGINAL - CCN3 DE RATÓN (NOV)

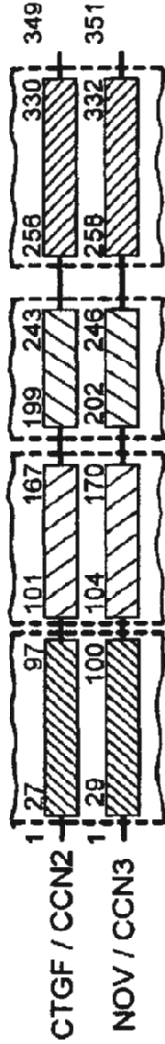
MSLFLRKRCLCLGFLLFHLLSQVSASLRCPPKCPSPISPTCAPGVRSVLDGCSCCP
 VCARQGESCSSEMRPCDQSSGLYCDRSADPNNQTGICMVPEGDNCVFDGVIYRNGEKFE
 PNCQYFCTCRDGGIIGCLPRCQLDVLPGPDCPAPRKVAVPGECCCKWTSGSDEQGTQGT
 LGGLALPAYRPEATVGEVSDSSINCIETTEWSACSKSCGMGVSTRVTNRNRQCEMVK
 QTRLCIVRPEQEPEEVTDKKGGKCLRKKSLKAIHLQFENCISLYTYKPPFCGVCSDG
 RCCTPHNTKTIQVEFQCLPGEI IKKPVVMVIGTCTCYSNCFQNNQNEAFLQDLELKTSRGEI

**SECUENCIA MODIFICADA USADA PARA DISEÑAR PÉPTIDOS - SUSTITUCIÓN DE
 CISTEINA POR SERINA**

MSLFLRKRSLSLGFLLFHLLSQVSASLRSRSPFPKSPISPTSAFVRSVLDGSSSSP
 VSARQGESSESSEMRPSDQSSGLYSDRSADPNNQTGISMVPEGDNSVFDGVIYRNGEKFE
 PNSQYFSTSRDGGIIGSLPRSOLDVLPGPDCPAPRKVAVPGESEKWTSGSDEQGTQGT
 LGGLALPAYRPEATVGEVSDSSINSIETTEWSASSKSCGMGVSTRVTNRNRQSEMVK
 QTRLSIVRPEQEPEEVTDKKGGKSLRKKSLKAIHLQFENSTSLTYKPPFRFSGVSSDG
 RSSTPHNTKTIQVEFQSLPGEI IKKPVVMVIGTSTSYSNSPQNNQNEAFLQDLELKTSRGEI

FIG. 3

MSLFLRKRSLSLGFL 1	WSASSKSSGMGVSTR 22	(PARTE DE #23)
SLGFLLFHLLSQVSA 2	GVSTRVTRNRNRQSEM 23	(PARTE DE #29 Y #30)
SQVSASLRSPSRSP 3	RQSEMVKQTRLIVR 24	(PARTE DE #8 Y #9)
RSPSRSPKSPSISPTSA 4	LSIVRPSEQEPEEVT 25	(PARTE DE #s 20,21,22)
SPTSAPGVRSVLDGS 5	PEEVTDKKGGKSLRT 26	(PARTE DE #s 20,21,22)
VLDGSSSPVSARQR 6	KSLRTKKSLKAIHLQ 27	
SARQRGESSSEMRRPS 7	AIHLQFENSTSLYTY 28	
EMRPSDQSSGLYSDR 8	SLYTYKPRFSGVSSD 29	
LYSDRSADPNNTGTI 9	GVSSDGRSSTPHNTK 30	
NOTGISMVPEGDNV 10	PHNTKTIQVEFFQSLP 31	
GDNSVFDGVIYRNGE 11	FQSLPGEIHKPVMV 32	
YRNGEKFEPNQYF 12	KPVMVIGTSTSYSNS 33	
SOYFSTSRDGGIGSL 13	SNSPQNNEAFLQDL 34	
QIGSLPRSQLDVLLP 14	AFLQDLELKTSGEI 35	
DVLLPGPDSAPRKY 15	<u>KQTRLIVRPSEQ 36</u>	
APRKVAVPGESSEK 16	<u>FSGVSSDGRSSTPH 37</u>	
SSEKWTSGSDEQGTQGT 17	<u>SDRSADPNNTGTIS 38</u>	
DEQGTQGTIGGLALP 18	<u>QTTEW SASSKSSGMG 39</u>	
LALPAYRPEATVGV 19	<u>SSKSSGMGVSTRVTN 40</u>	
ATVGVVEVSDSSINSI 20		
SINSIEQTTEWSASS 21		



RESULTADOS DE SIM CON

SECUENCIA 1: HCCN2 (349 RESIDUOS) NM 001901
 SECUENCIA 2: HCCN3 (357 RESIDUOS) NM 002514

53,2 % DE IDENTIDAD EN 325 RESIDUOS SOPALANTES; PUNTUACIÓN 995,0; FRECUENCIA DE HUECOS: 1,2

FIG. 4

- HCCN2 15 VLLALCSRPAVGNCSGEC -- RCPDEPAPRCPAGVSLVLDGCGCCRVCAKQLGELCTERD
- HCCN3 21 LLLHLGQVAATQRCPPQCPGRCPATP - PTCAPGVRAYLDGCSCLVCARQGESCSdle
- HCCN2 73 PCDPHKGLFCDFGSPANKIGVCTAKDGAPCFIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVG
- HCCN3 80 PCDESSGLYCDRSADPSNQIGICTAVEGDNCVEDGVIYRSGEKFPSCFKQCTCRDGOIG
- HCCN2 133 CMPICSMVDVRLPSPDCPFRVRVYKLPKGCCEEWVDEPKDQTVVGPALAAAYRLEDTFGPDP
- HCCN3 140 CVPRCQLDVLLPEPNCPPARPKVEVPGECCWKICGPDDEEDSLGGLTLAAYREATLQVEV
- HCCN2 193 TMIRANCLVQTTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENI - K
- HCCN3 200 SDSSVNCIEQTTTEWTACSKSCGMGFSTRVTNRNRQCEMLKQTRLCMVRPCEPEQPTDK
- HCCN2 252 KGKKCI RTPKISKPIKFTSLSGCTSMKTYRAKFCGVCTDGRCCTPHRTTTTLEVEFKCPDGE
- HCCN3 260 KGKKCLRTKKSLKAIHLQFNKCTSLHTYKPRFCGVCSGDGPCCTPHNTKTIQABFQCSPGQ
- HCCN2 312 VMKKNMMFIKTCACHYNCFGDNDIF
- HCCN3 320 IVKKPVMVIGTCTCHTNCPKNEAF

58,3 % DE IDENTIDAD EN 12 RESIDUOS SOPALANTES; PUNTUACIÓN 41,0; FRECUENCIA DE HUECOS: 0,0

```

-----1-----3-----5-----
MSLFLRKRSLGLFLHLLSQVSAASLRSPSRPPKSPSISPTSAFGVRSVLDGSSSSP
-----2-----4-----6-----
-----7-----9-----11-----
VSAQRGESSEMRPSDQSSGLYSDRSADPNNQIGISMVPEGDNVFDGVIYRNGEKFE
-----6-----8-----10-----12-----
-----13-----15-----17-----
PNSQYFSTRDQIGSLPRSQLDVLPGPDPAPRKAIVAPGESSEKWTSGDEQGTQGT
-----12-----14-----16-----18-----
-----19-----21-----23-----
LGGALPAYRPEATVGVESDSSINSIEQTTENSASKSSGGMGVSTRVTRNRNQSEMVK
-----18-----20-----22-----24-----
-----25-----27-----29-----
QTRLIVRPSQEPPEEVDKKGKSLRTPKSLKAHLQFENSTSLYTKPRRFSGVSSDG
-----24-----26-----28-----30-----
-----31-----33-----35-----
RSSTPHNTKIQVEFQSLPGEIHKPVMVIGTSTSYNSPQNNEAFLQDLELKTSRGEI
-----30-----32-----34-----

```

FIG. 5

MUESTRA REGIONES EN LA SECUENCIA DE CCN3 SELECCIONADAS- TODAS LAS CISTEINAS SE SUSTITUYERON POR SERINAS (ITAL COMO SE MUESTRA). LA LINEA DISCONTINUA MUESTRA PÉPTIDOS SOLAPANTES FABRICADOS. LA NEGRITA MUESTRA SECUENCIA DE PÉPTIDOS DISEÑADOS PARA REGIONES ESPECÍFICAS, QUE TAMBIÉN SE SOLAPAN CON OTROS FABRICADOS.

FIG.6

A PARTIR DEL ELEMENTO SIMILAR A TROMBOSPONDINA (TSP), DE CCN3 DE RATÓN:

(CCN3p 39) QTTEWSACSKSCGM APROX. 90 % DE HOMOLOGÍA, SECUENCIA APROX. 206-220

(CCN3p 40) CSKSCGMGVSTRVTN APROX. 90 % DE HOMOLOGÍA, SECUENCIA APROX. 213-227

(CCN3p 36) KQTRLCIVRPCEQ APROX. 50 % DE HOMOLOGÍA, SECUENCIA APROX. 236-248

A PARTIR DEL ELEMENTO C-TERMINAL, CCN3 DE RATÓN

(CCN3p 37) FCGVCS DGRCC TPH APROX. 92,9 % DE HOMOLOGÍA, SECUENCIA APROX. 289-302

A PARTIR DEL ELEMENTO DEL DOMINIO DE UNIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A INSULINA (IGFBD), CCN3 DR

(CCN3p 38) CDRSADPN NQTGIC APROX. 28 % DE HOMOLOGÍA, SECUENCIA APROX. 84-98

FIG. 7A

PÉPTIDOS FABRICADOS Y ENSAYADOS (CON CUALESQUIERA CISTEÍNAS [C]
DESCUBIERTAS EN LA SECUENCIA NATURAL SUSTITUIDAS POR SERINAS [S])

CCN3p37
CCN3p38

ACETYL-FSGVSSDGRSSTPH-NH2
ACETYL-SDRSADPNNTGIGIS-NH2

FIG. 7B

SECUENCIA NATURAL EQUIVALENTE (ES DECIR CON CISTEÍNAS)

CCN3p37 (SER HUMANO Y RATÓN)
CCN3p38 (RATÓN)
CCN3p38 (SER HUMANO)

FCGVSDGRCCTPH (ES IGUAL EN RATÓN Y SERES HUMANOS)
CDRSADPNNTGIG
CDRSADPSNQTGIC (CCN3) DE SER HUMANO ES DIFERENTE EN UN AA DE LA DE RATÓN

* LA LETRA EN NEGRITA (AA) INDICA QUE LA SECUENCIA ES DIFERENTE EN ESTA
POSICIÓN DE LA FABRICADA Y ENSAYADA

FIG. 7C

SECUENCIA NATURAL DE CCN2 Y CCN3 HUMANA EN LAS REGIONES SELECCIONADAS PARA CCN3p37 Y CCN3p38 CON CISTEINAS INTACTAS

FCGVCTDGRRCCTPH	CCN2 HUMANO (LA NEGRITA MUESTRA DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA CON CCN3)
FCGVCS DGRRCCTPH	CCN3p37 HUMANO CON CISTEINAS INTACTAS
CDFGSPANRKIGVC	CCN2 HUMANO (LA NEGRITA MUESTRA DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA CON CCN3)
CDRSADPSNQTGIC	CCN3p38 HUMANO CON CISTEINAS INTACTAS

* NÓTESE QUE LA SECUENCIA PARA CCN2 ES A MENUDO BASTANTE DIFERENTE DE LA CCN3 INCLUSO EN ALINEAMIENTO ÓPTIMO

FIG. 7D

SECUENCIA NATURAL DE CCN2 Y CCN3 DE RATÓN EN LAS REGIONES SELECCIONADAS PARA CCN3p37 Y CCN3p38 CON CISTEINAS INTACTAS

FCGVCTDGRRCCTPH	CCN2 DE RATÓN (LA NEGRITA MUESTRA DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA CON CCN3)
FCGVCS DGRRCCTPH	CCN3p37 DE RATÓN CON CISTEINAS INTACTAS (IGUAL QUE LA HUMANA ANTERIOR)
CDFGSPANRKIGVC	CCN2 DE RATÓN (LA NEGRITA MUESTRA DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA CON CCN3)
CDRSADPNNQTGIC	CCN3p38 DE RATÓN CON CISTEINAS INTACTAS (DIFERENTE EN 1 AA DE LA HUMANA ANTERIOR EN CCN3)

* NÓTESE QUE LA SECUENCIA PARA CCN2 ES A MENUDO BASTANTE DIFERENTE DE LA CCN3 INCLUSO EN ALINEAMIENTO ÓPTIMO

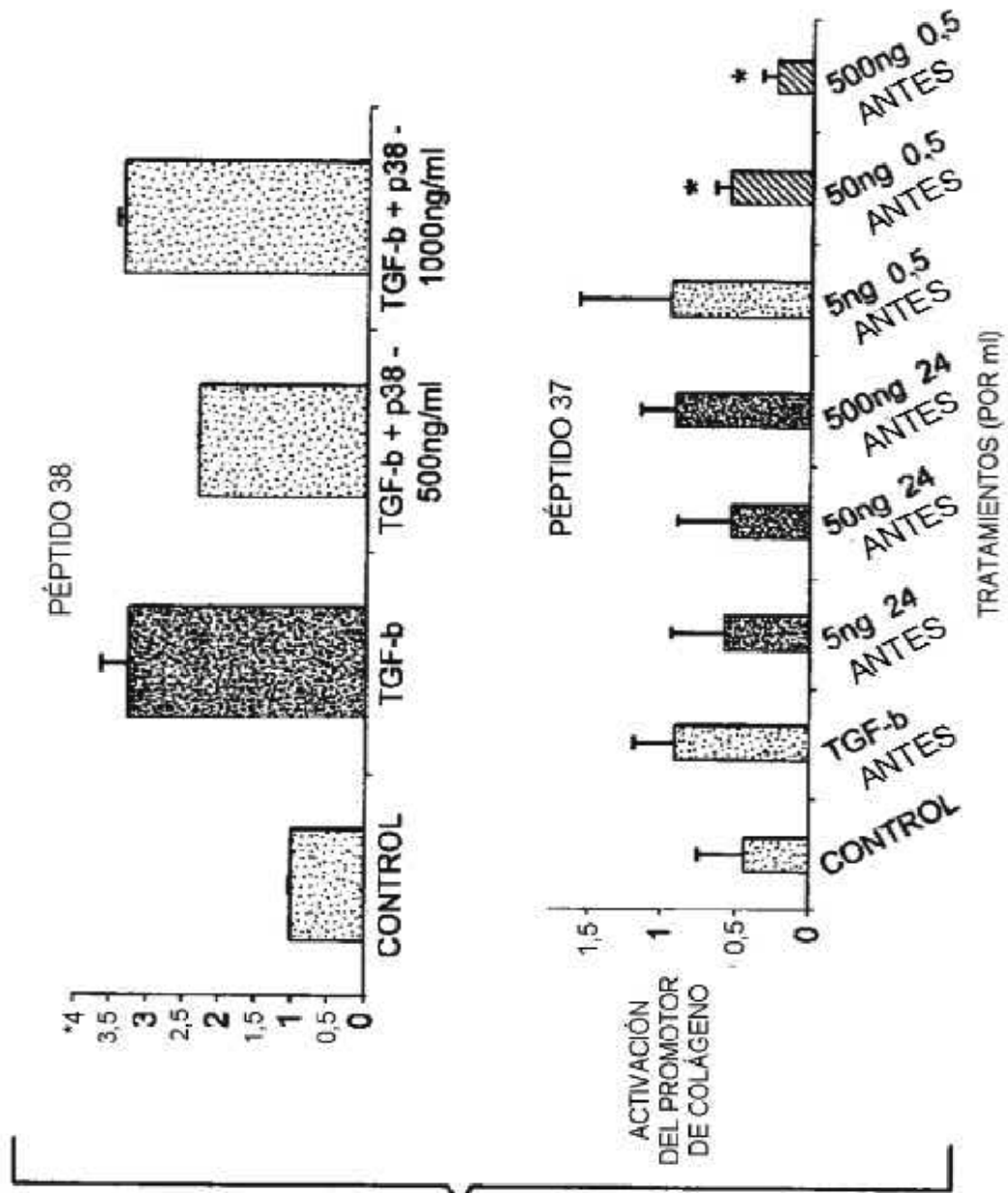


FIG. 8

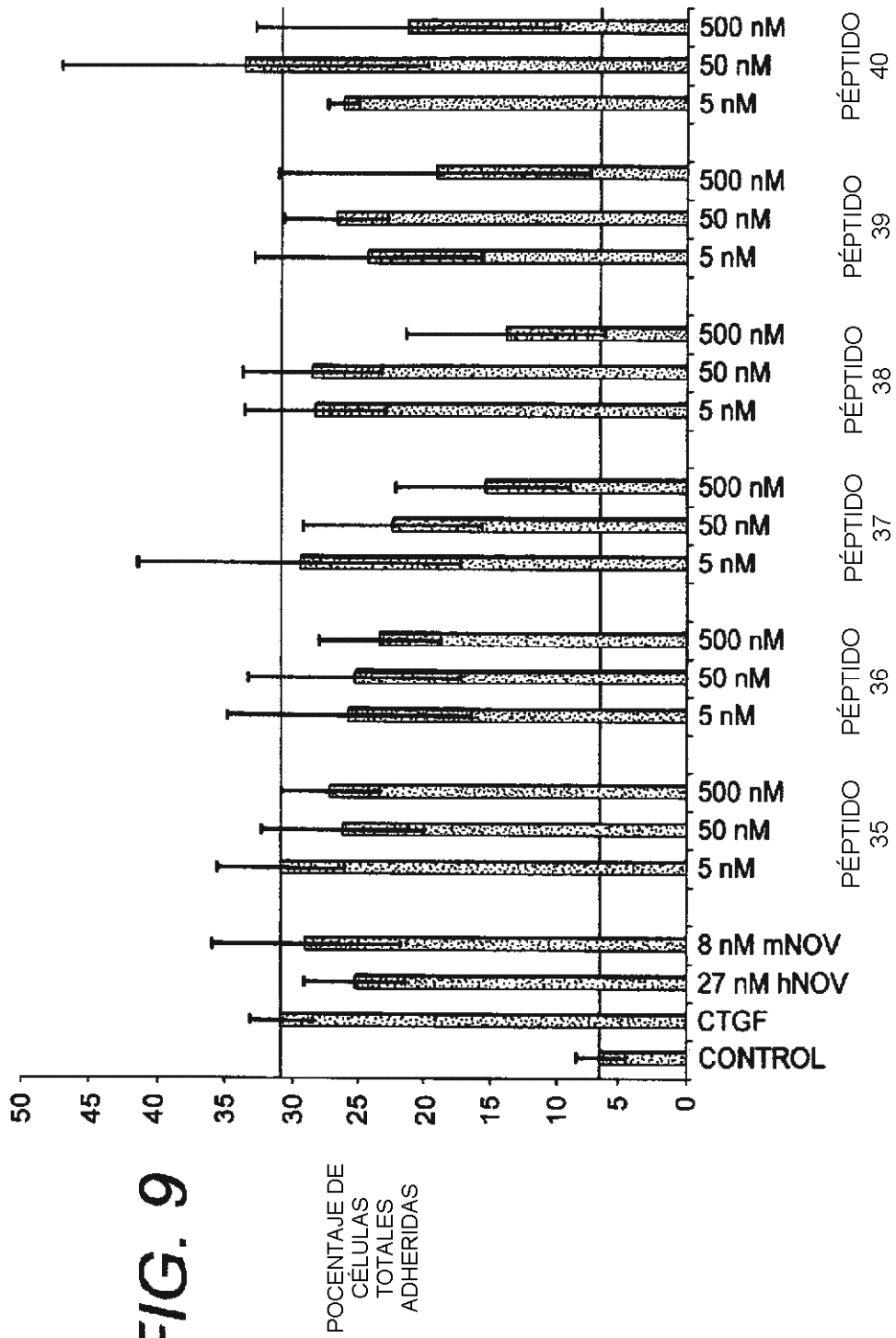


FIG. 10A

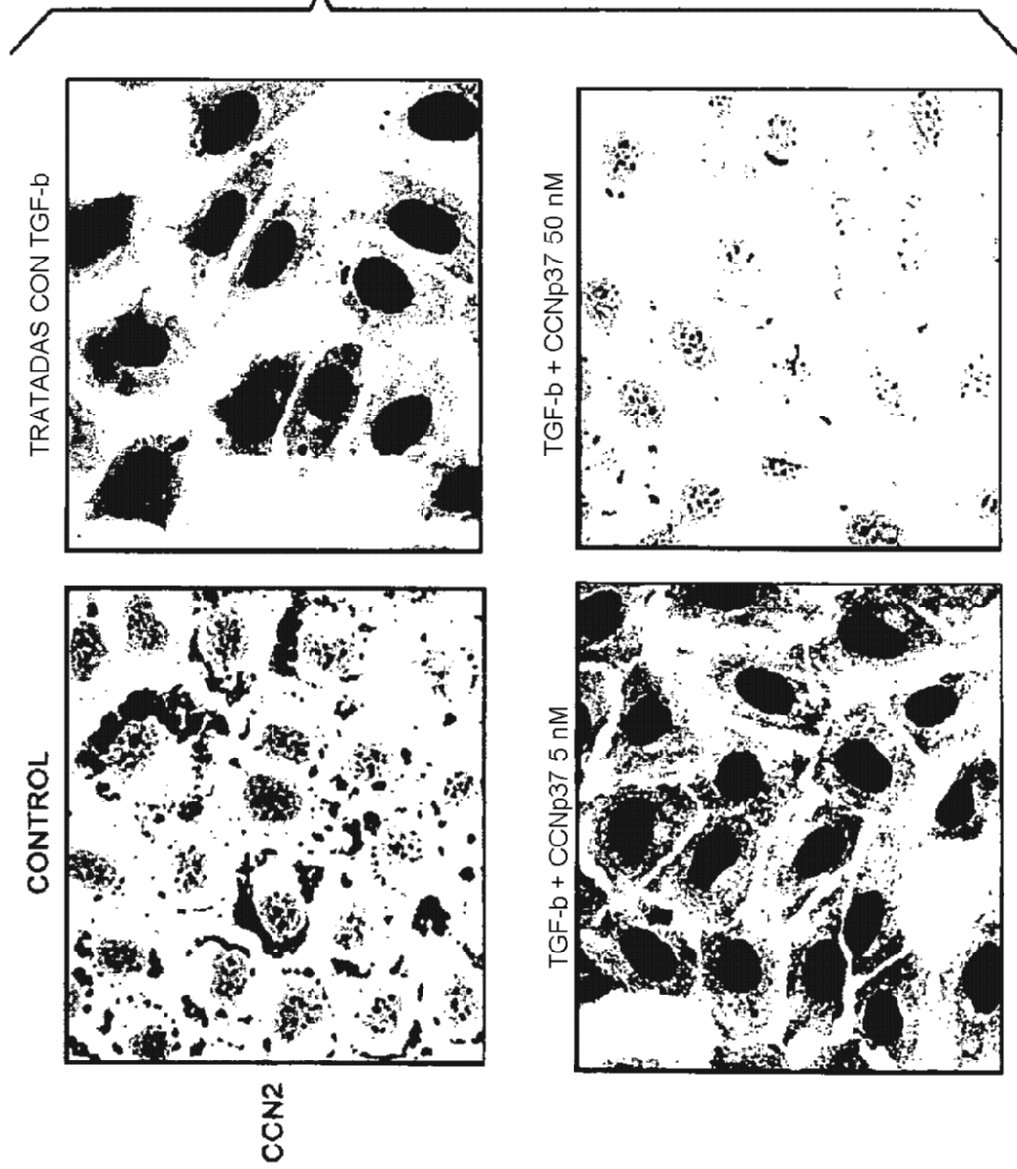
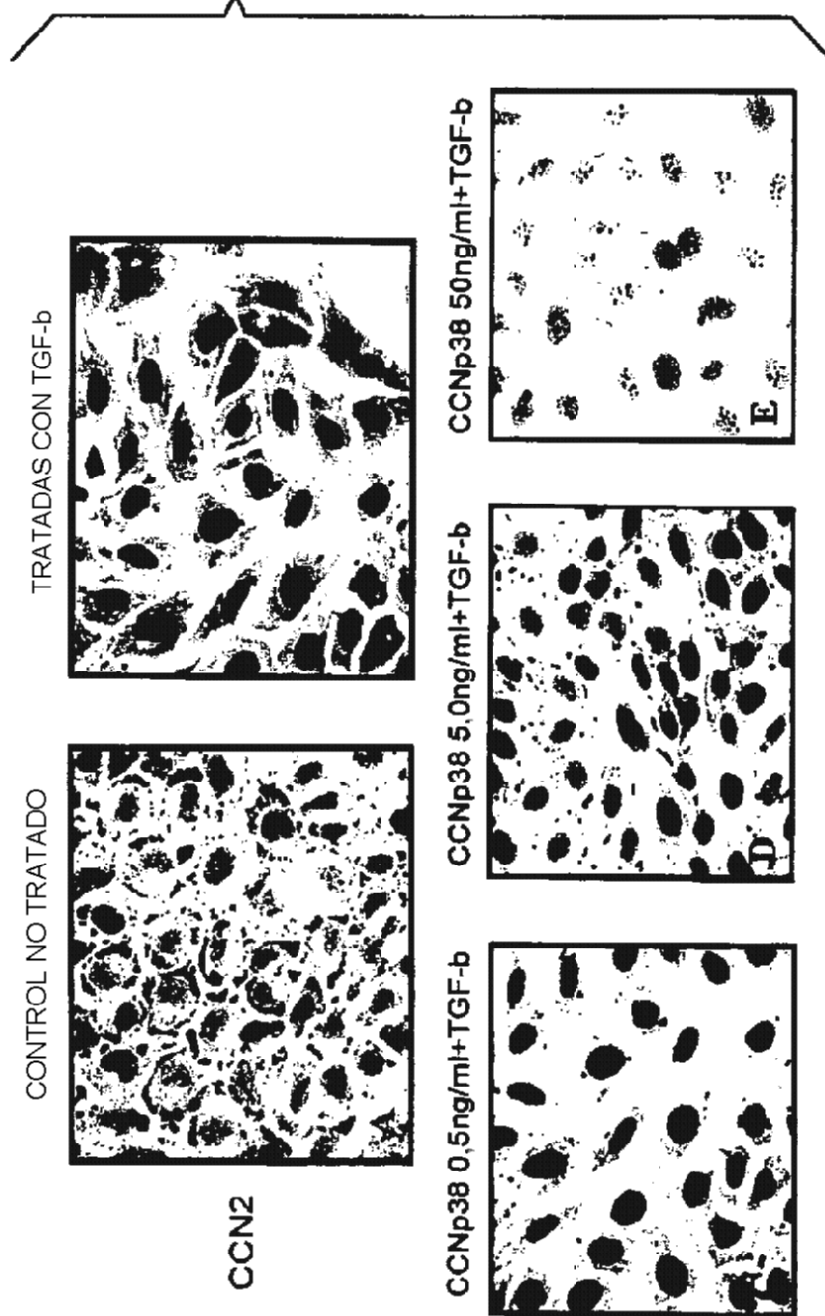


FIG. 10B



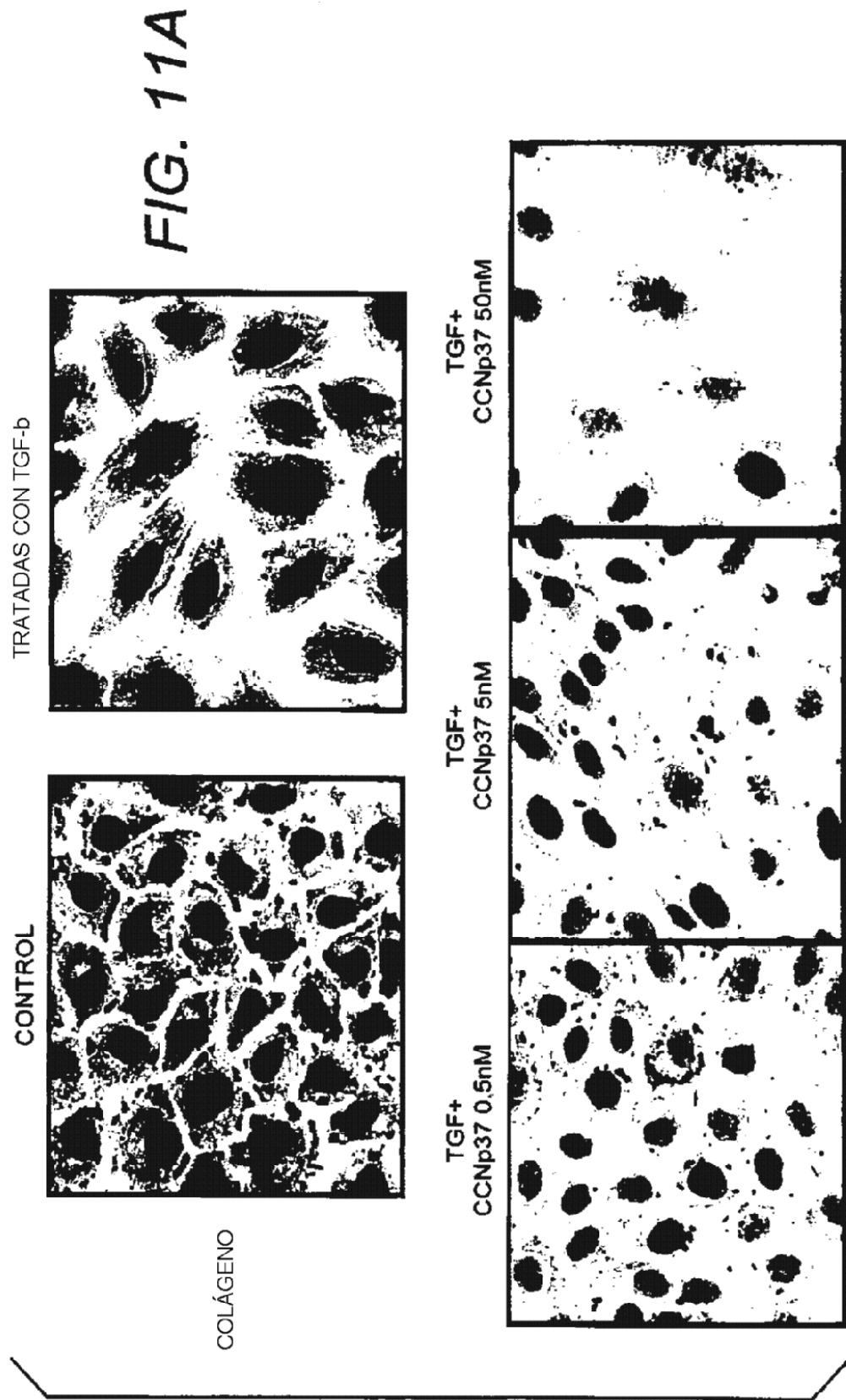
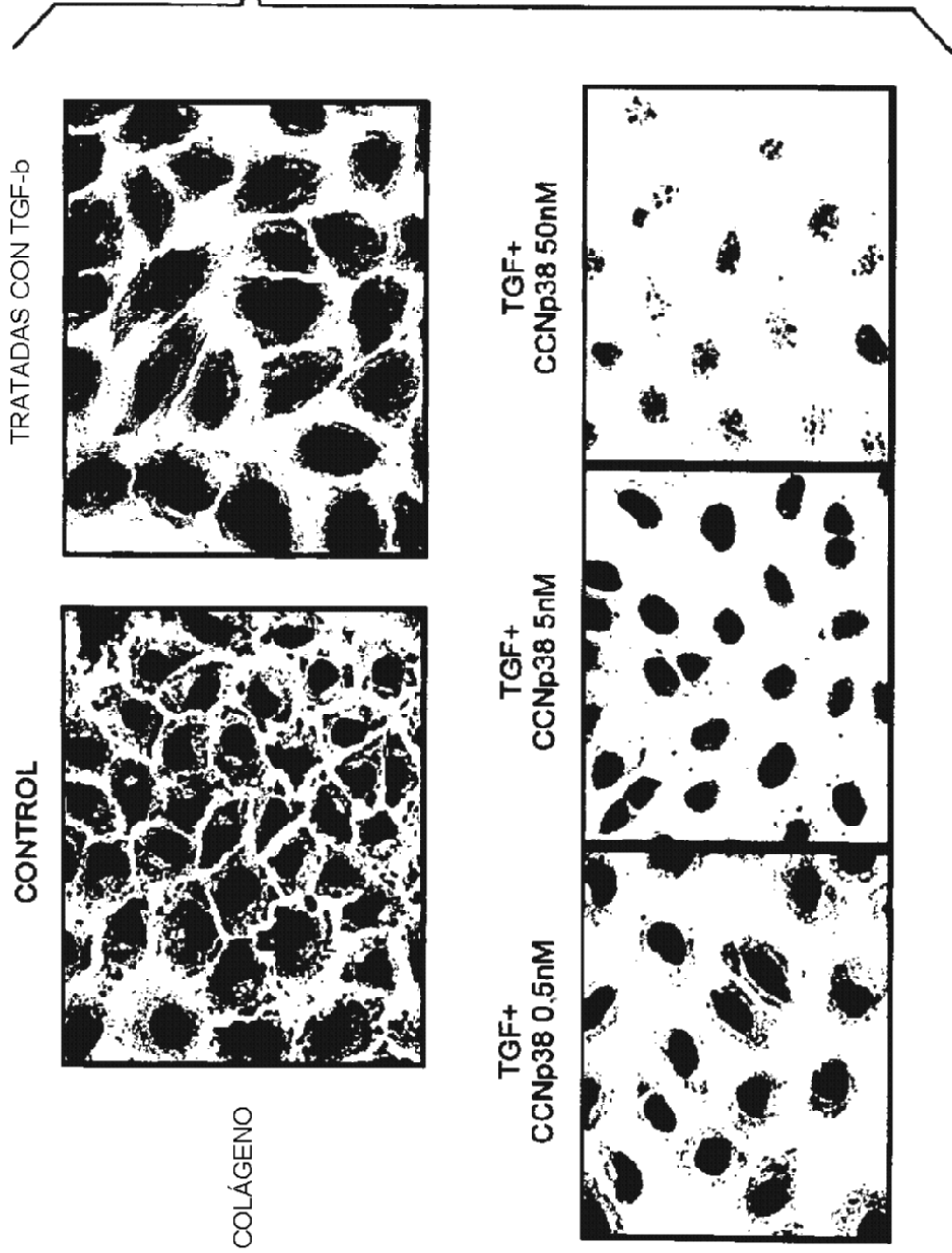


FIG. 11B



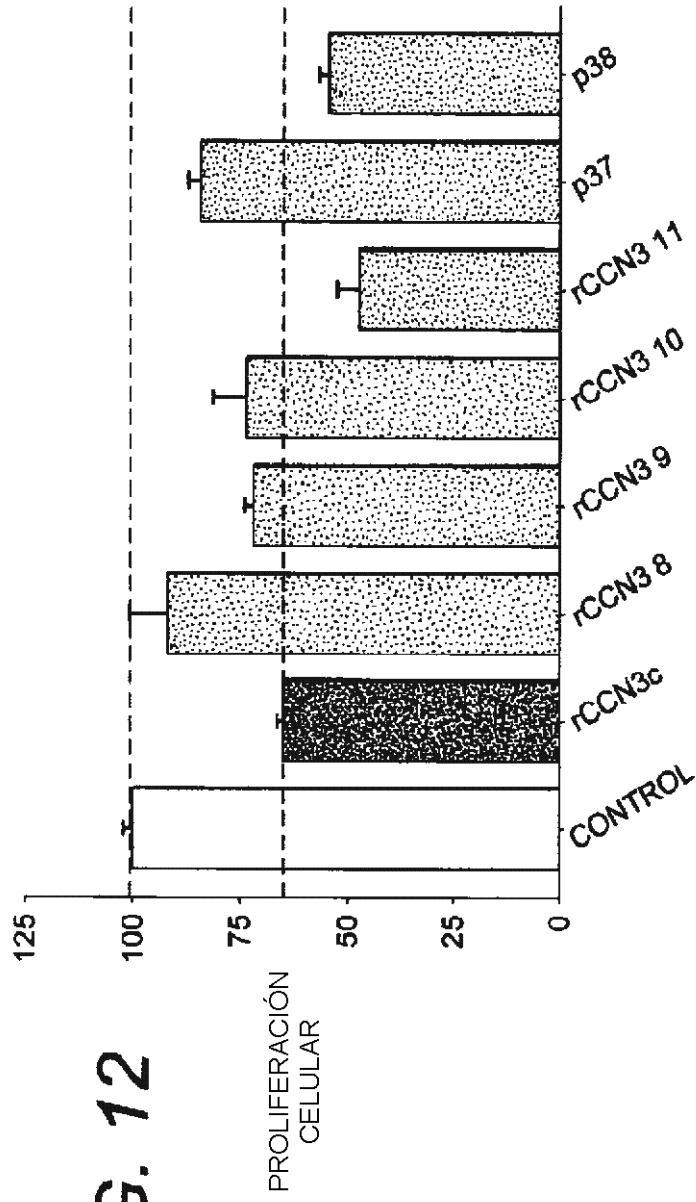


FIG. 12

EL PÉPTIDO C38, Y EN MENOR MEDIDA EL C37, INHIBEN EL CRECIMIENTO Y LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOGENA CRÓNICA HUMANA.