

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 648**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2012 PCT/CN2012/078378**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13026334**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12825332 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2749568**

54 Título: **Prevención de la síntesis de ADN celular y polipéptido de inhibición de la proliferación celular y uso de esto**

30 Prioridad:

23.08.2011 CN 201110242869

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

03.04.2017

73 Titular/es:

**WUHAN YICHENG BIOTECH, INC. (100.0%)
Building B1, Room 525, New Drug Incubation
Platform, No. 666 Gaoxin Avenue, East Lake Hi-
tech Development Zone
Wuhan, Hubei 430074, CN**

72 Inventor/es:

**HU, JUNBO;
XIA, XIANMIN y
WANG, GUIHUA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 607 648 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

Prevención de la síntesis de ADN celular y polipéptido de inhibición de la proliferación celular y uso de esto

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de la bioingeniería médica, y se refiere a un polipéptido que previene la síntesis de ADN y la inhibición de la proliferación celular, así como su uso.

Antecedentes de la invención

10 El tumor es un tipo de enfermedad estrictamente peligrosa para la salud humana, para la cual, la quimioterapia, la radioterapia y el tratamiento quirúrgico se aplican en la clínica. Estos métodos han formado relativamente maduro sistema terapéutico, y obtuvo buenos efectos. Sin embargo, como hay baja selectividad en medicina para el tratamiento de tumores ahora de uso común, es difícil evitar tales desventajas como efectos tóxicos y secundarios fuertes y pequeñas ventanas terapéuticas entre células normales y el tumor y el potencial de desarrollo para mejorar aún más los efectos del tratamiento incluso alcanzar el objetivo de curar es limitado, por lo que es urgente desarrollar nuevos métodos terapéuticos eficaces.

15 El rápido desarrollo de la biología de las células tumorales en los últimos años ofrece una posibilidad real de satisfacer esta necesidad social, entre los cuales, con la iluminación de las vías de transducción de señalización, se encuentran cada vez más objetivos de fármacos que pueden usarse para el tratamiento de tumores. Y algunos de ellos se han aplicado con éxito en la clínica y se obtuvo muy buenos efectos. Por ejemplo, la proteína BCR-ABL se expresa en muchas células de leucemia, que tiene una actividad de proteína quinasa relativamente fuerte y juega un papel importante en la aparición y desarrollo de leucemia. A través del estudio de la estructura de la proteína BCR-ABL, muchos compuestos que pueden inhibir específicamente su actividad biológica son diseñados y producidos, y los medicamentos, incluyendo Glivec se utilizan en el tratamiento de pacientes con leucemia. El Glivec es la primera opción para el tratamiento de muchos tipos de leucemia y otros tumores en la actualidad.

25 Las señales de crecimiento celular se transmiten al núcleo celular mediante fármacos promotores del crecimiento dentro y fuera de las células a través de una serie de proteínas, provocando el cambio de estructura y función de muchas ciclinas reguladoras y conduciendo a la división celular. Entre estas proteínas que regulan el ciclo celular, la proliferación de células del antígeno nuclear (PCNA) juega un papel importante. La horquilla de replicación de ADN es el complejo de proteínas clave de la síntesis de ADN en la replicación del ADN y PCNA es una composición de complejo de horquilla de replicación de ADN. Puede unir ADN y muchos tipos de proteínas, especialmente la ADN polimerasa necesaria para la replicación del ADN, y hacer que la ADN polimerasa facilite la síntesis de nuevas cadenas de ADN que participan en la replicación del ADN. PCNA existe en todas las células en división, debido a la función vital de PCNA en el ciclo celular, para bloquear su función biológica en el ciclo celular es una manera ascendente de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de tumores y otras enfermedades resultantes de la proliferación celular anormal. Hasta ahora, como el mecanismo que PCNA participa en la regulación del ciclo celular se desconoce, en la actualidad no hay ningún método útil o compuesto que puede bloquear directamente la función biológica de PCNA para inhibir el crecimiento celular.

35 El documento WO 2008/089645 A1 proporciona un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido que inhibe el crecimiento celular, un dominio de transducción de proteínas y un marcador His, en el que el polipéptido que inhibe el crecimiento celular consiste en 25 aminoácidos del extremo amino de la proteína p55PIK. Se dice que el polipéptido de fusión es capaz de inhibir el crecimiento celular y tratar enfermedades tumorales.

40 Los datos UniProt baso 8 de abril de 2008 "SubName: Completo = fosfatidilinositol 3-quinasa gamma subunidad reguladora.

{EC0:0000313I Ensembl: ENSMUSP00040118568}; Banderas: Framento; "describe la subunidad reguladora 82aa de fosfatidilinositol 3-quinasa de ratón gamma que comprende MPYSTEELIFYIEMDP.

Sumario de la invención

45 La invención proporciona también un polipéptido fusionado PTD-P15 que se caracteriza por su secuencia de aminoácidos: ácido arginina-asparagínico -leucina-tirosina -ácido asparagínico ácido asparagínico ácido asparagínico ácido asparagínico lisina ácido asparagínico arginina metionina - Prolina - tirosina - serina - treonina - ácido glutámico - leucina - isoleucina - fenilalanina - tirosina - isoleucina - ácido glutámico - metionina - ácido asparagínico - prolina.

50 La invención también proporciona el uso del polipéptido fusionado PTD-P15 en la preparación de fármacos para el tratamiento de tumores y otras enfermedades asociadas con el crecimiento celular anormal.

En esta investigación, se ha encontrado la interacción entre un fragmento polipeptídico y PCNA. La secuencia de aminoácidos del fragmento es: metionina - prolina - tirosina - serina - treonina - ácido glutámico - leucina - isoleucina - fenilalanina - tirosina - isoleucina - ácido glutámico - metionina - ácido asparagínico - prolina (ver Lista de

Secuencias de Aminoácidos y Nucleótidos); En lo sucesivo el polipéptido se denomina P15. Y también se observa que, después de la unión de P15 y PCNA, la unión de PCNA y ADN polimerasa se bloquea, mientras que la ADN polimerasa unida a PCNA es necesaria para la replicación del ADN, un proceso importante en ciclo celular. De acuerdo con este resultado, se supone que si P15 se expresa en células, el polipéptido puede inhibir la unión de PCNA y ADN polimerasa, inhibiendo adicionalmente la replicación del ADN mediada por la ADN polimerasa y previniendo la división celular.

La clave para testificar el modelo anterior es introducir P15 en las células y observar el impacto de P 15 en la división celular. Para lograr este objetivo, en virtud de las técnicas de biología molecular, se creó una construcción de ADN que codifica la proteína fusionada que comprende P15 y la proteína fluorescente verde (GFP), luego transfirió la construcción a células humanas cultivadas y luego observó el cambio de la proteína fusible expresada P15-GFP en ciclo celular. Además, se produjo un polipéptido fusionado PTD-P15 que comprende un fragmento polipeptídico con la capacidad de penetrar en la citomembrana y P15 por medio de síntesis artificial; La secuencia de aminoácidos de PTD es: arginina - ácido asparagínico - leucina - tirosina - ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - lisina - ácido asparagínico - arginina. Se añadió PTD-P15 en células cultivadas y se observó el impacto de P15 en las células en el ciclo celular. Para observar el impacto de P15 sobre el crecimiento del tumor en el modelo animal, se observó si PTD-P15 podría inhibir el crecimiento de tumor en el modelo animal mediante la inyección de PTD-P15 en la vena caudal de ratones pequeños.

Los resultados del experimento muestran que cuando P15 se expresa en varios tipos de líneas celulares cultivadas con capacidades de crecimiento y división o se añade PTD-P15, P15 inhibirá la capacidad de PCNA para unirse a ADN polimerasa, causando una reducción significativa en el índice observacional. Con respecto a la síntesis del ADN y otros varios testificando el crecimiento celular, lo que demuestra que P15 tiene la capacidad de inhibir la proliferación celular; Y la inyección de PTD-P15 puede inhibir la proliferación celular y el crecimiento de tumor en modelo animal.

En comparación con los métodos existentes utilizados para inhibir la proliferación celular, la aplicación de la invención consiguió los siguientes efectos:

- 1) P15 tiene la capacidad de bloquear PCNA de ADN polimerasa de unión, por lo tanto, la replicación del ADN facilitada por la ADN polimerasa se inhibe, dando lugar a detención del ciclo celular. Esto proporciona un nuevo método y enfoque para diseñar y seleccionar nuevos fármacos para el tratamiento de tumores y otras enfermedades resultantes del crecimiento anormal de células. Simultáneamente, PTD-P15 puede inhibir eficazmente el crecimiento del tumor. Esto demuestra que P15 todavía tiene el efecto biológico de inhibir el crecimiento celular incluso después de penetrar en la citomembrana, y también muestra que polipéptidos o moléculas con la capacidad de penetrar la citomembrana pueden usarse para ayudar a P15 con actividad biológica a penetrar en la citomembrana.
- 2) P15 tiene efectos tóxicos y secundarios bajos y antigenicidad débil, y de acuerdo con los resultados experimentales, se encuentra que, sin impacto evidente en la apoptosis, P15 no tiene un efecto letal obvio sobre las células normales. Cuando se añade PTD-P15 a células cultivadas o se aplica a animales, no se observa toxicidad obvia.
- 3) Tanto P15 como PTD-P15 expresados en células pueden inhibir eficazmente el crecimiento de células tumorales de seres humanos y ratones in vivo y sistemas de cultivo in vitro. Esto demuestra que P15 tiene ventajas tales como alta eficiencia y amplio espectro en el tratamiento de tumores y otras enfermedades que resultan del crecimiento anormal de células.
- 4) Con un pequeño peso molecular, PTD-P15 puede ser sintetizado químicamente, y es conveniente para la aplicación directa a gran escala en la clínica. Y también, podemos inyectar P15 en células usando otros métodos (por ejemplo, el uso de plásmido o vectores de virus) para tratar el tumor y otras enfermedades resultantes de la proliferación celular anormal.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: PTD-P15 bloquea PCNA de ADN polimerasa de unión. Se cultivaron células de cáncer rectal HT29 de pacientes en placas de cultivo, en las que se añadieron el polipéptido de control o diferentes cantidades de PTD-P15. Después de una noche de cultivo, se recogieron las células y se ensayó la cantidad de ADN polimerasa unida por PCNA en células con co-immunoprecipitación. Los resultados muestran que la adición de PTD-P15 puede reducir la ADN polimerasa unida por PCNA, porque la cantidad de ADN polimerasa unida por PCNA está estrechamente relacionada con la replicación del ADN. Por lo tanto, se muestra que, PTD-P15 puede disminuir la velocidad de replicación del ADN. Mientras se bloquea la capacidad de PCNA para unirse a ADN polimerasa, se inhibe la función de la polimerasa para facilitar la replicación del ADN y se bloquea la división celular.

Las Figuras, 2a, 2b, 2c and 2d: diferentes ciclos celulares inhibidos por PTD-P 15. HT29 células de cáncer rectal de los pacientes por lo que se cultivaron en platos de cultivo, en el que el polipéptido de control o diferentes cantidades de PTD-P15 se añadieron. Después de 24 horas de cultivo, se recogieron las células y se probó el porcentaje de células en diferentes ciclos celulares. Los resultados muestran que PTD-P15 puede aumentar las cantidades de células en la fase G0 / G, mientras que disminuye la cantidad de células en la fase S y G2 / M. Esto demuestra que PTD-P 15 puede inhibir el ciclo celular.

Descripción detallada de las realizaciones

La invención se demostrará e ilustrará en virtud de experimentos concretos y datos a continuación, pero dejaremos en claro que estas realizaciones no son limitación de la invención. Está demostrado que P 15 tiene eficacia en la inhibición de la proliferación celular y el crecimiento tumoral en los siguientes experimentos, incluyendo, pero sin limitarse a lo siguiente.

Ejemplo 1 Ensayo de expresión de P15-GFP por construcción de ADN después de codificación de cADN P15 introducido en pEGFP.

El vector pEGFP - N 1 se adquirió de American Clontech (Cat No. 6085 - 1). El plásmido que incluye el cADN que puede codificar GFP se digirió con EcoRI-BamHI (adquirido de American Promega, Cat N° R6011, R6021), y luego el plásmido digerido se separó y se purificó en gel de agarosa para una futura reacción acoplada. El kit de reactivos utilizado para la recuperación del fragmento de ADN se adquirió de la alemana Qiagen (Cat No. 28704).

El cADN que codifica P15 era de ADN bicatenario por medio de síntesis artificial, cuya secuencia es:

Una sola hebra 1

5 'TTTTGAATTCATGCCCTATTCGACAGAACTGATATTTTATATTGAAATGGATCCTGGATCC;

Hebra individual 2

5 'TTTTGGATCCAGGATCCATTTCAATATAAAATATCTGTTCTGTGCGAATAGGGCATGAATTC.

Después de mezclar, los dos hilos simples se combinaron en ADN de doble hebra. Después de la purificación (el kit de reactivos usado para la purificación comprado de la alemana Qiagen, Cat No. 28704), el resultado se digirió primero con EcoRI-BamHI; Y se purificó con gel de agarosa, después se llevó a reacción acoplada con el vehículo pEGFP-N1 después de digerir y purificar (el kit de reactivo utilizado para la reacción acoplada adquirida de Promega Americano, Cat No. M1801). Tras la transformación bacteriana (célula competente de Promega americana, Cat N ° L2001, se seleccionaron los clones positivos.) Después de que se demostró la corrección de la secuencia de cADN mediante la prueba de la secuencia de nucleótidos, el plásmido preparado se purificó a gran escala, Utilizado para la purificación a gran escala adquirida a la alemana Qiagen, Cat N ° A7270) para futuros experimentos. Este plásmido expresó una proteína fusionada consistió en P15 y GFP respectivamente en células eucariotas. La P15 expresada se conectó al extremo N de GFP y el fusible Proteína se denominó P15-GFP.

El kit de reactivos para transfección se adquirió de American Invitrogen (Cat No. 11668). El experimento de transfección se terminó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las células COS7 se cultivaron en un DMEM 35 de suero bovino con una concentración de masa del 10%. Después de transfectadas durante 48 horas, las células COS7 se lavaron dos veces con PBS. Se añadió el lisado siguiente para lisis celular. Después de que el ADN se dañó con onda ultrasónica, se añadieron cantidades apropiadas de 2-mercaptoetanol y azul de bromofenol. Después de que se dispuso en agua hirviendo durante 5 minutos y se almacenó en hielo, se extrajo la muestra y se añadió en gel SDS-poliacrilamida con una concentración de masa del 12% para electroforesis. La proteína separada se transfirió a una membrana de nylon a través de la cual se ensayó la generación de proteína fusionada con anticuerpo anti-GFP (adquirido a American Invitrogen, Cat N° R970) y los resultados demostraron la expresión de P15-GFP en las células.

Ejemplo 2: Experimento de expresión de P15 que inhibe el crecimiento celular y el ciclo celular

El impacto de P15 sobre el crecimiento celular se ensaya con NIH / 3T3 (células de fibroblastos y epiteliales, adquiridas de ATCC americana, Cat N° CRL-1658) y MCF-7 (línea de células de cáncer de mama, adquirida a ATCC americana, Cat No. HTB -22). Las células se cultivaron en un plato de cultivo celular de 10 cm que contenía un DMEM de suero bovino fetal al 10% (SBF) con una concentración de masa del 10% a 37°C bajo una condición de 5% de CO2 (volumen) / 95% de aire).

Plásmido utilizado para el experimento: pEGFP - P15 (para expresar la proteína fusionada P15 - GFP); Plásmido de control: pEGFP - N1.

Después de mezclar el plásmido para transfección y el reactivo de lipofectamina (adquirido de American Invitrogen, Cat No. 11668), la mezcla permaneció durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se introdujo primero en células (con una densidad celular de aproximadamente 50%) cultivadas en DMEM sin suero durante 5 horas de cultivo a 37°C y luego en SBF con una concentración de masa de 10% durante 48 horas de cultivo. Bajo el microscopio de fluorescencia, fue fácil distinguir las células que expresan GFP fusionado y las proteínas fluorescentes únicas y las que no expresan estas 55 proteínas. Además, mediante el uso de FCM, fue fácil separar y purificar las células de proteína fluorescente positiva. Los indicadores simbólicos para ensayar el crecimiento celular, tales como el ciclo celular, se usaron para estudiar y testificar el impacto de P15 sobre el crecimiento celular, mientras que en estos experimentos, sólo las células que expresan proteínas fluorescentes se usaron como grupo de control.

Primero, utilizamos el plásmido antes mencionado para transfectar 3T3 y MCF7, y usamos FCM para clasificar las células GFP positivas transfectadas con ADN y analizamos la distribución del ciclo de estas células dos días después.

5 Los resultados experimentales muestran que: la expresión de P15 no tiene efecto evidente en la apoptosis de las células, mientras que P15 puede inhibir el ciclo celular de entrar en la fase S y la inducción de células en la fase G₀ / G₁. Sus funciones se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1).

TABLA 1 Funciones de P15 en la inhibición del ciclo celular y la inducción de células en Fase G₀ / G₁

	Células 3T3			Células MCF7		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
GFP	32,4%	25,9%	41,7%	62,2%	22,6%	15,2%
P15-GFP	52,1%	22,1%	25,7%	85,6%	11,1%	3,3%

10 La síntesis de ADN es el símbolo de la proliferación celular. En el siguiente experimento, probamos el impacto de P15 sobre la síntesis de ADN 15. Dentro de las 15 horas después de 3T3 y MCF7 transfectando pEGFP-N1 y expresando el plásmido P15-GFP durante dos días, las células marcadas con BrdU que pueden penetrar en la cadena de ADN recién sintetizada se analizaron en fluido de cultivo celular. Las células GFP positivas en plásmido se detectaron y transfectaron con técnica de inmunofluorescencia, y se determinó la tasa positiva de penetración de BrdU en el ADN (esto refleja la velocidad de síntesis de ADN). Los resultados muestran que P15 también inhibió fuertemente la síntesis de ADN (mostrada en la Tabla 2).

TABLA 2 Síntesis de ADN inhibidor de P15

	Células 3T3		Células MCF7	
	BrdU Células positivas	Proporción de inhibición	BrdU Células positivas	Proporción de inhibición
GFP	53,8%	0%	31,2%	0%
P15-GFP	12,5%	76,8%	5,2%	83,4%

Ejemplo 3 Síntesis artificial del polipéptido fusionado PTD-P15 que comprende polipéptido con la capacidad de penetrar en la membrana celular y P15

20 De hecho, P15 no puede penetrar libremente en la membrana celular. Para observar el impacto de P15 sobre el ciclo celular y el crecimiento tumoral, sintetizamos artificialmente el polipéptido fusionado con P15 que puede penetrar en la membrana celular. El fusido se denominó PTD-P15 cuya secuencia de aminoácidos es: ácido arginina-asparagínico - leucina-tirosina-ácido asparagínico-ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - lisina - ácido asparagínico - arginina - metionina - prolina - tirosina - serina - treonina - ácido glutámico - leucina - isoleucina - fenilalanina - tirosina - isoleucina - ácido glutámico - metionina - ácido asparagínico - prolina; La secuencia de aminoácidos del fragmento P15 es metionina - prolina - tirosina - serina - treonina - ácido glutámico - leucina - isoleucina - fenilalanina - tirosina - isoleucina - ácido glutámico - metionina - ácido asparagínico - prolina; Y la del fragmento de PTD con la función de penetrar en la membrana celular es: ácido arginina - asparagínico - leucina - tirosina - ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - lisina - ácido asparagínico - arginina.

Entretanto, diseñamos y sintetizamos un polipéptido de control cuya secuencia de aminoácidos es: ácido asparagínico - arginina - arginina - ácido asparagínico - leucina - tirosina - ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - lisina - ácido asparagínico - Arginina - metionina - alanina - glicina - treonina - metionina.

35 **Ejemplo 4 PTD - P15 bloquea ADN polimerasa de unión de PCNA**

40 PTD-N15 bloquea la ADN polimerasa de unión a PCNA. Las células de cáncer rectal humano HT29 se cultivaron en placas de cultivo, en las que se añadieron el polipéptido de control o diferentes cantidades de PTD-P15. Después de una noche de cultivo, se recogieron las células y se ensayó la cantidad de ADN polimerasa unida por PCNA en células con co-inmunoprecipitación. Los resultados muestran que la adición de PTD-P15 CAN puede reducir la ADN polimerasa unida por PCNA, porque la cantidad de ADN polimerasa unida por PCNA está estrechamente relacionada con la replicación del ADN. En este sentido podemos decir que PTD-P15 puede disminuir la velocidad

de replicación del ADN. Siempre que se bloquee la capacidad de PCNA para unirse a ADN polimerasa, se inhibe la función de la polimerasa para facilitar la replicación del ADN y se bloquea la división celular (Figura 1).

Ejemplo 5 Experimento del impacto del polipéptido fusionado PTD-P15 sobre el crecimiento celular y el ciclo

5 El impacto de PTD-P15 sobre el crecimiento celular se ensayó con la línea celular HeLa humana (células Hela adquiridas de ATCC americana, Cat No. HTB-22). Las células Hela se cultivaron en placas de cultivo celular de 10 cm que contenían DMEM de suero bovino fetal al 10% (SBF) con una concentración de masa del 10% a 37°C bajo una condición de cultivo de aire de 5% de CO₂ (volumen) / 95% de aire). Cuando las células se cultivaron hasta la fase logarítmica, se añadieron PTD-P15 en diferentes concentraciones (respectivamente 8, 30 y 50 mcg / mL), mientras que el polipéptido de control (grupo de control en blanco) se añadió en otras células cultivadas para el control. Después de 24 horas de cultivo, se recogieron las células y se adoptó FCM para el análisis del ciclo celular. 10 Los resultados experimentales muestran que: PTD-P15 puede inhibir la proliferación celular, aumentar las cantidades de células en la fase G₀ / G₁, mientras que no tiene un impacto evidente en la apoptosis celular, como se muestra en las Figs. 2a, 2b, 2c y 2d.

Ejemplo 6 Experimento de PTD-P15 que inhibe el crecimiento de tumores de cáncer rectal humano en ratones

15 Después de 5x10⁶ células de cáncer rectal humano HT29 inyectadas en el tejido subcutáneo de ratones, los ratones fueron 15 divididos al azar en dos grupos. Después de un día desde la inyección de las células tumorales, se inyectaron varios 1 mg de PTD-P15 en los ratones en el grupo de tratamiento a través de la vena caudal y la inyección de la misma cantidad se repitió cada dos días durante cinco veces. Los tiempos y el tiempo de inyección de 1 mg de polipéptido de control fueron iguales que los del grupo de tratamiento. Después de diez días de la inyección de células tumorales, se mataron los ratones, de los cuales se extrajeron los tumores para medir el peso. 20 Los resultados muestran que: en comparación con el grupo de control, el peso de los tumores en los ratones 20 tratados con PTD-P 15 se redujo en un 57%.

Ejemplo 7 Experimento de PTD-P15 que inhibe el crecimiento del tumor de leucemia humana en ratones

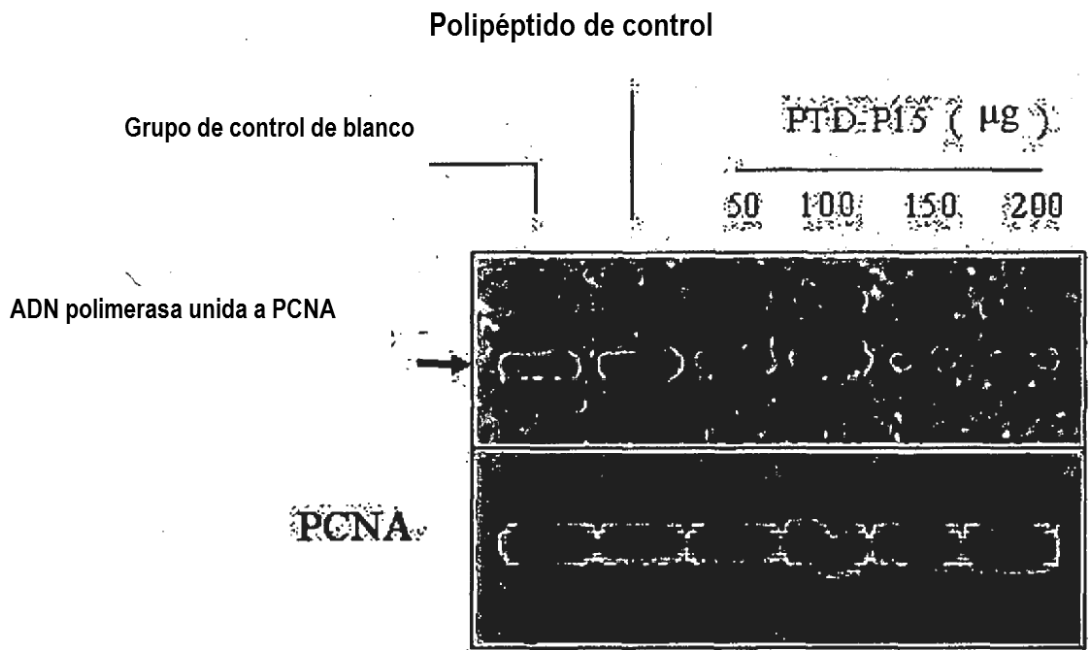
25 Después de 5X10⁶ células de leucemia granulocítica humana K562 inyectadas en el tejido subcutáneo de ratones, los ratones 25 se dividieron al azar en cinco grupos. A los ratones de cada grupo se les inyectó respectivamente 1 mg de solución en blanco, 1 mg de polipéptido de control, 1 mg de PTD-P15, 10 mg de Glivec y la solución que comprendía 1 mg de PTD-P15 + 10 meg de Glivec y la inyección De las mismas cantidades se repitió cada dos días durante 7 veces. Después de dos semanas, se mataron los ratones, de los cuales los tumores crecidos en el tejido subcutáneo de los ratones se sacaron y pesaron. Los resultados muestran que, en comparación con el grupo de control, la inyección de PTD-P15 puede obviamente reducir el peso de los tumores producidos por K562 en un 34%. Glivec es un medicamento usado para la leucemia en la clínica en la actualidad, y en la actualidad, la inyección de Glivec también redujo el peso de los tumores en un 48%. En el caso de la combinación de PTD-P 15 y Glivec, hubo una mayor reducción en el peso de los tumores que la de los tumores producidos, siempre que solo uno de los dos fármacos fue inyectado individualmente y la reducción podría ser del 69% El control del polipéptido de control. Esto demuestra que la combinación de PTD-P15 y Glivec tiene mejor efecto de tratamiento tumoral que la inyección individual de los mismos, tal como se muestra en la Tabla 3. 35

TABLA 3 PTD-P15 que inhibe el crecimiento del tumor formado por células K562 en modelo animal

Grupo de animales	Peso promedio de los tumores (g)	Proporción de inhibición
Control en blanco	2,48	0%
Polipéptido de control	2,53	-2%
PTD-P15 (1mg)	1,63	34%
Glivec (10mcg)	1,28	48%
PTD-P15 (1 mg) + Glivec (10 meg)	0,76	69%

REIVINDICACIONES

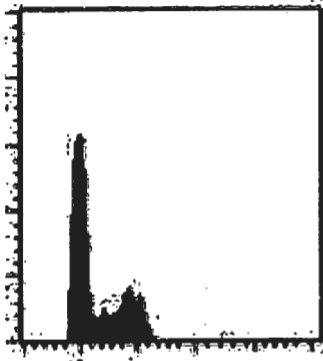
1. Un polipéptido fusionado PTD-P15 que se **caracteriza por** su secuencia de aminoácidos: ácido arginina-asparagínico - leucina - tirosina - como ácido paragínico - ácido asparagínico - ácido asparagínico - lisina - ácido asparagínico - arginina - metionina - prolina - Tirosina - serina - treonina - ácido glutámico - leucina - isoleucina - fenilalanina - tirosina - isoleucina - ácido glutámico - metionina - ácido asparagínico - prolina.
2. Uso del polipéptido fusionado PTD-P 15 de reivindicación 1 en la preparación de medicamentos para el tratamiento de tumor y otras enfermedades asociadas con el crecimiento celular anormal.



Co-inmunoprecipitación de anticuerpo: anticuerpo α PCNA

FIG. 1

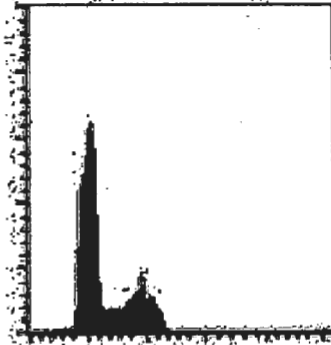
Polipéptido de control



G₀/G₁ 60,1%
S 23,5%
G₂/M 16,4%

FIG. 2A

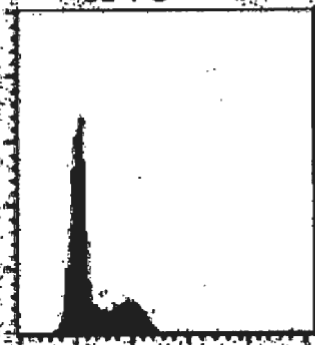
PTD-P15
(8 µg/ml)



G₀/G₁ 62,9%
S 22,3%
G₂/M 14,8%

FIG. 2B

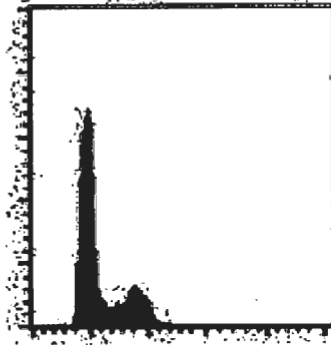
PTD-P15
(30 µg/ml)



G₀/G₁ 66,9%
S 19,6%
G₂/M 13,5%

FIG. 2C

PTD-P15
(50 µg/ml)



G₀/G₁ 74,2%
S 10,5%
G₂/M 15,3%

FIG. 2D