

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 986**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/76 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2011 PCT/GB2011/052310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO2012069836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2011 E 11804746 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2643010**

54 Título: **Complejo biológicamente activo y su preparación**

30 Prioridad:

24.11.2010 GB 201019937

24.11.2010 GB 201019936

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

29.05.2017

73 Titular/es:

HAMLET PHARMA AB (100.0%)

BMC D10, Klinikgatan 32

222 42 Lund, SE

72 Inventor/es:

SVANBORG, CATHARINA;

MOK, KENNETH HUN;

TRULSSON, MARIA;

MOSSBERG, ANN-KRISTIN;

STORM, PETTER y

HO, CHING SHING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 613 986 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

Complejo biológicamente activo y su preparación

5 La presente invención se refiere a complejos biológicamente activos que tienen actividad terapéutica, en particular, en el tratamiento de tumores o como agentes antibacterianos o antiviricos. Los complejos pueden usarse en métodos de tratamiento de tumores y cánceres, en particular, para métodos para abordar selectivamente células tumorales en preferencia a células sanas, y la invención proporciona adicionalmente composiciones y reactivos para su uso en estos métodos.

10 Últimamente ha habido mucho interés en la producción de complejos que implican proteínas parcialmente no plegadas y lípidos. Estas proteínas pueden tener propiedades drásticamente diferentes y particularmente propiedades biológicas diferentes a las de las proteínas correspondientes en un estado completamente plegado. La obtención de una nueva función beneficiosa tras el desplegamiento parcial de la proteína y la unión de ácido graso es un fenómeno notable, y puede reflejar una ruta genérica significativa de diversificación funcional de proteínas a través de la variación de sus estados conformacionales y ligandos asociados. Por tanto, además del corte y empalme alternativo de los transcritos de ARNm, las modificaciones post-traduccionales y los cambios en la estructura terciaria de los dominios específicos, el desplegamiento parcial de una proteína previamente nativa se está reconociendo como un mecanismo para generar diversidad funcional. Esto puede deberse a una respuesta celular a proteínas desplegadas y al cofactor lipídico, que define sus propiedades alteradas. Sin embargo, esta respuesta puede ser diferente en, por ejemplo, células tumorales, lo que significa que pueden dar lugar a potencial terapéutico. Para formar restos estables, las proteínas desplegadas frecuentemente están modificadas de algún modo y, en particular, pueden unirse a cofactores tales como cofactores de ácido graso. Los complejos formados de este modo pueden ser estables y dar lugar a opciones terapéuticas.

25 HAMLET (alfa-lactalbumina humana que se ha vuelto letal para células tumorales, por sus siglas en inglés *human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells*) es un ejemplo de este tipo de una nueva familia de moléculas tumorocidas, con propiedades notables. Formada a partir de α -lactalbumina parcialmente desplegada y con ácido oleico como constituyente integral (Svensson, 2000 n.º 13204), HAMLET se descubrió por casualidad cuando se estudiaba la capacidad de la leche humana de prevenir que las bacterias se unieran a células (Hakansson et al., 1995). Experimentos *in vitro* previos mostraron que HAMLET presentaba actividad antitumoral amplia con un alto grado de selectividad tumoral y posteriores estudios terapéuticos han confirmado la actividad tumorocida de HAMLET y la selectividad relativa por tejido tumoral *in vivo*. En un estudio clínico controlado con placebo, la administración tópica de HAMLET retiró o redujo el tamaño de papilomas en la piel (Gustafsson et al., 2004) y en pacientes con cáncer de vejiga, instilaciones locales de HAMLET causaron muerte rápida de las células tumorales, pero no del tejido sano que rodeaba el tumor (Mossberg et al., 2007). La eficacia terapéutica de HAMLET en cáncer de vejiga se demostró recientemente en un modelo murino de cáncer de vejiga (Mossberg et al. 2010) y el tratamiento con HAMLET retardó la progresión del tumor y condujo a supervivencia aumentada en un modelo de rata de xenoinjerto de glioblastoma sin evidencia de muerte celular en tejido cerebral sano (Fischer et al., 2004). HAMLET, por tanto, parece identificar rutas de muerte que se conservan en células tumorales, distinguiéndolas de ese modo de células diferenciadas de células sanas.

45 También se ha descubierto que complejos que usan lisozima equina y ácido oleico producen muerte celular (Vukojevic et al. Langmuir, 2010, 26(18) 14782-14787), lo que sugiere que diferentes proteínas desplegadas pueden llegar a ser citotóxicas cuando se acoplan a un factor adecuado.

50 Los canales de iones son proteínas de membrana que detectan alteraciones en la tensión de la membrana o en el entorno celular, y su activación se ha propuesto para catalizar varias cascadas de señalización, incluyendo estrés del RE, MAP quinasas p38, GTPasas pequeñas, PI3K/Akt y NFkB, así como rutas dependientes de Ca^{2+} , principalmente en células sensoriales o en células musculares implicadas en respuestas mecánicas.

55 Los canales están presentes en la mayoría de tipos celulares, incluyendo bacterias, sin embargo y recientemente, se han propuestos las perturbaciones de los canales iónicos para promover la transformación maligna, la tumorigénesis y la metástasis (véase, por ejemplo, Huang, S., y Ingber, D. E. (2005). Cancer Cell 8, 175-176; Wolf, K et al., (2007). Nat Cell Biol 9, 893-904, y Arcangeli, A et al. (2009). Curr Med Chem 16, 66-93), lo que sugiere la relevancia inmediata de dichos canales para la homeostasis de las células cancerosas.

60 Específicamente, los solicitantes han identificado un ejemplo de una molécula que actúa como activador de canales de iones con especificidad tumoral y proponen que la amplia respuesta de muerte de las células tumorales y de ciertas bacterias a este y otros agonistas con especificidad similar de diana implica la perturbación de los canales de iones, que se conservan a través de la evolución. La desdiferenciación de las células tumorales puede implicar, por tanto, la reversión a un repertorio de canales de iones más "primitivo", que puede abordarse por dichos agonistas. Esta muerte selectiva de tumor a través de la perturbación de canales de iones es particularmente relevante, especialmente en vista de los efectos protectores de las moléculas ya documentadas contra tumores en pacientes y en modelos animales.

65

Los solicitantes investigaron la activación sensible a iones y si la señalización desencadenada por dichos canales podría distinguir la respuesta de muerte de las células tumorales de la respuesta de supervivencia de células diferenciadas sanas. Se detectaron flujos rápidos de Na^+ y K^+ seguidos por movilización de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares en células de carcinoma.

5 La inhibición de la muerte celular por amilorida y por BaCl_2 , que bloquea los flujos de Na^+ y K^+ , sugirió que la muerte se desencadena a través de la activación combinada de canales mecanosensibles y de canales de potasio e inhibición de la inducción de estrés del RE y la respuesta de muerte dependiente de p38 sugirió que los flujos de iones activan directamente las rutas de señalización corriente abajo que ejecutan la muerte de células de carcinoma. Las células diferenciadas sanas, en contraste, mostraron una respuesta débil y transitoria de Ca^{2+} con un tratamiento similar pero no activación p38 y, en su lugar, una respuesta inmunitaria innata acompañaba su supervivencia. Es posible que la selectividad tumoral *in vivo* pueda depender, por tanto, de las perturbaciones de los canales de iones y una respuesta de muerte de MAPK p38, acompañada por una respuesta inmunitaria innata beneficiosa en tejidos adyacentes.

15 La señalización defectuosa de canales de iones desregula los mecanismos de control del ciclo celular, reparación de daños en el ADN, apoptosis, adhesión y migración (Huang y Ingber, 2005 *Cancer Cell* 8, 175-176; Wolf et al., 2007 *Nat Cell Biol* 9, 893-904). La relación de función de los canales de iones al cáncer ha recibido, por lo tanto, una atención creciente, y los canales de iones están estableciendo como moduladores de señales que promueven la transformación oncogénica. La comprensión de las aberraciones de los canales de iones en la progresión del cáncer es esencial, por lo tanto, y el control de su función puede constituir un nuevo enfoque importante para la terapia contra el cáncer. Se ha propuesto abordar los canales de iones en células cancerosas como una futura opción terapéutica (Arcangeli et al., 2009, *Curr. Med Chem* 16, 66-93), ya que tiene el control de canales de iones mecanosensibles y de otros canales de iones, que se sobreexpresan en células de carcinoma. A pesar de esta utilidad propuesta, el potencial terapéutico de los moduladores de canales de iones sigue estando infraexplotado debido, en parte, a los efectos secundarios que reflejan la ausencia de especificidad tumoral.

20 Los solicitantes ahora han identificado sustancias con actividad activadora de canales de iones con especificidad tumoral y proponen que la amplia respuesta de muerte de las células tumorales y de ciertas bacterias puede implicar la perturbación de canales de iones, que se conservan a través de la evolución. La desdiferenciación de células tumorales puede implicar, por tanto, la reversión a un repertorio de canales de iones más "primitivo" que se aborda por estas sustancias.

30 Aunque la transformación oncogénica y la función de las células cancerosas requieren el apoyo de canales de iones, la variabilidad y complejidad de los canales de iones es considerable. Los genes que codifican canales de iones frecuentemente se sobreexpresan en cánceres humanos, debido a amplificaciones génicas, regulación epigenética o variantes de corte y empalme de los genes que codifican los canales, excepto por *KCNRG*, que codifica una proteína reguladora del canal de K^+ con propiedades supresoras tumorales (ref), no se ha informado de mutaciones específicas de tumor en genes de canales de iones. Además, aunque la mayoría de las células cancerosas humanas muestran dinámica de onda de Ca^{2+} alterada, las alteraciones específicas de cáncer en la "naturaleza espaciotemporal" de las ondas de Ca^{2+} o los perfiles de expresión de canales de iones, no se han identificado en gran medida (Arcangeli et al., 2009). En tipos celulares específicos, se ha encontrado que es eficaz la inhibición mediada por ARNip de canales de iones individuales, pero debido a la complejidad, la reducción de los canales individuales a menudo es insuficiente para obtener pérdida de función y para reproducir un fenotipo relevante para el cáncer. El uso de inhibidores farmacológicos de canales, por lo tanto, sigue siendo crucial para definir la implicación general de diferentes clases funcionales de canales de iones, aunque cada inhibición no define completamente un tipo de canal específico.

35 Dentro de estas limitaciones técnicas, nuestros resultados muestran que es posible perturbar las membranas de células tumorales, conduciendo a flujos de iones, despolarización y a la abertura de canales de iones de tal manera que se discriminan células tumorales de células diferenciadas sanas. Se demostró que la muerte y los cambios morfológicos de las células tumorales resultantes son dependientes de los canales de iones, usando inhibidores farmacológicos y se sugirió una vinculación entre la activación del canal de iones y la muerte celular por análisis transcriptómico amplio del genoma, que muestra que el bloqueo de los canales reducía la cantidad de genes expresados de forma diferencial en células de carcinoma tratadas de aproximadamente 400 a 40. La regulación transcripcional de las rutas de mayor valoración de estrés del RE, p38 y Ras se inhibía por los bloqueantes de canales, así como la fosforilación de las proteínas correspondientes y la inhibición de la activación de los canales de iones prevenía la muerte de células de carcinoma y linfoma.

40 Nuestros recientes estudios en vesículas artificiales y en modelos de membrana de células tumorales sugirieron que los canales mecanosensibles se abren por tratamiento, también. Los canales mecanosensibles se abren por fuerzas de deformación de la bicapa lipídica que surgen de asimetrías locales o globales en la presión transbica o en la curvatura de la bicapa (Kumar). Las imágenes de fluorescencia mostraron que una acumulación de la sustancia administrada en membranas de fosfolípidos sin receptores perturba su estructura por elongación. Se obtuvieron resultados similares con vesículas de membrana plasmática de células tumorales, que formaban invaginaciones de membrana de tipo tubo después de la exposición a la sustancia. Además, los solicitantes han descubierto, durante

algunos tratamientos, que se forman poros transitorios en bicapas lipídicas artificiales a pH fisiológico, lo que explica posiblemente la filtración observada de la membrana. Por tanto, además de la activación de los canales de iones, la permeabilización directa de las membranas de células de carcinoma podría activar la muerte celular.

5 El perfil de señalización en células de carcinoma fue coherente con los patrones previamente observados después de la activación fisiológica de canales mecánicos, inducidos por expansión en una diversidad de tipos celulares. Las perturbaciones mecánicas de la membrana han demostrado perturbar ERK1/2 a través de proteínas G y especialmente la señalización de p38 (Correa Meyer). JNK y p38 también son mediadores clave de señales estimuladas por diversas tensiones y son principalmente responsables de respuestas tales como apoptosis dependiente de estrés y de respuestas inflamatorias. HAMLET desplazaba el perfil de señalización de MAPK de las células tumorales de la ruta ERK1/2 a p38 y, por tanto, de proliferación a muerte. En mamíferos, las MAPK se dividen en tres grupos principales, ERK, JNK/proteína quinasas activadas por estrés y p38, basándose en su grado de homología, actividades biológicas y motivos de fosforilación (Cobb, 1999). MKK3 y MKK6 activan MAPK quinasas p38 por fosforilación en Thr180 y en Tyr182 y las MAPK quinasas p 38 activadas fosforilan y activan la MAPKAP quinasas 2 y fosforilan los factores de transcripción ATF-2, Max y MEF2. La posterior fosforilación de p53 y CHOP, entre otras dianas, conduce a la activación de mecanismos de muerte celular, incluyendo permeabilización mitocondrial, activación de caspasas y fragmentación del ADN, que se ha demostrado que sucede en algunas células de carcinoma tratadas. Además, la fosforilación de Hsp27 media los reordenamientos citoesqueléticos, explicando potencialmente el cambio en la morfología que se observaba en células de carcinoma expuestas a algún tratamiento.

Los cambios en las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} pueden comprender la capacidad del RE de plegar correctamente las proteínas, provocando de ese modo la respuesta de proteínas desplegadas. HAMLET activaba las tres ramas principales de la respuesta de proteínas desplegadas y, además, varios genes relacionados con estrés del RE estaban regulados positivamente de forma transcripcional, incluyendo ATF4 y BIP. La activación de eIF2 α en respuesta a HAMLET puede actuar como "freno de emergencia" para prevenir la síntesis adicional de proteínas cuando está comprometida la capacidad de plegamiento del RE. El tratamiento con HAMLET también desencadenaba la escisión de ATF6 y un aumento en XBP1 con corte y empalme, actuando ambos para inducir la transcripción de un conjunto diverso de chaperonas y otros genes regulados por estrés del RE, para aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas del RE. La inhibición por amilorida de la respuesta transcripcional de estrés del RE y de la fosforilación de eIF2 α indica que la activación de canales de iones es un desencadenante esencial de la respuesta de estrés del RE a HAMLET. Además, los experimentos presentados a partir de ahora en este documento sugieren que HAMLET interacciona directamente con chaperonas del RE o con los detectores de estrés del RE ya que HAMLET ha demostrado interaccionar directamente con los proteasomas, que desempeñan un papel crucial en el estrés del RE y en la respuesta de proteínas desplegadas. HAMLET también puede perturbar indirectamente la capacidad de plegamiento de proteínas de células de carcinoma disminuyendo los niveles de ATP y causando daño y permeabilización mitocondrial.

En células diferenciadas sanas, HAMLET abordaba las rutas de señalización inmunitarias innatas implicadas en la inmunidad innata y suprimía de forma transitoria la señalización de p38. Aunque esta respuesta inmunitaria era baja o estaba ausente en células tumorales, estaban fuertemente reguladas rutas de respuestas inmunitarias similares en células de carcinoma tras inhibición específica de p38, lo que implica que estas no son estrategias de respuesta celular completamente diferentes. La movilización de Ca^{2+} intracelular por HAMLET tanto en células de carcinoma como en células sanas podría indicar que este mecanismo de activación está compartido, aunque de diferente magnitud. Pero la posterior respuesta de canales de iones se observaba principalmente en las células de carcinoma que, sin embargo, sugiere que esta es la etapa crítica para desencadenar la muerte celular, una hipótesis también apoyada por los efectos de rescate de los bloqueantes de canales de iones. Esta respuesta inmunitaria innata serviría de forma ideal para activar macrófagos y otras células para rebuscar y digerir los remanentes de células apoptóticas en sitios de tejido dañado y proporcionan un entorno inmunitario adecuado para la eliminación de células cancerosas.

Se especula que la capacidad de eliminar de forma selectiva una amplia gama de células tumorales combinada con la respuesta inmunitaria innata de células diferenciadas sanas puede dar lugar a baja toxicidad en estudios clínicos, así como otros efectos beneficiosos. La respuesta del efector p38 en células tumorales acompañado por una respuesta inmunitaria innata beneficiosa en tejido adyacente puede servir como enfoque doble para eliminar células cancerosas manteniendo al mismo tiempo la integridad tisular.

La identificación del repertorio de canales de iones abre una gama de opciones terapéuticas específicas que se espera que proporcionen terapias potenciadas contra el cáncer. La investigación de ese repertorio ha permitido a los solicitantes determinar elementos específicos que pueden dar lugar a nuevos agentes activos terapéuticos que forman un aspecto de la invención que se describe adicionalmente a continuación.

Dichos agentes activos pueden comprender un complejo biológicamente activo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de una variante de una proteína de origen natural, donde dicho polipéptido está al menos parcialmente desplegado en comparación con dicha proteína de origen natural, por ejemplo, como resultado de una modificación de al menos un resto de cisteína; o un péptido de hasta 50 aminoácidos; y una sal farmacéuticamente

aceptable de un ácido graso o un lípido.

Por ejemplo, el polipéptido presente en el complejo puede tener la secuencia de una variante de α -lactalbúmina o una variante de lisozima.

Como se usa en este documento, la expresión "biológicamente activo" significa que el complejo tiene una actividad biológica, que es diferente o más fuerte que los componentes individuales. En particular, el complejo es capaz de inducir la muerte celular, en particular, selectivamente en células tumorales y/o tiene un efecto bactericida o antivírico no observado con la proteína nativa que incluye, por ejemplo, formas monoméricas de α -lactalbúmina, aunque pueden estar disponibles otros efectos terapéuticos.

El término "polipéptido", usado en este documento incluye proteínas y péptidos incluyendo péptidos largos.

Los péptidos adecuados para su uso en los complejos pueden ser un fragmento del polipéptido o de la proteína de origen natural. El término "fragmento", como se usa en este documento se refiere a cualquier parte de la secuencia dada de aminoácidos que formará un complejo con la actividad similar a los complejos que incluyen la secuencia proteica completa tal como una secuencia de aminoácidos de α -lactalbúmina o de lisozima. Los fragmentos pueden comprender más de una parte de dentro de la proteína de longitud completa, unidos juntos. Las partes adecuadamente comprenderán al menos 5 y preferiblemente al menos 10 aminoácidos consecutivos de la secuencia básica.

Los fragmentos adecuados incluirán mutantes de delección que comprenden al menos 10 aminoácidos, por ejemplo, al menos 20, más adecuadamente al menos 50 aminoácidos de longitud o péptidos sintéticos análogos con estructuras similares. Incluyen regiones pequeñas de la proteína o combinaciones de estas.

En una realización particular, se proporciona un complejo biológicamente activo que comprende un péptido de no más de 50 aminoácidos y una sal farmacéuticamente aceptable de un ácido graso o lípido.

El péptido tiene no más de 50 aminoácidos y, en particular, puede tener de 10-45 aminoácidos. Dichos complejos son más fáciles de preparar y los materiales de partida son menos costosos. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse usando métodos convencionales para la producción de péptidos. Los complejos formados pueden ser más fáciles de manipular y formular para la administración, debido al peso molecular más pequeño.

Se obtiene adecuadamente de una proteína de origen natural o de una variante de la misma. Las proteínas adecuadas son aquellas identificadas como activas en dichos complejos, tales como α -lactalbúmina, β -lactalbúmina o lisozima. En particular, el péptido es un fragmento de α -lactalbúmina y específicamente un fragmento del dominio α de α -lactalbúmina. En una realización particular, el péptido comprende aminoácidos de Alfa 1 (restos 1-40) o de Alfa 2 (restos 81-123) de α -lactalbúmina humana, o regiones análogas de otras α -lactalbuínas tales como α -lactalbúmina bovina.

El péptido adecuadamente no contiene elementos que dan lugar al plegamiento y, por lo tanto, adecuadamente carece de los aminoácidos que dan lugar a unión intramolecular tales como restos de cisteína. En particular, cuando el péptido se obtiene de una proteína de origen natural, se reemplaza cualquier resto de cisteína por otros aminoácidos tales como alanina.

Por tanto, en particular, el complejo comprende aminoácidos de Alfa 1 (restos 1-40) o de Alfa 2 (restos 81-123) de α -lactalbúmina humana donde las cisteínas están reemplazadas con otros aminoácidos tales como alanina, para evitar cualquier unión intramolecular.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un complejo biológicamente activo que comprende un péptido de hasta 50 aminoácidos, que comprende un fragmento de α -lactalbúmina en que cualquier resto de cisteína está reemplazado por otros aminoácidos; y una sal farmacéuticamente aceptable de un ácido graso o lípido: donde el fragmento es de la SEQ ID NO 3 o de la SEQ ID NO 4 KQFTKXELSQLLKDIDGYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 3) LDDITDDIMXAKKILDKIDYWLAKALXTEKLEQWLXEKL (SEQ ID NO 4) donde X es un resto de aminoácido diferente de cisteína.

Un ejemplo particular de dichas secuencias son las de la SEQ ID NO 5 o de la SEQ ID NO 6. KQFTKAELSQLLKDIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 5) LDDITDDIMAACKILDKIDYWLAKALATEKLEQWLAEKL (SEQ ID NO 6).

La expresión "variante" se refiere a proteínas o a polipéptidos que tienen una función biológica similar, pero en que la secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de bases de la que se obtiene, porque uno o más aminoácidos dentro de la secuencia están sustituidos por otros aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden considerarse como "conservativas" cuando un aminoácido está reemplazado con un aminoácido diferente con propiedades ampliamente similares. Las sustituciones no conservativas son cuando los aminoácidos se reemplazan con aminoácidos de un tipo diferente.

Por "sustitución conservativa" se entiende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, en que las clases se definen del siguiente modo:

Clase	Ejemplos de aminoácido
No polar:	A, V, L, I, P, M, F, W
Polar no cargado:	G, S, T, C, Y, N, Q
Ácido:	D, E
Básico:	K, R, H

5 Como es bien sabido para los expertos en la materia, alterar la estructura primaria de un péptido por una sustitución conservativa puede no alterar significativamente la actividad del péptido porque la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares a los de la cadena lateral del aminoácido que se ha sustituido. Esto sucede incluso cuando la sustitución está en una región que es crítica en la determinación de la conformación del péptido.

10 Son posibles sustituciones no conservativas con la condición de que no interrumpan la función de los polipéptidos de dominio de unión a ADN.

15 Hablando ampliamente, serán posibles menos sustituciones no conservativas sin alterar la actividad biológica de los polipéptidos.

20 La determinación del efecto de cualquier sustitución (y, de hecho, de cualquier deleción o inserción de aminoácido) pertenece completamente a las capacidades rutinarias de los expertos en la materia, que pueden determinar fácilmente si un polipéptido variante retiene las propiedades fundamentales y actividad de la proteína básica. Por ejemplo, cuando se determina si una variante del polipéptido está dentro del alcance de la invención, el experto en la materia determinará si los complejos que comprenden la variante retienen la actividad biológica (por ejemplo, muerte de células tumorales) de complejos formados con formas desplegadas de la proteína nativa y el polipéptido tienen al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, aún más preferiblemente el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de la proteína nativa.

25 Las variantes del polipéptido pueden comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos con al menos el 70 % de identidad, por ejemplo, al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad con una secuencia proteica nativa tal como una secuencia de alfa-lactalbúmina o lisozima.

30 El nivel de identidad de secuencia se determina adecuadamente usando el programa informático BLASTP con las secuencias proteicas nativas como secuencia base. Esto significa que las secuencias proteicas nativas forman la secuencia contra la cual se determina el porcentaje de identidad. El software BLAST está disponible al público en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accesible desde el 12 de marzo de 2009).

35 Sin embargo, en una realización particular, el polipéptido se basa en la secuencia de α -lactalbúmina humana, pero puede usarse α -lactalbúmina de otras fuentes, incluyendo α -lactalbúmina bovina u ovina como proteína base.

40 El péptido comprende un péptido recombinante que tiene la secuencia de un fragmento de α -lactalbúmina, pero que carece de los enlaces o entrecruzamientos disulfuro intramoleculares. Asegurando que el péptido recombinante carece de los entrecruzamientos disulfuro intramoleculares, la molécula será tridimensionalmente no nativa y completamente inactiva en términos de su actividad biológica endógena original. Esto se consigue cambiando los restos de cisteína en la α -lactalbúmina nativa por otros restos, en particular restos de alanina. Los restos de cisteína se cambiarán a otros restos, tales como restos de alanina. En particular, la proteína de péptido recombinante se basa en la secuencia de α -lactalbúmina.

45 En una realización particular, el péptido es un fragmento de una proteína recombinante que tiene la secuencia de α -lactalbúmina madura nativa, pero que tiene todas las cisteínas encontradas en las posiciones 6, 28, 61, 73, 77, 91, 111 y 120 en la secuencia de longitud completa de α -lactalbúmina humana madura mutadas a otros aminoácidos, tales como alanina, que no dan lugar a puentes disulfuro. Por tanto, los péptidos que pueden utilizarse de acuerdo con la invención representan un fragmento de una proteína de la SEQ ID NO 1.

50 KQFTKAELSQLLKDIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQAIVENNESTEYGLFQISNKLWAKSSQVPQSRNIADISADKF
LDDDITDDIMAAKILDIKGIDYWLAHKALATEKLEQWLAEKL (SEQ ID NO 1)

55 donde la negrita indica posiciones de mutaciones de cisteínas en α -lactalbúmina humana nativa.

60 Como se presenta en el documento WO2010079362, pueden adherirse restos adicionales de aminoácido, por ejemplo, hasta 20 aminoácidos, en el extremo N y/o C-terminal de la proteína, si fuera conveniente, por ejemplo, con fines de expresión. Por tanto, en particular, se ha producido una proteína recombinante que se muestra en la SEQ ID NO. 1, pero con una metionina adicional en el extremo N-terminal (SEQ ID NO 2 mostrada a continuación).

MKQFTKAELSQLLKIDIGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQAIVENNESTEYGLFQISNKLWAKSSQVPQSRNIADISADK
FLDDITDDIMAAKKILDIKIDYWLAKALATEKLEQWLAEKL (SEQ ID NO 2)

5 El péptido usado en el complejo está adecuadamente en forma pura, y se prepara adecuadamente usando métodos convencionales de síntesis de péptidos o por expresión recombinante. En particular, el ADN que codifica el péptido requerido puede insertarse en vectores de expresión adecuados tales como plásmidos, que después pueden emplearse para transformar células hospedadoras, por ejemplo, células procariotas tales como *E. coli* o células eucariotas tales como células particulares de insecto usando métodos convencionales.

10 En particular, la sal de ácido graso o lípido presente en el complejo de la invención es una sal soluble en agua. Ejemplos particulares de sales adecuadas pueden incluir sales de metales alcalinos o alcalinotérreos. En una realización particular, la sal es una sal de metal alcalino tal como una sal de sodio o potasio.

15 Adecuadamente, los ácidos grasos o lípidos incluyen aquellos que se sabe que proporcionan complejos biológicamente activos. Estos incluyen ácidos grasos, por ejemplo, como se describe en el documento WO2008058547.

20 Ejemplos particulares de ácidos grasos o lípidos que forman la base de las sales usadas en la presente invención son aquellos que tienen de 4-30, por ejemplo, de 6 a 28, tal como de 8 a 26 átomos de carbono. En realizaciones particulares, el ácido graso o lípido tiene de 10 a 24, tal como de 12 a 22, por ejemplo, de 14 a 20 átomos de carbono. En particular, el ácido graso o lípido tendrá 16, 17, 18 o 20 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados.

25 En particular, sin embargo, los complejos de la invención utilizan sales de ácidos que tienen 18 átomos de carbono. Un ejemplo específico es una sal de ácido oleico, y en particular una sal de ácido oleico C18:1 de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ o $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$.

30 El complejo puede prepararse métodos similares a los descritos, por ejemplo, en el documento WO99/26979 y el documento WO2008/138348, cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia.

35 De acuerdo con aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para preparar un complejo biológicamente activo como se describe anteriormente. Dicho método puede comprender combinar juntos un péptido de hasta 50 aminoácidos como se define anteriormente; con una sal de un ácido graso o lípido en condiciones en que formarán un complejo biológicamente activo.

40 La preparación puede realizarse simplemente mezclando juntos un péptido adecuado y un oleato, por ejemplo, en una solución tal como una solución acuosa. La relación de oleato:péptido añadida a la mezcla está adecuadamente en el intervalo de 20:1 a 1 a 1, pero preferiblemente está presente un exceso de oleato, por ejemplo, en una relación de oleato:péptido de aproximadamente 5:1. La mezcla puede realizarse a una temperatura de 0-50 °C, convenientemente a temperatura y presión ambiente. Este método de preparación simple proporciona una ventaja particular para el uso de dichos péptidos en los complejos. Los métodos pueden realizarse *in situ*, cuando se requiera para el tratamiento. Por tanto, pueden proporcionarse kits que comprenden péptidos y sales para mezclar inmediatamente antes de su administración. Dichos kits y reactivos para su uso en los kits forman un aspecto adicional de la invención. Los péptidos son adecuadamente péptidos sintéticos aunque pueden prepararse por tecnología de ADN recombinante.

45 El uso de una sal y, en particular, una sal soluble en agua del ácido graso o lípido significa que el método de preparación se facilita ya que pueden formarse soluciones acuosas, por ejemplo, para la aplicación a columnas de intercambio iónico y similares.

50 Los métodos para preparar complejos que comprenden un péptido como se describe anteriormente serán análogos a los usados para preparar HAMLET y complejos relacionados, por ejemplo, en los documentos WO9926979, WO2008058547, WO2008138348 y WO2010079362. En todos estos casos, el complejo activo se forma poniendo en contacto una proteína con un ácido graso o lípido y, en particular, ácido oleico, en condiciones específicas tales como condiciones de intercambio iónico y recuperando el producto activo. Para producir complejos de acuerdo con la presente invención, se usará una solución que comprende una sal de un ácido graso o lípido en lugar de ácido oleico puro. El uso de una solución salina aborda un problema particular de la técnica anterior porque el ácido graso o lípido usado no es soluble en agua, haciendo difícil la manipulación. Las sales pueden ser solubles en agua y, por tanto, evitar este problema.

60 El documento WO2010/131237 describe métodos para producir complejos biológicamente activos poniendo en contacto una proteína tal como alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y lisozima, con un exceso de sal soluble en agua de un ácido graso en presencia de condiciones desnaturantes de proteína globulares. Informan también de que cuando se hicieron intentos por producir estos complejos con una alfa-lactalbúmina bovina usando una columna cromatográfica del modo previamente descrito para la producción de HAMLET, los rendimientos eran significativamente inferiores. Los solicitantes también han descubierto que dichos productos pueden prepararse en

lugar de con sales solubles en agua de ácidos grasos para producir complejos altamente eficaces sin pérdida de actividad, pero con una mayor facilidad de producción. Por tanto, parece que la presencia de un resto protonado no es esencial para la formación de complejos estables.

5 Sin embargo, también se ha descubierto que cuando la proteína aplicada a una columna es alfa lactalbúmina humana, y la columna se ha pre-tratado o acondicionado usando una solución de una sal de ácido oleico, los rendimientos son comparables o mejores que los conseguidos usando ácido oleico. Esto es sorprendente a la luz de la descripción del documento WO2010/131237.

10 Además, se ha descubierto que las sales de ácidos grasos y, en particular, oleatos tienen actividad intrínseca en la activación de los canales de iones lo que se ha encontrado que son relevantes para la actividad de HAMLET. Por tanto, puede esperarse que el uso de dichas sales pueda ser beneficioso en una función clínica o como un componente de nuevas entidades terapéuticas.

15 Los polipéptidos usados en el proceso están en un estado desplegado y, por lo tanto, si se someten a plegamiento, pueden requerir una etapa de tratamiento preliminar para desplegarlos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, en condiciones ácidas y se forman estados similares a pH neutro tras la eliminación del ión Ca^{2+} unido fuertemente por agentes quelantes tales como EDTA (ácido etileno diamina tetraacético), por reducción de los enlaces disulfuro o a temperaturas elevadas (Pfeil et al., 1987 Biochim Biophys Acta, 911:114-116; Kuwajima 1996 Faseb J. 1:102-109; Shulman et al., 1995 J. Mol. Biol. 253, 651-657).

20 Sin embargo, por el uso de un péptido que se sintetiza de acuerdo con la secuencia de una proteína que carece de enlaces o entrecruzamientos disulfuro intramoleculares, no se necesitan etapas de pretratamiento, por ejemplo, por tratamiento con un agente quelante de calcio tal como EDTA, sometiendo el material a bajo pH o a alta temperatura, para retirar el calcio y aumentar la cantidad de material de tipo globular fundido presente.

25 En particular, cuando se usa el método de la invención, se obtienen altos rendimientos del complejo biológicamente activo, convenientemente.

30 El polipéptido como se define anteriormente es activo cuando se mezcla con el lípido. La proteína desplegada adecuadamente se pone en contacto con la sal del ácido graso o lípido en condiciones que permitirán que tenga lugar el intercambio iónico, en particular, en una columna de intercambio iónico, específicamente una columna de intercambio aniónico tal como una columna de DEAE-Trisacryl M (disponible en BioSeptra, Ville-neuf, Francia). La columna adecuadamente se "pre-acondiciona" con una sal del ácido graso tal como oleato sódico, antes de aplicar la proteína a la misma. Esto puede conseguirse eluyendo o acondicionando la columna en primer lugar con la sal, que está adecuadamente en forma de una solución acuosa. Adecuadamente, la solución salina se eluye a través de una columna que contiene nuevo material no usado o reacondicionado de intercambio iónico tal como DEAE-Trisacryl. Los tampones adecuados de elución incluyen Tris-HCl y NaCl con un pH de 8,5. La cantidad de solución salina aplicada a la columna de este modo puede depender poco de factores tales como el tamaño de la columna y el volumen de proteína recombinante necesaria para convertirse en complejo biológicamente activo. Por ejemplo, se ha descubierto que pueden usarse solamente 10 mg de ácido para acondicionar una columna de 14 cm x 1,6 cm.

45 Después de haber aplicado el polipéptido a la columna (por ejemplo, en solución en un tampón adecuado), después se eluye con un gradiente lineal de sal, y se aísla la fracción que eluye alto contenido de sal (NaCl 0,7-1 M o equivalente).

50 Como alternativa, como se describe en el documento WO2008138348, el polipéptido puede mezclarse con una solución del ácido graso o lípido antes del contacto con el medio de intercambio iónico, en particular, por elución en una columna de intercambio iónico.

55 Por tanto, puede producirse un complejo biológicamente activo poniendo en contacto un polipéptido que tiene la secuencia de alfa lactalbúmina o variante de la misma que carece de enlaces disulfuro intramoleculares (entrecruzamientos), con una sal de ácido oleico o con una columna de intercambio aniónico en condiciones en que se forma un complejo biológicamente activo, eluyendo la columna con un gradiente salino y aislando el complejo de una fracción que eluye a alta concentración de sal.

60 La expresión "alta concentración de sal" se refiere a concentraciones de sales con cationes tales como aluros y, en particular, cloruros a concentraciones en exceso de 0,5 M, por ejemplo, en exceso de 0,75 M y, en particular, a aproximadamente 1 M.

La concentración necesaria puede variar dependiendo de la sal usada, pero en una realización particular, la sal es NaCl y adecuadamente NaCl 0,7-1 M.

Adecuadamente, la sal de ácido oleico usada en el proceso está en forma pura.

65 Puede usarse una columna pre-tratada de forma repetida para convertir numerosas fracciones de una proteína

natural y también recombinante que tiene la secuencia de α -lactalbúmina o un fragmento de la misma en complejo biológicamente activo como se describe anteriormente. Una vez agotada la columna o disminuida la tasa de conversión hasta niveles inaceptables, la etapa de pre-tratamiento puede repetirse para restaurar la actividad de producción de complejo.

5 Un medio de intercambio iónico que se ha pre-tratado con una solución, adecuadamente una solución acuosa, de una sal de ácido graso o lípido, en particular ácido oleico es, por lo tanto, adecuado para su uso en un proceso como se describe anteriormente.

10 Los medios adecuados de intercambio iónico son resina de intercambio aniónico, que puede ser intercambiadores fuertes o débiles de aniones. Por ejemplo, en una realización particular, el medio de intercambio iónico puede ser DEAE Trisacryl, pero las alternativas incluyen DEAE Ceramic, Capto Q, DEAE Sepharose Q, Sepharose XL, Q Sepharose XL, Source 30Q o Unosphere Q. En una realización particular, el medio de intercambio iónico es una resina fuerte basada en amonio cuaternario (Q). Los tamaños de partícula adecuadamente varían de 40-165 micrómetros. En particular, el medio de intercambio iónico está en forma de una columna de intercambio iónico convencional.

20 Los complejos obtenidos como se describe usando alfa-lactalbúmina humana y oleato sódico se ha descubierto que son biológicamente activos porque tienen actividad en inducir la muerte de células tumorales, por ejemplo, por apoptosis y/o tienen un efecto bactericida que es al menos igual al obtenido con otros complejos biológicamente activos tales como HAMLET. Además, se ha descubierto que sales y, en particular, sales oleato tales como oleato sódico parecen tener algún efecto tumoricida inherente. Por lo tanto, la inclusión de este en el complejo puede dar lugar a aumentos de la actividad.

25 Sin embargo, las sales también pueden tener utilidad terapéutica, por ejemplo, en combinación con otros agentes terapéuticos antineoplásicos incluyendo complejos. Las composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer pueden contener adecuadamente dichas sales.

30 Además, se ha descubierto que complejos de este tipo general pueden abordar específicamente núcleos celulares y también pueden usarse para "transportar" de forma eficaz reactivos a los núcleos de las células para maximizar su efecto. Esto es particularmente útil cuando el complejo aborda específicamente una célula tumoral, por ejemplo. Por tanto, los complejos pueden comprender adicionalmente un reactivo secundario que se combina con el complejo, de modo que se transporta al núcleo plasma de las células que son susceptibles al complejo. Se describen complejos análogos, por ejemplo, en el documento WO 99/27967.

35 Dicho reactivo secundario puede acoplarse por conjugación o por unión covalente, por ejemplo, mediante un grupo enlazador o espaciador como se entendería en la técnica. Las reacciones enzimáticas pueden mediar o facilitar el acoplamiento.

40 Las técnicas de producción recombinante también permiten la posibilidad de que el polipéptido del complejo pudiera producirse en forma de una proteína de fusión con dicho reactivo secundario.

Ejemplos de dichos reactivos secundarios incluyen citoxinas tales como reactivos quimioterapéuticos conocidos usados para el tratamiento del cáncer, toxinas microbianas tales como toxina diftérica y anticuerpos monoclonales. Como alternativa, dicho reactivo secundario comprende un agente de marcaje tal como biotina o marcadores radiactivos tales como ¹²⁵I. Por ejemplo, puede introducirse un grupo de marcaje en una proteína usando una reacción enzimática o teniendo un elemento de construcción marcado (tal como isótopos radiactivos, por ejemplo, ¹⁴C, ³⁵S) dentro de la proteína. El marcaje con ¹²⁵I puede realizarse de forma enzimática acoplando ¹²⁵I a la proteína con la ayuda de lactoperoxidasa. La biotinización de la proteína se realiza permitiendo que el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinil- ϵ -aminocapróico reaccione con la proteína formando un enlace amida estable con grupos amino libres en la proteína.

55 La proteína también puede marcarse añadiendo un aminoácido radiactivo durante la producción de una proteína recombinante.

Dependiendo de la naturaleza de dicho reactivo secundario, el complejo de la invención puede usarse en el diagnóstico y/o en el tratamiento del cáncer. Para este fin, el complejo adecuadamente se formula como una composición farmacéutica.

60 Por tanto, los complejos como se describe anteriormente pueden formularse en composiciones farmacéuticas útiles combinándolos con vehículos farmacéuticamente aceptables del modo convencional. Dichas composiciones forman un aspecto adicional de la invención.

65 Las composiciones de acuerdo con este aspecto de la invención son adecuadamente composiciones farmacéuticas en una forma adecuada para uso tópico, por ejemplo, como cremas, pomadas, geles o soluciones o suspensiones acuosas u oleosas. Estos pueden incluir los vehículos, cargas y/o excipientes habitualmente conocidos, que son

farmacéuticamente aceptables.

Las soluciones tópicas o cremas adecuadamente contienen un agente emulsionante para el complejo proteico junto con un diluyente o base de crema.

5 La dosis diaria del complejo varía y depende del paciente, la naturaleza de la afección que se está tratando, etc., de acuerdo con la práctica clínica normal. Como norma general, se usan de 2 a 200 mg/dosis del complejo biológicamente activo para cada administración.

10 Un método para tratar el cáncer comprende administrar a un paciente que lo necesite un complejo biológicamente activo como se describe en anteriormente.

15 En particular, el complejo puede usarse para tratar cánceres tales como papilomas humanos de la piel, cáncer humano de vejiga y glioblastomas. En el último caso, la administración puede ser por infusión como se sabe en la técnica.

La invención proporciona adicionalmente el complejo biológicamente activo como se define anteriormente para su uso en terapia, en particular en el tratamiento del cáncer.

20 Además, se ha descubierto que el uso de una sal de un ácido graso en lugar del propio ácido graso en la producción conduce a un rendimiento potenciado de complejo biológicamente activo, que es bastante inesperado.

25 Sin embargo, como se menciona anteriormente, la identificación del repertorio de canales de iones abre una gama de opciones terapéuticas específicas que se esperará que proporcionen terapias potenciadas contra el cáncer.

Por tanto, un método para abordar selectivamente células cancerosas comprende aplicar a un paciente que lo necesite

- 30 (i) un reactivo que modula selectivamente los canales de iones en una membrana celular y se inhibe por amilorida o por sustancias comparativas; y/o
 (ii) un reactivo que modula selectivamente los canales de potasio en una membrana celular y se inhibe por cloruro de bario (BaCl_2) o por sustancias comparativas; en combinación con
 (iii) un reactivo que causa muerte celular al menos en células tumorales.

35 Los solicitantes han descubierto que estos canales particulares pueden ser más susceptibles a la modulación en células tumorales de lo que son en células sanas y que, por lo tanto, abordando específicamente estos canales, puede aumentarse la selectividad de los agentes citotóxicos para células tumorales por co-administración de estas sustancias, reduciendo de ese modo el riesgo de efectos secundarios.

40 Como se usa en este documento, la expresión "modula selectivamente" significa que el reactivo actúa sobre o activa una cantidad limitada de canales de iones solamente. Al hacer esto, el reactivo será capaz de tener un impacto terapéutico sobre la célula, pero también limitando los efectos a esos canales que son particularmente sensibles en células tumorales, esto minimizará los efectos no específicos sobre las células sanas. En el caso del reactivo (i) anterior, dichos reactivos pueden identificarse en virtud del hecho de que se inhiben por amilorida (3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometil)pirazina-2-carboxamida) u otras sustancias comparativas. En el caso del reactivo (ii) anterior, dichos reactivos pueden identificarse en virtud del hecho de que se inhiben por BaCl_2 u otras sustancias comparativas.

50 Como se usa en este documento, la expresión "sustancias comparativas" se refiere a bloqueantes de canales con actividad comparable o sustancias que modulan canales de iones similares de un modo similar al compuesto de referencia. En líneas generales, sin embargo, los reactivos para su uso en la invención tendrán capacidad de identificarse con referencia a la capacidad de los compuestos de referencia para inhibir la modulación de los canales de iones usando métodos convencionales, por ejemplo, como se ilustra posteriormente en este documento en los ejemplos.

55 Adecuadamente, los reactivos (i) y (ii) no modulan o abren canales mecanosensibles en el sentido de que no se inhiben por cloruro gadolinio (GdCl_3), o canales generales de Ca^{2+} como se ilustra porque se inhiben por rojo de rutenio (oxicloruro de rutenio amoniaco) o canales de potasio activados por Ca^{2+} de gran conductancia como se ilustra por la inhibición por tetrandrina (6,6',7,12-tetrametoxi-2,2'-dimetil-1 beta-berbanano).

60 En una realización particular, los reactivos (i), (ii) y/o (iii) pueden comprender un único reactivo que será diferente a HAMLET o análogos terapéuticos conocidos del mismo. Los análogos de HAMLET son conocidos, por ejemplo, a partir del documento WO03074547, cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia.

65 Una forma particular de único reactivo que puede conseguir esta función es un complejo biológicamente activo como se describe anteriormente.

Sin embargo, este resultado puede conseguirse por terapias de combinación, en que, por ejemplo, un reactivo que es agentes citotóxicos no específicos relativamente eficaces se asocian con un reactivo que cumple los requisitos de (i) y/o (ii) anteriores o una combinación de reactivos que consigue este efecto. Los agentes citotóxicos (iii) pueden asociarse con los reactivos (i) y/o (ii) que se unen, por ejemplo, se unen covalentemente a las moléculas. Sin embargo, también puede ser suficiente la asociación mediante la formación de complejos u otros efectos de enlace de hidrogeno.

Sin embargo, ejemplos de dichos reactivos (i) y/o (ii) pueden incluir complejos proteína desplegada-lípido (diferentes de HAMLET), anticuerpos, moléculas pequeñas, ARNip o ARNhc, lípidos o sales de lípidos. Los reactivos pueden ser moduladores conocidos de canales de iones o pueden identificarse reactivos adecuados usando métodos adecuados de selección, por ejemplo, como se describe a continuación.

En particular, el agente citotóxico es uno que interacciona con la ruta de p38 para lograr el efecto de eliminación.

Una composición para abordar selectivamente células cancerosas puede comprender una composición que comprende

- (i) un reactivo que modula selectivamente los canales de iones en una membrana celular y se inhibe por amilorida o por sustancias comparativas; y/o
- (ii) un reactivo que modula selectivamente los canales de potasio en una membrana celular y se inhibe por cloruro de bario ($BaCl_2$) o por sustancias comparativas; en combinación con
- (iii) un reactivo que causa muerte celular al menos en células tumorales.

Dichas composiciones pueden comprender una única composición o, cuando los componentes son componentes individuales, pueden envasarse por separado para administración secuencial o concurrente. Las composiciones generalmente comprenderán adicionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables como es convencional en la técnica. Incluyen diluyentes sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones son adecuadamente composiciones farmacéuticas en una forma adecuada para uso tópico, por ejemplo, como cremas, pomadas, geles o soluciones o suspensiones acuosas u oleosas. Estos pueden incluir los vehículos, cargas y/o excipientes habitualmente conocidos, que son farmacéuticamente aceptables.

Las soluciones tópicas o cremas contienen adecuadamente un agente emulsionante para el complejo proteico junto con un diluyente o base de crema.

Además, un método para identificar reactivos que pueden ser útiles en los métodos y composiciones anteriores comprende aplicar un reactivo de ensayo a célula; determinar el efecto sobre los canales de iones en presencia o en ausencia de amilorida o una sustancia comparativa; y/o en presencia o en ausencia de $BaCl_2$ o moléculas comprables; e identificar aquellos reactivos cuya actividad se inhibe por la presencia de al menos uno de amilorida o $BaCl_2$.

El efecto sobre los canales de iones puede determinarse, por ejemplo, por co-administrador de un indicador que es capaz de penetrar en las células cuando se abren los canales de iones. Una vez presentes en las células, dichos indicadores reaccionan en el entorno celular para desarrollar una señal detectable. Uno de dichos indicadores es FluoxOR™ disponible en Tecan Group, Suiza.

Adecuadamente, la célula usada en el ensayo es una célula tumoral que se ha descubierto que es particularmente susceptible a reactivos que modulan los canales de iones de este modo. Sin embargo, el hecho de que este repertorio de canales esté compartido por bacterias puede significar que las células usadas en el método de selección puedan ser células bacterianas ya que, de hecho, las células bacterianas pueden proporcionar una imitación de las células tumorales susceptibles en este caso.

Para asegurar una selectividad óptima por células tumorales, el ensayo se realiza también en presencia o en ausencia de al menos un inhibidor seleccionado de gadolinio, tetrandina y rojo de rutenio, y aquellos compuestos donde la presencia o la ausencia del inhibidor no afecta a la permeabilidad celular en estos casos, puede seleccionarse como candidato preferido para evaluación adicional.

Los reactivos de ensayos adecuados incluyen moléculas pequeñas y restos químicos, así como complejos de proteína desplegada/lípido (diferentes de HAMLET), anticuerpos, moléculas pequeñas, ARNip o ARNhc, lípidos o sales de lípidos.

Aunque la transformación oncogénica y la función de las células cancerosas requieren el apoyo de los canales de iones, la variabilidad y la complejidad de los canales de iones es considerable. Los genes que codifican canales de iones frecuentemente se sobreexpresan en cánceres humanos, debido a amplificaciones génicas, regulación epigenética o variantes de corte y empalme de los genes que codifican los canales. Excepto *KCNRG*, que codifica una proteína reguladora del canal de K^+ con propiedad supresoras tumorales, no se ha informado de mutaciones

específicas de tumor en los genes de canales de iones, sin embargo. Además, la mayoría de las células cancerosas humanas muestran dinámica de onda de Ca^{2+} alterada y no se han identificado en gran medida alteraciones específicas de cáncer en la "naturaleza espaciotemporal" de las ondas de Ca^{2+} o en los perfiles de expresión de los canales de iones (Arcangeli et al., supra. 2009) pero se han analizado varios enfoques en la bibliografía. En tipos celulares específicos, la inhibición mediada por ARNiP de canales de iones individuales se ha encontrado que es eficaz, pero debido a la complejidad, la reducción de los canales individuales a menudo es insuficiente para obtener la pérdida de función y un fenotipo distinto. El uso de inhibidores farmacológicos de canales, por lo tanto, sigue siendo crucial para definir la implicación general de diferentes clases funcionales de canales de iones. Con esto en mente, los resultados ilustrados posteriormente en este documento sugieren que la perturbación de las membranas de células tumorales y la apertura de ciertos canales de iones, como se demuestra por HAMLET, puede usarse como mecanismo para discriminar células tumorales de células diferenciadas sanas. Este hallazgo puede usarse para potenciar la selectividad y reducir los efectos secundarios en muchas situaciones quimioterapéuticas.

Los flujos registrados de Ca^{2+} y de K^+ y la inhibición de la muerte celular por amilorida y por BaCl_2 sugirió que tanto los canales de Na^+ /mecanosensibles y los canales de potasio se abren por HAMLET. Este patrón de activación de canales de iones es coherente con nuestros estudios recientes en vesículas artificiales y en modelos de membrana de células tumorales. Las imágenes de fluorescencia mostraron que HAMLET se acumula en membranas de fosfolípidos libres de receptor y altera su estructura por elongación. Se obtuvieron resultados similares con vesículas de membrana plasmática de células tumorales, que formaban invaginaciones de membrana de tipo tubo después de exposición a HAMLET. Además, existen evidencias de que HAMLET forma poros en bicapas lipídicas artificiales, lo que explica por qué HAMLET induce filtración de membrana a pH fisiológico además de activación de los canales de iones, la permeabilización directa de membranas de células de carcinoma por HAMLET podría iniciar una movilización de Ca^+ independiente de canales. Esto explicaría porque la muerte celular no se inhibía por cloruro de gadolinio (GdCl_3), que inhibe los canales MSC, por rojo de rutenio, que es un inhibidor general de Ca^{2+} o tetrandrina, que inhibe canales de potasio activados por Ca^{2+} de gran conductancia.

Este mecanismo complejo de acción estaba adicionalmente apoyado por los experimentos de ionóforos, que demuestran que HAMLET no permeabiliza completamente la membrana o causa muerte de células necróticas. Esto esencial para la comprensión del complejo, ya que las membranas celulares se perturban por lípidos y se ha demostrado que una sobrecarga de ácido oleico causa lisis celular. En este estudio, el ácido oleico en solitario no mostraba actividad de activación de canales de iones a concentraciones relevantes para el complejo HAMLET, lo que acentúa la necesidad tanto de la proteína desplegada como del lípido para conseguir estos efectos específicos sobre canales de iones y la señalización.

Las especies de proteínas desplegadas que forman el amiloide han demostrado, en algunos casos, actividad citotóxica, que se ha explicado por la formación de poros en membranas celulares. Además, el espectro celular de oligómeros amiloides es muy diferente del de HAMLET, sin embargo, siendo la toxicidad para tejidos sanos un problema principal. Por tanto, se especula que los efectos tumorocidas de HAMLET pueden reflejar los efectos combinados sobre canales mecanosensibles y activados por $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ frente a un fondo de permeabilización transitoria de membrana.

HAMLET demostró desplazar el perfil de señalización de MAPK de células tumorales de la ruta ERK1/2 a p38 y, por tanto, de proliferación a muerte celular. Estos resultados son coherentes con los efectos presentados de los canales de iones sobre rutas de respuesta celular. En mamíferos, las MAPK están divididas en tres grupos principales, ERK, JNK/proteína quinasas activadas por estrés y p38, basándose en su grado de homología, actividades biológicas y motivos de fosforilación. JNK y p38 son mediadores clave de las señales de estrés estimuladas por diversas tensiones tales como UV e irradiación γ , estrés osmótico y choque térmico; citoquinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral α e interleuquina-1 β ; y fármacos quimioterapéuticos parecen ser responsables principalmente de respuestas protectoras, apoptosis dependiente de estrés y respuestas inflamatorias.

En células diferenciadas sanas, HAMLET abordaba rutas de señalización implicadas en la inmunidad innata y suprimía de forma transitoria la señalización de p38. Aunque esta respuesta inmunitaria era baja o estaba ausente en células tumorales, rutas similares de respuesta inmunitaria estaban fuertemente reguladas en células de carcinoma en inhibición específica de p38, lo que sugiere que estas son estrategias de respuesta celular no completamente diferentes. La movilización de Ca^{2+} intracelular por HAMLET tanto en células de carcinoma como en células sanas podría indicar que este mecanismo de activación está compartido, aunque de diferente magnitud. La posterior respuesta de canales de iones se observaba principalmente en las células de carcinoma, sin embargo, lo que sugiere que esta es la etapa crítica para desencadenar la muerte celular, una hipótesis también apoyada por los efectos de rescate de los bloqueantes de canales de iones. Este brazo innato de la respuesta inmunitaria serviría de forma ideal para activar macrófagos y otras células que rebuscan y digieren los remanentes de células apoptóticas en sitios de daño tisular y proporcionan un entorno inmunitario adecuado para la eliminación de células cancerosas. Se especula que la capacidad de HAMLET de eliminar de forma selectiva una amplia gama de células tumorales combinada con la respuesta inmunitaria innata de las células diferenciadas sanas puede explicar la baja toxicidad de HAMLET en estudios clínicos, así como sus efectos beneficiosos. La respuesta del efector p38 en células tumorales acompañada por una respuesta inmunitaria innata beneficiosa en el tejido adyacente puede servir como enfoque doble para eliminar células cancerosas manteniendo al mismo tiempo la integridad tisular.

La invención se describirá ahora particularmente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos que muestran los resultados de experimentos expuestos a continuación.

Los experimentos que dan lugar a la invención se describirán ahora particularmente a modo de ilustración y ejemplo. Los ejemplos se refieren a figuras que pueden resumirse del siguiente modo:

Figura 1. HAMLET altera la morfología de vesículas lipídicas por elongación de la membrana e induce flujos de iones en células tumorales.

(A, paneles superiores) Micrografías de campo claro que muestran vesículas de yema de huevo adherentes a vidrio antes y después de una exposición de 40 minutos a HAMLET, α -lactalbúmina (HLA) o ácido oleico (OA). La morfología se registró por microscopía de contraste de interferencia diferencial. Barra de escala 20 μ M. A T = 0, las vesículas eran rígidas, con morfología predominantemente redondeada. Después de la exposición a HAMLET, las estructuras unilamelares eran más prominentes y las membranas estaban alargadas (véanse las flechas negras). La morfología de las vesículas tratadas con HLA u OA estaba inalterada. (Paneles inferiores) Efecto de HAMLET sobre PMV de células de carcinoma pulmonar. Las PMV sobre placas de fondo de vidrio se expusieron a HAMLET, a HLA o a OA y se tiñeron con rojo Nilo para microscopía confocal. Después de la exposición a HAMLET, se detectaron invaginaciones de membrana en células tumorales, pero no en células diferenciadas normales. Como control, también se expusieron PMV de células diferenciadas sanas en placas de fondo de vidrio a HAMLET y se tiñeron con rojo Nilo. No se detectaron cambios en la composición de membrana. (B) Por fluorimetría, se demostró que los flujos de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ eran específicos de HAMLET, ya que PBS, α -lactalbúmina o ácido oleico no tenían efecto. Amilorida o $BaCl_2$ inhibían los flujos de Ca^{2+} . Para los efectos de otros inhibidores de canales de iones, véase la Figura 8. (C) HAMLET desencadena flujos de K^+ y de Ca^{2+} , visualizados por imágenes confocales a tiempo real de células de carcinoma pulmonar, cargadas con el fluoróforo de Ca^{2+} Fluo-4 AM o con el fluoróforo de K^+ FluxORTM.

Figura 2. Los inhibidores de canales de iones rescatan las células de carcinoma de muerte y bloquean la captación de HAMLET y el cambio morfológico.

(A) Viabilidad de células de carcinoma pulmonar después de exposición a HAMLET (21 o 35 μ M, 3 horas), cuantificada por exclusión de azul de tripano (niveles de ATP en la figura S2). Se inhibió el efecto tumorocida de HAMLET por amilorida o $BaCl_2$, pero $GdCl_3$, rojo de rutenio y tetrandrina no mostraron efecto (medias \pm ETM, dos a tres experimentos). (B) $BaCl_2$ y amilorida evitaban que las células de carcinoma cambiaran su morfología en respuesta a HAMLET (media de dos imágenes en un experimento \pm ETM). (C) Internalización de HAMLET marcado con Alexa-fluor por células tumorales (35 μ M, 1 hora), visualizada por microscopía confocal. Amilorida o $BaCl_2$ inhibía la internalización, dejando HAMLET asociado con la superficie celular. (D) Transferencia de Western de lisados celulares, que confirma la reducción en HAMLET asociado a células por amilorida y $BaCl_2$ (35 μ M, 1 hora, detectado con anticuerpos anti- α -lactalbúmina). GAPDH era el control de carga. (E) La respuesta transcripcional a HAMLET requiere canales de iones funcionales. Amilorida reducía notablemente la respuesta transcripcional global a HAMLET en células de carcinoma pulmonar. (F) La cantidad de genes expresados de forma diferencial (cambio factorial $\log_2 > 1$ y valor-p ajustado a FDR $< 0,05$) se reducía enormemente por amilorida. Para los efectos de los bloqueantes de canales de iones sobre células de carcinoma renal y de linfoma, véase la Figura 9 y 10.

Figura 3. HAMLET activa la ruta de señalización de p38

(A) Se identificaron cambios transcripcionales en células de carcinoma pulmonar A549 tratadas con HAMLET. Trescientos sesenta y siete genes mostraron un cambio factorial \log_2 mínimo de 1,2 en comparación con células de control tratadas con PBS, con un valor p ajustado de Benjamini-Hochberg $< 0,05$. Diez genes en la ruta de p38 estaban regulados positivamente (rojo) tres horas después del tratamiento con HAMLET (21 μ M) de células de carcinoma pulmonar (A549), como se marca en la ruta canónica. (B, C) Mapa térmico (triplicado para cada periodo de tiempo) y relaciones \log_2 de genes expresados de forma diferencial en la ruta de p38, 1, 3, 6 y 24 horas después de la exposición a HAMLET. (D, E) Fosforilación aumentada de p38 α , β , y γ y HSP27 y reducida de ERK1/2 en células de carcinoma renal (D) y pulmonar (E) expuestas a HAMLET (35 μ M, 30 minutos). Las membranas con anticuerpos fosfoespecíficos se sondearon con lisados proteicos de células de carcinoma tratadas con HAMLET o con PBS (control). Se cuantificó la fosforilación de las proteínas usando ImageJ. Los datos son la media \pm ETM de tres experimentos. Se dan imágenes de serie completa en la figura S2. (F) Fosforilación de p38 dependiente de la dosis y del tiempo en respuesta a HAMLET. Se sondearon las transferencias de lisados proteicos con anticuerpos específicos para p38 fosforilado (Thr180/Tyr182). Se trataron células de carcinoma pulmonar con HAMLET y se compararon con controles negativos tratados con PBS. Las membranas se separaron y se volvieron a sondear con anticuerpo contra p38 total y contra GAPDH como control de carga. Para los efectos sobre la señalización de p38 en células de carcinoma renal, véase la Figura 11.

Figura 4. La inhibición de p38 rescata células de carcinoma y de linfoma de muerte y del cambio morfológico en respuesta a HAMLET

(A, B) La inhibición de p38 (SB202190, 20 μ M) rescataba células de carcinoma (A549 y A498) y de linfoma de células T (Jurkat) de la muerte en respuesta a HAMLET (7-49 μ M, 3 h). Se cuantificó la viabilidad por exclusión de azul de tripano (A) o como niveles de ATP (B). Los datos son las medias \pm ETM para tres experimentos independientes. (C) Imágenes a tiempo real de morfología celular después de exposición a HAMLET, que muestran que la inhibición de p38 evita los cambios morfológicos en células de carcinoma (condensación nuclear, redondeo y formación de ampollas). HAMLET marcado con Alexa-fluor 568 es rojo y los núcleos son azules (Hoechst 33342). (D-E) Se transfectaron células de carcinoma pulmonar A549 usando ARNip contra

p38 α /MAPK14 y/o p38 β /MAPK11 o ARNip no dirigido. Se muestran los niveles relativos de ARNm de MAPK11 y de MAPK14 (MAPK/GAPDH, en % de células no transfectadas) como las medias +ETM para 4 experimentos independientes. También se confirmó la reducción sobre el nivel de proteína por transferencia de Western frente a p38 total (transferencia representativa mostrada). Se usó GAPDH como control de carga. (F) Se cuantificó el efecto citotóxico de HAMLET 48 horas después de la transfección como reducción en los niveles de ATP. Los datos son las medias +ETM para cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Para los efectos del inhibidor de p38 Birb0796, véase la Figura 13.

Figura 5. Los inhibidores de canales de iones reducen la fosforilación de proteínas.

Amilorida o BaCl₂ redujo la fosforilación de dianas en la señalización de p38 y las rutas de estrés del RE. Se expusieron células de carcinoma pulmonar a HAMLET (21 y 35 μ M) durante 1 hora, se transfirieron los lisados proteicos, se incubaron con anticuerpos como se indica en la figura y se cuantificaron usando ImageJ (transferencia representativa, +ETM de 2-3 experimentos independientes). (A) Amilorida o BaCl₂ (30 minutos de pretratamiento) inhibía la fosforilación de p38 inducida por HAMLET y (B) el estrés del RE, como se muestra por fosforilación reducida de eIF2 α . (C) Amilorida o BaCl₂ inhibía el cambio de señalización Ras/RAF/MEK-MAPK ya que se revertía la supresión de la fosforilación de p-ERK1/2 por HAMLET.

Figura 6. Respuesta inmunitaria innata a HAMLET en células diferenciadas normales

(A) La respuesta transcripcional a HAMLET es cualitativamente diferente en células normales (RPTEC), como se muestra por el mapa térmico de genes con un cambio factorial log₂ >2 en cualquier punto temporal. (B) La cantidad de genes expresados de forma diferencial (cambio factorial log₂ \geq 2) estaba reducida en comparación con células de carcinoma. (C) Siete genes relacionados con inmunidad innata están regulados positivamente en células normales, 75 minutos después de tratamiento con HAMLET. Dos genes, p38 y MKK3/6 están regulados negativamente. (D) Confirmación de la respuesta inmunitaria innata a HAMLET. Niveles elevados de TNF, IL-8 e IL-6 en sobrenadantes de células diferenciadas normales, pero no en células de carcinoma tratadas con HAMLET (21-42 μ M, 6 h). Los datos son las medias \pm ETM de triplicados de tres experimentos independientes. (E, F) Diferencia en la fosforilación de p38 entre células diferenciadas normales (HRTEC) y células de carcinoma renal, visualizadas por anticuerpos fosfoespecíficos. Para la supresión de las respuestas inmunitarias innatas por amilorida y BaCl₂, véase la Figura 14.

Figura 7. (A) Los flujos de iones inducidos por HAMLET (35 μ M) o sus constituyentes (todo-ala α -lactalbúmina 35 μ M u oleato sódico 175 μ M) se cuantificaron por fluorometría, como se describe. Ambos constituyentes mostraron actividad independiente de activación de canales de iones. El mutante parcialmente desplegado α -lactalbúmina^{all-ala} desencadenaba flujos de K⁺ comparables con HAMLET y flujos más débiles de Na⁺ o de Ca²⁺. El oleato desencadenaba flujos de K⁺, pero los efectos sobre los flujos de Na⁺ o de Ca²⁺ eran bajos. (B) Se estudió la respuesta transcripcional global a HAMLET por microserie y los 3000 genes superiores por varianza visualizados en un mapa térmico. HAMLET y el oleato causaban una respuesta transcripcional muy similar mientras que el ácido oleico era similar a controles no tratados. Rojo = alta expresión, verde = baja. (C) Los genes expresados de forma diferencial (cambio factorial log₂ de más de 1 en comparación con células de control tratadas con PBS y valor-p ajustado <0,05) eran muy similares entre células tratadas con HAMLET y con oleato. (D) Usando Ingenuity Pathway Analysis se visualizaron p38 y genes asociados con p38 en una red de señalización y se demostró que estaban regulados positivamente por HAMLET o por oleato. (E) HAMLET y el oleato causaban corte y empalme de XBP1, indicativo de estrés del RE, así como fosforilación de p38. (F) Las concentraciones de oleato correspondientes a 15 x la de HAMLET (35 μ M) no eran tumorocidas (para detalles sobre oleato como cofactor en la formación de complejos HAMLET y muerte celular).

Figura 8. Magnitud de los picos de Ca²⁺ con inhibidores diferentes. Se pre-trataron células de carcinoma (A549) y células diferenciadas sanas (HRTEC) con inhibidores y medios sin calcio según se indica. La magnitud del primer y el segundo pico de Ca²⁺ se cuantificaron usando el software LSM.

Figura 9A. Inhibidores de canales de iones rescatan células HeLa de muerte celular inducida por HAMLET. Se pre-incubaron células HeLa con inhibidores de canales de iones según se indica y se trataron con HAMLET (21-35 μ M) durante tres horas. Se cuantificó la muerte celular por ensayo con azul de tripano y por niveles de ATP.

Figura 9B. Inhibidores de canales de iones rescatan células Jurkat de muerte celular inducida por HAMLET. Se pre-incubaron células de linfoma Jurkat con inhibidores de canales de iones según se indica y se trataron con HAMLET (21-35 μ M) durante tres horas. Se cuantificó la muerte celular por ensayo de azul de tripano y por niveles de ATP.

Figura 10. Expresión diferencial de genes en la ruta de señalización de p38. Se expusieron células de carcinoma renal humano A498 a HAMLET durante tres horas y los genes expresados de forma diferencial se clasificaron de forma funcional usando Ingenuity Pathway Analysis. Se identificó la ruta de señalización de p38 como la ruta de valoración superior.

Figura 11. Fosforilación de MAPK en respuesta a HAMLET. A) Células de carcinoma renal responden a HAMLET por fosforilación de p38 α , p38 β y p38 γ , así como la diana corriente abajo HSP27. ERK1/2 se desfosforilaba. Los lisados de células de carcinoma renal (A498) se expusieron a HAMLET (35 μ M) durante 30 minutos. Las membranas con anticuerpos fosfoespecíficos se sondearon con lisados proteicos de células de carcinoma tratadas con HAMLET o con PBS (control). Se cuantificó la fosforilación de las proteínas usando ImageJ. Los datos son la media \pm DT. B) Las células de carcinoma pulmonar regulan negativamente ERK1/2 y activan p38 en respuesta a HAMLET. C) La inhibición de p38 por SB202190 anula la fosforilación de p38 y HSP27. Las células de carcinoma pulmonar se pre-incubaron con SB202190 (20 μ M, 30 minutos) y se trataron con HAMLET (35 μ M, 30 minutos). D) Células diferenciadas sanas no activan p38 en respuesta a HAMLET. Se trataron células renales pediátricas en cultivo primario con HAMLET (49 μ M, 30 minutos).

Figura 12. BIRB796 rescata células tumorales de muerte celular inducida por HAMLET. (A, B) La inhibición de p38 (BIRB796, 10 μ M) rescataba células de carcinoma (A549 y A498) de muerte en respuesta a HAMLET (7-35 μ M, 3 h). Se cuantificó la viabilidad por niveles de ATP. (B) BIRB796 (10 μ M) disminuye los cambios morfológicos asociados con muerte celular inducida por HAMLET (35 μ M, 3 h).

Figura 13. Respuesta transcripcional global en células diferenciadas sanas y tumorales. A) Mapa térmico de respuesta transcripcional global en células de carcinoma renal A498 tratadas con HAMLET y en células renales sanas. Las células de carcinoma mostraban una inducción más fuerte de la expresión génica que las células sanas. B, C) Agrupamiento jerárquico de todas las muestras de células renales sanas y de células de carcinoma renal A498. Las células renales sanas mostraban una normalización de la expresión 24 horas después de la exposición a HAMLET pareciéndose su perfil de expresión a células de control. Este no fue el caso para las células de carcinoma renal A498, donde varias rutas permanecían activadas.

La Figura 14 es una serie de gráficos que muestran los resultados de un ensayo de muerte celular como se describe a continuación, donde Ct es el control, HL es HAMLET, OA ácido oleico y Na-OA representa oleato sódico.

La Figura 15 es una serie de gráficos de un ensayo de muerte celular similar al asociado con la Figura 14 pero con el fin de determinar una respuesta a dosis.

La Figura 16 muestra los resultados de la producción de HAMLET usando columnas condicionadas con ácido oleico (A) u oleato sódico (B).

La Figura 17 muestra los resultados de espectros CD de UV lejano y próximo recogidos sobre HAMLET y NaOA-HAMLET.

La Figura 18 muestra los resultados de los estudios sobre el impacto de sustancias que incluyen complejos de acuerdo con la invención sobre canales de iones de potasio.

La Figura 19 muestra los resultados de los estudios sobre el impacto de sustancias que incluyen complejos de acuerdo con la invención sobre canales de iones de sodio.

La Figura 20 muestra la estructura de alfa-lactalbúmina con los dominios individuales resaltados.

La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo de muerte celular realizado usando diversas sustancias que incluyen complejos de la invención y componentes de los mismos.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Producción de HAMLET

HAMLET se produjo como se ha descrito previamente (Svensson et al., (2000). Proc Natl Acad Sci U S A 97, 4221-4226). Se purificó α -lactalbúmina nativa de leche humana por cromatografía de interacción hidrófoba. La proteína se desplegó con EDTA, se sometió cromatografía de intercambio iónico en una matriz pre-acondicionada con ácido oleico y se eluyó con alta concentración salina. HAMLET se liofilizó después de la purificación.

Células

Se cultivaron células (ATCC) de linfoma de células T (Jurkat), células de carcinoma pulmonar (A549), de ovario (HeLa) y renal (A498) en RPMI-1640 con aminoácidos no esenciales (1:100), piruvato sódico 1 μ M, 50 μ g/ml de gentamicina (Gibco), y suero fetal de ternera (FCS) al 5 % (A549 y A498) o al 10 % (HeLa y Jurkat), respectivamente. Las células epiteliales renales humanas (HRTEC) las proporcionó amablemente la Dr. Diana Karpman (Lund University, Lund, Suecia) y se cultivaron en DMEM/F12 con FCS al 15 % (Karpman et al., 1998). Se obtuvo la aprobación IRB del Comité Ético Médico de la Lund University Medical Faculty, Lund, Suecia (número de decisión LU 456-96). Las células RPTEC primarias (células epiteliales del túbulo proximal renal humano) se adquirieron de Lonza y se cultivaron en DMEM-F12 suplementado con NEAA, piruvato sódico, gentamicina, glutamax y FBS al 15 % (Gibco).

Flujos de iones

Se realizó el ensayo del canal de potasio (K^+) FluxOR™ en el TECAN infinite F200 (Tecan Group, Suiza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). En resumen, este implicaba el tampón de carga FluxOR™ (solución salina equilibrada de Hank (HBSS), tamponada con HEPES 20 μ M pH ajustado a 7,4 con NaOH). Se usó concentrado Powerload™ y Probenecid soluble en agua respectivamente para potenciar la solubilidad y la retención del colorante, respectivamente. Se retiró el medio de las placas celulares manualmente, y se aplicaron 80 μ l de tampón de carga que contenía la mezcla de colorante FluxOR™ a cada pocillo. Una vez dentro de la célula, la forma de éster AM no fluorescente del colorante FluxOR™ se escinde por esterasas endógenas en un indicador sensible a talio. El colorante se cargó durante 60 minutos a temperatura ambiente y después se retiró con el sobrenadante. Después de lavar con tampón PBS sin colorante, se añadió un volumen final de 80 μ l de tampón de ensayo que contenía probenecid soluble en agua. Las células recibieron uno de los siguientes inhibidores de canales: 3,3 μ l por pocillo de amilorida 30 μ M, 3,0 μ l de BaCl₂ 32 μ M, 1,8 μ l de gadolinio 5,4 μ M, 3 μ l de tetrandrina 3,2 μ M y 2,3 μ l de rojo de rutenio 2,6 μ M, y se después se incubaron a temperatura ambiente (23-25 °C) durante 30 minutos para permitir el equilibrado de los compuestos de ensayo. Antes de la inyección, se preparó tampón de estimulación a

partir del tampón sin cloruro y reactivos de talio proporcionados en el kit, así como HAMLET, para conseguir concentraciones añadidas finales de T1+ 2 mM y HAMLET 35 μM después de dilución 1:5 tras inyección del tampón de estímulo en las células que se habían cargado con colorante FluxOR™

5 Ensayo de muerte celular

Las células se desprendieron de los matraces de cultivo celular con versen (0,2 g de EDTA en 200 ml de H₂O y 800 ml de PBS), se lavaron con PBS y se resuspendieron en RPMI-1640 sin suero. Se incubó HAMLET disuelto en PBS con las células (0,5 x 10⁶/ml para A549, A498 y células HeLa; 1 * 10⁶/ml para Jurcat) a 37 °C. Se añadió FCS después de 1 hora. La muerte celular se cuantificó por exclusión de azul de tripano (Chroma Gesellschaft Schmid & Co) o midiendo los niveles de ATP (kit ATPlite, PerkinElmer, Infinite 200, Tecan). Se capturaron imágenes ópticas usando el microscopio holográfico digital HoloMonitor™ M2 (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Suecia).

15 Inhibidores e iARN

Para estudios con inhibidores, se pre-trataron las células durante 30 minutos. Los inhibidores usados fueron cloruro de gadolinio (GdCl₃, 100 μM), cloruro de bario (BaCl₂, 1 μM), rojo de rutenio (30 μM), tetrandrina (10 μM) y amilorida (1 μM), todos de Sigma Aldrich. Para la inhibición de p38, se usó SB202190 (20 μM , Sigma Aldrich) o BIRB796 (10 μM , Axon Medchem) disuelto en DMSO. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS y se añadió medio nuevo con inhibidor. Para interferencia de ARN, se usó pre-mezclas de ARNip FlexiTube contra MAPK11 (SI00606053), MAPK14 (SI00300769) y ARNip de control negativo All Star (SI03650318) de Qiagen. Se transfeció A549 directo usando concentración de ARNip final 25 nM en placa de 24 pocillos. Después de 48 horas, se examinó la reducción por transferencia de Western (anti-p38, 1:1000, Cell Signalling) y por RT-PCR (MAPK14, QT00079345, QIAGEN).

25 RT-PCR y corte y empalme de XBP1

Se preparó ARN con el kit RNeasy Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se trató con DNasa I (QIAGEN). Se sintetizó el ADNc usando el sistema de RT-PCR de primera hebra Superscript III (Invitrogen). La PCR de XBP1 con corte y empalme y sin corte y empalme fue como se describe (Yoshida et al., 2001). Se realizó PCR a tiempo real en un instrumento Rotorgene 2000 (Corbett Life Science, Sídney, Australia) usando ensayos de expresión génica TaqMan (Applied BioSystems) de CHOP/DDIT3 (Hs01090850), de IL6 (Hs00985639), de IL8 (Hs00174103) y de TNF α (Hs00174128). Se usó GAPDH (Hs99999905_ml) para la normalización.

35 Imágenes de células vivas

Para las imágenes de células vivas, las células se pre-trataron con SB202190 durante 30 minutos, se tiñeron los núcleos con Hoechst 33342 (Invitrogen) y se añadió HAMLET marcado con Alexa-Fluor 568 (HAMLET marcado al 10 %, Molecular Probes) en medio libre de suero. Se añadió FCS después de 1 hora. Se detectó la fluorescencia con ajustes del estenopeico correspondientes a 1 unidad de Airy. Las células se mantuvieron a 37 °C, CO₂ al 5 % y se examinaron sin fijar por microscopía confocal LSM510 DUO (Carl Zeiss).

Transferencia de Western y cuantificación de citoquinas

Se separaron volúmenes iguales de lisados por SDS-PAGE en geles de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de PVDF. Para otras transferencias de Western, se permitió que 200.000 células se adhirieran durante una noche en una placa de 6 pocillos. Después del tratamiento con HAMLET, las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de lisis M-PER (Pierce) que contenía coctel inhibidor de proteasa completo y coctel inhibidor de fosfatasa PhosSTOP (ambos de Roche). Las células desprendidas se recogieron por centrifugación. Los lisados se aclararon por centrifugación y se midieron las concentraciones de proteínas usando el ensayo de proteínas DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se separaron cantidades iguales de proteína por SDS-PAGE en geles de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de PVDF (GE Healthcare). Las membranas se saturaron con BSA (GAPDH) o leche en polvo desnatada (fosfo-p38, p38, fosfo-ERK1/2, ERK1/2) y se incubaron con anticuerpos anti-p38, anti-fosfo-p38, anti-ERK1/2, anti-fosfo-(Thr202/Tyr204)-p44/42 (todos 1:500-1000, Cell Signaling Technology), anti-ATF6 (1:1000, IMG-273, Imgenex), anti-fosfo-eIF2 α (Ser51), (1:500, Cell Signaling Technology) o anti-GAPDH (1:3000-5000, Novus Biologicals) seguido por anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano rusticano anti-conejo (1:1000, Dako-Cytomation, Glostrup, Dinamarca) o anti-ratón (1:40000-50000, Novus Biologicals) para la tinción. Los anticuerpos unidos se detectaron con el reactivo de transferencia de Western (GE Healthcare, Little Chalfont, R.U.) y el equipo GelDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Si fuera necesario, las membranas se separaron con tampón de separación de transferencia de Western Restore (Pierce, Rockford, IL), se bloquearon y se volvieron a sondear con nuevos anticuerpos. Se analizó la fosforilación de MAP quinasa en una serie de Phospho-MAPK humana (Proteome Profiler Array, R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron las intensidades de banda y manchas usando ImageJ (Abramoff et al., 2004). La cuantificación de citoquinas (IL6, IL8, TNF α) se realizó en un sistema de inmunoensayo IMMULITE 1000 (Siemens Diagnostics).

65

Transcriptómica

Para el análisis de microserie con inhibidores de canales de iones, se permitió que 200.000 células A549/pocillo se adhirieran durante una noche en una placa de 6 pocillos. Después de 1 hora de tratamiento con HAMLET, las células se lisaron y se extrajo el ARN usando el kit RNeasy Mini (QIAGEN). Las muestras se enviaron a AROS Applied Biotechnology (Árhus, Dinamarca) para el análisis. Los datos se pre-procesaron usando RMA implementado en los paquetes de software libre "affy" proporcionados por R and Bioconductor (<http://www.r-project.org>). Los genes expresados de forma diferencial se identificaron usando estadística-t ajustada de Bayes empíricamente y se caracterizaron usando la herramienta de agrupación de anotación funcional en la Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), (Dennis et al., 2003) e Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems). Todos los datos de microserie se registraron en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo>) con los números de acceso GSE23772.

Para el análisis de microserie ampliado, se evaluó la expresión génica por microseries de genoma completo Illumina (HumanHT-12 Expression BeadChip). Los datos se normalizaron usando correlación cruzada (Chua et al., 2006). Los genes con un cambio factorial $\log_2 \geq 1,2$ en células tumorales y $\geq 2,0$ en células diferenciadas sanas en cualquier punto temporal se consideraron como expresados diferencialmente (valor-p ajustado de Benjamini-Hochberg $< 0,05$).

Análisis estadístico

Se realizaron mediciones ANOVA repetidas con el software InStat (versión 3.06, GraphPad, San Diego, CA).

Resultados

Activación de canales de iones por HAMLET; diferencia entre células de carcinoma y células diferenciadas normales

Para examinar si HAMLET modula la actividad de canales de iones en células tumorales, primero se cuantificaron los cambios en Ca^{2+} y K^+ intracelular. Las células de carcinoma pulmonar primero se pre-cargaron con el fluoróforo Fluo- de Ca^{2+} Fluo-4, se expusieron a HAMLET (35 μM) y se examinaron por microscopia confocal a tiempo real por cambios en la intensidad de fluorescencia (Figura 1A). el ionóforo de Ca^{2+} A23187, que actúa como lanzadera de Ca^{2+} a través de las membranas celulares, se usó como control positivo (Abbott et al., 1979).

HAMLET desencadenó un aumento por etapas rápido en Ca^{2+} intracelular (Figura 1A), empezando después de aproximadamente 30 segundos, con un segundo pico después de aproximadamente 100 segundos, pero con heterogeneidad considerable. El ionóforo causaba un aumento más drástico y sostenido en los niveles intracelulares de Ca^{2+} que HAMLET (31 % del ionóforo, Figura 1B) e implicaba todas las células en comparación con aproximadamente el 50 % de las células expuestas a HAMLET. El ionóforo también desencadenaba cambios inmediatos en la morfología de células de carcinoma, lo que indica ruptura de la membrana y necrosis (Figura 1B). Los cambios morfológicos en las células tratadas con HAMLET se producían de forma más gradual y con diferentes características, que implican que el mecanismo de alteración inicial de la membrana difiere entre HAMLET y el ionóforo. Para distinguir la movilización de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares del flujo entrante de Ca^{2+} extracelular, entonces se añadió EGTA al medio celular. El aumento prematuro en Ca^{2+} intracelular en respuesta a HAMLET (35 μM) era insensible a EGTA, pero la posterior respuesta de Ca^{2+} se inhibía por EGTA, ya que era la respuesta al ionóforo (Tabla 1), lo que sugiere que HAMLET desencadena la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares, seguido por apertura de canales de iones. Los flujos de K^+ a través de las membranas de células tumorales se cuantificaron posteriormente en las mismas condiciones experimentales, usando el fluoróforo FluxOR™, que emite fluorescencia después de que el talio haya entrado en las células a través de los canales de K^+ . HAMLET abría rápidamente los canales de K^+ en células de carcinoma (Figura 1D).

Los cambios en los niveles de Ca^{2+} y K^+ se examinaron posteriormente en células diferenciadas sanas en cultivo primario, que demostraron previamente sobrevivir a la exposición a HAMLET (Hakansson et al., 1995; Svanborg et al., 2003). Se pre-incubaron células epiteliales tubulares renales humanas (HRTEC) con Fluo-4 como se describe, se expusieron a HAMLET (35 μM) y se examinaron por microscopia confocal a tiempo real. HAMLET movilizó una respuesta débil y transitoria de Ca^{2+} en HRTEC, que duró aproximadamente 90 segundos en comparación con la respuesta prolongada a HAMLET en células de carcinoma ($p < 0,00$, Figura 1C) y era insensible a tratamiento con EGTA, lo que revela que Ca^{2+} puede mobilizarse desde almacenes intracelulares por HAMLET también en células sanas, pero que los efectos posteriores sobre los canales de iones son débiles o ausentes (Figura 1D). No se observó cambio en la morfología, pero el ionóforo de Ca^{2+} dio lugar a un aumento rápido y sostenido en Ca^{2+} y un sucedió un cambio rápido de la morfología, con características necróticas, lo que demuestra que esta respuesta estaba intacta en células sanas, si se estimulaba apropiadamente.

Los resultados, especialmente la respuesta prolongada de Ca^{2+} y la magnitud de la activación del canal de K^+ , sugiere que la activación de los canales de iones por HAMLET distingue las células de carcinoma de células diferenciadas sanas.

Inhibidores de canales de iones modifican los flujos de Ca^{2+} y de K^+ en respuesta a HAMLET

Para caracterizar adicionalmente la activación de canales de iones por HAMLET, se pre-trataron células de carcinoma con bloqueantes de canales definidos. Amilorida es un inhibidor de canales de sodio con efectos sobre canales mecanosensibles, el cloruro de bario (BaCl_2) es un inhibidor general de canales de K^+ , el cloruro de gadolinio (GdCl_3) inhibe canales mecanosensibles, el rojo de rutenio es un inhibidor general de Ca^{2+} y tetrandrina inhibe canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia. Las células de carcinoma se pre-incubaron con Fluo-4 como se describe anteriormente, se pre-trataron con cada uno de los inhibidores de canales durante 30 minutos, se expusieron a HAMLET (35 μM) y se examinaron por imágenes confocales a tiempo real. Además, las células tratadas con EGTA se compararon con células con niveles extracelulares intactos de Ca^{2+} , para distinguir el pico prematuro del posterior flujo de entrada de Ca^{2+} (Figura 1B, Tabla en la Figura 8).

El primer pico de Ca^{2+} insensible a EGTA en células de carcinoma se inhibió por amilorida, BaCl_2 y GdCl_3 , que ilustra un efecto de HAMLET sobre canales tanto mecanosensibles como abiertos por voltaje en células de carcinoma. El flujo de K^+ se inhibió fuertemente por GdCl_3 , lo que implica que podrían estar implicados canales mecanosensibles (Figura 1E), mientras que amilorida y BaCl_2 dieron inhibición intermedia. En células sanas, GdCl_3 no tuvo efecto sobre las células sanas, sin embargo, lo que indica una diferencia en la mecanodetección entre células de carcinoma y células diferenciadas sanas. La baja señal de K^+ después de exposición a HAMLET se redujo adicionalmente por los bloqueantes de canales (Figura 1E).

Estos resultados muestran que HAMLET activa los canales de Ca^{2+} y de K^+ preferiblemente en células de carcinoma, lo que implica que la apertura de los canales de Ca^{2+} y de K^+ podría ser un componente esencial de las respuestas de células de carcinoma a HAMLET. La inhibición de los canales de K^+ por BaCl_2 y de los canales de Ca^{2+} por rojo de rutenio y por tetrandrina mostró que estos canales se activaban juntos. Los efectos inhibidores de amilorida y de GdCl_3 sugirieron que las MSC podrían perturbarse por HAMLET, además de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} .

La inhibición de los canales de iones previene la muerte celular inducida por HAMLET

Para examinar si los canales de iones funcionales son importantes para la actividad tumoricida de HAMLET, se pre-trataron células de carcinoma pulmonar A549 en suspensión con los inhibidores de canales durante 30 minutos y se expusieron a concentraciones crecientes de HAMLET durante 3 horas. En ausencia de inhibidores, se detectó una rápida respuesta letal dependiente de la dosis a HAMLET, medida por exclusión de azul de tripano (Figura 2A, B) y por los niveles de ATP (Figura 2A, B). Amilorida y BaCl_2 redujeron notablemente la muerte celular, pero GdCl_3 , rojo de rutenio y tetrandrina no tuvieron efecto sobre la viabilidad. El efecto de rescate de amilorida y BaCl_2 se confirmó en células de carcinoma de ovario (células HeLa) y en células de linfoma (células Jurkat), en las condiciones descritas anteriormente (Figuras 9 y 10). Los inhibidores mostraron eficacia similar observada en células de carcinoma pulmonar, lo que implica que podrían aparecer alteraciones de los canales de iones ampliamente en células de carcinoma y de linfoma, en respuesta a HAMLET. El efecto de rescate de amilorida y BaCl_2 estuvo sostenido en las células de carcinoma durante 24 horas, cuando el 44 % de las células de control habían muerto, mientras que las células pre-tratadas con BaCl_2 o con amilorida aún eran viables (13 y 8 %, respectivamente, Figura 11). El efecto de rescate y la diferencia en la actividad entre los inhibidores fue similar para células adherentes y para células en suspensión expuestas a HAMLET (21 y 35 μM) durante 3 horas, lo que sugiere que las interacciones de matriz extracelular no estaban implicadas directamente en la respuesta de muerte (Figura 2C y 9).

Para examinar si el cambio inducido por HAMLET en la morfología de células de carcinoma se modificaba por los inhibidores de canales, se expusieron células de carcinoma pulmonar, carcinoma renal y linfoma a HAMLET en presencia o en ausencia de inhibidores de canales de iones y se examinaron por microscopía óptica (Figura 2C y Figura suplementaria). Después del pre-tratamiento con amilorida y con BaCl_2 , las células de carcinoma mantuvieron su morfología normal. En contraste, GdCl_3 , rojo de rutenio y tetrandrina no evitaron los cambios morfológicos en respuesta a HAMLET.

Los resultados anteriores demuestran que la activación de canales de iones es esencial para la respuesta tumoricida a HAMLET en células de carcinoma y para los cambios morfológicos que acompañan a la muerte. En particular, indican la implicación de canales dependientes de Ca^{2+} y de K^+ pero no de tetrandrina.

La transcripción inducida por HAMLET se reduce enormemente por amilorida

Para comprender los mecanismos de muerte de células de carcinoma y la contribución de la activación de los canales de iones, se examinó la respuesta de transcripción global a HAMLET, usando series de genoma completo. Se expusieron células de carcinoma pulmonar A549 a HAMLET (21 μM) durante 1 hora y se compararon células pre-tratadas con amilorida con células en medio en solitario. Los datos sin procesar se normalizaron usando RMA (Irizarry et al., 2003) y se descubrió que eran de excelente calidad con alta correlación de replicación ($>0,99$) y valores NUSE cercanos a 1. Se obtuvo una visión global imparcial de la transcripción realizando un agrupamiento jerárquico de los 3000 genes superiores por varianza y se visualizó en un mapa térmico (Figura 2D y 13). Los genes con valores-p ajustados de Bayes empíricamente $<0,05$ y cambios factoriales $\log_2 >1$ se consideraron expresados de forma diferencial y se caracterizaron funcionalmente usando Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (Dennis et al., 2003) e Ingenuity Pathway Analysis.

La inhibición de canales de iones causó una reducción drástica de la respuesta transcripcional a HAMLET. En ausencia de inhibidor, se encontró un total de 336 genes expresados de forma diferencial en respuesta a tratamiento con HAMLET (Figura 3B, Tabla 1).

5

Tabla 1

Gen_símbolo	Gen_nombre
ATF3	factor 3 de transcripción de activación
ATF7IP2	proteína 2 de interacción con factor 7 de transcripción de activación
ARL17A	factor de ADP-ribosilación tipo 17A
ADRB1	receptor beta-1 adrenérgico
AHSA2	AHA1, activador de homólogo 2 de ATPasa proteica de 90 kDa de choque térmico (levaduras)
AREG	amfirregulina
ANGPTL4	angiopoyetina tipo 4
ANKRD1	dominio 1 de repetición anquirina (músculo cardíaco)
AADAC	arilacetamida desacetilasa (esterasa)
ABCD3	casete de unión a ATP, subfamilia D (ALD), miembro 3
ABCE1	casete de unión a ATP, subfamilia E (OABP), miembro 1
ATP6V1B2	ATPasa, de transporte de H ⁺ , lisosómica 56/58 kDa, V1 subunidad B2
AXIN2	axina 2
BCL6	CLL de células-B/linfoma 6
BHLHE40	familia de hélice-bucle-hélice básico, miembro e40
BRI3BP	proteína de unión a BRI3
BTBD10	dominio BTB (POZ) que contiene 10
BANP	proteína nuclear asociada a BTG3
CCL20	quimioquina (motivo C-C) ligando 20
CXCL2	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 2
CXCL3	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3
CLCC1	canal de cloruro CLIC tipo 1
C1orf59	fase de lectura abierta 59 del cromosoma 1
C10orf140	fase de lectura abierta 140 del cromosoma 10
C14orf181	fase de lectura abierta 181 del cromosoma 14
C20orf177	fase de lectura abierta 177 del cromosoma 20
C20orf199	fase de lectura abierta 199 del cromosoma 20
C6orf141	fase de lectura abierta 141 del cromosoma 6
C8orf4	fase de lectura abierta 4 del cromosoma 8
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo
CUL3	culina 3
CCNG2	ciclina G2
CCNL1	ciclina L1
CDKL3	quinasa dependiente de ciclina tipo 3
CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteína, 61
CSRNP1	proteína nuclear rica en cisteína-serina 1
CYP27B1	citocromo P450, familia 27, subfamilia B, polipéptido 1
DDX3X	polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 3, ligado a X
DERL1	familia de dominio tipo Der1, miembro 1
DDIT3	transcripto 3 inducible por daño en el ADN
DNAJB1	homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 1
DOT1L	histona H3 metiltransferasa tipo DOT1 (<i>S. cerevisiae</i>)
DUSP1	fosfatasa 1 de especificidad doble
DUSP10	fosfatasa 10 de especificidad doble
DUSP5	fosfatasa 5 de especificidad doble
DUSP6	fosfatasa 6 de especificidad doble
DUSP8	fosfatasa 8 de especificidad doble
EGR1	respuesta 1 de crecimiento temprano
EGR2	respuesta 2 de crecimiento temprano
ENGASE	endo-beta-N-acetilglucosaminidasa
EPHA2	receptor A2 de EPH
EREG	epirregulina
EPM2AIP1	proteína 1 de interacción con EPM2A (laforina)
ERRF1	inhibidor 1 de retroalimentación del receptor de ERBB
EIF4A1	factor 4A1 de inicio de la traducción eucariota
EIF4A2	factor 4A2 de inicio de la traducción eucariota
FAM172A	familia con similitud de secuencia 172, miembro A
FAM173B	familia con similitud de secuencia 173, miembro B
FAM178A	familia con similitud de secuencia 178, miembro A
FAM24B	familia con similitud de secuencia 24, miembro B

ES 2 613 986 T3

Gen_símbolo	Gen_nombre
FASTKD1	dominios 1 de FAST quinasa
FOS	homólogo de oncogén vírico de osteosarcoma murino FBJ
FOSB	homólogo B de oncogén vírico de osteosarcoma murino FBJ
FST	folistatina
FOXQ1	caja forkhead Q1
FRAT2	frecuentemente reordenado en linfomas 2 de células T avanzados
GPR125	receptor 125 acoplado a proteína G
GXYLT1	glucósido xilosiltransferasa 1
GPAM	glicerol-3-fosfato aciltransferasa, mitocondrial
GADD45A	detención del crecimiento e inducible por daño en el ADN, alfa
GADD45B	detención del crecimiento e inducible por daño en el ADN, beta
GDF15	factor 15 de diferenciación del crecimiento
HBS1L	tipo HBS1 (<i>S. cerevisiae</i>)
HSPD1	proteína 1 de 60 kDa de choque térmico (chaperonina)
HSPA1L	tipo proteína 1 de 70 kDa de choque térmico
HSPA1A	proteína 1A de 70 kDa de choque térmico
HSPA1B	proteína 1B de 70 kDa de choque térmico
HSPA6	proteína 6 de 70 kDa de choque térmico (HSP70B')
HERC4	hectodominio y RLD 4
HBEGF	Factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina
HNRNPA0	ribonucleoproteína A0 nuclear heterogénea
HNRNPH3	ribonucleoproteína H3 nuclear heterogénea (2H9)
HMGA2	AT-hook 2 de grupo de alta movilidad
HINT1	proteína 1 de unión a nucleótidos de triada de histidina
HIST1H1C	grupo 1 de histonas, H1c
HIST1H2AK	grupo 1 de histonas, H2ak
HIST1H2BK	grupo 1 de histonas, H2bk
HIST1H4E	grupo 1 de histonas, H4e
HIST1H4H	grupo 1 de histonas, H4h
HIST2H2BE	grupo 2 de histonas, H2be
HAS2	hialuronano sintasa 2
IER2	respuesta temprana inmediata 2
INHBA	inhibina, beta A
ID3	inhibidor de proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante, de unión a ADN 3
IL11	interleuquina 11 interleuquina 12A (factor 1 de maduración de estimulación de células citolíticas naturales,
IL12A	factor 1 de maduración de linfocitos citotóxicos, p35)
IL6	interleuquina 6 (interferón, beta 2)
IL8	interleuquina 8
JUN	oncogen jun
KLHL7	kelch tipo 7 (<i>Drosophila</i>)
KRT34	queratina 34
hCG_1749898	proteína tipo 2-4 asociada a queratina
KRTAP4-8	proteína tipo 4-8 asociada a queratina
KIAA0776	KIAA0776
KLF10	factor 10 tipo Kruppel
KLF2	factor 2 tipo Kruppel (pulmón)
KLF4	factor 4 tipo Kruppel (intestino)
KLF6	factor 6 tipo Kruppel
KLF7	factor 7 tipo Kruppel (ubicuo)
LRRC49	repetición rica en leucina que contiene 49
LIF	factor inhibidor de leucemia (factor de diferenciación colinérgico)
LMBR1	homólogo 1 de región de extremidad (ratón)
LEAP2	péptido 2 antimicrobiano expresado en hígado
LRP5L	proteína tipo 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MCTS1	secuencia 1 amplificada de células T malignas
MAP7D3	dominio MAP7 que contiene 3
MALAT1	transcripto 1 de adenocarcinoma pulmonar asociado a metástasis (no codifica proteína)
MEX3B	homólogo B de mex-3 (<i>C. elegans</i>)
MIB1	homólogo 1 de mindbomb (<i>Drosophila</i>)
MYH9	miosina, cadena pesada 9, no muscular
NA	NA
NDUFC2	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1, subcomplejo desconocido, 2, 14,5 kDa
NANOS1	homólogo 1 de nanos (<i>Drosophila</i>)
NEDD9	expresado en células precursoras neurales, regulado negativamente con el desarrollo 9

ES 2 613 986 T3

Gen_símbolo	Gen_nombre
NEK2	quinasa 2 relacionada con NIMA (gen a nunca en mitosis)
NKX3-1	factor nuclear de homeobox 1 NK3 del potenciador génico de polipéptido ligero kappa en inhibidor de células B,
NFKBIZ	zeta
NR4A1	subfamilia 4 de receptores nucleares, grupo A, miembro 1
NUBPL	tipo proteína de unión a nucleótidos
OBFC2A	pegamiento de unión a oligonucleótido/oligosacárido que contiene 2A
PER1	homólogo 1 de period (<i>Drosophila</i>)
PMAIP1	proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato
PHLDA11	dominio tipo homólogo de pleckstrina, familia A, miembro 1
PARP1	poli (ADP-ribosa) polimerasa 1
PABPC1L	proteína de unión a poli(A), tipo 1 citoplasmática
PABPN1	proteína de unión a poli(A), nuclear 1
POLR2B	polipéptido B de polimerasa (ARN) II (dirigido por ADN), 140 kDa
PRDM1	dominio PR que contiene 1, con dominio ZNF
PCYOX1	prenilcisteína oxidasa 1
PREPL	prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 de tipo proil endopeptidasa (prostaglandina G/H sintasa y
PTGS2	ciclooxigenasa)
PSMD12	proteasoma (prosome, macropaina) subunidad 26S, no ATPasa, 12
PPP1CB	proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma beta
PPP1R15A	proteína fosfatasa 1, subunidad 15A reguladora (inhibidor)
PRPF3	homólogo 3 de factor de procesamiento de pre-ARNm PRP3 (<i>S. cerevisiae</i>)
RHOB	familia del gen homólogo de ras, miembro B
RGS2	regulador de señalización 2 de proteína G, 24 kDa
RTN4IP1	proteína 1 de interacción con reticulon 4
RND3	GTPasa 3 de familia Rho
RNGTT	ARN guanililtransferasa y 5'-fosfatasa
SKP2	proteína 2 asociada a quinasa de fase S (p45)
SAMHD1	dominio SAM y dominio 1HD
SGK1	quinasa 1 regulada con suero/glucocorticoides
SNHG12	gen 12 hospedador de ARN nucleolar pequeño (no codifica proteína)
SNORA12	ARN nucleolar pequeño, caja 12 H/ACA
SLC25A24	familia 25 de transportador de solutos (transportador mitocondrial; transportador de fosfato), miembro 24
SLC9A2	familia 9 de transportador de solutos (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 2
SFRS2	factor de corte y empalme, rico en arginina/serina 2
SFRS5	factor de corte y empalme, rico en arginina/serina 5
SPRY2	homólogo 2 de sprouty (<i>Drosophila</i>)
SBNO1	homólogo 1 de strawberry Notch (<i>Drosophila</i>)
SUMF1	factor asociado a proteína de unión a caja TATA (TBP) factor 1 modificador de sulfatasa, ARN polimerasa I, D,
TAF1D	41 kDa
THBS1	trombospondina 1
TRA2A	homólogo alfa de transformador 2 (<i>Drosophila</i>)
TM9SF2	miembro 2 de la superfamilia de transmembrana 9
TMEM168	proteína transmembrana 168
TMEM30A	proteína transmembrana 30A
TRIB1	homólogo 1 de tribbles (<i>Drosophila</i>)
WRB	proteína básica rica en triptófano
TSC22D3	familia de dominio TSC22, miembro 3
TUFT1	superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral tufelina 1, miembro 10d, señuelo con truncamiento
TNFRSF10D	dominio de muerte
TNFAIP3	proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa
TP53INP1	proteína 1 nuclear inducida por proteína p53 tumoral
USP9X	peptidasa 9 específica de ubiquitina, ligada a X
UXS1	UDP-glucuronato descarboxilasa 1
UNC119B	homólogo B de unc-119 (<i>C. elegans</i>)
MAFF	homólogo F de oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf (aviar)
MYC	homólogo de oncogén vírico de mielocitomatosis v-myc (aviar)
ZC3HAV1	dedos de zinc tipo CCCH, antivírico 1
ZNF280D	proteína de dedos de zinc 280D
ZFP36L1	proteína de dedos de zinc 36, tipo 1 C3H
ZFYVE27	dedos de zinc, dominio FYVE que contiene 27

Gen_símbolo Gen_nombre
ZMAT3 dedos de zinc, matrina tipo 3

La lista de genes está dominada por la ruta que controla la señalización de MAPK p38 (n=15, valor-p ajustado = $1,6 \times 10^{-3}$), regulación de muerte celular (valor de enriquecimiento (ES) = 4,7, n=22) o estrés del RE (ES=2,22, n=8). En contraste, solamente 52 genes se expresaban de forma diferencial en células pre-tratadas con amilorida (Tabla 2).

5

Tabla 2

SÍMBOLO	NOMBRE DEL GEN
EGR1	respuesta 1 de crecimiento prematuro
FOS	homólogo de oncogén vírico de osteosarcoma murino FBJ
KLF2	factor 2 tipo Kruppel (pulmón)
FST	folistatina
MYLIP	factor nuclear de proteína de interacción con cadena ligera reguladora de miosina de potenciador del gen de polipéptido ligero kappa en inhibidor de células B,
NFKBIZ	zeta
JUN	oncogén jun
RPL18	proteína ribosómica L18
CXCL3	ligando 3 de quimioquina (motivo C-X-C)
PDK4	piruvato deshidrogenasa quinasa, isozima 4
HNRPDL	tipo ribonucleoproteína D nuclear heterogénea
RHOB	familia de gen homólogo ras, miembro B
RPS24	proteína ribosómica S24
CCNL1	ciclina L1
KLF6	factor 6 tipo Kruppel
NA	NA
ATF3	factor 3 de transcripción de activación
KLF10	factor 10 tipo Kruppel
CCL20	ligando 20 de quimioquina (motivo C-C)
CXCL2	ligando 2 de quimioquina (motivo C-X-C)
C8orf4	fase de lectura abierta 4 del cromosoma 8 HAS2 hialuronano sintasa 2
MEX3B	homólogo B de mex-3 (<i>C. elegans</i>)
IL6	interleuquina 6 (interferón, beta 2)
MAT2A	metionina adenosiltransferasa II, alfa
CUZD1	dominios 1 tipo CUB y zona pelucida
HBP1	molécula CD55 del factor 1 de transcripción de caja HMG, factor que acelera la descomposición para el complemento
CD55	(grupo de sangre Cromer)
PRC1	regulador proteico de prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 de citoquinesis 1 (prostaglandina G/H sintasa y
PTGS2	ciclooxigenasa)
BTG2	familia BTG, miembro 2
DDIT3	transcrito 3 inducible por daño en el ADN
DUSP5	fosfatasa 5 de especificidad doble
PRDM1	dominio PR que contiene 1, con dominio ZNF
AREG	anfirregulina
RPL37A	proteína ribosómica L37a

Los genes detectados estaban principalmente implicados en la regulación transcripcional y no incluían genes implicados en la señalización de p38, en la muerte celular o en el estrés del RE. Amilorida en solitario no tuvo efectos significativos sobre la transcripción. Los resultados implicaban que es necesaria la activación de canales de iones para que sucediera la respuesta transcripcional a HAMLET.

10

HAMLET desencadena estrés del RE en células de carcinoma

Las alteraciones en la regulación de Ca^{2+} en el RE pueden alterar el plegamiento de las proteínas en el RE por inactivación de las chaperonas dependientes de Ca^{2+} , tales como GRP78 y calreticulina. Un aumento en proteínas desplegadas puede activar una serie conservada de eventos de transducción de señales. Abarcando la membrana del RE, se activan tres detectores de estrés del RE PERK, ATF6 e IRE1 por una sobrecarga de proteínas desplegadas. Tras la activación de PERK, eIF2 α se fosforila, desactivando la traducción de proteínas para evitar la sobrecarga de proteínas desplegadas. Para examinar si HAMLET altera el RE y desencadena una respuesta de proteínas desplegadas, se analizó la transcripción de genes inducidos por estrés del RE. El análisis de microserie reveló una respuesta de estrés del RE en células de carcinoma pulmonar tratadas con HAMLET, con transcripción aumentada de genes claves relacionados con estrés del RE, tales como ATF4 (factor 4 de transcripción de activación), BiP (GRP78), IRE1 (enzima 1 que requiere inositol), PERK (RE quinasa tipo PKR) y XBP1 (proteína 1 de unión a caja X), (Figura 4A y 4B). A nivel de proteínas, HAMLET desencadenaba fosforilación de eIF2 α dependiente

15

20

25

del tiempo (30 minutos) y de la dosis en células tumorales A549 (Figura 3C). La transferencia de Western reveló adicionalmente un aumento en ATF6 escindido, así como de longitud completa después de tres horas de tratamiento con HAMLET (Figura 3D). El corte y empalme de XBP1 a través de IRE1 (Yoshida et al., 2001) se detectó por PCR en células de carcinoma tratadas con HAMLET (30 minutos), produciendo un producto de PCR de 442 pb (XBP1) y un producto más pequeño que carecía de 26 pb (XBP1s), (Figura 3E). Esta respuesta fue más rápida que el corte y empalme de XBP1 en respuesta al control de tunicamicina a pesar de la alta concentración de tunicamicina (15 mg/ml). Finalmente, el ARNm de CHOP, que codifica un factor de transcripción pro-apoptótico implicado fuertemente en la muerte celular inducida por estrés del RE (Wang y Ron, 1996), aumentaba 30 veces después del tratamiento con HAMLET (3 horas, Figura 3F) confirmando la fuerte regulación de CHOP también observada en los estudios de microserie. Son resultados son coherentes con una alteración directa y rápida del RE por HAMLET, como se refleja por la movilización de Ca^{2+} .

HAMLET desencadena una respuesta de muerte celular dependiente de p38 en células tumorales

Para identificar las rutas que ejecutan muerte de células tumorales corriente abajo de los canales de iones, se examinaron adicionalmente las respuestas transcripcionales globales a HAMLET en células de carcinoma pulmonar humano (A549) y de carcinoma renal (A498) durante un periodo prolongado de 15 minutos a 24 horas. La ruta de señalización de MAPK p38 se identificó como una ruta canónica de alta valoración en células A549 (Figura 4A).

El gen MKK3, que actúa directamente corriente arriba de p38 y es responsable de su fosforilación y de su activación, estaba regulado positivamente, junto con nueve genes de la ruta de p38 (Figura 4B, C). Dos fosfatasa de especificidad doble (DUSP, DUSP1 y DUSP10) estaban reguladas positivas con cambios factoriales \log_2 de 1,34 y 1,98, respectivamente. Las DUSP son reguladores de retroalimentación conocidos de la señalización de MAPK, regulados positivamente cuando la ruta está activa (Owens y Keyse, 2007). Adicionalmente, tanto DUSP1 como DUSP10 son promiscuos y se sabe que regulan tanto JNK (DUSP1 y DUSP10), así como ERK (DUSP1). Los genes corriente abajo de p38 incluían CREB5, CHOP y HIST2H3C. La respuesta a HAMLET era bifásica para la mayoría de los genes regulados, con un aumento inicial que tenía su máximo después de 3 horas y continuaba durante 6 horas. Después de 24 horas, la actividad transcripcional volvía a los niveles basales para seis de los diez genes, mientras que IRAK2, PLA2G4C, CHOP y CREB5 mantenían expresión elevada. Otros genes afectados por tratamiento con HAMLET estaban implicados en muerte celular y en la estructura de la cromatina, coherente con las observaciones previas (Aits et al., 2009; Hallgren et al., 2008; Svanborg et al., 2003). Los resultados se confirmaron en células de carcinoma renal A498, donde la ruta de p38 de nuevo surgió como la ruta canónica de mayor valoración (Figura 11).

Las MAPK p38 se activan por fosforilación doble sobre restos conservados de treonina y tirosina por MKK3/6 y cuando se fosforilan, una amplia diversidad de proteínas efectoras, incluyendo quinasas MAPKAPK2, chaperonas HSP27 y factores de transcripción ATF2 y CHOP quedaban activos (Cuenda y Rousseau, 2007). En series de anticuerpos contra fosfo-MAPK tanto células de carcinoma renal como pulmonar demostraron responder rápidamente a HAMLET (30 minutos) fosforilando p38 α y HSP27 (Figura 3D; imágenes de fosfoserie dadas en la Figura 12A, B). Además, p38 β y p38 γ se fosforilaban en células de carcinoma renal (Figura 4D). Había una pérdida paralela de fosforilación de ERK1/2 en ambos tipos celulares, coherente con un desplazamiento de proliferación celular a muerte celular (Figura 4D, E), (Xia et al., 1995). La quinasa JNK mostró alteraciones mínimas después de 30 minutos (Figure S2A, B). La fosforilación de p38 también se confirmó por transferencia de Western y demostró ser dependiente de la dosis y del tiempo (Figura 3F). En marcado contraste, no apareció fosforilación de p38, sus isoformas o HSP27 en células renales diferenciadas sanas en respuesta a HAMLET (Figura 12E).

Para determinar si la señalización de p38 estaba implicada en la muerte celular, se inhibieron p38 α y p38 β en células de carcinoma pulmonar y renal y de linfoma Jurkat con dos inhibidores de p38 de molécula pequeña: SB202190, un inhibidor de piridinilimidazol altamente específico; y BIRB796, un compuesto de diaril urea, que alberga poca similitud estructural con SB202190 (Fabian et al., 2005), (Figura 5A-B y Figura 12B). La rápida respuesta tumorocida dependiente de la dosis a HAMLET se atenuaba claramente por SB202190, medida por tinción con azul de tripano (Figura 5A) y por los niveles de ATP (Figura 5B). El efecto de la inhibición de p38 sobre la muerte celular también se observó por imágenes confocales a tiempo real de células de carcinoma pulmonar expuestas a HAMLET marcado de forma fluorescente. Las imágenes de células no fijadas, registradas a tiempo real, revelaron rápidos cambios morfológicos con formación de ampollas, redondeo, pérdida de citoplasma y condensación nuclear (Figura 5C). El inhibidor de p38 retardaba estos cambios durante aproximadamente 6 horas (Figura 5C). Para descartar que los efectos observados se debían a efectos no relacionados con p38, también se usó ARNip dirigido a p38 α y a p38 β . La supresión mediada por ARNip de p38 α y de p38 β en combinación bloqueaba la muerte celular inducida por HAMLET (Figura 5D), pero ninguno de los ARNip tenía ningún efecto, lo que indica que una isoforma es suficiente para inducir muerte celular. La inhibición de la actividad MAPK p38 por SB202190 estaba acompañada por una marcada disminución en la fosforilación de p38 y de HSP27 (Figura 12C, D) tras tratamiento con HAMLET.

Estos resultados identifican genes de la ruta de MAPK p38 como efectores principales de la respuesta de muerte prematura a HAMLET y sugiere que cuando se bloquea p38, sucede un rescate significativo.

En células diferenciadas sanas, HAMLET activa la inmunidad innata sin una respuesta de p38

Para examinar la base molecular de la diferencia en la susceptibilidad a HAMLET entre células de carcinoma y células diferenciadas sanas, se compararon los perfiles transcripcionales. Las células sanas respondían menos fuertemente a HAMLET que las células de carcinoma renal (2064 genes en riñón pediátrico en comparación con 4424 en células de carcinoma renal, Figura 6A) y mostraron una respuesta transitoria, en lugar de sostenida (Figura 6B). Extraordinariamente, la ruta de señalización de p38 mostró evidencias de regulación negativa en puntos temporales prematuros con expresión disminuida de MKK3, p38 y HSP27 después de 60 y 75 minutos de exposición a HAMLET (Figura 6E). Se descubrió que las rutas reguladas significativamente por HAMLET en células sanas estaban implicadas en la regulación de la inmunidad innata (ruta de IL-6, Figura 6C) y la señalización de glucocorticoides. Aquellos genes prominentes regulados positivamente identificados incluían IL-1, IL-6, c-Jun, c-Fos, IκB y TNFα, y se confirmó un claro aumento en los niveles de proteínas secretadas para IL-6, IL-8 y TNFα (Figura 6D). Estas citoquinas no se secretaban por las células de carcinoma. Además, otras rutas de señalización relacionadas con muerte identificadas como expresadas de forma diferencial en células de carcinoma tales como el receptor de muerte, p53 y estrés del RE, no mostraron regulación significativa en células diferenciadas sanas. Por tanto, las células diferenciadas sanas expuestas a HAMLET mostraban una respuesta inmunitaria innata independiente de p38 restringida.

La fosforilación de p38 y de eIF2α inducida por HAMLET y las respuestas inmunitarias innatas se previenen por inhibidores de canales de iones

Para examinar si los canales de iones también controlaban la fosforilación en respuesta a HAMLET, se pre-trataron células tumorales con inhibidores de canales de iones y se cuantificó la fosforilación de p38, eIF2α y ERK1/2 usando anticuerpos fosfoespecíficos. Los bloqueantes de canales de iones redujeron la fosforilación de p38 o de eIF2α en células de carcinoma (Figura 7A y B) y en paralelo, se revirtió la reducción en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 7B). Por tanto, los bloqueantes de canales de iones eran capaces no solamente de bloquear los cambios transcripcionales en respuesta a HAMLET, sino también de anular la fosfoseñalización dentro de estas rutas.

Para examinar adicionalmente si la respuesta inmunitaria innata en células diferenciadas sanas requiere canales de iones funcionales, se cuantificó la expresión de ARNm de IL-6, IL-8 y TNFα en células pre-tratadas con amilorida y BaCl₂, usando qRT-PCR. HAMLET (21 μM, 1 hora) causó un aumento de 30 veces en el ARNm de IL-6 que se anuló por amilorida (Figura 7D). Se observaron resultados similares para IL-6 y TNFα. BaCl₂ no inhibió la respuesta de IL-6 y de IL-8 a HAMLET, pero causó una reducción en la expresión de TNFα inducida por HAMLET.

Estos resultados confirman que los flujos de iones y la activación de los canales de iones es una etapa esencial para activar las diferentes respuestas celulares a HAMLET tanto en células de carcinoma como en células diferenciadas sanas. De forma interesante, la ruta de Ras/MAPK, que es crucial para su supervivencia celular, se mantenía cuando las células con HAMLET se pre-trataban con inhibidores.

Ejemplo 2

Comparación de las respuestas celulares provocadas por HAMLET/oleato y ácido oleico

Métodos

Preparaciones de soluciones madre:

Ácido oleico:

Se "diluyeron" 5 μl de ácido oleico en 1 ml de RPMI para dar una "solución turbia" 16 mM. Oleato: se disolvieron 5 mg de oleato sódico en 1 ml de RPMI para dar una solución transparente 16 mM. HAMLET, preparado se describe, por ejemplo, en el documento WO9926979: se diluyó 1 mg en 100 μl de PBS. $0,001/15200 = 6,6 \times 10^{-8}$ mol

Se añadió a cada uno de los pocillos:

$$\text{HAMLET: } 50 \text{ } \mu\text{l} = 3,3 \times 10^{-8} \text{ mol ALA, } 16,5 \times 10^{-8} \text{ mol OA}$$

$$\text{Oleato/OA: } 10 \text{ } \mu\text{l} = 1 \times 10^{-5} \text{ l} \times 16 \times 10^{-3} = 1,6 \times 10^{-7} = 16 \text{ mol OA}$$

(10 μl de las soluciones madre de oleato y ácido oleico es equivalente molar a los moles de OA/Na-oleato presente en 0,5 mg de HAMLET).

Ensayo de muerte celular

Se sembraron células A549 hasta una densidad de 0,8 - 1,0 x 10⁶ células/pocillo en RPMI sin FCS. Se añadieron diferentes volúmenes de soluciones de HAMLET/oleato y ácido oleico. Las células se incubaron durante 1 hora a 37

°C, CO₂ al 5 % durante 1 hora antes de añadir 50 µl de FCS (concentración final del 5 %) a los pocillos. Las células después se incubaron adicionalmente durante 2 horas adicionales antes de determinar la viabilidad por exclusión de azul de tripano y por mediciones de ATP.

5 Los resultados se muestran en la Figura 14 donde la Figura 14A muestra el valor medio del ensayo de azul de tripano y la Figura 14B muestra los valores medios de ATP, donde Ct es el control, HL es HAMLET, OA es ácido oleico a una concentración en moles, equivalente a la que existe en 0,5 mg de HAMLET y Na-OA representa oleato sódico también a una concentración en un equivalente molar a la cantidad en HAMLET-oleato.

10 El experimento se repitió, pero con diversas concentraciones de ácido oleico y de oleato sódico para intentar averiguar una respuesta a la dosis. Los resultados se muestran en la Figura 15.

15 Esta serie de experimentos muestra que HAMLET elimina las células tumorales de forma más eficaz que el oleato o el ácido oleico (OA) sin proteínas. Las concentraciones molares se eligieron basándose en la estequiometría conocida en HAMLET.

20 Sin embargo, se descubrió que el oleato también era tumoricida, como se muestra usando un diseño de respuesta a dosis. El oleato eliminaba las células tumorales a concentraciones tres a cinco veces mayores que la concentración en HAMLET. Este efecto era más fuerte que el de ácido oleico.

20 Ejemplo 3

Conversión de alfa-lactalbúmina parcialmente desplegada en una columna condicionada con oleato; comparación con HAMLET después de acondicionamiento con OA.

25 Métodos:

30 Se disolvieron 10 µl de ácido oleico en 100 µl de EtOH y se añadieron 10 ml de tampón A (TRIS 10 mM, NaCl 0,15 mM, pH 8,5) durante la agitación. Se añadió el ácido oleico a la columna, como se ha descrito previamente, y se usó para la conversión de alfa-lactalbúmina tratada con EDTA.

35 Se disolvieron 10 mg de oleato sódico en 1 ml de tampón A x 1 como menciona anteriormente y después se diluyeron adicionalmente hasta un volumen total de 10 ml y se añadieron a la columna correspondiente al procedimiento usado para el procedimiento de ácido oleico. La columna después se usó para la conversión de alfa-lactalbúmina tratada con EDTA.

40 Los resultados se muestran en la Figura 16. Se comparó la capacidad del oleato de formar complejos de tipo HAMLET con la de OA. Las eficacias de conversión fueron similares, en términos de la posición del pico eluido con concentración salina, pero la apropiada estequiometría de proteína frente a oleato tiene que examinarse (Fig. 16A). En este trabajo, el rendimiento de la fracción activa obtenida con una columna condicionada con oleato sódico fue comparable o mejor que cuando se usaba ácido oleico.

45 Además, la respuesta de muerte celular de los dos complejos se investigó usando el método descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Actividad tumoricida de oleato-HAMLET

Sustancia	Conc. (mg/ml)	Azul de tripano	Actividad ATP
Control	-	88	100
HAMLET	0,5	8	21
Oleato-HAMLET	0,5	1	27

En este conjunto de datos, el complejo de oleato era al menos tan tumoricida como el complejo de OA.

50 Ejemplo 4

Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de HAMLET y de NaOA-HAMLET

55 Materiales y métodos

Se recogieron espectros CD de UV lejano y próximo sobre HAMLET y NaOA-HAMLET a 25 °C usando un espectropolarímetro Jasco J-810. Se disolvieron materiales liofilizados en PBS hasta 1 mg/ml (32 µM para HAMLET y 43 µM para HAMLET-NaOA medidos por A₂₈₀). Se obtuvieron espectros de UV próximo entre 240 y 320 nm y espectros de UV lejano entre 195 y 250 nm. La fase de longitud de onda fue de 1 nm, el tiempo de respuesta fue 8 s, y la tasa de exploración fue 10 nm/min. Se presentó un promedio de seis exploraciones donde la elipticidad media del residuo, θ_m en grad. cm² dmol⁻¹, se calculó como se describe previamente (Svensson et al., 1999, J. Biol. Chem., 274: 6388-96).

Los resultados se muestran en la Figura 17. Se examinó la estructura terciaria de HAMLET (línea continua negra) y de NaOA-HAMLET (línea discontinua) por espectroscopia CD de UV próximo. Los espectros se registraron a 1 mg/ml en PBS. Los espectros tanto de HAMLET como de NaOA-HAMLET se identificaron esencialmente, mostrando una disminución en la intensidad en comparación con la de una proteína completamente plegada. La diferencia en la intensidad de los espectros se debía a una diferencia en sus concentraciones molares (32 μ M para HAMLET; 43 μ M para NaOA-HAMLET). La estructura secundaria de los dos complejos se examinó por espectroscopia CD de UV lejano. Ambos complejos retenían un contenido casi idéntico de estructura secundaria, como se muestra por el análisis de estructura secundaria K2D.

10 Ejemplo 5

Estudios transcriptómicos

15 Se investigaron los efectos relativos sobre la expresión génica en las células tratadas como se describe en el Ejemplo 1 para intentar determinar a nivel genómico los efectos de los diversos componentes.

En total se generaron 12 muestras de ARN (triplicadas de control, tratadas con ácido oleico, HAMLET y oleato) y se hibridaron con microseries de genoma completo Affymetrix Whole Genome U219. Los perfiles de hibridación resultantes se evaluaron antes y después de la normalización RMA y se descubrió que eran de excelente calidad. Para el análisis estadístico, los datos normalizados se ajustaron a un modelo lineal y se realizó un análisis bayesiano empírico, acoplado con ajuste de valor-p.

25 De la comparación resultante, se identificó un total de 336 y 426 genes expresados de forma diferencial con un valor-p ajustado $<0,05$ y un cambio factorial \log_2 de 1 para células tratadas con HAMLET y con oleato, respectivamente. En contraste, las células tratadas con ácido oleico tenían un programa transcripcional muy similar al de las células de control con solamente dos genes expresados de forma diferencial.

30 Las listas de genes resultantes para células tratadas con HAMLET (Tabla 4) y con oleato (Tabla 5) se compararon y se descubrió que compartían una gran cantidad de genes ($n=145$, Tabla 3). En las siguientes tablas, las abreviaturas son las dadas anteriormente en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

Tabla 3

35 ATF3, AHS2, AREG, ANGPTL4, ANKRD1, AADAC, ABCD3, ABCE1, ATP6V1B2, BCL6, BHLHE40, BANP, CCL20, CXCL2, CXCL3, CLCC1, C10orf140, C14orf181, C6orf141, C8orf4, CTGF, CUL3, CCNL1, CDKL3, CYR61, CSRNP1, DDX3X, DERL1, DDIT3, DNAJB1, DOT1L, DUSP1, DUSP10, DUSP5, DUSP6, DUSP8, EGR1, EGR2, EPHA2, EREG, ERFF1, EIF4A2, FAM172A, FAM173B, FASTKD1, FOS, FOSB, FST, FOXQ1, GPR125, GPAM, GADD45A, GADD45B, GDF15, HBS1L, HSPD1, HSPA1L, HSPA1A, HSPA1B, HSPA6, HERC4, HBEGF, HNRNPA0, HNRNPH3, HMGA2, HINT1, HIST1H1C, HIST1H2AK, HIST1H2BK, HIST1H4E, HIST2H2BE, HAS2, IER2, INHBA, ID3, IL11, IL12A, IL6, IL8, JUN, KLHL7, KRT34, hCG_1749898, KRTAP4-8, KIAA0776, KLF10, KLF2, KLF4, KLF6, KLF7, LRRC49, LIF, LRP5L, MCTS1, MAP7D3, MALAT1, NA, NDUFC2, NANOS1, NEDD9, NEK2, NKX3-1, NFKBIZ, NR4A1, NUBPL, PER1, PMAIP1, PHLDA1, PABPC1L, POLR2B, PRDM1, PCYOX1, PREPL, PTGS2, PSMD12, PPP1R15A, RHOB, RGS2, RTN4IP1, RND3, SKP2, SAMHD1, SGK1, SNHG12, SNORA12, SLC9A2, SFRS2, SPRY2, SBNO1, SUMF1, TAF1D, TRA2A, TM9SF2, TMEM168, TMEM30A, TRIB1, WRB, TSC22D3, TNFAIP3, UXS1, UNC119B, MAFF, MYC, ZC3HAV1, ZFP36L1.

Tabla 4

50 ATF7IP2, ARL17A, ADRB1, AXIN2, BRI3BP, BTBD10, C1orf59, C20orf177, C20orf199, CCNG2, CYP27B1, ENGASE, EPM2AIP1, EIF4A1, FAM178A, FAM24B, FRAT2, GXYL1, HIST1H4H, LMBR1, LEAP2, MEX3B, MIB1, MYH9, OBFC2A, PARP1, PABPN1, PPP1CB, PRPF3, RINGT, SLC25A24, SFRS5, THBS1, TUFT1, TNFRSF10D, TP53INP1, USP9X, ZNF280D, ZFYVE27, ZMAT3.

Tabla 5

55 DERA, ALCAM, ACOT9, ADAMTS1, ARL14, ARL4D, ADRB2, ADM, AKNAD1, ANKRD37, ANXA1, API5, ARRDC3, ABCC4, BAG3, BDNF, CAPN7, CALU, CREB5, CEBPB, C1orf63, C18orf55, C20orf3, DEDD2, DDIT4, DNAJB4, DNAJC27, EGR4, ERMP1, EDN2, FBXO3, FAR1, FBN2, FOXD3, FOSL1, GBE1, GAD1, GPCPD1, GEM, HES1, HIST1H2AG, HIST1H2BD, HIST1H2BN, HDAC1, HOXB2, HTRA1, IER5, IGF2R, JMJD6, JUNB, LIPA, MXD1, MAT2A, METTL11A, MCL1, NF2, NCRNA00201, NFIL3, OPA1, KCNJ2, PDK3, RCN2, RPL4, RPS27A, SIK1, SEL1L, SERTAD1, STAM, SNRPA1, SNORD14D, SNORA41, NALCN, SAT1, SPRY4, SOX9, STC1, SMARCA4, TBC1D7, TPM1, TSPYL2, VEGFA, VLDLR, WSB1, ZFP36, ZNF57, ZNF655, ZFAND2A

60 Coherente con los hallazgos previos, las listas incluían una gran cantidad de genes en la ruta de p38, incluyendo CREB5, DDIT3, DUSP1, DUSP10, GADD45A, GADD45B y MYC, todos regulados positivamente en respuesta a HAMLET. También se encontraron nueve genes asociados a estrés del RE expresados de forma diferencial, incluyendo miembros de la familia de la proteína 70 de choque térmico (HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSP1D), otras chaperonas (DNAJB1, HSPA6), miembros de la maquinaria de degradación asociada al retículo endoplasmático (DERL1), así como fosfatasa asociadas al RE (PPP1R15A).

A continuación propusimos investigar los genes específicos para HAMLET y oleato, respectivamente. en células tratadas con HAMLET, los aciertos predominantes incluían genes implicados en reparación de daño en el ADN y en la cromatina (OBFCA2, PARP1, PPP1CB, TP53INP1 y ZMAT3), procesamiento del ARN (PRPF3, RNGTT, PABN1 y SFRS5) y muerte celular (AXIN2, THBS1, TNFRSF10D y ZMAT3). Los genes específicos de oleato (n=143) estaban dominados por genes de muerte celular (API5, BAG3, HDAC1, MCL1) y por factores de transcripción (MXD1, DEDD2, EGR4, HOXB3, NFIL2).

Estos resultados sugieren que el oleato sódico tiene un mayor efecto intrínseco que puede ser de apoyo a la actividad de HAMLET mientras que el ácido oleico es menos activo a nivel génico. La lista de genes combinados (Tabla 1), por tanto, puede definir una firma génica provocada por complejos de lípido-proteína. Esta firma posibilita una selección de compuestos similares con el objetivo de identificación de otros complejos tumoricidas de proteína-lípido. Adicionalmente, en este caso, podría ser beneficioso desde un punto de vista de la actividad asegurar que el propio complejo contiene oleato en preferencia a ácido oleico.

Ejemplo 6

Péptidos de α -lactalbúmina y activación de canales de potasio

HAMLET desencadena un rápido flujo de potasio en células tumorales. La actividad del canal de potasio, por lo tanto, se midió en líneas celulares de carcinoma pulmonar A549 usando un indicador, que emite una señal de fluorescencia tras entrar en las células a través de canales de potasio abiertos, indicador de talio (Tl^+) (Figura 18). Para abordar si los péptidos de α -lactalbúmina en solitario o en combinación con oleato tiene actividad similar de activación de canales de iones, las células tumorales se expusieron a tres péptidos, que cubren la secuencia completa de α -lactalbúmina - Alfa 1 (resto 1-40), Beta (resto 41-80), Alfa 2 (resto 81-123) (Figura 20). Añadir los péptidos en solitario o en diferentes mezclas entre sí no abrió los canales de potasio (Figura 18A y 18B).

En HAMLET, el oleato contribuye a la activación de los canales de iones y a las actividades tumoricidas. Una concentración de 175 μ M (5 x la concentración de HAMLET que se basa en 4-8 restos de oleato en HAMLET), se activaron los canales de potasio por oleato en solitario, pero en eficacia inferior que HAMLET. Las combinaciones de péptidos individuales con oleato se ensayaron posteriormente. Los péptidos en solitario o en diferentes combinaciones se mezclaron con oleato y se añadieron inmediatamente a las células. Tanto las mezclas de Alfa 1-oleato como de Alfa 2-oleato activaron los canales de potasio de forma más eficaz que el oleato en solitario (Figura 18C). La mezcla de Beta-oleato, sin embargo, inhibía los flujos, produciendo una señal de fluorescencia inferior a la basal. Una mezcla de Alfa 1 + Alfa 2-oleato (Figura 18D), dio un aumento de fluorescencia comparable a HAMLET después de aproximadamente 4 minutos, pero la activación sucedía más lentamente que para el complejo de HAMLET. La mezcla de Alfa 2-Beta-oleato dio una señal similar a oleato en solitario después de aproximadamente 3 minutos mientras que la mezcla de Alfa 1-Beta-oleato dio una señal ligeramente inferior. La mezcla que consiste en los tres péptidos y oleato dio la señal más baja, entre la basal y la mezcla de Alfa 1-Beta-oleato.

Los resultados sugieren que los péptidos Alfa 1 y Alfa 2 pueden presentar el oleato a las membranas de células tumorales de un modo que activa los flujos de iones. El dominio beta no muestra esta capacidad, sin embargo.

Ejemplo 7

Péptidos de α -lactalbúmina y activación de canales de sodio

Se midió el flujo entrante de sodio en células Jurkat usando el indicador de sodio CoroNa Green. Se cuantificó la fluorescencia cada 20 segundos de intervalo durante un periodo total de medición de 10 minutos. HAMLET desencadenó un aumento inmediato de la señal de fluorescencia cuando se añadía a las células mientras que el control de PBS dio una ligera disminución en la señal de fluorescencia en el tiempo. En contraste, el péptido individual y las mezclas de dos o los tres péptidos no desencadenaban un aumento en la fluorescencia (Figura 19A y 19B).

El oleato en solitario no desencadenaba un flujo de sodio, ya que no había aumento en la señal de fluorescencia (Figura 19C). Las mezclas de Alfa 1-oleato y Alfa 2-oleato desencadenaban un aumento intermedio de fluorescencia en comparación con HAMLET, y la mezcla de Alfa 1-oleato dio una señal de fluorescencia inferior que la mezcla de Alfa 2-oleato. La mezcla de Beta-oleato desencadenaba una señal de fluorescencia, similar a la de oleato.

Las mezclas de dos o más péptidos con oleato se muestran en la Figura 19D. La mezcla de Alfa 1-Alfa 2-oleato dio un aumento de fluorescencia ligeramente inferior que la mezcla de Alfa 1-oleato. Ambas mezclas de Alfa 1-Beta-oleato y Alfa 2-Beta-oleato dieron una señal de fluorescencia similar a la de oleato en solitario. La mezcla que consiste en los tres péptidos y oleato dio una señal similar a la de la mezcla de Alfa 1-Alfa 2-oleato.

Ejemplo 8

Los péptidos de α -lactalbúmina y oleato causan muerte celular

Para investigar el efecto del péptido α -lactalbúmina en causar actividad tumoricida, se trataron células Jurkat con uno o más péptidos y se evaluó el grado de muerte celular por dos ensayos de muerte celular, concretamente el ensayo de ATP y el ensayo PrestoBlue. En resumen, las células se incubaron con el péptido respectivo en solitario o en combinación con 5 veces de equivalente de oleato sódico. La mezcla de péptido y oleato se preparó como se describe en el Ejemplo 7, y se añadió inmediatamente a las células. El péptido en solitario no causaba ninguna disminución en la viabilidad celular, medida por ambos ensayos. Las mezclas de Alfa 1-oleato y Alfa 2-oleato causaban muerte celular, en un grado similar a HAMLET, medida por ambos ensayos (Figura 21). Por otro lado, Beta-oleato causaba aproximadamente un 50 % de muerte celular, medida por ensayo de ATP, pero no por ensayo PrestoBlue.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hamlet Pharma AB Svanborg, Catharina Mok, Kenneth H Trulsson, Maria Mossberg, Ann-Kristin Storm, Petter Ho, Ching Shing Greaves, Carol P

<120> Complejo Biológicamente Activo y su Preparación

<130> CPG/P1898PC00

<150> GB 1019937.0
<151> 24-11-2010

<150> GB 1019936.2
<151> 24-11-2010

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complejo sintético

<400> 1

ES 2 613 986 T3

Lys Gln Phe Thr Lys Ala Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp
 1 5 10 15

Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Ala Thr Met Phe His
 20 25 30

Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala Ile Val Glu Asn Asn Glu Ser Thr
 35 40 45

Glu Tyr Gly Leu Phe Gln Ile Ser Asn Lys Leu Trp Ala Lys Ser Ser
 50 55 60

Gln Val Pro Gln Ser Arg Asn Ile Ala Asp Ile Ser Ala Asp Lys Phe
 65 70 75 80

Leu Asp Asp Asp Ile Thr Asp Asp Ile Met Ala Ala Lys Lys Ile Leu
 85 90 95

Asp Ile Lys Gly Ile Asp Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala Leu Ala Thr
 100 105 110

Glu Lys Leu Glu Gln Trp Leu Ala Glu Lys Leu
 115 120

- <210> 2
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Complejo sintético
- <400> 2

ES 2 613 986 T3

Met Lys Gln Phe Thr Lys Ala Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile
 1 5 10 15

Asp Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Ala Thr Met Phe
 20 25 30

His Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala Ile Val Glu Asn Asn Glu Ser
 35 40 45

Thr Glu Tyr Gly Leu Phe Gln Ile Ser Asn Lys Leu Trp Ala Lys Ser
 50 55 60

Ser Gln Val Pro Gln Ser Arg Asn Ile Ala Asp Ile Ser Ala Asp Lys
 65 70 75 80

Phe Leu Asp Asp Asp Ile Thr Asp Asp Ile Met Ala Ala Lys Lys Ile
 85 90 95

Leu Asp Ile Lys Gly Ile Asp Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala Leu Ala
 100 105 110

Thr Glu Lys Leu Glu Gln Trp Leu Ala Glu Lys Leu
 115 120

5 <210> 3
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Complejo sintético

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido diferente de cisteína

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido diferente de cisteína

<400> 3

Lys Gln Phe Thr Lys Xaa Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp
 1 5 10 15

Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Xaa Thr Met Phe His
 20 25 30

Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala
 35 40

<210> 4
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Complejo sintético
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido diferente de cisteína
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido diferente de cisteína
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido diferente de cisteína
 25
 <400> 4
 Leu Asp Asp Asp Ile Thr Asp Asp Ile Met Xaa Ala Lys Lys Ile Leu
 1 5 10 15
 Asp Ile Lys Gly Ile Asp Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala Leu Xaa Thr
 20 25 30
 Glu Lys Leu Glu Gln Trp Leu Xaa Glu Lys Leu
 35 40
 30
 <210> 5
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Complejo sintético
 <400> 5
 Lys Gln Phe Thr Lys Ala Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp
 1 5 10 15
 Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Ala Thr Met Phe His
 20 25 30
 Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala
 35 40
 40
 <210> 6
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 613 986 T3

<220>

<223> Complejo sintético

<400> 6

5

Leu Asp Asp Asp Ile Thr Asp Asp Ile Met Ala Ala Lys Lys Ile Leu
1 5 10 15

Asp Ile Lys Gly Ile Asp Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala Leu Ala Thr
20 25 30

Glu Lys Leu Glu Gln Trp Leu Ala Glu Lys Leu
35 40

REIVINDICACIONES

5 1. Un complejo biológicamente activo que comprende un péptido de hasta 50 aminoácidos que comprende un fragmento de alfa lactalbúmina en que cualquier resto de cisteína se reemplaza por otros aminoácidos; y una sal farmacéuticamente aceptable de un ácido graso o un lípido: en el que el fragmento es de la SEQ ID NO 3 o de la SEQ ID NO 4

10 KQFTKXELSQLLKDIDGYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 3)
LDDITDDIMXAKKILDIKGIDYWLAHKALXTEKLEQWLXEKL (SEQ ID NO 4)

donde X es un resto de aminoácido diferente a cisteína.

15 2. Un complejo biológicamente activo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento es de la SEQ ID NO 5 o de la SEQ ID NO 6:

KQFTKAELSQLLKDIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 5)
LDDITDDIMAAKKILDIKGIDYWLAHKALATEKLEQWLAEKL (SEQ ID NO 6).

20 3. Un complejo biológicamente activo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la sal de ácido graso o de lípido es una sal soluble en agua, tal como una sal de sodio o de potasio.

4. Un complejo biológicamente activo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la sal del ácido graso o del lípido es una sal de ácido oleico.

25 5. Un método para preparar un complejo biológicamente activo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho método mezclar conjuntamente un péptido como se define en la reivindicación 1 y una sal de un ácido graso.

30 6. Una composición farmacéutica que comprende un complejo biológicamente activo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Un complejo biológicamente activo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en terapia.

35 8. Un kit que comprende un péptido de hasta 50 aminoácidos como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 y una sal farmacéuticamente aceptable de un ácido graso o de un lípido.

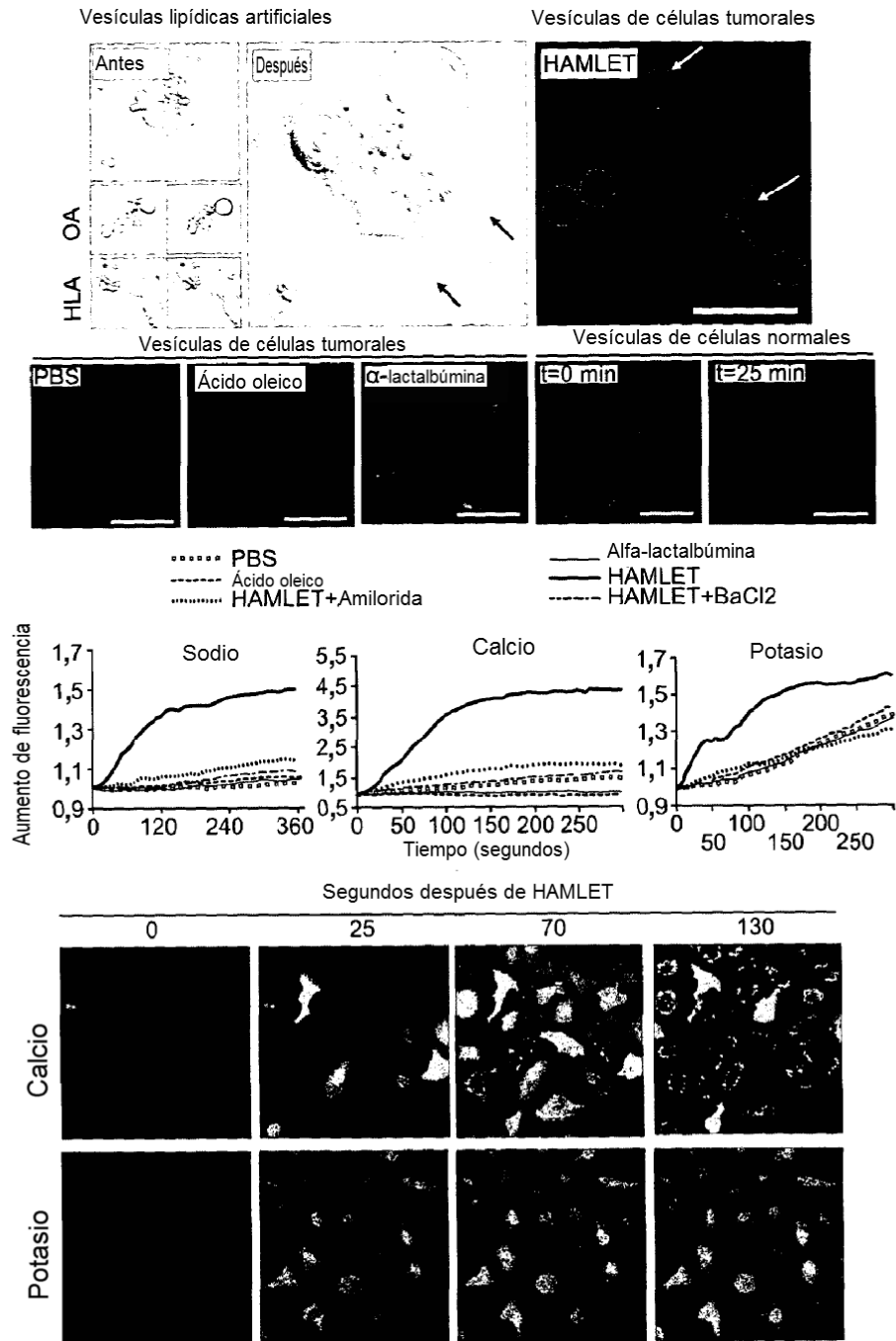


Figura 1

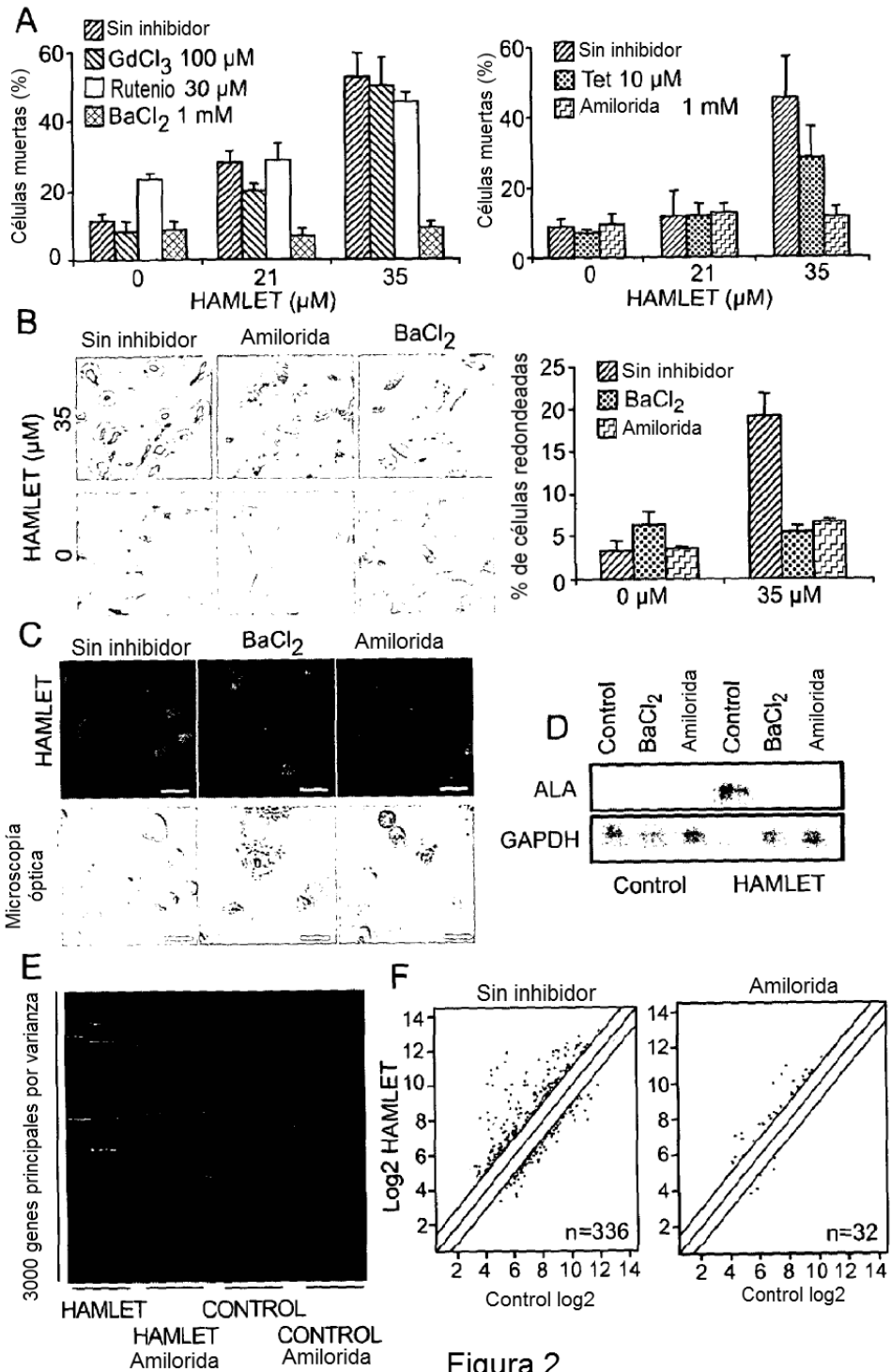
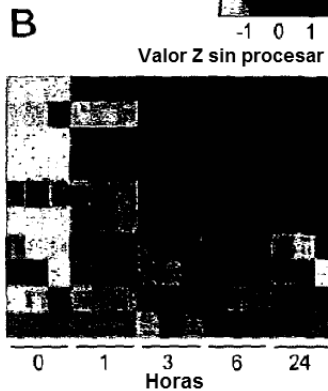
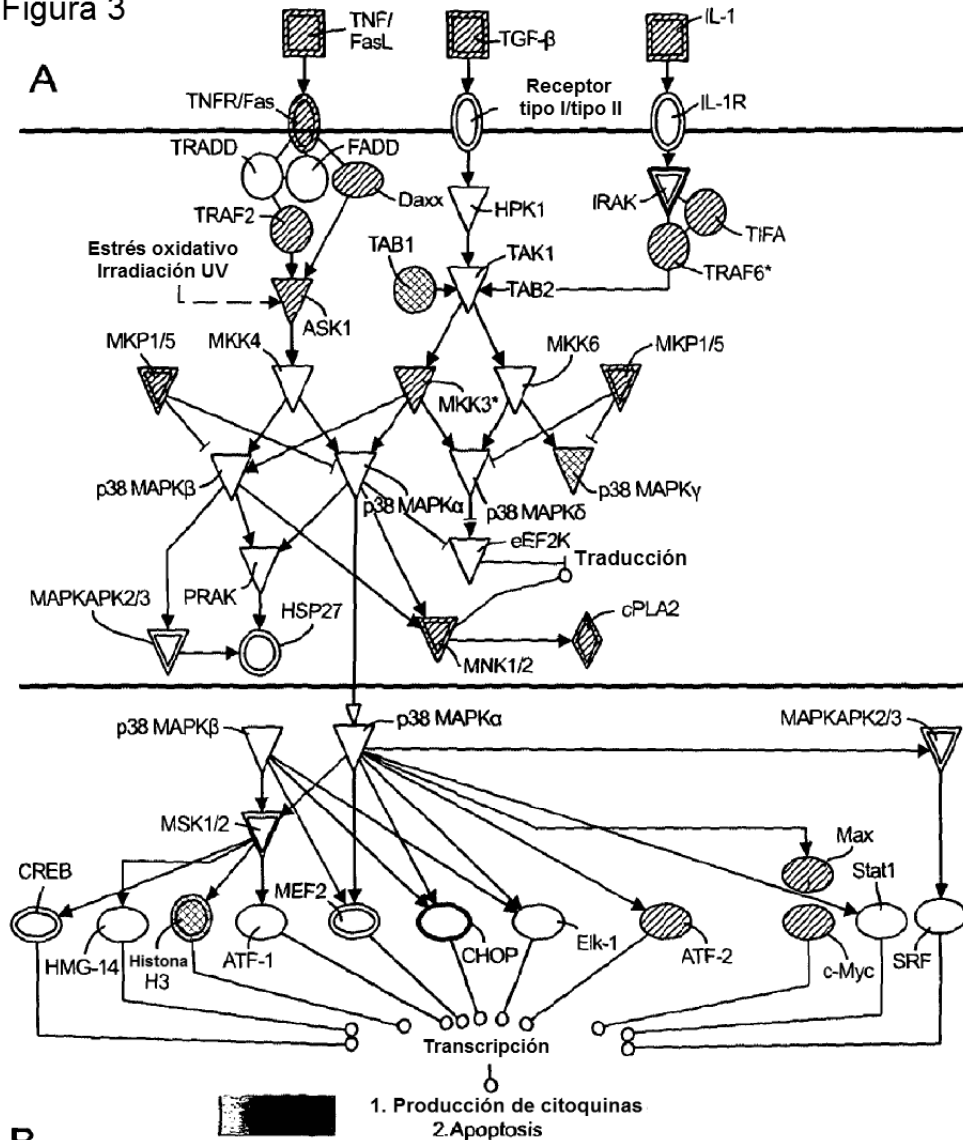


Figura 2

Figura 3



C

Símbolo del gen	Probo ID	1h	3h	6h	24h
		Factor de cambio Loc2			
CHOP	ILM_1676984	0,87	1,00	3,39	1,88
CRE85	ILMN_1728877	0,08	2,48	1,91	1,34
DUSP1	ILMN_1781285	1,16	1,34	1,12	0,64
DUSP10	ILMN_2401878	0,83	1,08	1,89	1,09
HIST2H3C	ILMN_1666179	0,26	1,85	1,67	0,01
IRAK2	ILMN_1745984	0,41	1,87	1,94	1,25
LOC653604	ILMN_1793461	1,10	2,50	1,69	0,24
MKK3	ILMN_1680777	0,15	0,85	2,26	1,52
TNF	ILMN_1728100	0	1,33	1,09	0

Figura 3 continuación

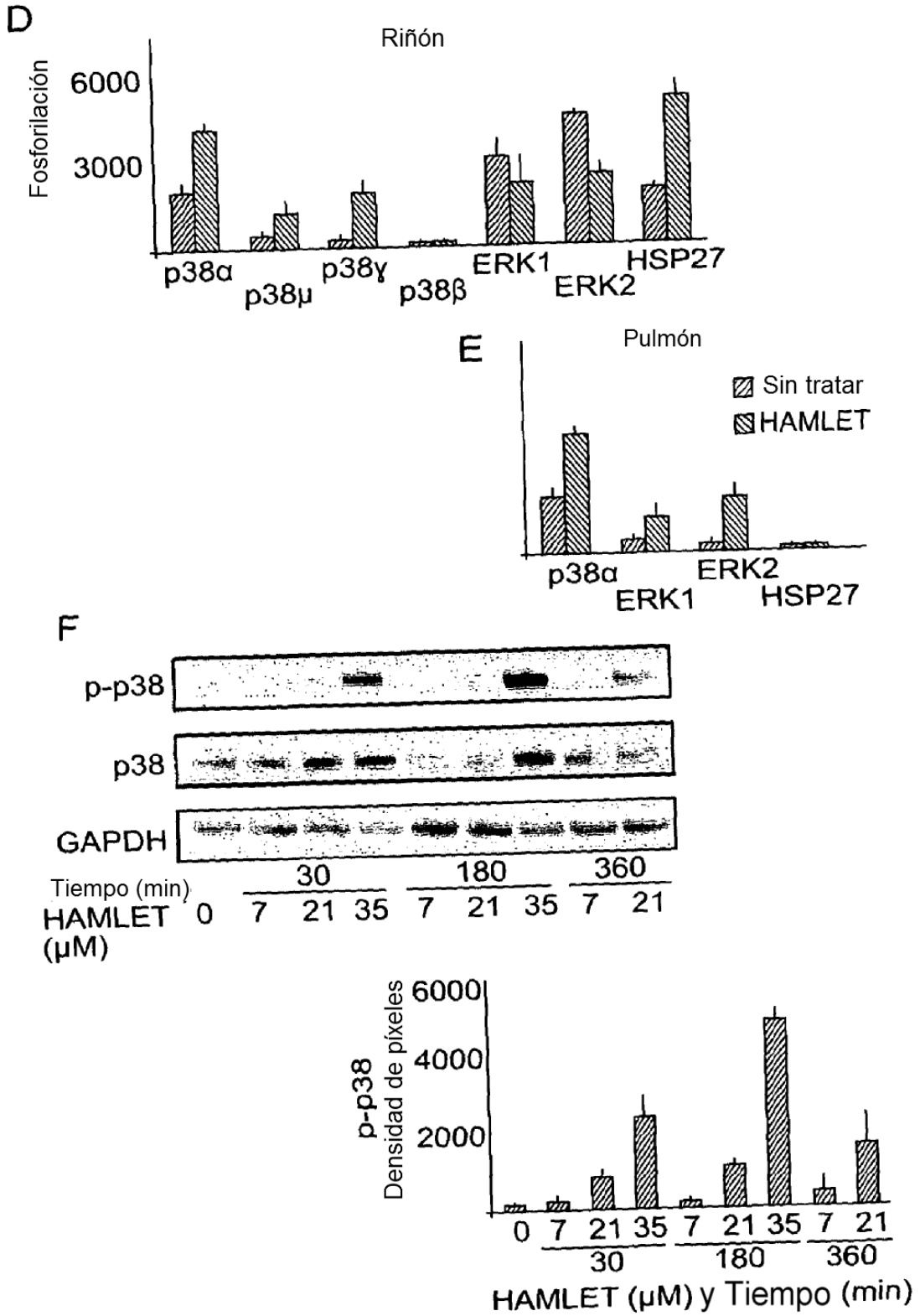


Figura 4

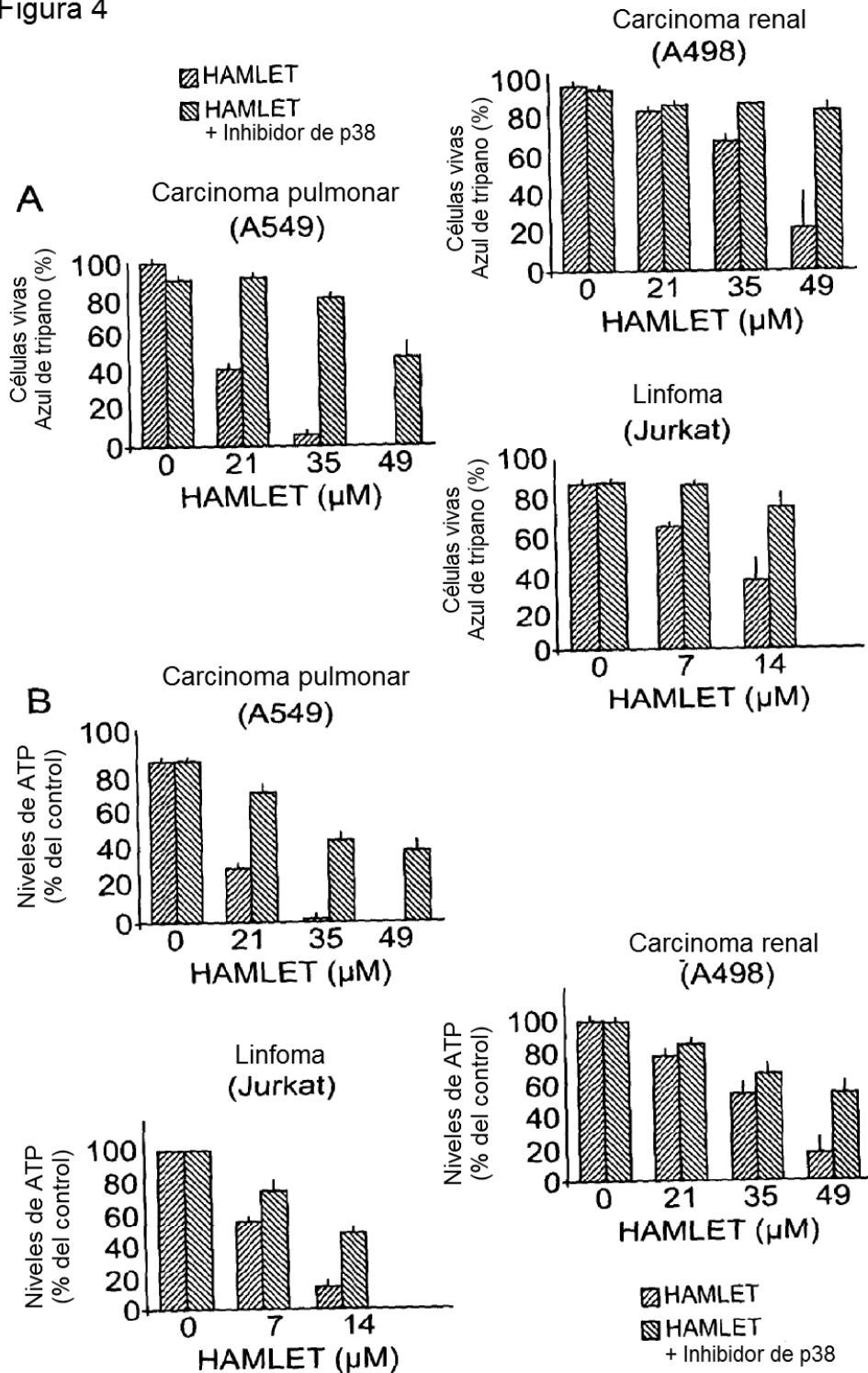


Figura 4 continuación

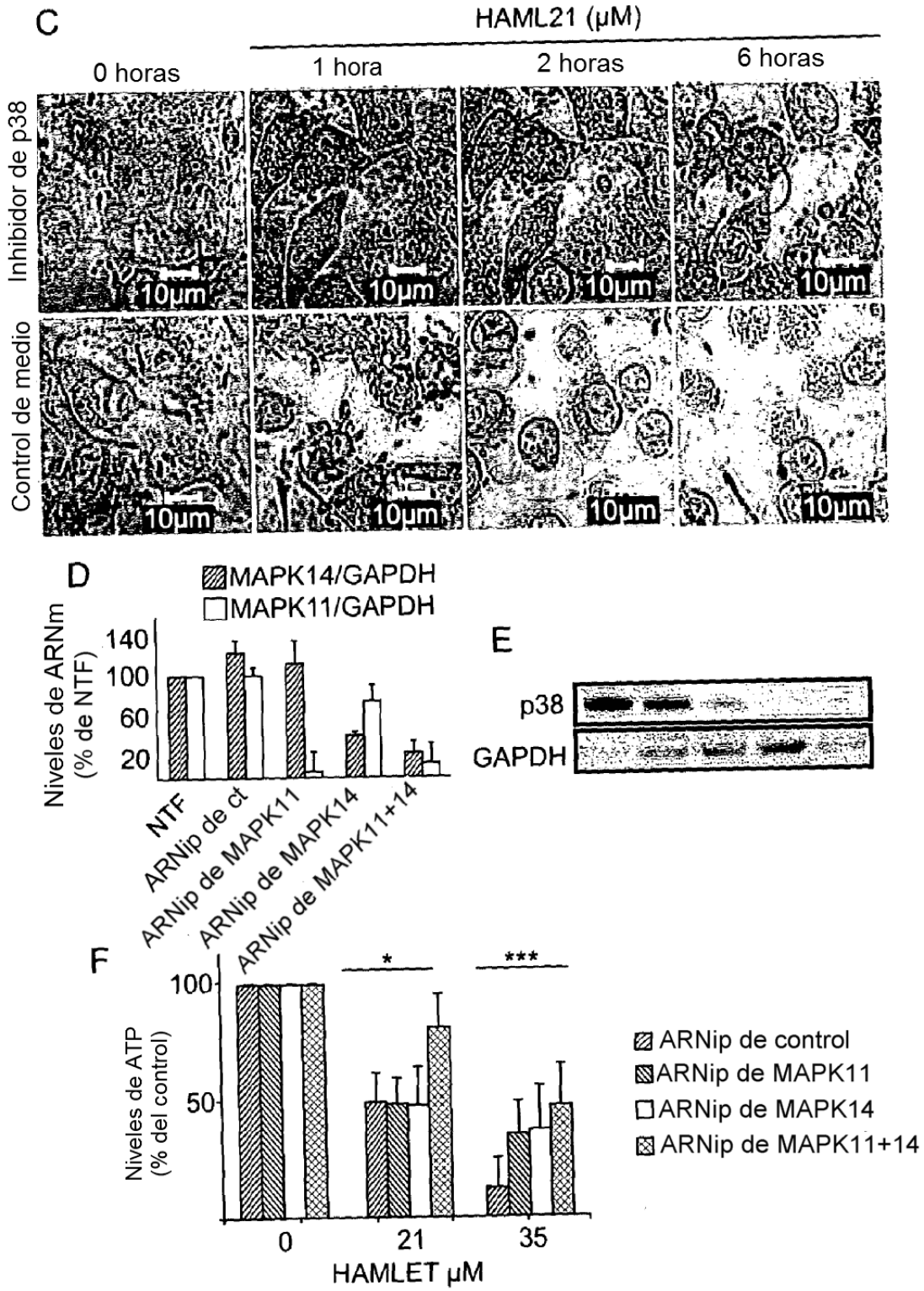


Figura 5

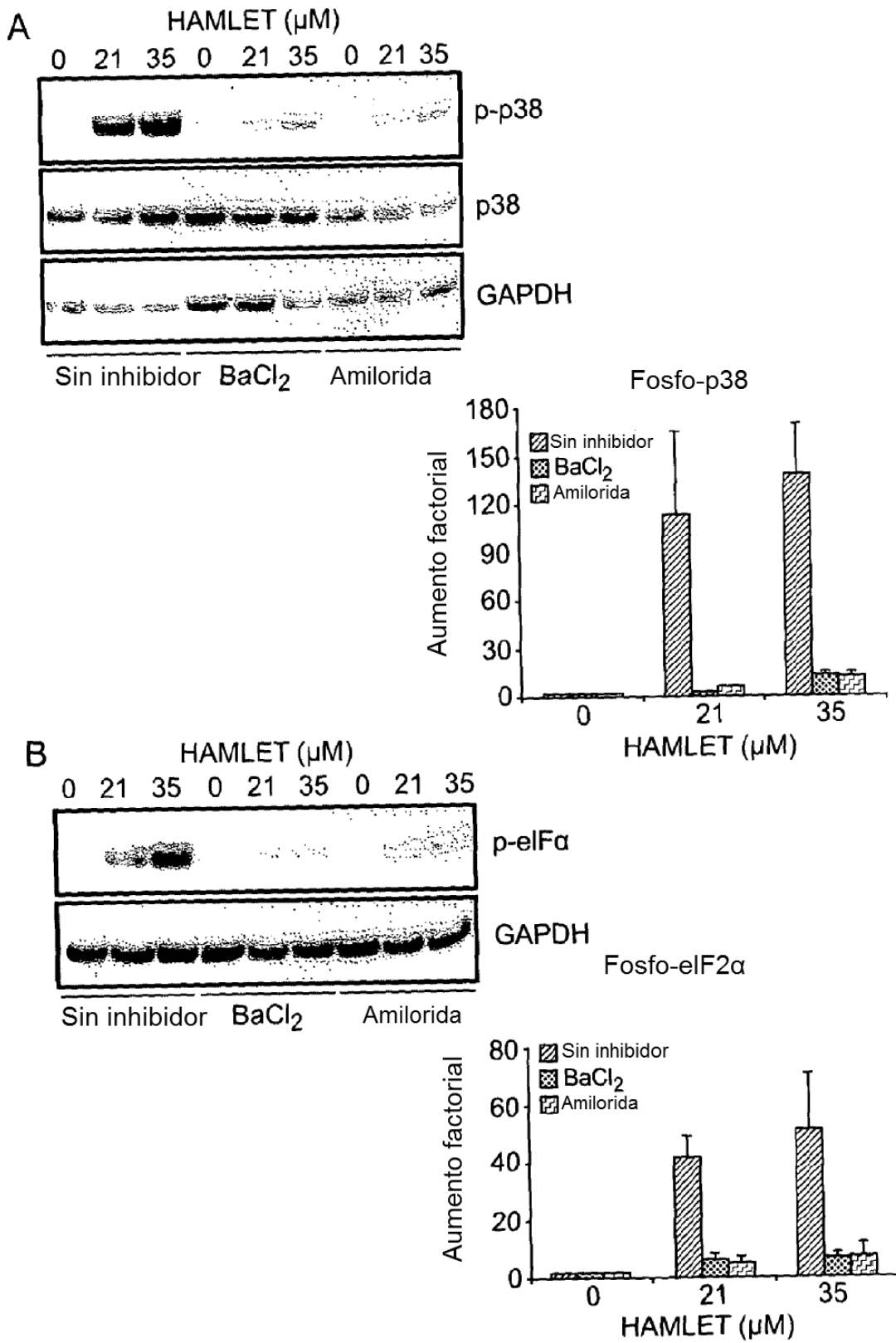


Figura 5 continuación

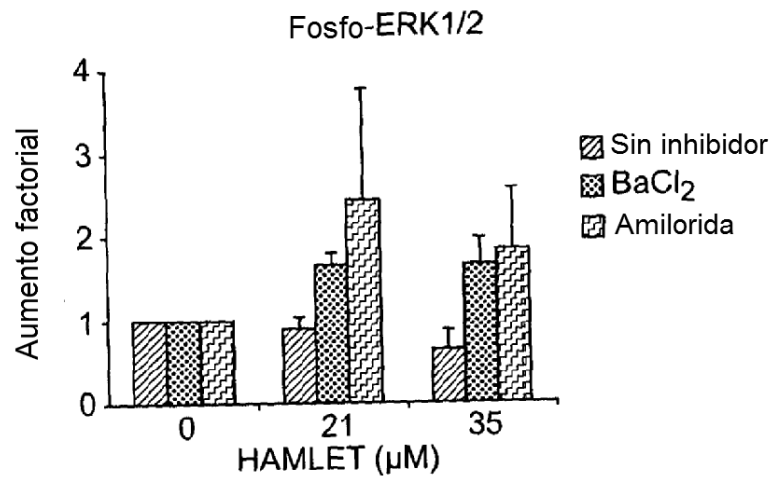
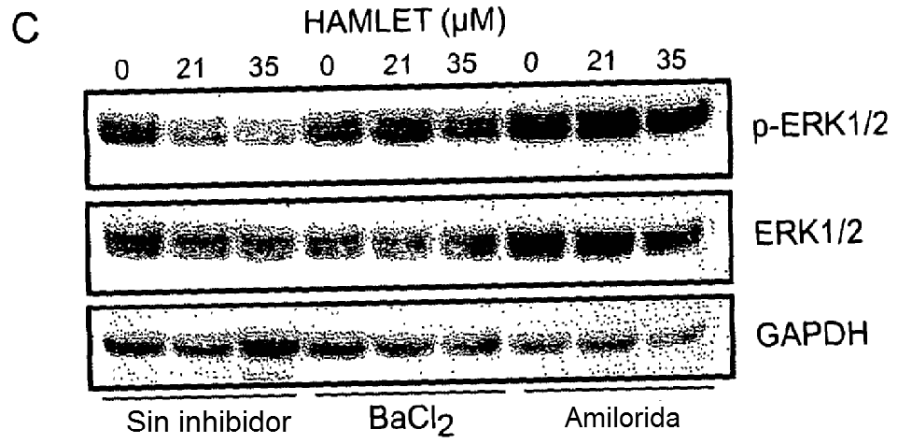


Figura 6

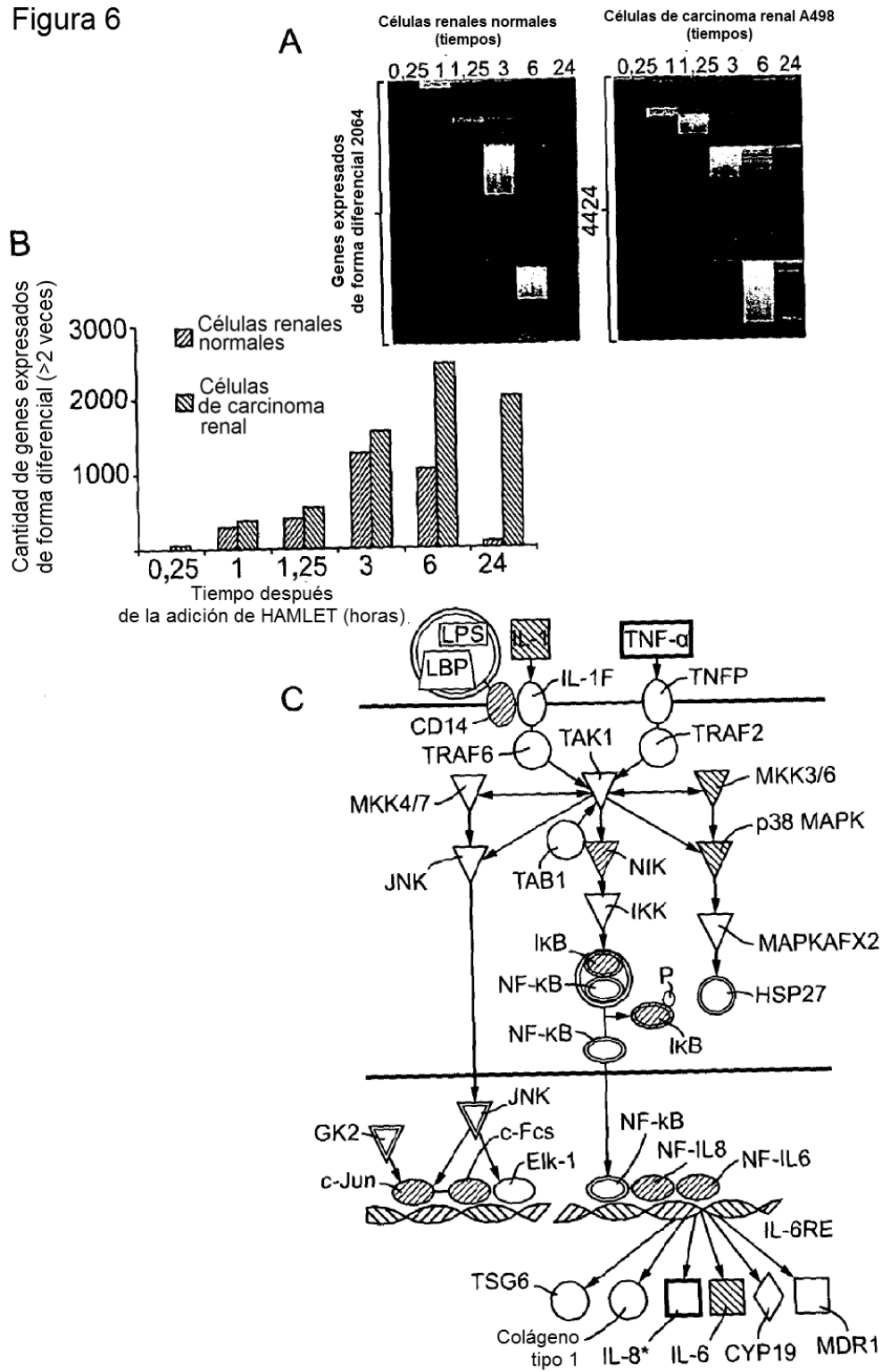


Figura 6 continuación

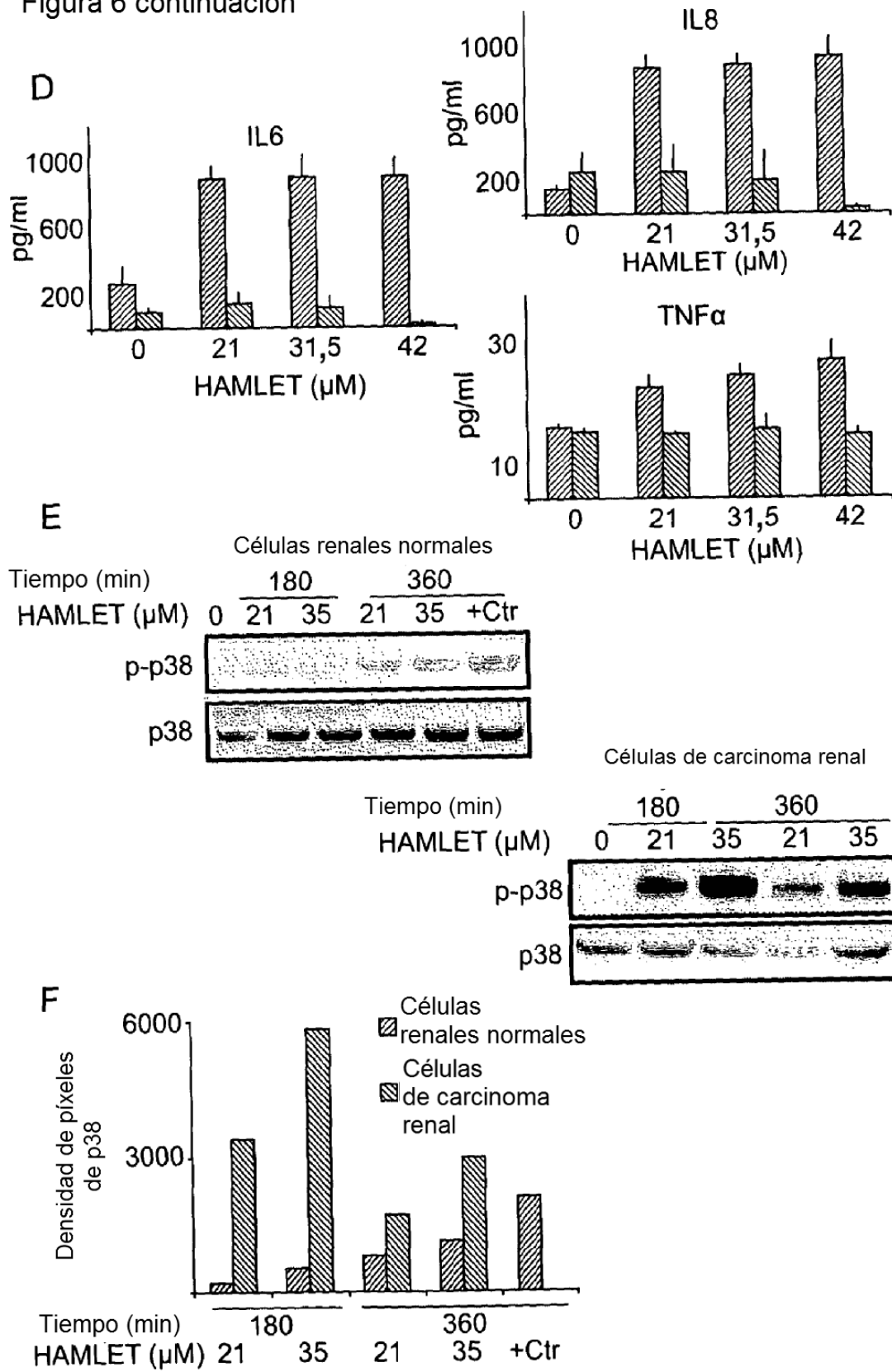
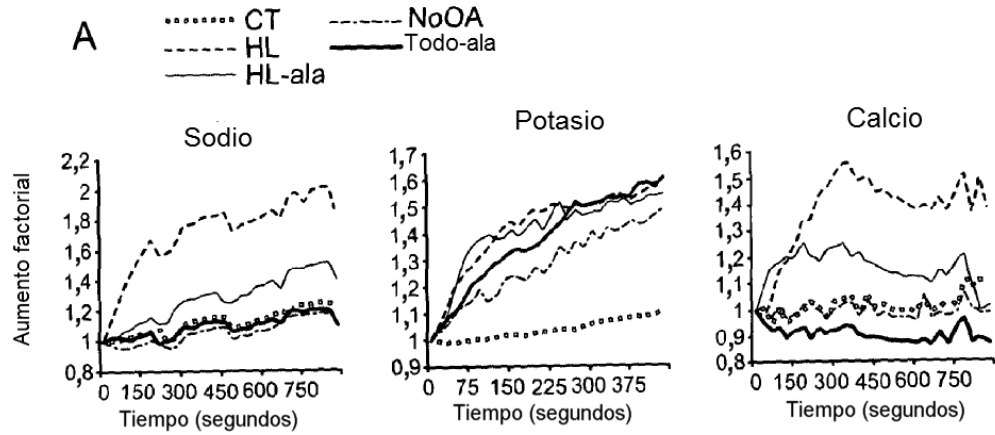
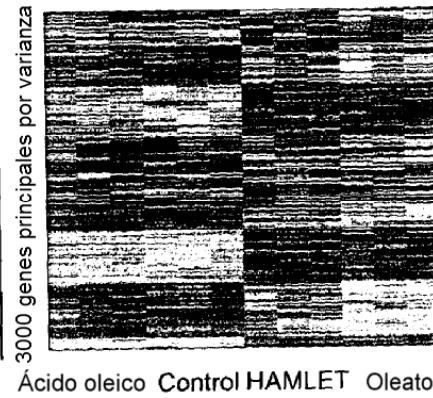


Figura 7



B



C

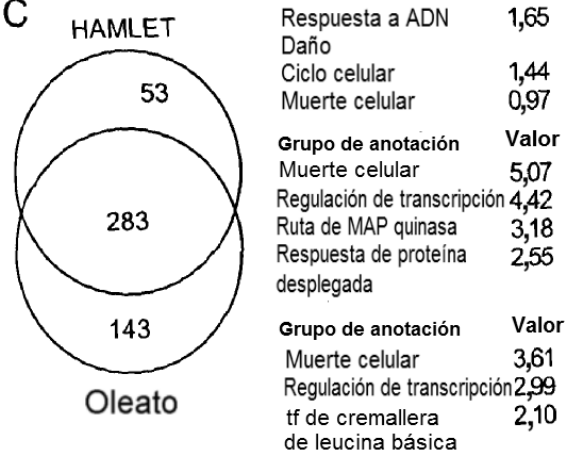


Figura 7 continuación

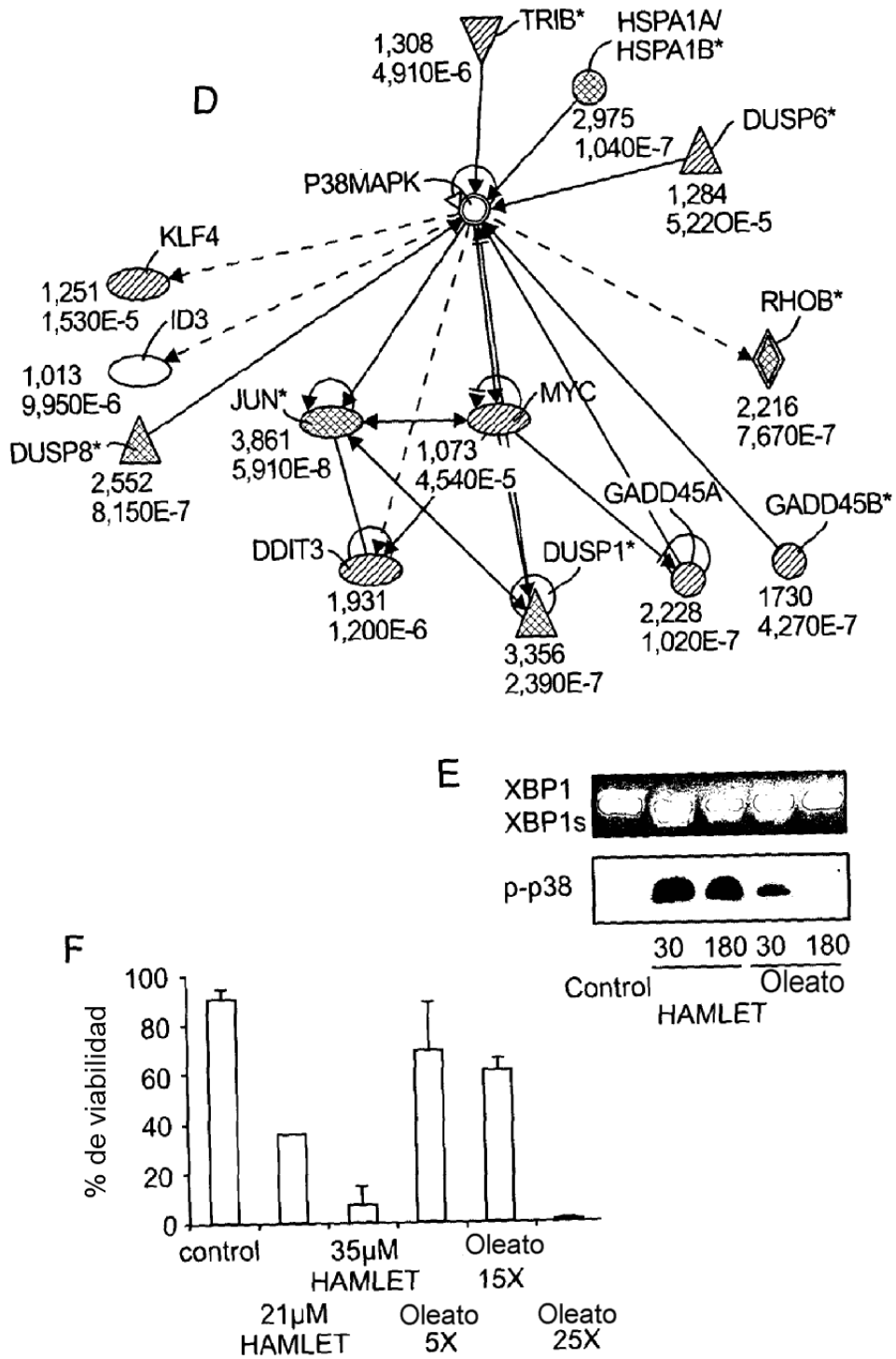
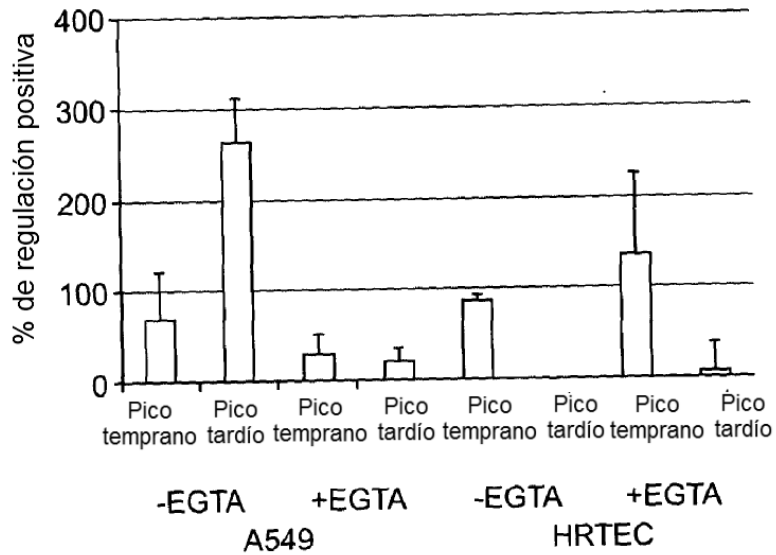


Figura 7

Figura 8 - Picos de calcio +/- EGTA



Tipo de célula	EGTA	Inhibidor	% de células respondedoras	
			Pico temprano	Pico tardío
Carcinoma	-	Ninguno	57	100
	-	Amilorida	100	89
	-	BaCl ₂	0	25
	-	GdCl ₃	0	100
	+	Ninguno	60	32
	+	Amilorida	0	0
	+	BaCl ₂	0	0
	+	GdCl ₃	0	0
Diferenciada sana	-	Ninguno	100	0
	-	Amilorida	60	40
	-	BaCl ₂	25	75
	-	GdCl ₃	0	0
	+	Ninguno	100	22
	+	Amilorida	0	0
	+	BaCl ₂	0	0
	+	GdCl ₃	86	0

Figura 9 Inhibidores de canales-HeLa

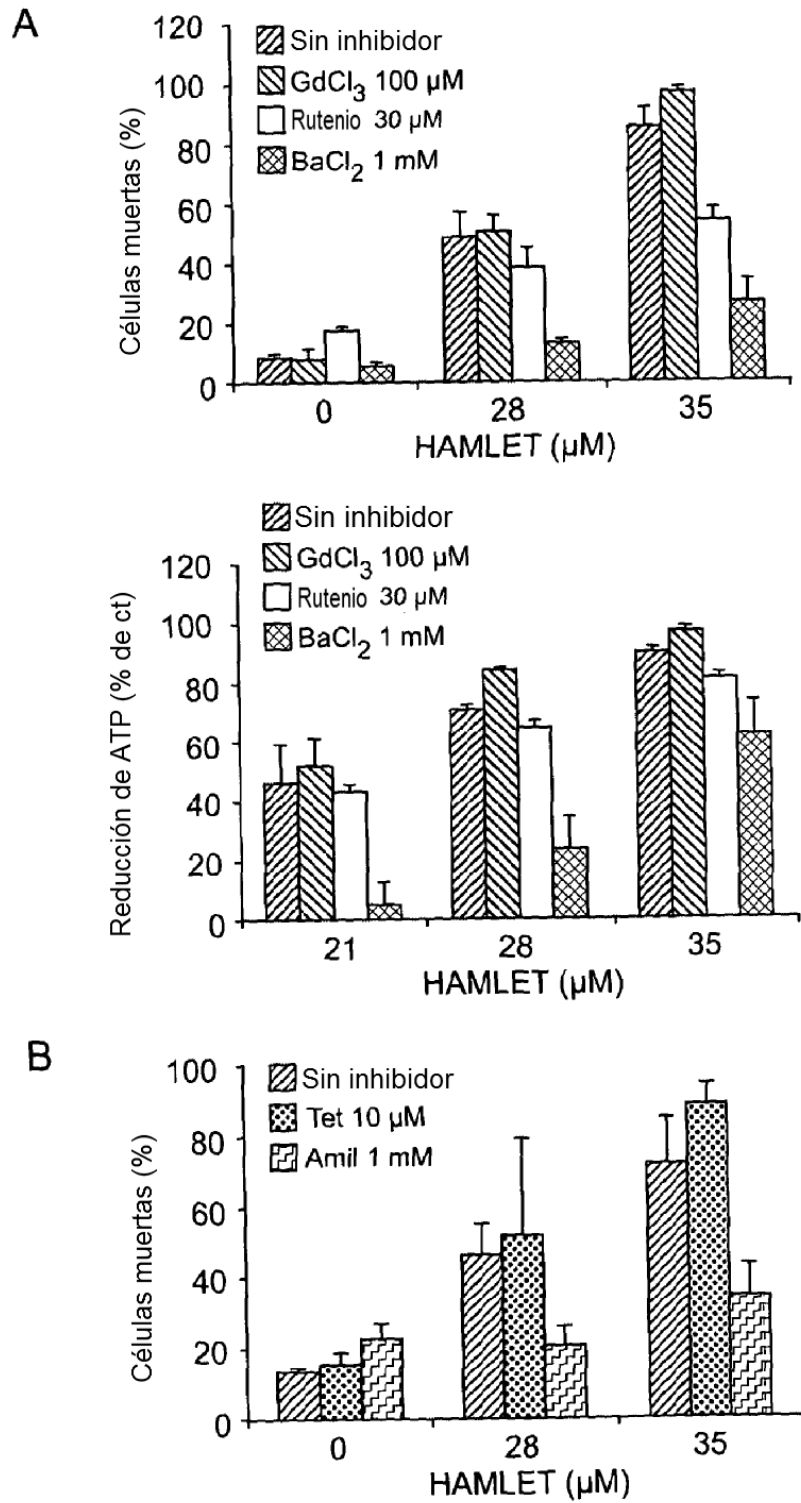


Figura 9 Inhibidores de canales-HeLa
(continuación)

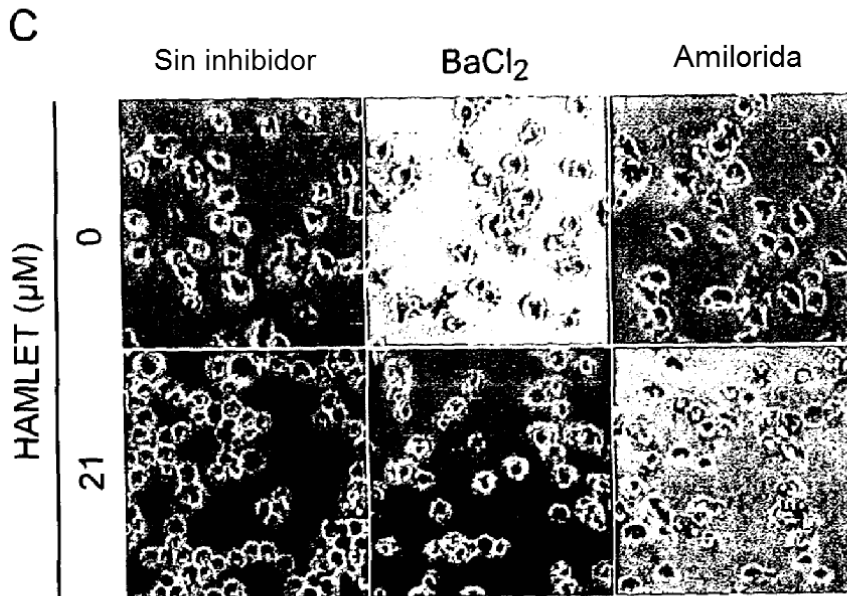
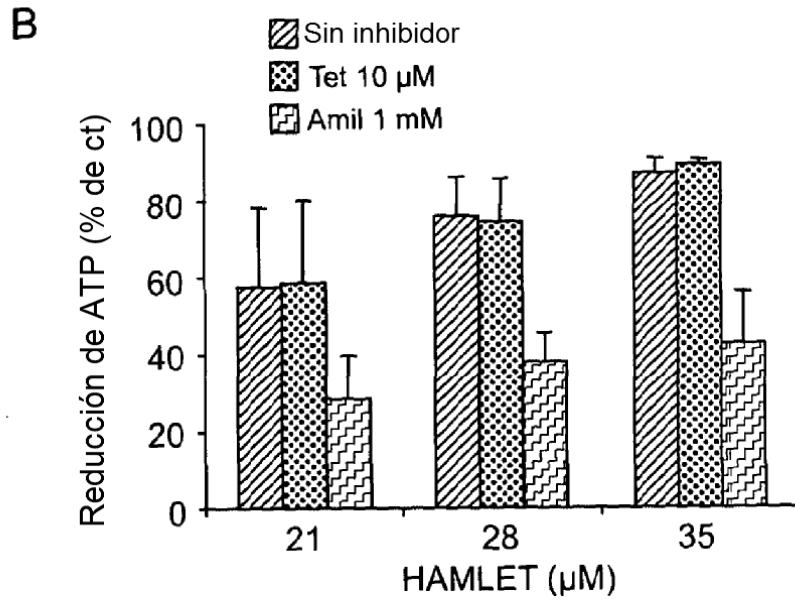


Figura 9A - Inhibidores de canales-Jurkat

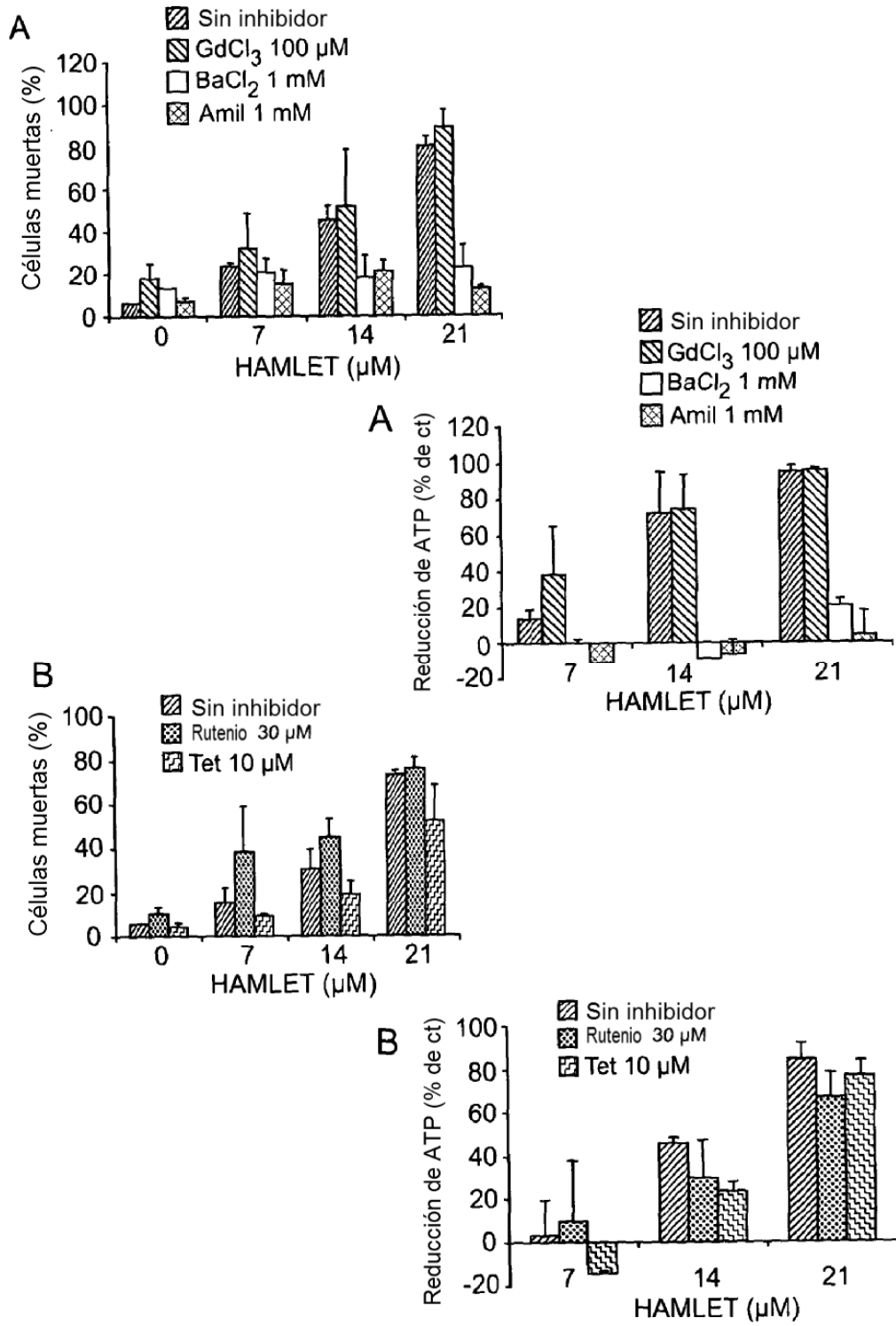


Figura 10 -Ruta de p38 en células de carcinoma renal

Genes expresados de forma diferencial en la ruta de señalización de p38 en células de carcinoma renal A498 tratadas con HAMLET

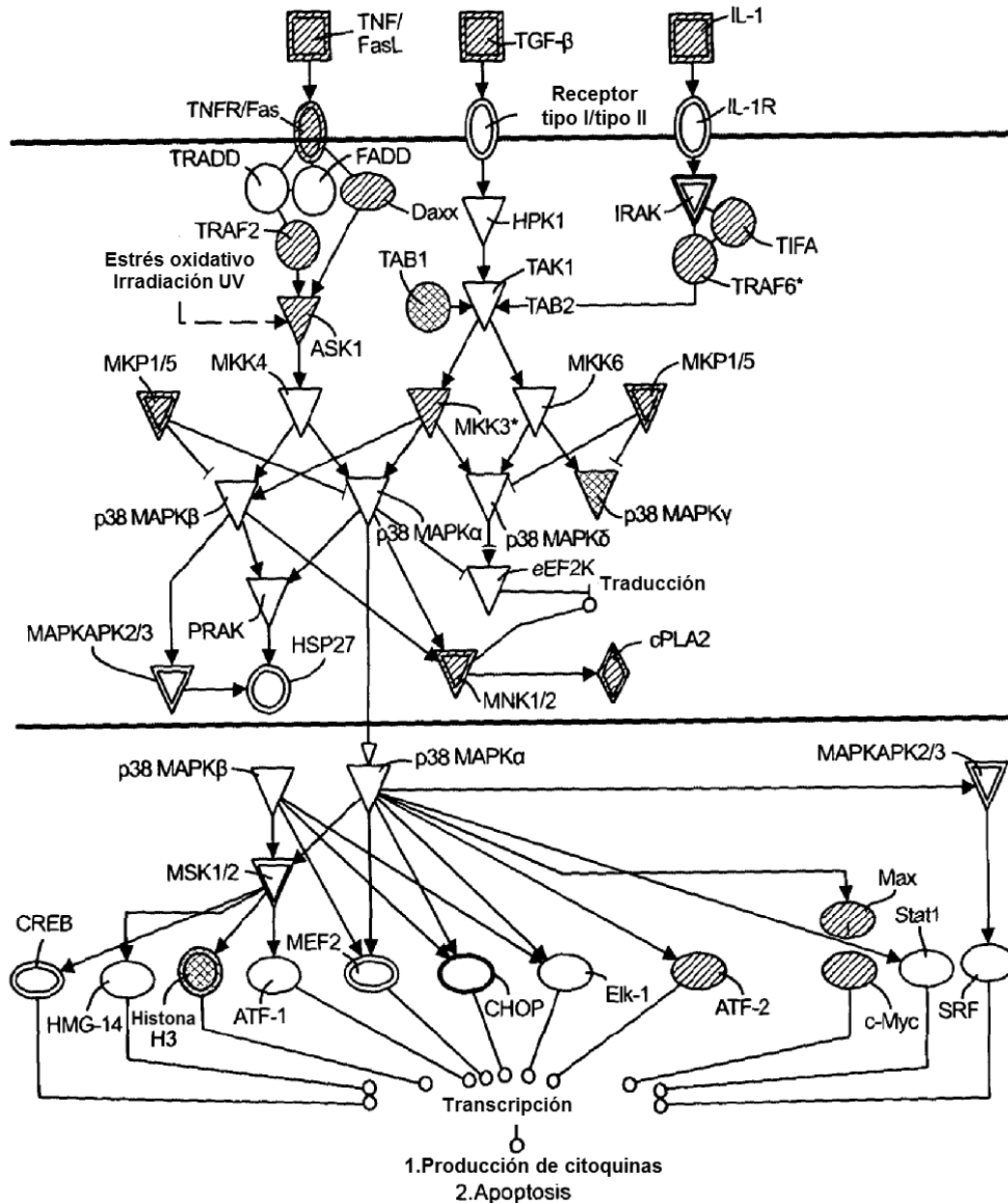


Figura 11 -Fosforilación de p38

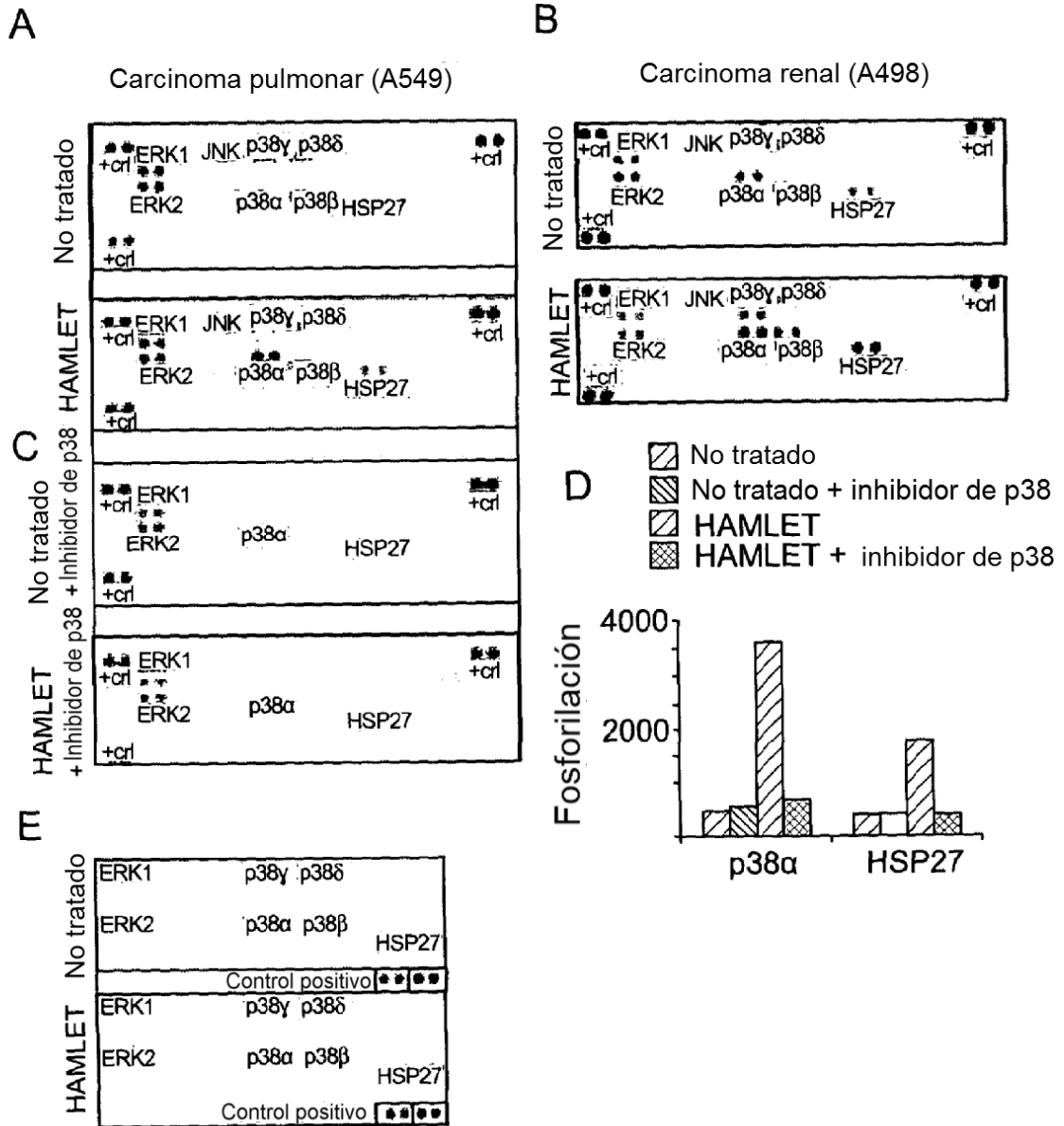
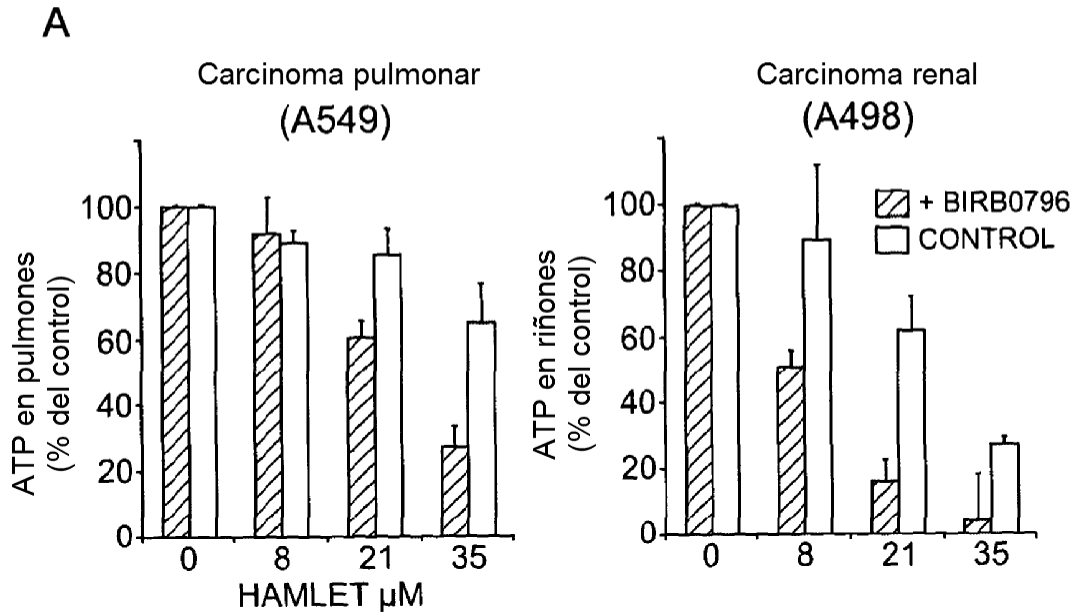


Figura 12 - Inhibición de p38 por BIRB796



B

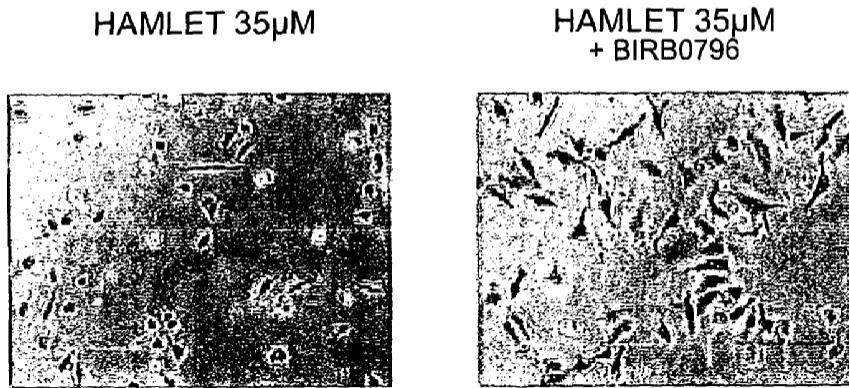
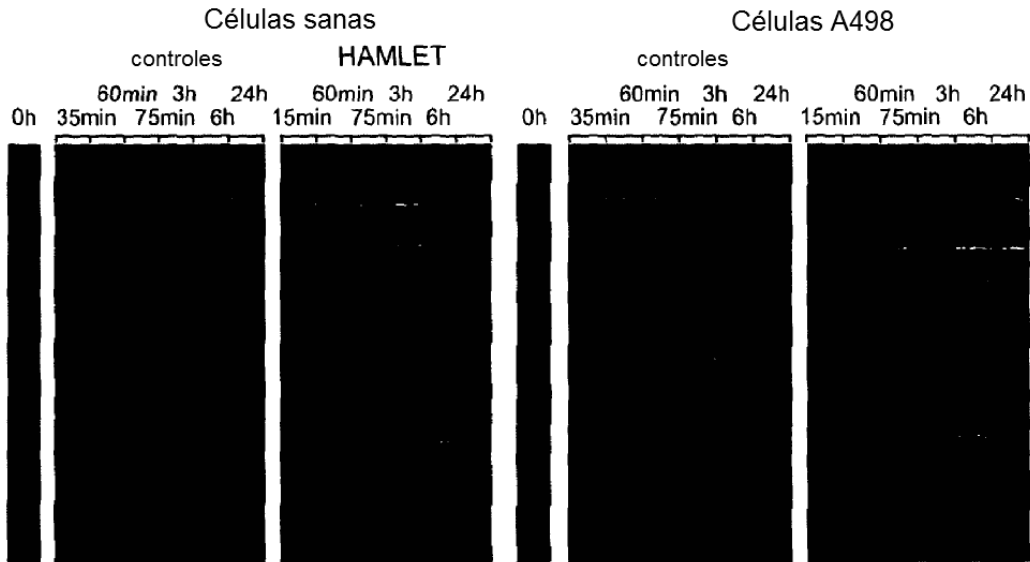
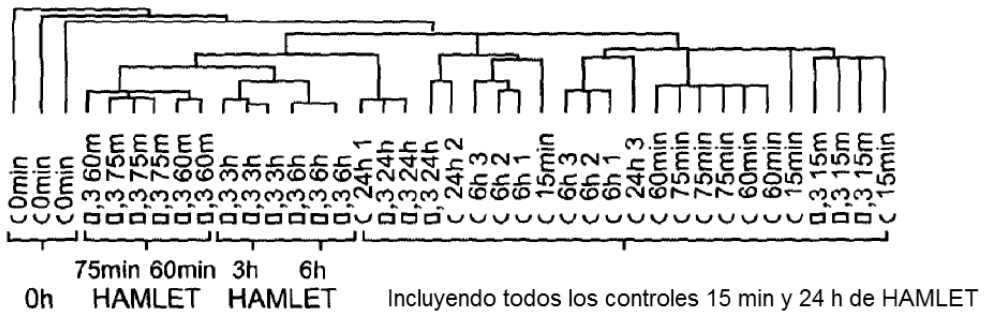


Figura 13 -Respuesta de transcripción global en células de carcinoma frente a células diferenciadas sanas

A) Cambios transcripcionales globales



B) Células renales sanas



C) Células renales de carcinoma

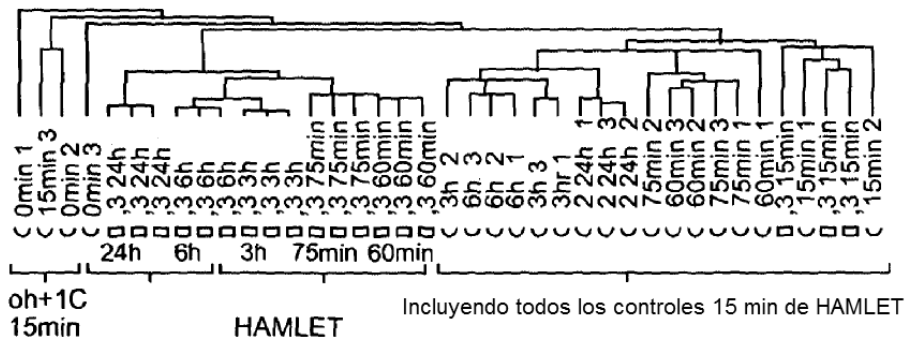


Figura 14A

Valor medio de azul de tripano

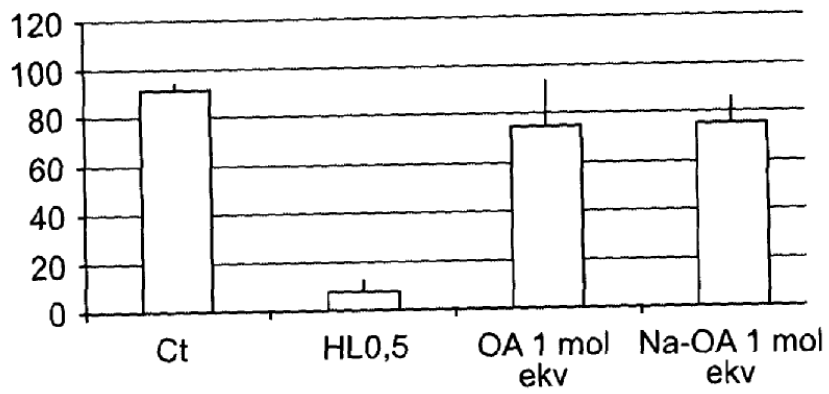


Figura 14B

Valor medio de ATP

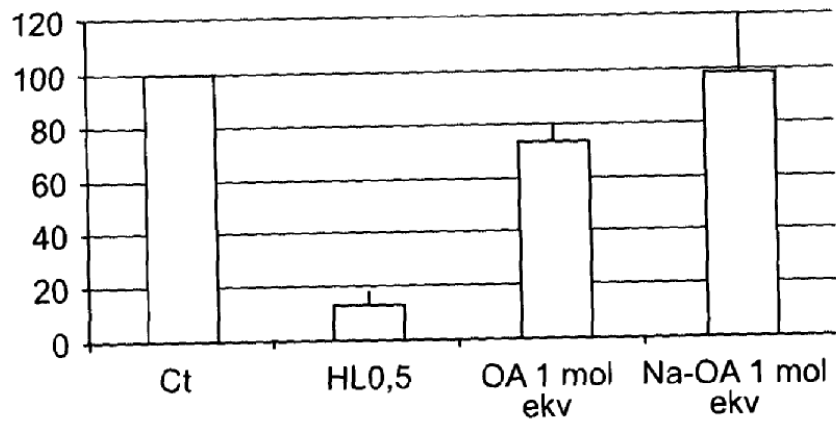


Figura 15A

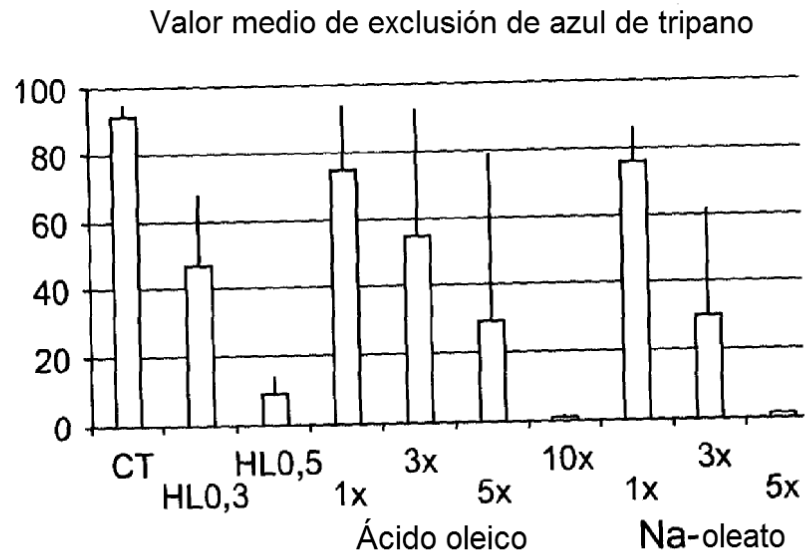


Figura 15B

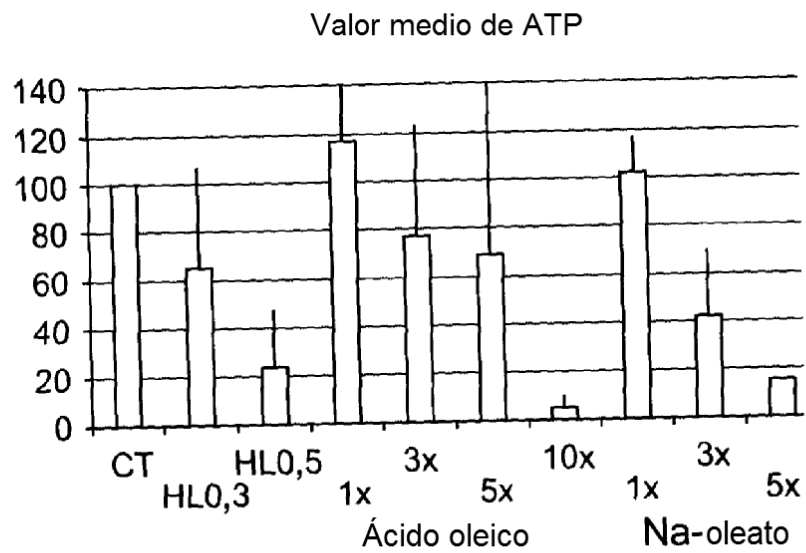


Figura 16A

Cromatografía de conversión:

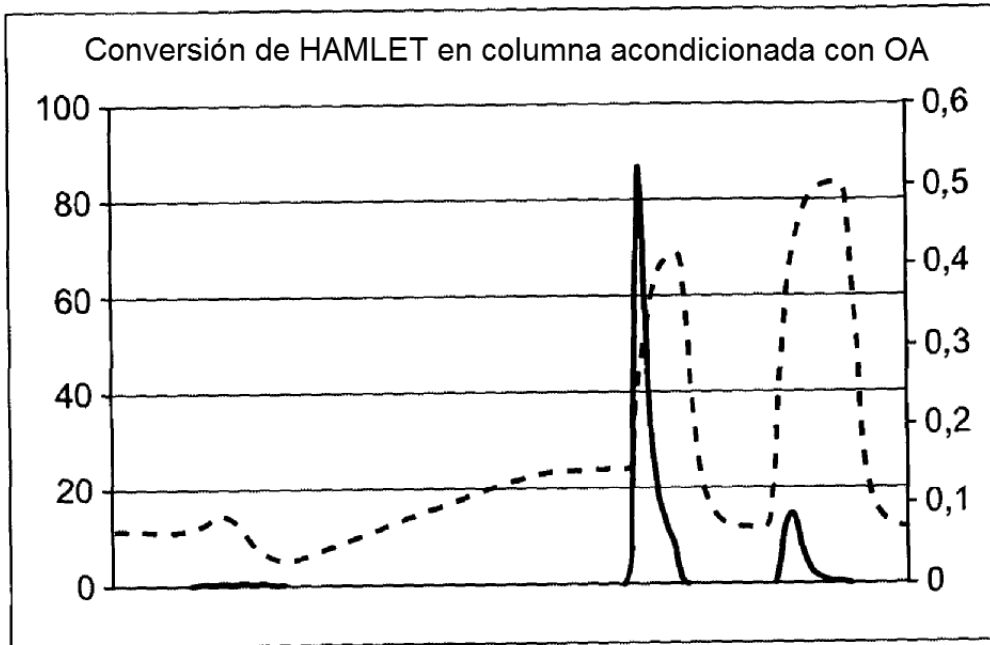


Figura 16B

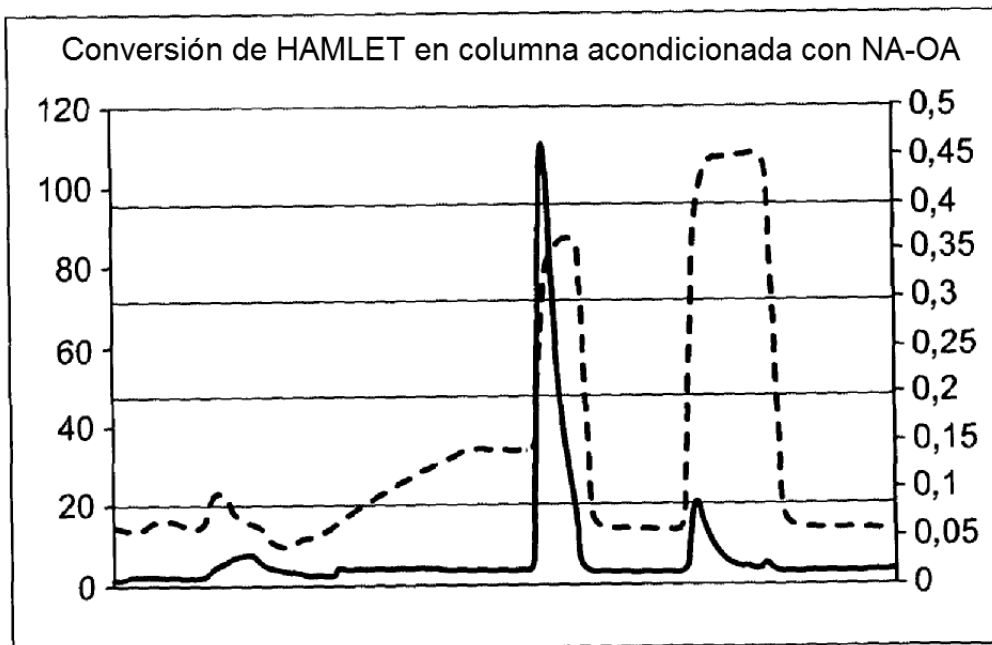
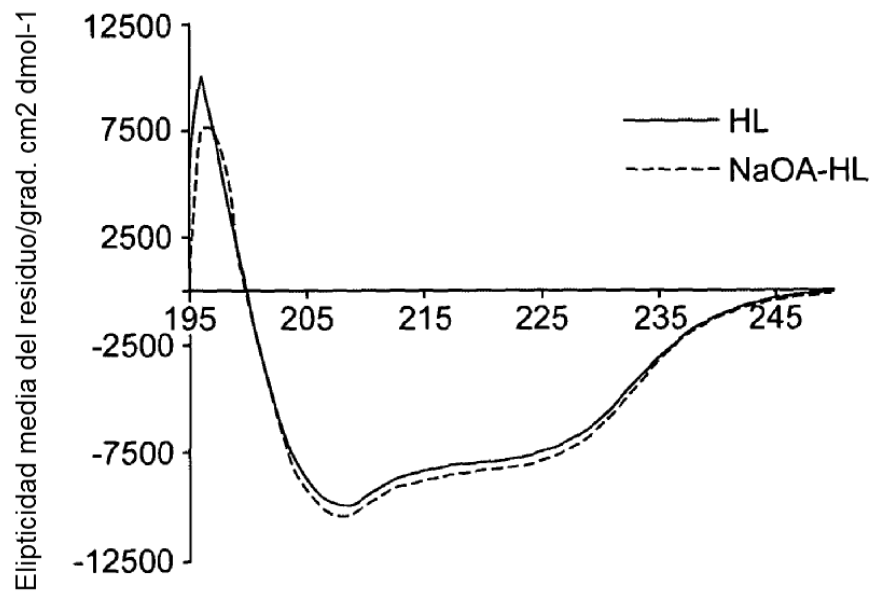
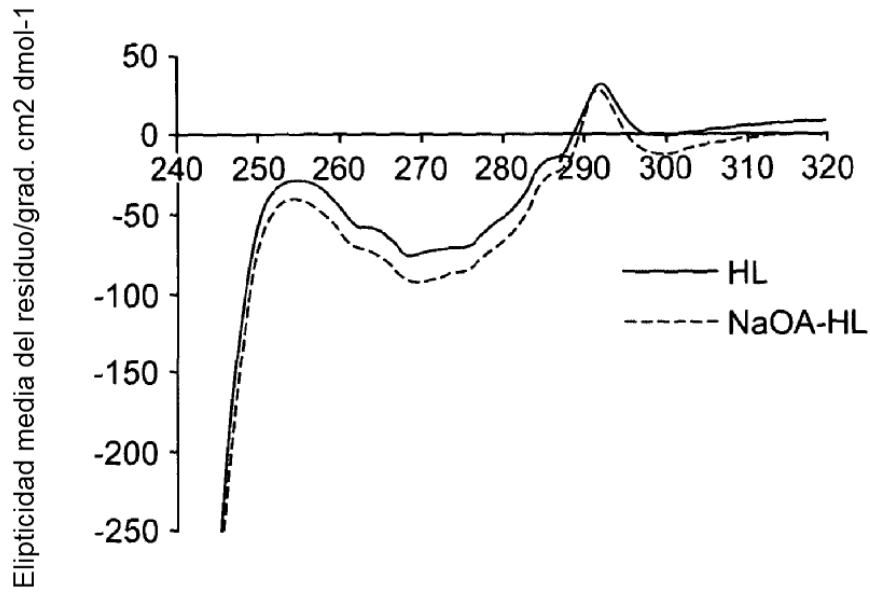


Figura 17



	A280	ϵ (ml mg ⁻¹ -cm ⁻¹ l (cm)	c (mg/ml)	PM	c (uM)	
HL	1,006581	2,04	1	0,493422059	15200	32,46197755
NaOA-HL	1,335161	2,04	1	0,654490686	15200	43,05859778

Análisis de estructura secundaria K2D

	Alfa	beta	Aleatorio
HL	0,30	0,12	0,58
NaOA-HL	0,29	0,13	0,58

Figura 18

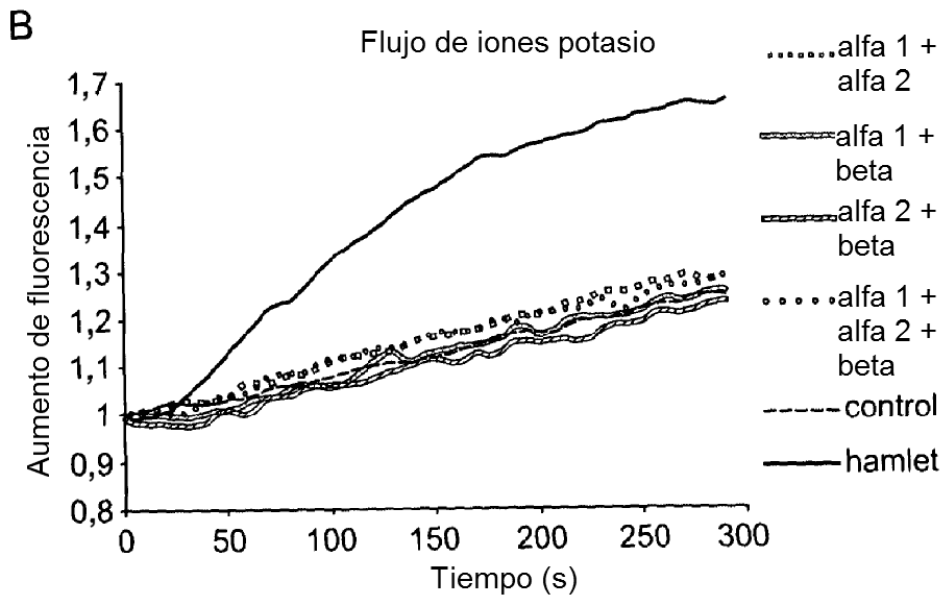
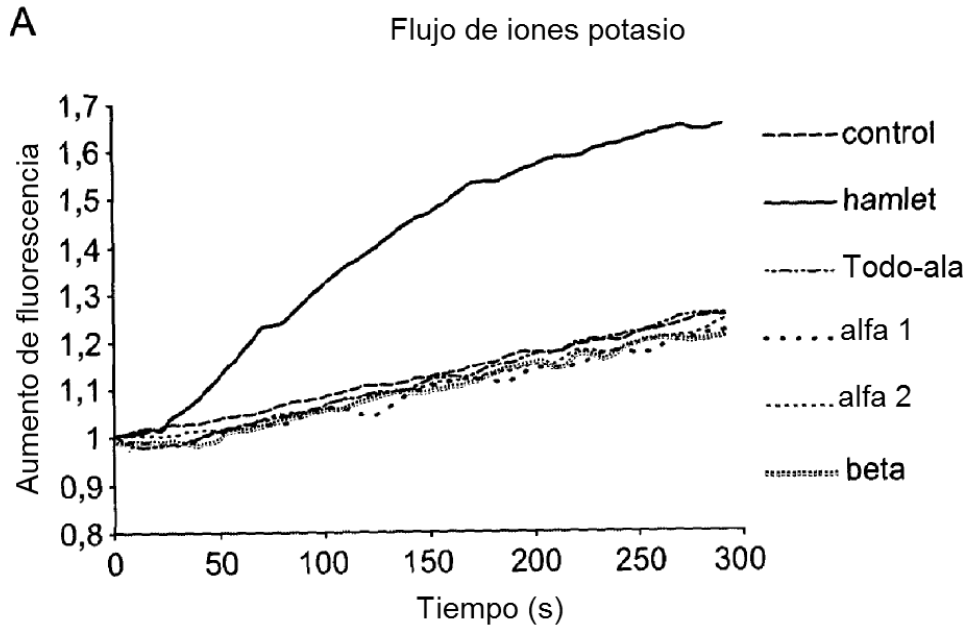


Figura 18 continuación

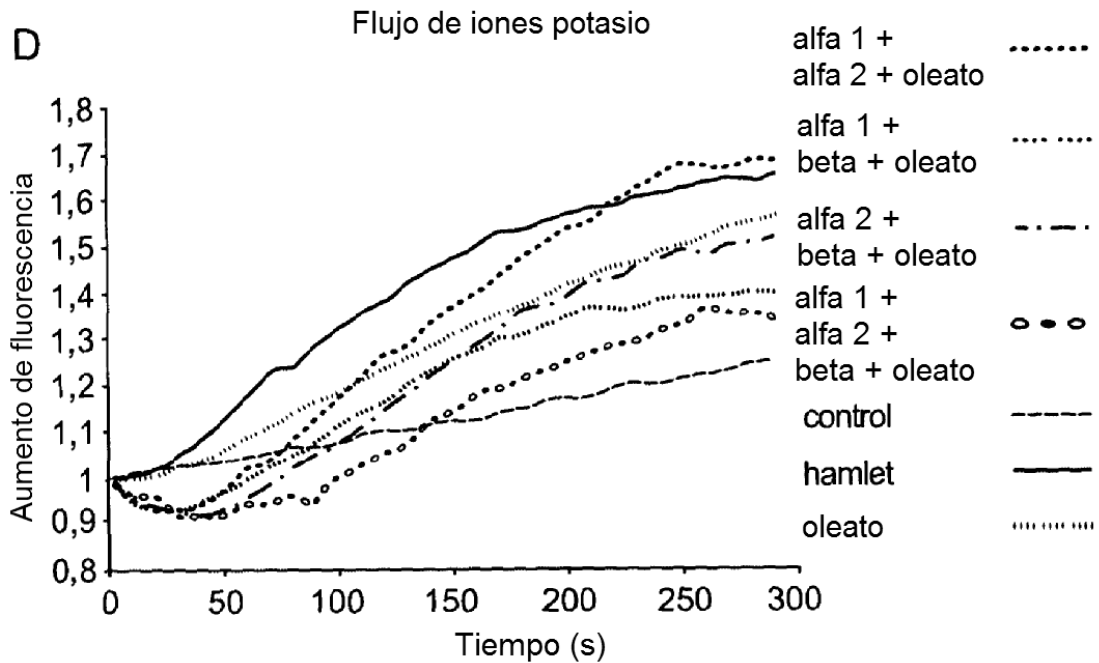
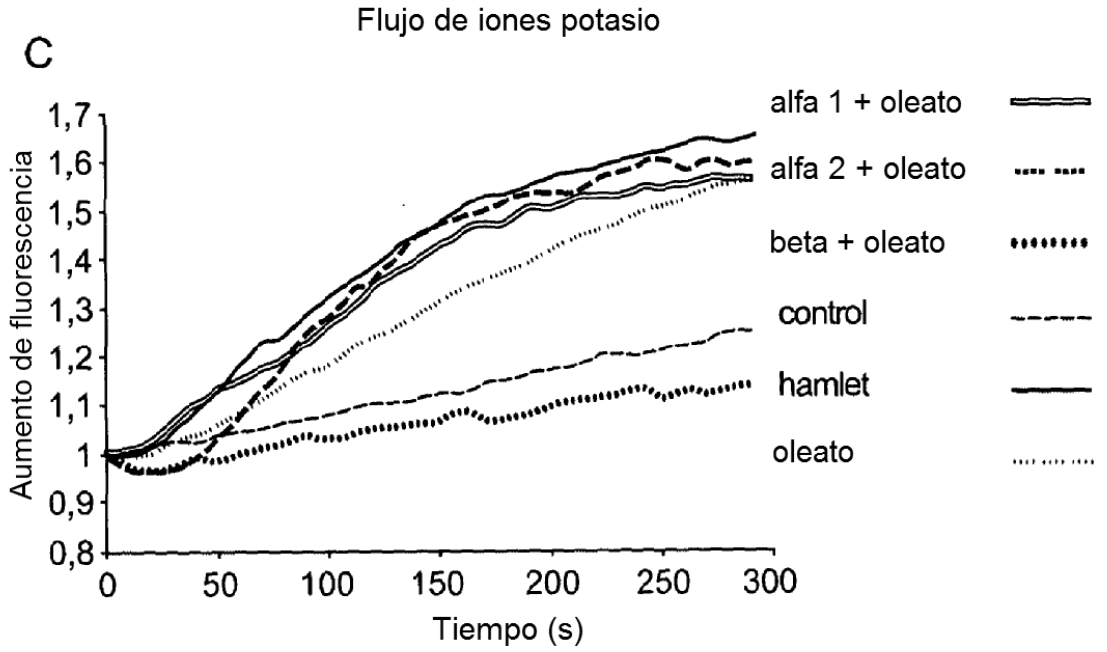


Figura 19

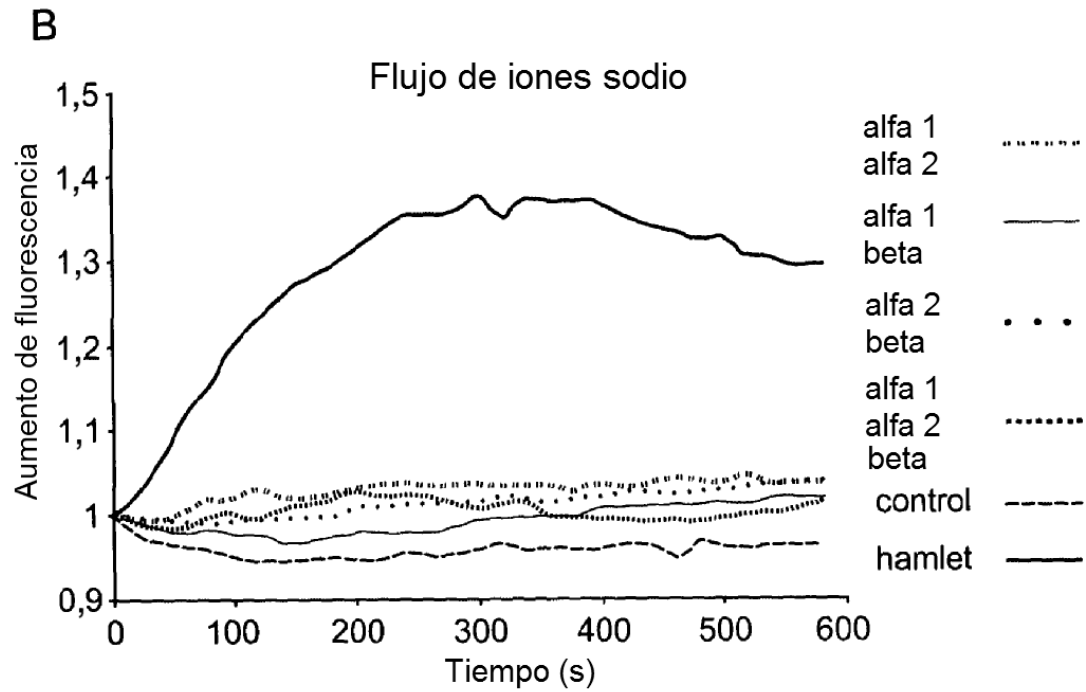
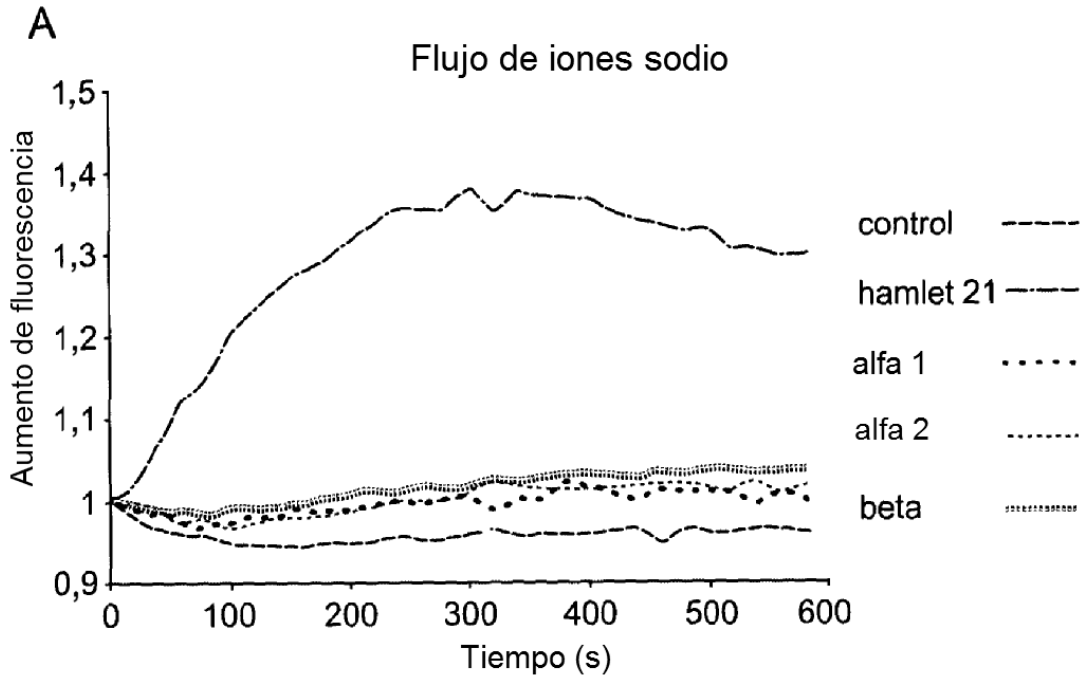


Figura 19 continuación

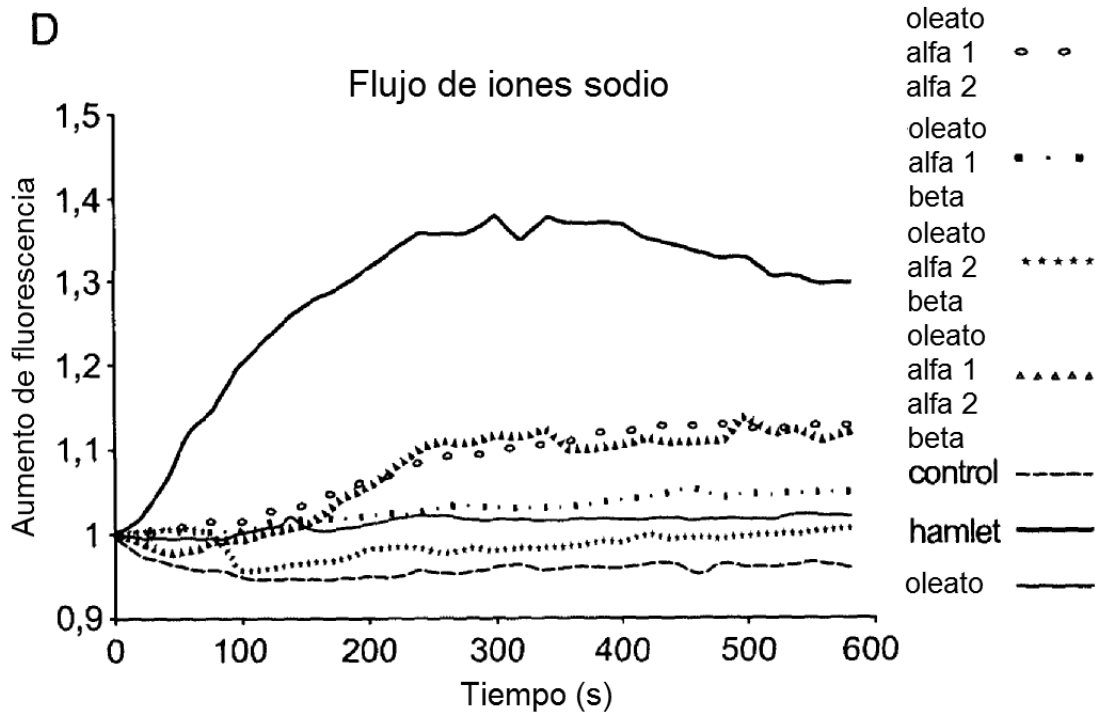
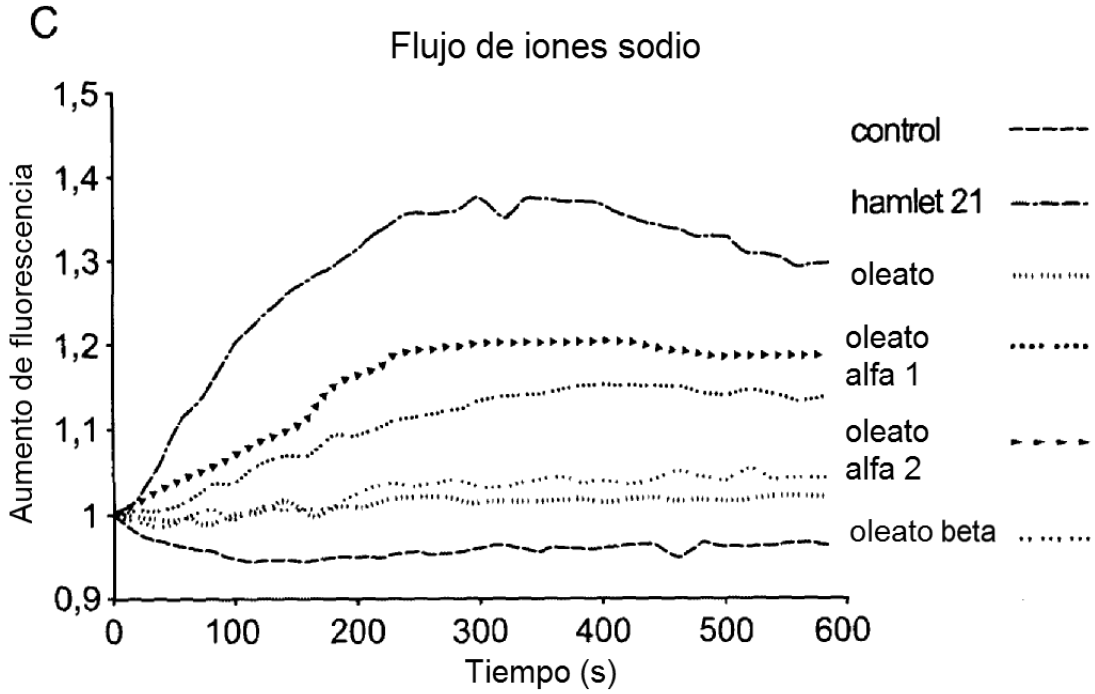


Fig. 20

Los péptidos indicados
están resaltados en negrita

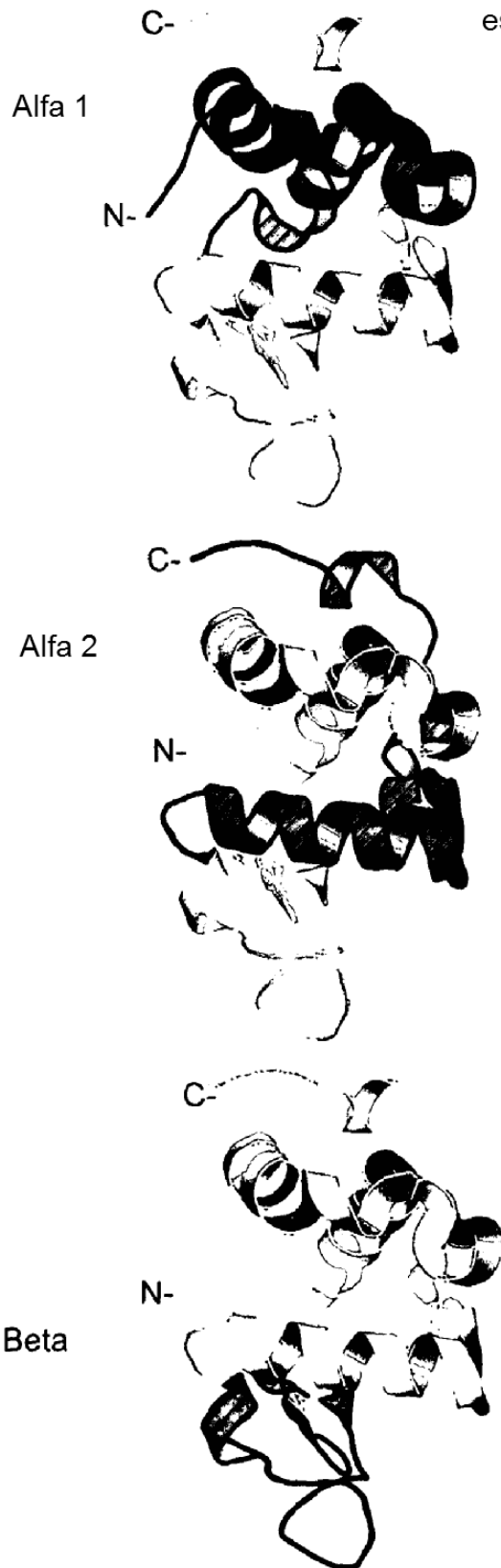


Figura 21

