

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 571**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2011** **PCT/CU2011/000003**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011** **WO2011150897**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2011** **E 11728172 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 2578227**

54 Título: **Método para la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

31.05.2010 CU 20100013

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA (CIGB) (100.0%)
Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán
Playa, Ciudad De La Habana 10 600, CU**

72 Inventor/es:

**GUERRA VALLESPÍ, MARIBEL;
FERNÁNDEZ MASSÓ, JULIO, RAÚL;
MUSACCHIO LASA, ALEXIS;
GIL VALDÉS, JEOVANIS;
REYES ACOSTA, OSVALDO y
OLIVA ARGÜELLES, BRIZAIDA, MAYLIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 619 571 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

Método para la terapia del cáncer

5 Campo de la técnica

La presente invención se enmarca dentro del campo de la biomedicina, en particular con la terapia del cáncer, al revelar una nueva diana terapéutica para el desarrollo de fármacos antitumorales. Estos fármacos, debido a su mayor selectividad y eficacia, contribuyen a la mejora en los tratamientos actuales del paciente con cáncer. En la presente descripción se describe un método para el tratamiento del cáncer mediante la expresión y acumulación de la proteína COMMD1 en el núcleo de las células tumorales. Las modificaciones químicas introducidas en la estructura primaria del péptido HARIKPTFRRLKWYKGFW aumentan la localización nuclear de COMMD1 y la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de este péptido.

15 Estado de la técnica anterior

A pesar de los grandes avances en la terapia del cáncer, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales con un modo de acción novedoso, debido al desarrollo de resistencia a los fármacos anticancerígenos existentes por las células tumorales. Los péptidos son de gran interés como nuevos fármacos terapéuticos, por su papel como mediadores de funciones biológicas importantes y sus propiedades intrínsecas únicas que los hacen agentes terapéuticos particularmente atractivos. Los péptidos muestran una alta actividad biológica, que se asocia con baja toxicidad y alta especificidad. Los beneficios que se obtienen de estas características incluyen una elevada especificidad de unión a la diana deseada, una reducción de las interacciones adversas fármaco a fármaco y la menor acumulación en los tejidos, lo que reduce el riesgo de complicaciones debido a metabolitos intermediarios (Vlieghe y *otros*, 2010, Drug Discovery Today, 15:40-56). En la actualidad existen terapias anticáncer que utilizan péptidos y/o pequeñas moléculas, con selectividad de unión a una proteína diana específica, la cual tiene una función biológica importante en el desarrollo del cáncer. En un primer escenario, estas terapias pueden dirigirse a inhibir una función específica de una proteína y causar la apoptosis de la célula tumoral, por ejemplo: Los inhibidores de las proteínas de estrés térmico (HSP) (Subbarao y *otros*, 2004, Pharmacology & Therapeutics, 101:227-257); Inhibidores de la tirosina quinasa (Garrido y *otros*, 2007, Rev Med Chil. 10:1327-1332). En la mayoría de las situaciones estas proteínas se consideran aberrantes en el proceso maligno, cuando se comparan con el tejido normal.

En un segundo escenario, el fármaco se une a una proteína diana que puede o no ser aberrante en el proceso maligno comparado al tejido normal, en este caso se afectan las vías de señalización que están activas en el proceso de malignidad, por ejemplo: inhibidores de la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), inhibidores del ensamblaje de los microtúbulos e inhibidores del factor transcripcional NFkB.

Mientras que el primer escenario es altamente efectivo en determinadas neoplasias malignas hematopoyéticas, la mayoría de estas terapias tiene efectividad limitada en la complejidad de los tumores sólidos. Por el contrario, el segundo escenario incluye algunos de los fármacos más efectivos para el cáncer y más tóxicos en la farmacopea oncológica. Por esta razón, se necesita avanzar en la búsqueda de nuevos fármacos que sean cada vez más selectivos y efectivos, y al mismo tiempo que minimicen su toxicidad.

En este sentido la identificación de nuevas dianas terapéuticas y la comprensión de su papel en el desarrollo del cáncer, ayudará a identificar nuevos mecanismos de resistencia a fármacos y facilitará el diseño de nuevos fármacos que retengan una mayor actividad y puedan combinarse con los ya existentes, para reducir su toxicidad e incrementar la calidad de vida del paciente con cáncer. La proteína COMMD1, previamente conocida como MURR1 (van de Sluis y *otros*, 2002, Human Molecular Genetic, 11:165-173) pertenece a una nueva familia de proteínas, conocidas por su acrónimo COMMD (Dominio del gen MURR1 del Metabolismo del Cobre, abreviado COMMD). Los diez miembros de la familia de proteínas son altamente conservados en organismos pluricelulares y se expresan ubicuamente, pero las funciones biológicas de la mayoría de sus miembros se desconocen. La característica principal de esta familia es la presencia del dominio COMM (Dominio Murr1 del Metabolismo del Cobre) conservado y único, que comprende los residuos de aminoácidos 110-190 de la región C-terminal (Burstain y *otros*, 2005, The Journal of Biological Chemistry, 280:22222-22232). COMMD1 se asocia a diversos procesos biológicos tales como: el control del metabolismo del cobre (Tao y *otros*, 2003, Journal of Biological Chemistry, 278:41593-41596); la regulación del transporte intracelular de sodio (Biasio y *otros*, 2004, Journal of Biological Chemistry, 279:5429-5434); la inhibición del factor transcripcional NFkB (Maine y *otros*, 2007, The EMBO Journal, 26:436-447); la inhibición de la expresión de genes regulados por el factor inducible por hipoxia HIF-1 α (van de Sluis y *otros*, 2007, Molecular and Cellular Biology, 27:4142-4156).

COMMD1 presenta interacción física con la subunidad RelA (p65) del factor transcripcional NFkB, con la subunidad catalítica- α del factor HIF-1 α , y con Delta ENaC en los canales epiteliales de sodio. En todos los casos esta interacción conlleva a la degradación de estas proteínas "clientes" a través de un mecanismo que involucra la ubiquitinación y las vías de degradación en el proteosoma. Se demostró que el dominio COMM está involucrado en las interacciones proteína a proteína, tanto para proteínas "clientes" de COMMD1, así como interacciones entre los miembros de la familia. Existe una propuesta para la estructura tridimensional de la región N-terminal de COMMD1,

pero aún no existe una estructura terciaria para el dominio COMM (Sommerhalter y otros, 2007, Journal of Molecular Biology, 365:715- 721).

La expresión basal de COMMD1 en la célula se controla mediante un proceso de ubiquitinación y degradación proteosomal, a través de una serie de residuos de leucina, que se localizan en el dominio COMM (Maine y otros, 2009, Biochemical Journal, 417:601-609). Recientemente, se describió que COMMD1 tiene un mecanismo constitutivo de transporte de citoplasma a núcleo a través de señales de exportación nuclear (NES) que se ubican, además, en su dominio COMM. Se describe que una disrupción en las secuencias de leucina y/o agentes que inhiban la degradación proteosomal, producen un aumento de la expresión de COMMD1 en las células. Además, la disrupción de las secuencias NES en COMMD1 incrementan la represión de la actividad transcripcional de los factores NFkB y HIF-1 α (Muller y otros, 2009, Traffic, 10:514-527).

Las células tumorales sobreexpresan diferentes proteínas, tales como la proteína XIAP (Inhibidor de apoptosis ligado al X) y clusterina secretoria (sCLU). Ambas proteínas promueven la degradación de COMMD1 y facilitan la activación de NFkB y la supervivencia de la célula tumoral. Se reporta que inhibidores del proteosoma, tal como MG132 (Shirley *et al*, 2005, Neoplasia 7:1104-1111; Zhou y otros, 2009, Cancer Research, 21:333-339), presentan efecto antitumoral mediante la inhibición del mecanismo de ubiquitinación y degradación proteosomal. Compuestos que se unen a XIAP inducen apoptosis, porque bloquean el efecto inhibitorio de esta proteína sobre la activación de la caspasa-3 y la caspasa-9 (Vogler y otros, Cancer Research, 2009, 69:2425-2434). Se propone que el ácido ribonucleico de interferencia (ARNi) diseñado para inhibir la función de sCLU tiene efecto antitumoral, por estabilizar un inhibidor citoplasmático del factor NFkB conocido como I-kB (Zoubeidi y otros, 2010, Molecular Cancer Research, 8:19-30).

En la solicitud de patente internacional WO 07/095867, la esencia de la invención se relaciona con péptidos derivados de la región 32-51 de la proteína LALF (factor antilipopolisacáridos de *Limulus*), en los que se realizaron sustituciones de aminoácidos para asegurar la disociación de la capacidad de unión al LPS e incrementar las actividades antitumoral e inmunomoduladora. Uno de esos péptidos es el nombrado péptido L2. Además, en otra Invención (Solicitud internacional PCT/CU2008/000006) se revela la capacidad de penetración en células de los péptidos anteriormente mencionados. Sin embargo, en tales invenciones no se describe ni se sugiere el mecanismo de acción de tales péptidos. Vallespi y otros, J Pept Sci. 2010 Enero;16(1):40-47 se refiere a un péptido que modifica la expresión génica de las células tumorales y exhibe un efecto antitumoral.

Van de Sluis y otros, J Clin Invest. 2010 Junio; 120(6):2119-30 se refiere a COMMD1 y a la invasión de las células tumorales.

En la actualidad existe un número de terapias para el tratamiento del cáncer (quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, etc.), muchas de las cuales se encuentran en fase de ensayos clínicos. Sin embargo, aún persisten desventajas asociadas a estas terapias tales como: la poca selectividad, la toxicidad y el desarrollo de resistencia al fármaco. Otro aspecto importante a tener en cuenta en este campo es la selección de biomarcadores útiles como diagnóstico y/o predictores de eficacia de un fármaco. Por tanto, aún existe la necesidad de investigar y descubrir nuevas moléculas que sean útiles en el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer, y el diseño de fármacos más selectivos y eficaces con menor toxicidad.

Descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema mencionado anteriormente, porque proporciona un agente o una composición que comprende el agente, para usar de conformidad con la reivindicación 1. En la presente descripción se describe un método para el tratamiento del cáncer mediante el incremento de la localización nuclear de la proteína COMMD1. Este incremento causa la reducción o el bloqueo de la proliferación de las células tumorales.

En esta invención se describe, por primera vez, que el péptido L2 (con secuencia HARIKPTFRRLKWKKYKGKFW, Sec. con núm. de ident. 1) y COMMD1 interactúan en las células, y que la localización nuclear de COMMD1 se asocia con la muerte de la célula tumoral. De este modo, en la presente descripción se describe el uso de la proteína COMMD1, en la identificación de compuestos con actividad antitumoral que facilitan la acumulación y localización nuclear de COMMD1.

Los datos proporcionados en la presente descripción demuestran que el péptido L2 interactúa con COMMD1, específicamente en la región comprendida entre los aminoácidos 110-190. Además, el péptido L2 produce la acumulación nuclear de COMMD1. Adicionalmente, se reporta por primera vez que la expresión de la proteína COMMD1 que contiene secuencias de localización nuclear (NLS) es suficiente para inducir la muerte celular. Por tanto, en la presente descripción se describe el uso de COMMD1, como diana terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Además, el péptido L552 (Sec. con núm. de ident. 3) se optimizó a partir de la secuencia del péptido L2 (Sec. con núm. de ident. 1), para favorecer la acumulación de COMMD1 en el núcleo de las células tumorales, e incrementar el efecto antitumoral de este péptido. El péptido L552 (Sec. con núm. de ident. 3), descrito en esta invención, que se optimizó

para facilitar la localización nuclear de COMMD 1, tiene la siguiente secuencia:

Ac-HARIKpTFERRIKWKYKGKFW

Sec. con núm. de ident. 3

5 La optimización se basó en modificaciones químicas, que se realizaron mediante sustituciones de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales (D- aminoácidos) en posiciones específicas (que se representan en minúsculas y negritas en la secuencia que se incluyó anteriormente) y mediante la protección del extremo N-terminal mediante acetilación (que se indica como **Ac-** en la secuencia que se incluyó anteriormente). Estas modificaciones que se realizaron al péptido L2 (Sec. con núm. de ident. 1), y que dan lugar al péptido L552 (Sec. con núm. de ident. 3),
10 garantizan la acumulación más alta de la proteína COMMD1 en el núcleo de las células y un incremento en la actividad antitumoral del péptido L552, con respecto al péptido original L2. Por tanto, el péptido L552 es una nueva clase de molécula que interacciona con COMMD1, que facilita su localización nuclear e inhibe la proliferación de las células tumorales.

15 Además, en la presente descripción se describe el uso de agentes que incrementan la localización nuclear de la proteína COMMD1 en la fabricación de fármacos para la terapia del cáncer. Entre los agentes o compuestos que facilitan la acumulación nuclear de COMMD1 se incluyen, por ejemplo: proteínas (que incluye los anticuerpos), muteínas, péptidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos nucleicos y pequeñas moléculas orgánicas. Estos compuestos pueden aislarse de fuentes naturales, prepararse sintéticamente o mediante la tecnología recombinante, o cualquier
20 combinación de estas. En la invención, el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 es el péptido L552 (Sec. con núm. de ident. 3). En el contexto de esta invención, incrementar o favorecer la acumulación nuclear de la proteína COMMD1 en el núcleo de las células, tiene el mismo significado. Además, en la presente descripción se describe que el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 puede ser del tipo ácido nucleico, como un vector de expresión de células de mamíferos que contiene una secuencia de DNA que codifica
25 para la proteína COMMD1 a la que se introdujeron secuencias NLS. Este tipo de vector puede usarse como terapia génica.

La invención proporciona, además, una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 6.

30 En la presente descripción se describe una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende un agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1. Además, en la presente descripción se describe la composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 (determinada por su concentración inhibitoria 50, (IC₅₀) y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición puede administrarse por vía parenteral o tópica.

35 La administración de una composición farmacéutica que comprende un agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 constituye una composición o agente para usar en un método para el tratamiento o la prevención de un tumor sólido en una persona, en donde el método comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente que facilite la localización nuclear de COMMD1, para reducir o bloquear el crecimiento de las
40 células tumorales.

En la presente descripción se describe que el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 puede administrarse a paciente con leucemia, específicamente leucemia mielocítica, para bloquear la proliferación de las células tumorales. Este agente puede ser efectivo, incluso en la presencia de un estímulo inflamatorio tal como el
45 lipopolisacárido bacteriano (LPS).

La invención proporciona, además, una combinación farmacéutica para el tratamiento del cáncer de conformidad con la reivindicación 8.

50 Se muestra que el péptido L552 puede usarse en combinación con la quimioterapia estándar para producir un efecto sinérgico y para reducir la dosis de los citostáticos tales como cisplatino y 5-fluoracilo (5-FU). En la presente descripción se describe una combinación farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende uno o varios agentes que incrementan la localización nuclear de la proteína COMMD1, y una o varios fármacos específicos para la quimioterapia del cáncer. En una modalidad de la invención, tal agente es el péptido L552 y el fármaco específico para la
55 quimioterapia estándar se selecciona entre cisplatino y 5-FU. En esta combinación farmacéutica los agentes y los fármacos que se incluyen en esta pueden administrarse simultáneamente, separadamente, o secuencialmente durante el tratamiento.

60 Por otra parte, datos recientes difundieron el concepto de que la inflamación es un componente crítico de la progresión tumoral. Actualmente el microambiente inflamatorio se cataloga como un rasgo característico del tumor, el cual se encuentra dentro de las seis características más importantes del cáncer, descrito por Hanahan y Weinbergs (Perwez y otros, 2007, Int J Cancer, 121:2373-2380).

65 Los datos que proporciona la presente descripción indican que el péptido L552 es efectivo en bloquear el crecimiento de las células tumorales en presencia de un estímulo inflamatorio. Similarmente, la expresión de la proteína GFP-N-

COMMD1 (que contiene Secuencias de Localización Nuclear) que se transfecta transitoriamente en las células tumorales, proporciona el mismo efecto que el péptido L552. Más específicamente, los resultados demuestran que el péptido L552 promueve la muerte de la célula tumoral en presencia de estímulos inflamatorios tales como el LPS y el TNF (factor de necrosis tumoral α). Similarmente, los datos experimentales demuestran la efectividad del péptido en un modelo murino de tumor de colon, en el cual los ratones se retaron con un estímulo inflamatorio mediante la inyección de LPS.

Por esta razón, además, la presente descripción describe un método para inhibir el desarrollo de los tumores asociados con inflamación y sus metástasis, que comprende la administración del péptido L552 a una persona que lo necesite. Entre los tumores que se asocian con inflamación y metástasis se encuentran, por ejemplo, los siguientes cánceres: colorectal, esófago, pulmón, próstata, mama, páncreas e hígado.

Además, la administración del péptido L552 puede usarse, profilácticamente, para prevenir el desarrollo de cáncer asociados con inflamación crónica, tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, pancreatitis, cirrosis, etc. Por tanto, además, la presente descripción describe un método para la prevención del cáncer asociado con inflamación crónica, que se caracteriza por la administración del péptido L552 o una composición que comprende dicho péptido a una persona que lo necesite.

Respecto a la dosis y esquema de tratamiento a seguir con las composiciones que comprenden el péptido L552, como un agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1, un experto puede determinar fácilmente las dosis y el esquema de tratamiento (profiláctico o terapéutico). Las cantidades efectivas pueden variar en dependencia de la potencia relativa de las composiciones individuales, y pueden calcularse basada en el peso molecular del péptido y la IC_{50} *in vitro* o en estudios animales. Por ejemplo, dado el peso molecular del compuesto (estructura química) y la dosis experimental efectiva (IC_{50}) una dosis en mg/kg puede calcularse rutinariamente. En general las dosis son de 0,2-4 mg/kg de peso. El péptido o la composición que lo contiene pueden administrarse una vez o varias veces, semanalmente o aún por varios meses.

Además, en la presente descripción se describe el uso de COMMD1 como un marcador pronóstico novedoso para los pacientes con cáncer, mediante la determinación de la presencia o ausencia de la localización nuclear de la proteína COMMD1 en una muestra.

Similarmente, el péptido L552 proporciona un agente activo para tratar enfermedades donde las proteínas COMM tienen un papel, o toman parte, en la progresión de la enfermedad. Esto es posible, por ejemplo, en enfermedades donde la cantidad de cualquiera de los miembros de la familia de proteínas COMMD está aumentada o disminuida y/o sus actividades se aumenten o se reduzcan, y esto cause la enfermedad. La capacidad del péptido L552 para unirse al dominio COMM, comprendido entre los residuos de los aminoácidos 110-190 del extremo C terminal de las proteínas COMMD, sustentan la actividad terapéutica de estos.

La invención además proporciona un péptido de conformidad con la reivindicación 11.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La figura 1 ilustra la interacción física entre el péptido L2 y COMMD1. Esto se realizó mediante la técnica de dos híbridos de levadura. Como controles negativos se usó el apareamiento de la cepa de levadura AH109 transformada con el vector vacío (pGBKT7) y los fragmentos de COMMD1 transformados en la cepa Y187. Para la identificación de la interacción se realizó el apareamiento de la cepa AH109 transformada con el vector que contiene la secuencia de L2 y cada fragmento de COMMD1 transformado en la cepa Y187. Como un control positivo, se utilizó el apareamiento pCL1 que contiene el factor de transcripción GAL4. Como puede observarse, la interacción ocurre con los plásmidos que contienen la secuencia completa del gen de COMMD1 y la construcción que contiene los aminoácidos 110-190 de la proteína COMMD1.

Figura 2. (A) La figura ilustra la validación de la interacción del péptido L2 con COMMD1 mediante la inmunoprecipitación (*pull-down*) en células SW948. En este experimento se muestran 100 μ g de proteínas totales (PT), la proteína COMMD1 recombinante que se obtiene en *Escherichia coli* (COMMD1 r), y el patrón de peso molecular (PM). (B) La figura ilustra la localización subcelular de COMMD1 en células SW948 tratadas con el péptido L2: Expresión de COMMD1 en núcleo (N), expresión de COMMD1 en citoplasma (C), células no tratadas (NT). La Beta Actina se muestra como un control de la fracción citoplasmática, y la proteína humana ribonuclear (hnRNP) como un control de la fracción nuclear.

Figura 3. (A) La figura ilustra la mayor acumulación nuclear de COMMD1 por el péptido L552 optimizado. Las proteínas Beta Actina y la hnRNP se usaron como control de la fracción del citosol y nuclear respectivamente. (B) La figura muestra la interacción entre el péptido L552 y la proteína COMMD1 en diferentes líneas de células tumorales, en experimentos de inmunoprecipitación (*pull-down*). No se detectó interacción con la proteína Culina7 (CUL7). La presencia de Beta Actina se muestra en extractos de proteínas totales de numerosas líneas celulares.

Figura 4. Efecto antiproliferativo de los péptidos en células tumorales de diferentes orígenes histológicos, LØ (linfocitos humanos aislados de sangre periférica).

Figura 5. Efecto antitumoral del péptido L552 en el modelo de tumor TC-1. (A) Se muestran las curvas de inhibición del crecimiento del tumor. (B) Se muestra el porcentaje acumulativo de supervivencia de los diferentes grupos experimentales.

Figura 6. La expresión de la proteína COMMD1 que contiene secuencias de localización nuclear (NLS) es suficiente para inducir la muerte celular. Se muestra el porcentaje de células no viables que se transfectaron transitoriamente con: la proteína verde fluorescente (GFP) como un control negativo y con las construcciones genéticas GFP-COMMD1 y GFP-N-COMMD1.

Figura 7. (A) Se muestra la quimiosensibilidad al 5-FU en células de carcinoma de colon HT-29 que se transfectaron con GFP-N-COMMD1. Se indican los valores de IC₅₀. (B) Se ilustra el efecto de un ambiente inflamatorio mediante la adición de LPS y TNF- α sobre la IC₅₀.

Figura 8. Ilustra el efecto del péptido L552 sobre la proliferación de células tumorales en presencia de diferentes estímulos inflamatorios. (A) Células de leucemia mieloide humana (THP-1) y (B) células de carcinoma de colon murino (CT-26) tratadas con LPS y TNF- α . Se muestran los valores de IC₅₀.

Figura 9. Efecto antitumoral del péptido L552 en un modelo de cáncer de colon en ratones BALB/c sometidos a un estímulo inflamatorio por inyección de LPS. (A) Se muestra el porcentaje acumulativo de supervivencia de los diferentes grupos experimentales. (B) Se muestra el promedio del volumen tumoral para cada grupo experimental.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Interacción física entre el péptido L2 y COMMD1.

Para identificar las interacciones del péptido antitumoral L2 con las proteínas se utilizó el sistema de dos híbridos de levadura. Para el clonaje de las secuencias correspondientes al péptido se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

L2F:

CATGCACGCTAGAATCAAGCCAACCTTCAGAAGATTGAAGTGAAGTACAAGG
GTAAGTTCTGGTAA

L2R:

GATCTTACCAGAACTTACCCTTGACTTCCACTTCAATCTTCTGAAGGTTGGCTT
GATTCTAGCGTG

que corresponden a la secuencia peptídica de L2: HARIKPTFRRLKWYKKGFW

Para el clonaje de estas secuencias en el vector pGBKT7 NcoI-BamHI, se adicionaron en los extremos de los oligonucleótidos secuencias complementarias a estos sitios. El plásmido recombinante pGBKL2-1, que contiene la secuencia del péptido L2 se verificó por análisis de restricción y secuenciación. La cepa de levadura AH 109 se transformó con el plásmido, por el método de acetato de litio, y se cultivó en el medio SD-Trp. Se verificó que no era capaz de autoactivarse al sembrarse en placas SD-Trp-His. Para el tamizaje de las interacciones se utilizó una librería proveniente de ADNc de hígado humano con la cual se transformó la cepa Y187. Para la formación de los diploides y la selección de las interacciones 5x10⁸ células de AH109 que contienen el plásmido pGBKL2-1 se cultivaron con 5x10⁸ células de Y187 que contienen la librería de ADNc de hígado humano, durante 4 horas en medio sólido YPDA a 30 °C. A las placas de medio YPDA se le añadieron 10 ml de agua estéril en su superficie, y las células se suspendieron cuidadosamente con espátulas, se transfirieron a 15 placas de SD-Trp- Leu-His-A de medio mínimo y se crecieron a 30 °C durante 7 días. Las 74 colonias resultantes se transfirieron a medio líquido SD-Trp-Leu en placas de 96 pocillos profundos. Después de observar el crecimiento en medio líquido se realizó la purificación del ADN de levaduras. Cada uno de los ADN se transformó individualmente en la cepa de *E.coli* DH10B, se purificaron los ADN y se conservaron a -20 °C. Con cada uno de los clones individuales se transformó la cepa de levadura Y187 y se verificó la interacción mediante el apareamiento con la cepa de AH109 transformada con los plásmidos pGBKT7 y pGBKL2-1. Se secuenció el ADN de los clones positivos. El análisis de las secuencias que se realizó mediante el uso del programa BLAST (Altschul y otros, 1990. J Mol Biol, 215:403-410) reveló que uno de los clones (L2-21) se corresponde con la secuencia del gen que codifica para los aminoácidos 6-190 de la proteína COMMD1, y que este clon es capaz de interactuar con el plásmido que contiene la secuencia del péptido L-2. Para identificar específicamente la región de la proteína COMMD1 responsable de esta interacción se realizaron delecciones a la construcción del plásmido pGBKL2-1, lo que generó los clones pGBKL2 (6-110), pGBKL2 (6-70), pGBKL2 (71-190), pGBKL2 (110-190). Como se aprecia en la Figura 1, la interacción se conserva solo en el plásmido pGBKL2 (110-190) que contiene el dominio COMM responsable de las interacciones descritas para las proteínas de la familia COMMD. Este resultado ilustra que el péptido L2 se une

específicamente a la región entre los aminoácidos 110-190.

Ejemplo 2. Experimentos de inmunoprecipitación (pulldown) y determinación de la localización nuclear de COMMD1 en células tumorales tratadas con el péptido L552.

Los experimentos se dividieron en dos bloques:

(A) El péptido sintético L2 (Sec. con núm. de ident. 1), se sintetizó mediante un procedimiento en fase sólida, se biotiniló y se usó como "cebo" unido a una resina de estreptavidina sefarosa. Como "presa" se utilizó un extracto de proteínas totales de SW948 (línea celular de carcinoma de colon humano). Estos experimentos se conocen como "pulldown". El extracto de proteínas totales se obtuvo a partir de 2×10^7 células mediante el uso de tampón de extracción (Tritón X-100 0,5 %, 25 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % glicerol; 1 mM Ditioneitol (DTT), y un inhibidor de proteasas. El péptido biotinilado (300 µg) se incubó con 50 µl de la resina estreptavidina sefarosa (GE Healthcare), durante una hora y se realizaron lavados con tampón fosfato salino (PBS 1 X) más DTT 1 mM. Posteriormente, se incubaron 500 µl de proteínas totales con 50 µl de resina que contiene el péptido biotinilado, a temperatura ambiente durante 5 horas. Posteriormente, la resina se lavó extensivamente con PBS 1X y DTT 1 mM. Las proteínas que permanecen unidas a la resina son aquellas que interactúan con el péptido, y se diluyeron en 25 µl de tampón para electroforesis (Tris HCl 62,5 mM; pH 6,9; 0,1M DTT, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 20 %, glicerol 10 % y bromofenol azul 0,01 %). Para detectar la proteína de interés se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5 %), seguido por la inmunodetección por "Western blot". Para detectar la proteína COMMD1, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la proteína COMMD1 (Sigma, clon 2A12). Como controles positivos se usaron un extracto de proteínas totales (100 µg) y la proteína recombinante COMMD1 que se obtuvo en *E. coli*. Los resultados que se muestran en la Figura 2A demuestran que el péptido L2 concentra la proteína COMMD1 en el experimento de inmunoprecipitación cuando se compara con el extracto de proteínas totales. Esto indica la interacción entre L2 y COMMD1.

(B) Las células SW948 (3×10^6 células) se incubaron durante 5 horas a 37 °C y 5 % CO₂ con el péptido L2 (50 µM). Posteriormente, se obtuvieron las proteínas citoplasmáticas y nucleares, como se describe (Vancurova y otros, 2001, Journal of Biological Chemistry, 276: 19746-19752). La detección de COMMD1 se realizó por "Western blot", mediante el uso de un anticuerpo anti-COMMD1. La Figura 2B demuestra la localización nuclear de COMMD1 en células SW948 tratadas con el péptido L2. La Beta Actina se utilizó como control de la fracción citoplasmática y la ribonucleoproteína humana (hnRNP) como un control de la fracción nuclear.

Ejemplo 3. Optimización del péptido L552 para la acumulación nuclear de COMMD1.

Al considerar que el péptido L2 y COMMD1 tienen una interacción física, y esto se asocia con la localización nuclear de COMMD1, se diseñaron varios péptidos a partir de L2 (Sec. con núm. de ident. 1), para potenciar la acumulación nuclear de COMMD1. Los péptidos descritos en la presente descripción se sintetizaron mediante el uso de un procedimiento en fase sólida. El péptido crudo se extrae con una solución de ácido acético al 30%; se liofiliza y posteriormente se purifica por cromatografía de fase reversa RP-HPLC. La masa molecular de los péptidos purificados se verifica mediante espectrometría de masa. La preparación resultante no es antigénica, no es pirogénica y es aceptable farmacéuticamente para su administración en animales y humanos. Las sustituciones se realizaron puntualmente, mediante la introducción de D-aminoácidos en posiciones específicas en el péptido original L2, cuya secuencia es HARIKPTFRRLKWYKGKFW (Sec. con núm. de ident. 1), tal como se muestra en la Tabla 1. En un caso, se bloqueó, además, el extremo N-terminal por acetilación.

Tabla 1. Secuencia de los péptidos utilizados en la invención

Péptido	Secuencia aminoacídica	Sec. Núm. Ident.	Características
L2	HARIKPTFRRLKWYKGKFW	1	Péptido descrito previamente en la solicitud WO 07/095867
L551	HARIK p TFRRIKWYKGKFW	2	Péptido con D- aminoácidos en las posiciones P-6 y L-11
L552	Ac- HARIK p TFRRIKWYKGKFW	3	Péptido con D- aminoácidos en las posiciones P-6 y L-11, y acetilado en la N-terminal
L553	HARIKPTFRRIKW y KgKFW	4	Péptido con D- aminoácidos en las posiciones K-14 y G-17
L554	HARiK p TFRRLKWYKGKFW	5	Péptido con D- aminoácidos en las posiciones R-3 y P-6.

Nota: los aminoácidos en **negritas** y **minúsculas** significan cambios por D-aminoácidos

En este experimento el objetivo fue identificar un péptido con alta capacidad para producir la acumulación de COMMD1 en el núcleo de las células. Las células SW948 (3×10^6 células) se incubaron durante 5 horas a 37 °C y 5 % CO₂ con los péptidos L2, L551, L552, L553 y L554 (50 µM). Posteriormente, se realizó el aislamiento de las proteínas citoplasmáticas y nucleares como se describe en el Ejemplo 2. La detección de COMMD1 se realizó por "Western blot", mediante el uso de un anticuerpo anti-COMMD1. La Figura 3A demuestra la localización nuclear de COMMD1 en células SW948 tratadas con los péptidos mencionados anteriormente. Los resultados indican que el péptido L552 induce la mayor acumulación de COMMD1 en el núcleo de las células tumorales. Adicionalmente, se demuestra la interacción entre el péptido L552 y COMMD1 mediante experimentos de inmunodetección (pulldown) en diferentes líneas de tumor, Figura 3B. Estos resultados validan la interacción entre L552 y COMMD1. Además, la interacción se relaciona con la facilitación de la acumulación nuclear de COMMD1.

Ejemplo 4. Ilustra el incremento del efecto antiproliferativo del péptido L552 en diferentes líneas tumorales.

Para este ensayo las células tumorales de origen humano H-82 (cáncer de pulmón de células pequeñas), H-125 (cáncer de pulmón de células no pequeñas), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama positivo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico), LS174T (adenocarcinoma colorectal) y HT-29 (adenocarcinoma colorectal resistente a la quimioterapia), se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 1×10^4 células/ml en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (Gibco). Después de 24 horas, los péptidos se adicionaron al medio de cultivo en un intervalo de dosis entre 9 µM y 300 µM. La incubación se realizó durante 48 horas en presencia de CO₂ al 5 % y pasado este tiempo se reveló con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro de difeniltetrazolio (MTT) (Gray MJ y otros, 2008, Natl Cancer Inst, 100:109-20).

Finalmente, se realizó la lectura de la placa a una absorbancia de 492 nm. Cada punto se realizó por duplicado, y los experimentos se realizaron al menos dos veces de manera independiente. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron de las curvas de proliferación celular respectivas. Los resultados se muestran en la Figura 4. Los resultados demuestran que la acetilación en el extremo N-terminal y la sustitución por D-aminoácidos, en posiciones específicas, garantizan un incremento en el efecto antiproliferativo del péptido L552. Sin embargo, no se observó ningún efecto en linfocitos humanos aislados de sangre periférica. Este resultado demuestra que el péptido L552, objeto de esta invención, incrementa su efecto citotóxico selectivo sobre células tumorales sin provocar aumento de la toxicidad en células sanas. Los resultados aportados demuestran que el péptido L552 se optimizó para su interacción con la proteína COMMD1, para facilitar su acumulación adicional en el núcleo y para aumentar el efecto antiproliferativo selectivo sobre las células tumorales.

Ejemplo 5. Efecto antitumoral del péptido L552 en un modelo murino de tumor TC-1.

En estos ensayos se usaron ratones C57BL/6 hembras, entre 8 y 10 semanas de edad (n=10 animales por grupo experimental). Para la implantación del tumor en este modelo, usamos las células TC-1 derivadas de células epiteliales de pulmón de C57BL/6 malignizadas, en forma de suspensión en solución salina (PBS). Una cantidad de 5×10^4 células en un volumen de 200 µl se inoculó en los ratones por vía subcutánea en la pata posterior derecha. Una vez que los tumores alcanzaron 100 mm³ de volumen, se administraron cinco dosis de los péptidos (L2, L552 y L551) con intervalos de 2 días, por vía subcutánea en la pata posterior derecha. En este estudio se evaluó una dosis de 0,2 mg de péptido por kilogramo de peso (4 µg/ratón). Los parámetros que se evaluaron para medir el efecto antitumoral de los péptidos de interés fueron la supervivencia de los animales y la masa tumoral, como se muestra en las Figura 5A y Figura 5B. El péptido L552 fue más efectivo en términos de la capacidad para inhibir la progresión del tumor e incrementar la supervivencia de los ratones en comparación con los péptidos L2 y L551. Estos resultados evidencian que las modificaciones que se introdujeron en el péptido L552 aumentaron la eficacia antitumoral *in vivo*. El análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre los grupos se realizó por el método log rank. Los resultados demuestran que el péptido L552 aumentó significativamente (*p< 0,05) la supervivencia de los animales en comparación con los otros péptidos evaluados. Estos resultados demuestran que las sustituciones por D-aminoácidos, en posiciones específicas, y el bloqueo del extremo N-terminal por acetilación, incrementan significativamente la capacidad antitumoral del péptido.

Ejemplo 6. Ilustra que la expresión de la proteína COMMD1 que contiene secuencias de localización nuclear es suficiente para inducir la muerte celular.

Para confirmar el papel de la localización nuclear de COMMD1 en la inhibición de la proliferación celular, se generaron los plásmidos recombinantes pGFP-COMMD1, que expresa COMMD1 fusionada a la GFP, y pGFP-N-COMMD1, que contiene, además, la secuencia peptídica de localización nuclear PKKKRKV. Para el clonaje de pGFP-COMMD1 se realizó la reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de los oligonucleótidos:

CF: TTCTGCAGTCGACCTTGAGGGTGGCAAA

CR: CGCTCGAGACATCTTCAGTTAGGCTGGCTGATCAGTGT

Para la amplificación del gen que codifica para COMMD1 con la introducción de NLS se usaron los oligonucleótidos:

NF: TGCAGTCGACCCGAAAAAGAAAGGGAACTTGAGGGTGGCAAACCC

CR: CGCTCGAGACATCTTCAGTTAGGCTGGCTGATCAGTGT.

Los clones recombinantes se analizaron por restricción y secuencia de ADN. Ambas construcciones y el control pEGFP se transfectaron transitoriamente en las líneas celulares HT-29 y HEK293 de forma transitoria mediante el uso de Polietilenimina (Sigma, USA) (Boussif, O y otros, 1995, Proc Nati Acad Sci, 92: 7297-7301), en placas de 24 pocillos, por duplicado. Después de 72 horas uno de los pocillos se utilizó para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia Axiovert 40 (Zeiss, Alemania) y el objetivo APlan 10X. Al pocillo restante se le eliminó el medio de cultivo y se realizó una tinción con una mezcla de Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (AO/BE) a una concentración de 5 mg/ml en PBS, para la identificación de la apoptosis (Rible D, y otros, 2005, BMC Biotechnology, 5:12-15), y las células se observaron en el microscopio Axiovert 40 y con el objetivo APlan 40X. Con este tipo de tinción la AO atraviesa la membrana de las células vivas y tiñe los núcleos y el citoplasma de las células en verde y en naranja, respectivamente, mientras que el BE solo penetra las células con pérdida de la integridad de las membranas y tiñe el ADN en rojo. La fluorescencia del BE domina sobre la fluorescencia de la AO.

La tinción AO/EB muestra las células viables teñidas con AO en las transfecciones con GFP y GFP-COMMD1. Solamente en el caso de las células que se transfectaron con la construcción GFP-N-COMMD1 se observaron las células con el núcleo teñido por el BE, lo que indica que se encuentran en una fase tardía de apoptosis. La Figura 6 muestra la gráfica del porcentaje de células con el núcleo teñido de rojo, de tres campos independientes por condición experimental. Se representan los valores y las desviaciones estándar. Estos resultados demuestran que la introducción de NLS en la proteína COMMD1, es suficiente para la inducción de la apoptosis en las células. Estos resultados demuestran, además, la utilidad de COMMD1 como nueva diana terapéutica.

Ejemplo 7. Ilustra el efecto de la localización nuclear de la proteína COMMD1 en la sensibilidad a 5-FU como a estímulos inflamatorios en la línea celular HT-29.

(A) La línea celular HT-29 que se transfectó transitoriamente con las construcciones descritas anteriormente se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 1×10^4 células/ml en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (Gibco). Después de 24 horas, el citostático 5-FU se adicionó al medio de cultivo en un intervalo de dosis entre 0,025 μ M y 2500 μ M, en diluciones seriadas de 1:10. La incubación se realizó durante 48 horas en presencia de CO₂ al 5 % y al término de la misma se reveló con MTT. Finalmente, se realizó la lectura de la placa a una absorbancia de 492 nm. Cada punto se realizó por duplicado, y se realizaron al menos dos experimentos de manera independiente. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron de las respectivas curvas de proliferación celular. Los resultados que se presentan en la Figura 7 A demuestran que la expresión de COMMD1 con NLS (GFP-N-COMMD1) produce un aumento de la sensibilidad de las células tumorales al 5-FU. En este ejemplo se demuestra una reducción en la IC₅₀ en las células que expresan GFP-N-COMMD1 en comparación con las células que expresan GFP o GFP-COMMD1. Estos resultados demuestran, además, la utilidad de COMMD1 como nueva diana terapéutica. Esto demuestra, además, que la localización nuclear de COMMD1 induce quimiosensibilidad a los citostáticos convencionales.

(B) La línea celular HT-29 que se transfectó transitoriamente con la construcción GFP- N-COMMD1 se sometió a diferentes estímulos inflamatorios, por ejemplo, LPS (40 μ g/ml) y TNF- α (20 ng/ml) durante 30 minutos. Posteriormente la IC₅₀ se evaluó como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 7B.

Ejemplo 8. Ilustra el efecto del péptido L552 sobre la proliferación de células tumorales sometidas a un estímulo inflamatorio.

Para este ensayo, células de leucemia mielocítica aguda de origen humano (THP-1) y células de carcinoma de colon murino (CT-26) se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 1×10^4 células/ml en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS). Las células se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de este tiempo se añadieron LPS (40 μ g/ml) o TNF- α (20 ng/ml) durante 30 minutos. La Figura 8 presenta los valores de la IC₅₀ de las líneas celulares THP-1 y CT-26 en presencia o ausencia de los estímulos anteriormente mencionados. Los resultados demuestran que el péptido L552 inhibe la proliferación celular en las líneas de cáncer THP-1 y CT-26, en presencia de diversos estímulos inflamatorios. Este resultado demuestra que el péptido L552 es efectivo en bloquear la proliferación de las células tumorales sometidas a diferentes agentes inflamatorios.

Ejemplo 9. Ilustra el efecto antitumoral del péptido L552 en un modelo de cáncer de colon en ratones BALB/c sometidos a un estímulo inflamatorio por inyección con LPS.

En estos ensayos se usaron ratones BALB/c hembras, entre 8 y 10 semanas de edad (n=10 animales por grupo experimental). Para la implantación del tumor en este modelo, se usaron las células CT-26 aisladas de un carcinoma de colon en ratones BALB/c. Un número de 7×10^4 células en suspensión, en 200 μ l de PBS 1X, se inocularon por vía subcutánea en la región axilar de los ratones. Después de 11 días, los animales recibieron una inyección, que se administró por vía intraperitoneal, de 10 μ g LPS/ratón (serotipo 055: B5, Sigma) en PBS. Una vez que los tumores alcanzaron 100 mm³ de volumen, un grupo recibió 5 dosis de péptido L552 (0.2 mg/kg de peso) en días alternos, un grupo recibió 5-FU en dosis de 20 mg/kg de peso. Los parámetros de interés que se evaluaron en este experimento fueron la supervivencia de los animales y el aumento del volumen de la masa tumoral.

Los resultados presentados en la Figura 9 demuestran la eficacia del péptido L552 en un modelo de carcinoma de colon en el cual se adicionó una faceta inflamatoria, por inyección de LPS. (A) Los resultados demuestran que el péptido L552 fue más efectivo en aumentar la supervivencia (*p<0,05) de los animales en comparación con el grupo tratado con 5-FU, cuando se adiciona el LPS. El análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre los grupos se realizó por el método log rank. (B) El péptido L552 fue más efectivo en términos de capacidad para inhibir la progresión tumoral. El resultado que se presenta en este ejemplo demuestra que el péptido L552 es efectivo en el tratamiento de la inflamación asociada al cáncer.

Ejemplo 10. Ilustra el efecto sinérgico de la combinación entre el péptido L552 y la quimioterapia estándar.

Para este ensayo, las células tumorales HT-29 y H-125 se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 1×10^4 células/ml en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (Gibco). Después de 24 horas, se adicionó el péptido al medio de cultivo en un intervalo de dosis entre 9 μ M y 300 μ M y el fármaco citostático se adicionó en un intervalo de dosis de diluciones seriadas de 1:10 por encima y por debajo de la IC₅₀ reportada para cada línea celular. La incubación se realizó durante 48 horas en presencia de CO₂ al 5 % y, se reveló con MTT. El efecto del tratamiento concomitante péptido y citostático se analizó según el programa computarizado CalcuSyn para el estudio de combinaciones de fármacos (Ting-Chao Chou, 2006, Pharmacological Reviews, 58: 621-681). Los datos que se presentan en la Tabla 2 demuestran que la combinación del péptido con el citostático puede reducir la cantidad de los citostáticos, dado por los valores que se muestran en el índice de la tasa de reducción del fármaco (RI). Estos resultados indican que el péptido puede administrarse en unión con la quimioterapia estándar para proporcionar un tratamiento efectivo (fracción de células afectadas entre 89 % - 94 %) con una menor cantidad del fármaco convencional. La combinación 5-FU + péptido L552 permite una reducción (IR) del citostático de 20 veces en la línea celular HT-29. Para la combinación cisplatino + péptido L552 la reducción del citostático es de 5 veces en la línea celular H-125. Estos resultados indican que el péptido puede administrarse en combinación con el tratamiento estándar para cáncer de pulmón y cáncer de colon, lo que facilita la reducción en la dosis del citostático. Esto puede disminuir los efectos adversos asociados a la quimioterapia.

Tabla 2. Sinergismo de la terapia combinada entre el péptido L552 y los citostáticos 5-FU y cisplatino, para dos líneas celulares de tumores humanos.

Línea celular	Af (fracción afectada)	IC	Fármaco 5-FU (μ M)	Fármaco L552 (μ M)	RI (5-FU)	RI (L552)
HT-29	89 %	0,3	5000	700	20	5
	Af (fracción afectada)	IC	Fármaco cisplatino (μ M)	Fármaco L552(μ M)	RI (cisplatino)	RI (L552)
H-125	94 %	0,5	273	308	5	3

Una IC < 1 significa sinergismo; IC = 1 significa aditividad; IC >1 significa antagonismo. Además, se muestra el Índice de Reducción (RI) del fármaco en combinación.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> MÉTODO PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER

5 <130> Péptido 552

<150> CU 2010-0113

<151> 2010-05-31

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 1

20 His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

<210> 2

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> prolina 6 es un D-aminoácido

30 <222> (6)..(6)

<220>

<221> leucina 11 es un D-aminoácido

35 <222> (11)..(11)

<400> 2

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

40 <210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<221> extremo N-terminal acetilado

<222> (1)..(1)

<220>

50 <221> prolina 6 D-aminoácido

<222> (6)..(6)

<220>

<221> leucina 11 D-aminoácido

ES 2 619 571 T3

<222> (11)..(11)

<400> 3

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

5 Gly Lys Phe Trp
 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> lisina 14 D-aminoácido
 <222> (14)..(14)

15 <220>
 <221> glicina 17 D-aminoácido
 <222> (17)..(17)

20 <400> 4

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
 20

25 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> arginina 3 D-aminoácido
 <222> (3)..(3)

35 <220>
 <221> prolina 6 D-aminoácido
 <222> (6)..(6)

<400> 5

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
 20

40

Reivindicaciones

1. Un agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 en una célula tumoral, o una composición que comprende el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 en una célula tumoral, para usar en un método para el tratamiento del cáncer, en donde el agente comprende un péptido con la secuencia de aminoácidos de la Sec. con núm. de ident. 3.
2. Un agente para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 en una célula tumoral comprende un péptido con la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 3.
3. Un agente para usar de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer es un tumor asociado con inflamación y metástasis
4. Un agente para usar de conformidad con la reivindicación 3, en donde el tumor asociado con inflamación y metástasis se localiza en el colon, recto, esófago, pulmón, próstata, mamas, páncreas o hígado.
5. Un agente para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde el agente es un péptido con la secuencia de aminoácidos de Sec. con núm. de ident. 3.
6. Una composición farmacéutica para la terapia del cáncer que comprende uno o varios agentes que incrementan la localización nuclear de la proteína COMMD1 en la célula tumoral, y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el agente es un péptido con la secuencia de aminoácidos de Sec. con núm. de ident. 3.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 en la célula tumoral es un péptido con la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 3.
8. Una combinación farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende uno o varios agentes de conformidad con la reivindicación 1 que incrementan la localización nuclear de la proteína COMMD1, y uno a varios fármacos específicos para la quimioterapia estándar del cáncer.
9. La combinación farmacéutica de la reivindicación 8, en donde el agente que incrementa la localización nuclear de la proteína COMMD1 comprende un péptido con la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 3, y el fármaco específico para la quimioterapia estándar del cáncer se selecciona entre cisplatino y 5-FU.
10. La combinación farmacéutica de la reivindicación 8, en donde los agentes y los fármacos que forman parte de la combinación se administran simultáneamente, separadamente, o secuencialmente durante el curso del mismo tratamiento.
11. Un péptido con capacidad de unión al dominio COMM caracterizado porque tiene la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 3.

Figura 1

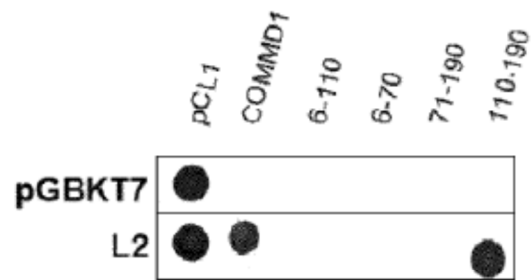


Figura 2

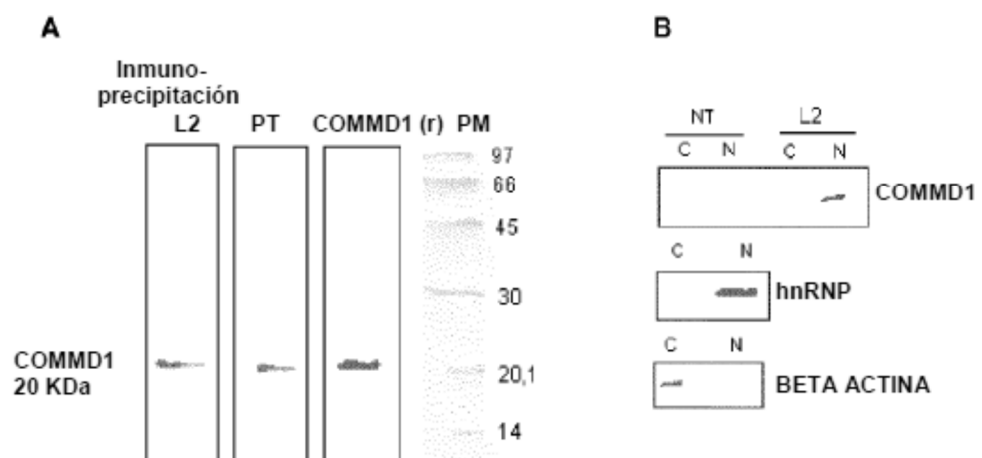


Figura 3

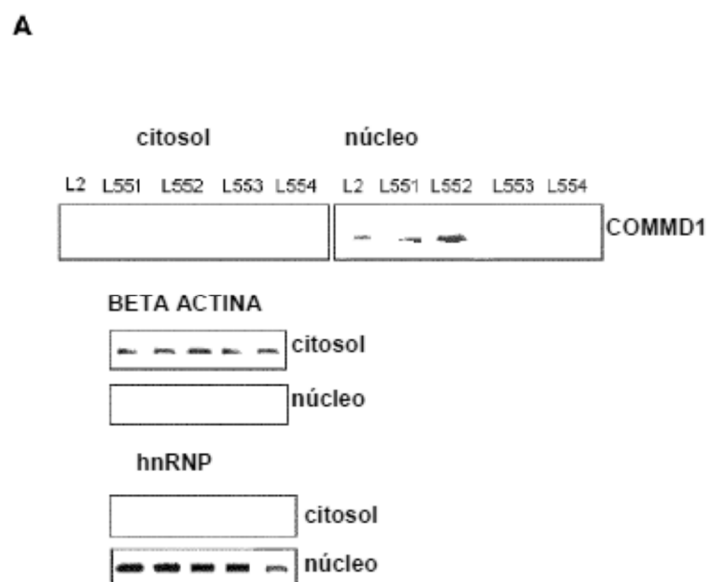


Figura 3

B

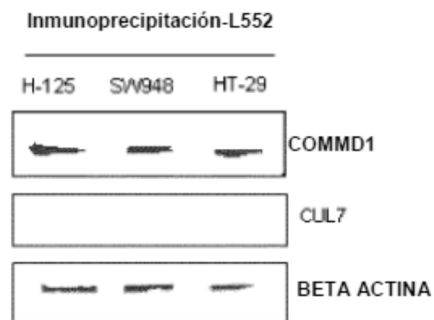


Figura 4

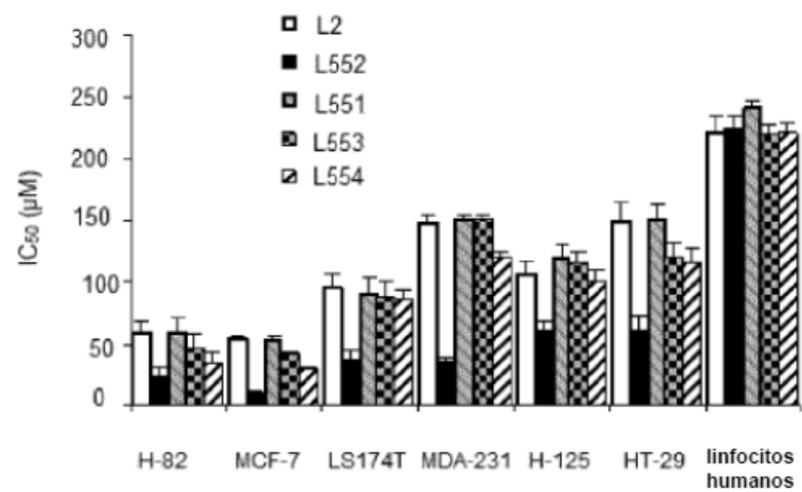


Figura 5

A

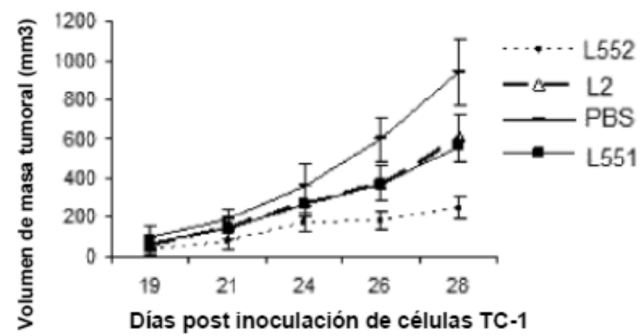


Figura 5

B

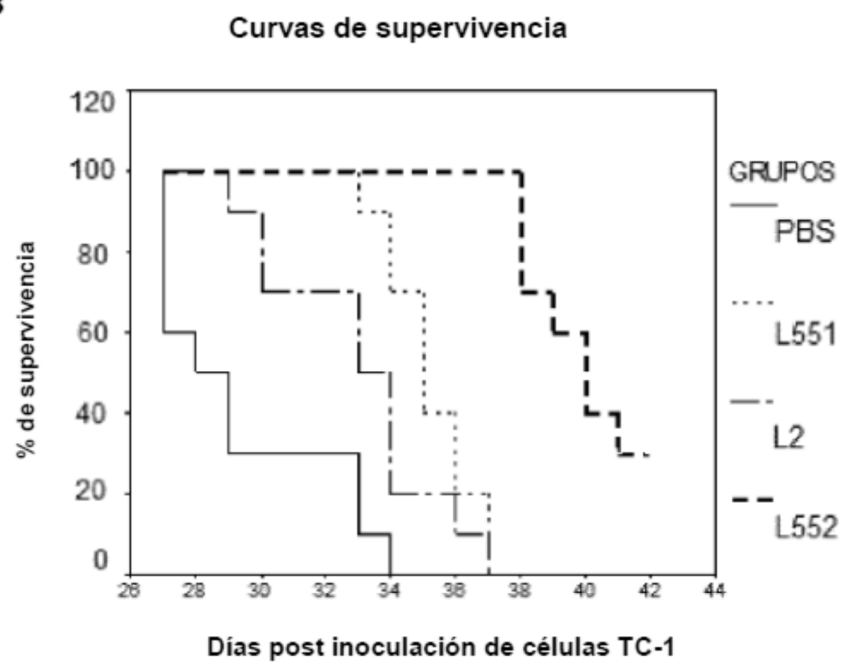


Figura 6

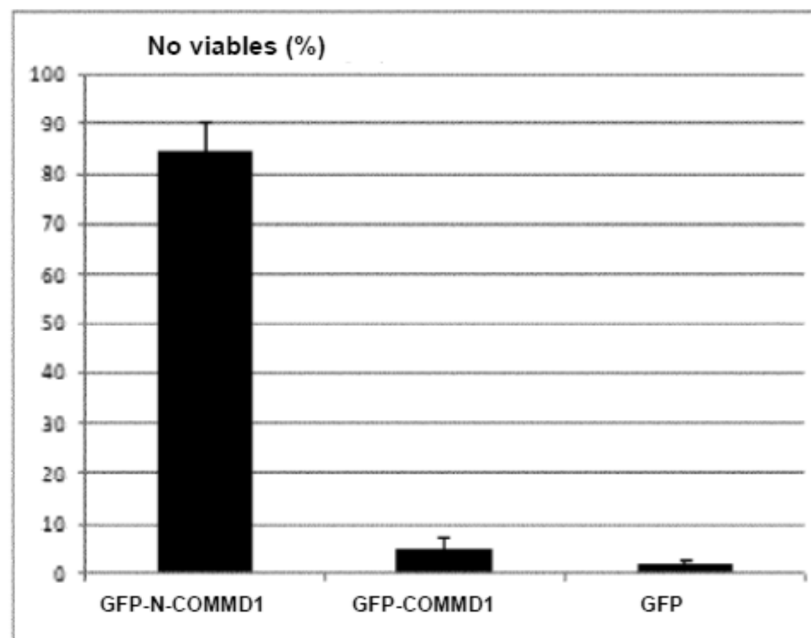


Figura 7

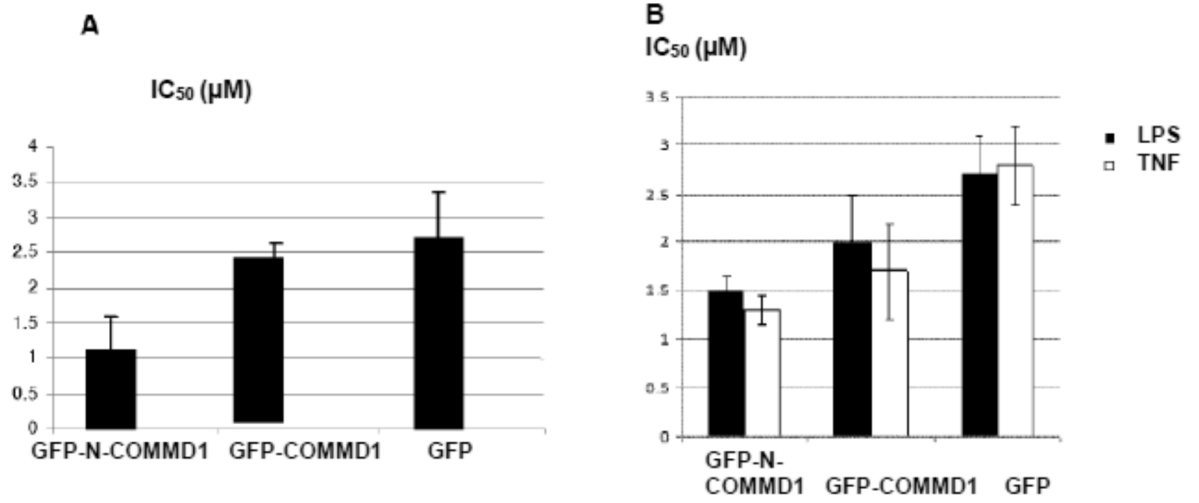


Figura 8

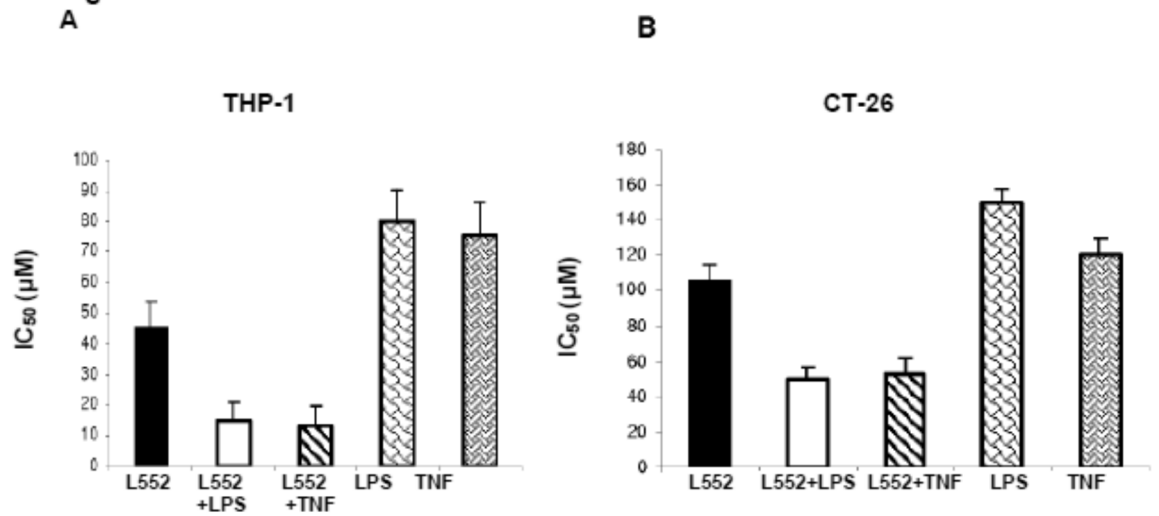
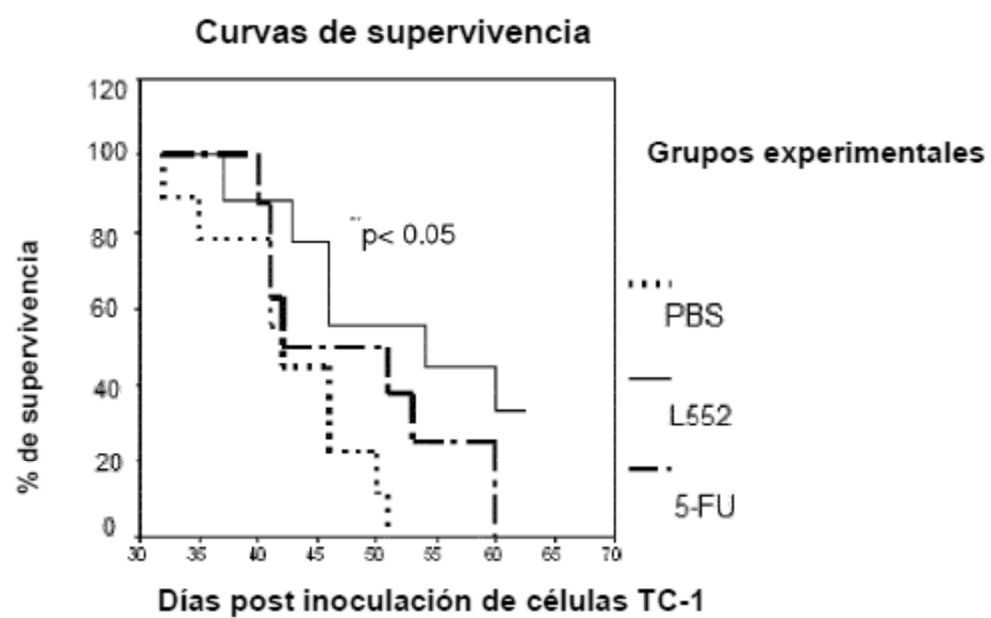


Figura 9
A



B

