

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 566**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2008 PCT/EP2008/053127**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2008 WO08113770**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08717866 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2139917**

54 Título: **Péptidos antiandrógenos y sus usos en la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

16.03.2007 US 895424 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2018

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)
Angel Building 407 St John Street London
EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**AURICCHIO, FERDINANDO y
MIGLIACCIO, ANTIMO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 677 566 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos antiandrógenos y sus usos en la terapia del cáncer

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos nativos, mutados específicamente en sitio y sintéticos que comprenden porciones del receptor de andrógenos humano y sus composiciones. La invención también se refiere a anticuerpos producidos contra estos péptidos y polinucleótidos que codifican estos péptidos. También se proporcionan procedimientos para sintetizar derivados de estos péptidos y su uso como composiciones antiandrógenas en el tratamiento y/o prevención de cánceres de próstata y/o mama, preparación de composiciones farmacéuticas, kits de diagnóstico y desarrollo de ensayos relacionados para su uso en terapias anticancerosas.

10 Estado de la técnica

Receptor de andrógenos en cánceres de próstata y mama humanos

El receptor de andrógenos (RA) es una proteína reguladora transcripcional activada por ligandos que media la inducción del desarrollo y la función sexual masculina a través de su actividad con andrógenos endógenos (Roy y col., 1999). Los andrógenos son generalmente conocidos como las hormonas sexuales masculinas. Las hormonas androgénicas son esteroides, que se producen en el cuerpo por los testículos y la corteza de la glándula suprarrenal o se pueden sintetizar en el laboratorio. Los esteroides androgénicos juegan un papel importante en muchos procesos fisiológicos, que incluyen el desarrollo y el mantenimiento de las características sexuales masculinas tales como masa muscular y ósea, crecimiento de la próstata, espermatogénesis y el patrón del cabello masculino (Siiteri y Wilson, 1974). Los andrógenos esteroideos endógenos incluyen testosterona y dihidrotestosterona (DHT). La testosterona es el principal esteroide secretado por los testículos y es el andrógeno circulante primario que se encuentra en el plasma de las parejas. La testosterona se convierte en DHT mediante la enzima 5-alfa-reductasa en muchos tejidos periféricos. Por lo tanto, se piensa que la DHT sirve como mediador intracelular para la mayoría de las acciones de andrógenos.

25 Otros andrógenos esteroideos incluyen ésteres de testosterona, tales como el cipionato, propionato, fenilpropionato, ciclopentilpropionato, isocarporato, enentato y ésteres de decanoato y otros andrógenos sintéticos tales como 7-metil-nortestosterona.

Los dos tipos principales de cáncer que expresan el receptor de andrógenos (RA) son el cáncer de próstata y el cáncer de mama. También pueden ser positivos a RA otros cánceres. El cáncer positivo a RA más común es el cáncer de próstata. Aproximadamente el 80-90 % de los cánceres de próstata dependen de andrógenos en el momento del diagnóstico inicial, y la terapia endocrina del cáncer de próstata se dirige hacia la reducción de los andrógenos séricos y la inhibición de RA (Denis y Griffiths, 2000). Sin embargo, cuando finalmente falla la terapia de ablación de andrógenos, el cáncer de próstata progresa a un estado hormonal refractario. RA se expresan a lo largo de la progresión del cáncer de próstata y persiste en la mayoría de los pacientes con enfermedad refractaria a hormonas (Mohler y col., 1996; van der Kwast y col., 1991; Sadi y col. 1991; Chodak y col. 1992; Hobisch y col., 1996). Además, la mayoría de los mutantes RA identificados a partir de cáncer de próstata refractario a hormonas son capaces de actividad transcripcional. Estas observaciones sugieren que la pérdida de la función de RA no es una causa importante de fallo de la ablación de andrógenos y que las células de cáncer de próstata negativas a RA no tienen un crecimiento significativo o una ventaja de supervivencia. En cambio, la evidencia clínica y experimental disponible sugiere que la progresión del cáncer de próstata se produce por la alteración del eje androgénico normal por la mala regulación de la actividad de RA a través de cascadas de traducción de señales, la alteración en la expresión de correguladores de RA y mutaciones de RA que le permiten volverse transcripcionalmente activo en respuesta a otros ligandos como testosterona y DHT. Aunque los andrógenos séricos solos pueden no promover la carcinogénesis de la próstata, la acción androgénica y el estado funcional de los RA son mediadores importantes de la progresión del cáncer de próstata. Se ha encontrado que niveles bajos de testosterona sérica en hombres con cáncer de próstata recientemente diagnosticado y no tratado se correlacionan con mayor expresión de RA, aumento de la densidad de vasos capilares dentro del tumor y mayor puntuación de Gleason (Schatzl y col., 2002). Análisis recientes de muestras clínicas de cáncer de próstata también recogidas de pacientes sin tratamiento preoperatorio demostraron que la expresión elevada de RA se correlacionaba con una menor supervivencia sin recidiva y progresión de la enfermedad (Lee, 2003). El tratamiento endocrinológico del cáncer de próstata implica principalmente la modulación de la actividad de RA a través de la privación de andrógenos testiculares circulantes mediante castración quirúrgica o castración química con agonistas de estrógenos (diétilstilbestrol) y LHRH (hormona liberadora de hormona luteinizante). La actividad de RA también puede bloquearse mediante la administración de antiandrógenos, ya sean solos o en combinación con la castración quirúrgica o química (denominado bloqueo combinado de andrógenos). Más del 80 % de los pacientes muestran respuesta positiva a la ablación androgénica. Sin embargo, los pacientes con cáncer de próstata metastásico finalmente experimentan progresión de la enfermedad en una media de 12 a 18 meses después de la terapia de privación de andrógenos. Los tumores de estos pacientes se consideran refractarios a la hormona. Aunque estos tumores son refractarios en el sentido de que han progresado a pesar de la reducción del andrógeno sérico y/o del tratamiento con antiandrógenos, es poco probable que la mayoría de estos tumores sean completamente resistentes a los andrógenos. En el 97 % de

los pacientes con cáncer de próstata metastásico refractario a hormonas, el tratamiento con andrógenos exógenos da lugar a un brote de la enfermedad y una respuesta desfavorable (revisado en Fowler y Whitmore, 1982). La terapia secundaria para pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas también se dirige predominantemente a la producción de andrógenos y la función de RA e incluye la administración de un antiandrógeno secundario, la inhibición de la producción de andrógenos suprarrenales y la inhibición adicional de HL (hormona luteinizante) con progesterona o agentes estrogénicos (Dawson y Vogelzang, 2000). Otros cánceres, como el cáncer de mama, también pueden ser positivos a RA (Moinfar y col., 2003). Los receptores de andrógenos se expresan comúnmente en el carcinoma ductal de mama *in situ*, así como en el carcinoma de mama invasivo. Un número significativo de carcinomas de mama pobremente diferenciados, siguen siendo positivos al RA, mientras que son negativos al RE (receptor de estrógeno) y negativos al RP (receptor de progesterona). Como el cáncer de próstata, el cáncer de mama se trata mediante privación de hormonas, que en este caso, se logra mediante burlando el estrógeno y el receptor de estrógeno. Con el tiempo, el cáncer de mama encuentra formas de crecer sin la necesidad de estrógeno y se vuelve letal. Los cánceres de mama que se vuelven refractarios a hormonas continúan expresando RA en la mayoría de los casos. Aunque la terapia hormonal secundaria también puede fallar, la capacidad de las terapias dirigidas a RA para proporcionar un beneficio terapéutico positivo sugiere que la actividad de RA es un mediador importante del crecimiento y la supervivencia del cáncer de próstata y de mama.

En este aspecto, la evidencia de que los receptores esteroideos activan las cascadas de transducción de señales (Migliaccio y col., 1996) abrió una nueva línea para el tratamiento de estos cánceres. Se ha demostrado que los andrógenos, así como los estrógenos, requieren la activación de la ruta Src/ras/erk para estimular la síntesis de ADN (Migliaccio y col., 2000). Dicha activación de la ruta se produce tras una interacción directa de receptores esteroideos con la tirosina-quinasa no receptora Src. Se han identificado los sitios cruciales para estas interacciones.

Terapias actuales

Los antiandrógenos no esteroideos como flutamida (Eulexin®), bicalutamida (Casodex®) o nilutamida (Anandron®) se han utilizado en la terapia del cáncer de próstata sensible a hormonas. De forma similar, la terapia antiestrógeno por tamoxifeno (Nolvadex®) o ICI 182.780 (Fulvestrant®) se utiliza comúnmente en el cáncer de mama sensible a hormonas.

Desafortunadamente, estos y otros enfoques similares con frecuencia se vuelven ineficaces debido al desarrollo de resistencia a los fármacos. Además, estos compuestos tienen algunos efectos secundarios indeseables, como un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares y, después del uso crónico, una pequeña incidencia incrementada de carcinoma de útero. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de tratar los cánceres de próstata y de mama de una manera más específica utilizando compuestos alternativos no tóxicos. Recientemente se demostró que el receptor de andrógenos estimulado por el factor de crecimiento o la hormona interactúa con la tirosina quinasa Src, que induce la proliferación "*in vitro*" de células de cáncer de próstata y mamario (Castoria y col., 1999; Migliaccio y col., 1996; 2000; 2005).

El documento WO 98/46250 desvela péptidos antiestrógenos fosfotirosina o malonil-tirosina caracterizados principalmente por motivos Leu. La presente invención no se refiere a dichas moléculas.

El documento WO 00/01813 desvela péptidos derivados del aa 234-391 del receptor de andrógeno humano. Aunque algunos de los péptidos desvelados comparten alguna similitud de secuencia con las moléculas de la invención, el documento de la técnica anterior falla al desvelar la actividad antagonista de dichos péptidos con respecto a la ruta de unión/activación de RA/Src. Además, los péptidos desvelados en el documento WO 00/1813 no han demostrado reducir o bloquear el crecimiento de células tumorales de próstata o de mama. No se ha demostrado que ejerzan una actividad antitumoral real y aplicable.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar péptidos dirigidos a anular la asociación del receptor de andrógenos/Src y el desarrollo de una nueva clase de compuestos para la terapia del cáncer de próstata y de mama.

55 Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona una molécula derivada de péptido aislada o purificada o parcialmente purificada que presenta la fórmula general:



50 en la que X es H, o un grupo acetilo o cualquier aminoácido natural o secuencia de aminoácidos provista con un grupo NH₂ libre o al menos derivado de acetilo; Y es un grupo OH o un grupo NH₂; "n" es un número entero de 1 a 10 y "m" es un número entero de 1 a 3; y en la que la secuencia de aminoácidos de la molécula derivada de péptido se selecciona del grupo que consiste en:

55 Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 1);
Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 2);

Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 3); y
 Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 4).

Preferentemente, la molécula derivada de péptido es capaz de inhibir o evitar la interacción del receptor de andrógenos (RA) con el dominio SH3 de la tirosina quinasa Src.

5 Preferentemente, la molécula derivada de péptido tiene actividad antitumoral *in vitro* o *in vivo*.

Preferentemente, la molécula derivada de péptido tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

10 Ac-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂;
 Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂;
 Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂; y
 Ac-Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz de la molécula derivada de péptido como se describe en las reivindicaciones.

15 Preferentemente, se proporciona la composición farmacéutica en la que (i) dicho péptido puede unirse a una molécula transportadora tal como BSA o KLH y/o está comprendido en una composición lipídica tal como una partícula lipídica, una nanocápsula, un liposoma o vesículas lipídicas con un excipiente farmacéutico; y/o (ii) la composición comprende al menos un segundo agente anticanceroso.

20 La presente invención también proporciona una molécula derivada de péptido como se describe en las reivindicaciones o una composición farmacéutica como se describe en las reivindicaciones para su uso como un medicamento.

Preferentemente, la molécula derivada de péptido o la composición farmacéutica es para su uso como agente antitumoral.

25 Preferentemente, la molécula derivada de péptido o la composición farmacéutica es para su uso contra (i) cáncer de mama o de próstata y/o (ii) otros cánceres que expresan receptores de andrógenos solos o junto con receptores de estradiol.

La presente invención también proporciona un uso de la molécula derivada de péptido como se describe en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento.

La presente invención también proporciona un uso de una molécula derivada de péptido como se describe en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

30 Preferentemente, el uso como se describe en las reivindicaciones es en el que el medicamento es para el tratamiento de (i) cáncer de mama o de próstata y/o (ii) otros cánceres que expresan receptores de andrógenos solos o junto con receptores de estradiol.

La presente invención también proporciona un anticuerpo capaz de reconocer específicamente una molécula derivada de péptido como se describe en las reivindicaciones.

35 La presente invención también proporciona un kit que comprende un anticuerpo como se describe en las reivindicaciones, unido operativamente a una etiqueta detectable y a reactivos de inmunodetección en recipientes únicos o múltiples.

La presente invención también proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido o un vector recombinante que expresa un péptido como se describe en las reivindicaciones.

40 La presente invención también proporciona células hospedadoras de mamífero, de ser humano o de bacterias que contienen la secuencia de ácidos nucleicos o el vector recombinante como se describe en las reivindicaciones.

La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para matar una célula cancerosa, que incluye una célula de cáncer de mama o de próstata, que comprende proporcionar a la célula una molécula derivada de péptido como se describe en las reivindicaciones.

45 La presente invención supera las dificultades inherentes en la materia anterior al proporcionar nuevas composiciones y procedimientos *in vitro* para utilizarse en el tratamiento de cánceres de próstata y de mama. La invención proporciona péptidos sintéticos novedosos, que exhiben actividad del receptor antiandrógeno para utilizarse en terapia o prevención del cáncer de próstata y/o de mama en humanos. Estos péptidos contienen tramos de prolina, que han sido implicados para jugar un papel principal en la interacción de RA con el dominio SH3 de la tirosina quinasa Src (Migliaccio y col., 2000) y, potencialmente, otras quinasas de la familia Src. Los dominios SH3 tienen
 50 una longitud de 50-70 aminoácidos y se pueden reconocer a menudo en la transducción de señal eucariota y en

5 proteínas del citoesqueleto (Kay y col., 2000). Se unen a péptidos ricos en prolina y, a través de dicha interacción, juegan un papel importante en la regulación de la actividad de la quinasa, así como en la localización y el reconocimiento del sustrato. Cada miembro de la familia quinasa Src tiene en su secuencia un dominio SH3. Los miembros de esta familia son nueve (Williams y col., 1998) y otros podrían ser identificados en el futuro. Se ha informado que los receptores de andrógenos y de progesterona ocupados por agonistas son capaces de interactuar con el dominio SH3 de Src (Migliaccio y col., 2000; Boonyaratanakornkit y col., 2001). Estas asociaciones probablemente eliminan la acción inhibitoria del dominio SH3 y provocan la activación de Src. Por consiguiente, los péptidos desvelados en la presente invención se unen al dominio SH3 de Src y evitan que los RA interactúen con Src y activen la transducción de señales. Se ha informado que los receptores de andrógenos y de estradiol (RE) se asocian en condiciones basales (Migliaccio y col., 2005): cuando uno de los dos receptores se activa mediante un agonista esteroide o un factor de crecimiento, los dos receptores interactúan con Src. Por lo tanto, la prevención de la asociación de RA con Src también evita la asociación de RE con esta quinasa y la activación de Src mediante RE. Como consecuencia, los péptidos desvelados en el presente documento también tienen una acción antiestrogénica.

15 Se desvela en el presente documento, pero no se reivindica, una molécula derivada de péptido aislada o purificada o parcialmente purificada que presenta la fórmula general:



20 en la que X es H, o un grupo acetilo o cualquier aminoácido natural o secuencia de aminoácidos provista con un grupo NH₂ libre o al menos derivado de acetilo; Y es un grupo OH o un grupo NH₂ o cualquier aminoácido o secuencia de aminoácidos con un grupo carboxi-amida C terminal; "n" es un número entero de 1 a 10 y "m" es un número entero de 1 a 3.

La molécula derivada de péptido es capaz de inhibir o evitar la interacción del receptor de andrógenos (RA) con el dominio SH3 de la tirosina quinasa Src.

La molécula derivada de péptido tiene una actividad antitumoral *in vitro* o *in vivo*.

25 Las variantes adicionales de estos péptidos también son objeto de la presente divulgación. De hecho, los compuestos derivados de aquellos descritos por la fórmula S1, y capaces de cumplir funciones biológicas similares pueden idearse (o derivarse) logrando cualquier tipo de duplicación, triplicación o, más en general, multimerización de la secuencia de los péptidos lineales desvelados. Como ejemplo, los péptidos desvelados en el presente documento pueden modificarse de acuerdo con los procedimientos informados por Tam y colaboradores (Tam y Spetzler JC, 1997) para la preparación de múltiples péptidos antigénicos o por Mutter y colaboradores para la preparación de proteína sintética ensamblada a plantilla (PSEP, Tuchscherer y Mutter, 1996).

30 Se pueden utilizar las moléculas resultantes para los fines de la presente solicitud como sales trifluoroacéticas, sales de acetato, sales clorhídricas, sales de sulfato y cualquier otra sal derivada de la disolución en tampones de trabajo utilizados, normalmente, por los expertos en la materia.

Los ejemplos de secuencias polipeptídicas desveladas en la presente solicitud son las enumeradas en la tabla 1:

Tabla 1.

Secuencia	SEQ. ID NO.
Ac-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH ₂	(SEQ. ID NO.1)
Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH ₂	(SEQ. ID NO.2)
Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH ₂	(SEQ. ID NO.3)
Ac-Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH ₂	(SEQ. ID NO.4)
Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-NH ₂	(SEQ. ID NO.5)
Ac-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH ₂	(SEQ. ID NO.6)
Ac-His-Pro-Lys-Pro-Ala-Arg-Ile-Pro-His-Pro-NH ₂ *	(SEQ. ID NO.7)
* La SEQ ID NO.7 es una secuencia mezclada de SEQ. ID # NO. 1	

40 En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, una composición que comprende un péptido aislado entre aproximadamente cuatro y aproximadamente 30 restos de aminoácidos de longitud, en el que el péptido incluye dentro de su secuencia un péptido que tiene la fórmula general S1 en la que cada aminoácido se puede reemplazar por cualquier derivado o análogo del mismo.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende un péptido aislado de entre diez y aproximadamente 50 o más restos de aminoácidos de longitud, en el que el péptido incluye dentro de su secuencia

una secuencia de aminoácidos representada por:

Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO.1)

en la que cada aminoácido puede ser reemplazado por cualquier derivado o análogo del mismo.

5 En una segunda realización, la invención se refiere a una composición que comprende un péptido aislado de entre veinte y aproximadamente 50 o más restos de aminoácidos de longitud, en el que el péptido incluye dentro de su secuencia una secuencia de aminoácidos representada por:

Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO.2)

en la que cada aminoácido puede ser reemplazado por cualquier derivado o análogo del mismo.

10 En una tercera realización, la invención se refiere a una composición que comprende un péptido aislado de entre catorce y aproximadamente 50 o más restos de aminoácidos de longitud, en el que el péptido incluye dentro de su secuencia una secuencia de aminoácidos representada por:

Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO.3)

en la que cada aminoácido puede ser reemplazado por cualquier derivado o análogo del mismo.

15 En una cuarta realización, la invención se refiere a una composición que comprende un péptido aislado de entre dieciséis y aproximadamente 50 o más restos de aminoácidos de longitud, en el que el péptido incluye dentro de su secuencia una secuencia de aminoácidos representada por:

Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO.4)

en la que cada aminoácido puede ser reemplazado por cualquier derivado o análogo del mismo.

20 Las composiciones de péptidos preferidas son aquellas que reducen o inhiben la actividad del receptor de andrógenos sobre el crecimiento celular. Los inventores han demostrado que esta reducción o inhibición se consigue mediante la reducción o anulación de la interacción de RA con quinasa Src (péptido(s) SH3-aglutinante). Preferentemente, la composición peptídica incluye péptidos que tienen una longitud de hasta diez aminoácidos e incluyen aquellos que tienen una longitud de aproximadamente 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13 o incluso 12 u 11 o más aminoácidos de longitud.

25 Se ha demostrado que los péptidos ejemplares de aproximadamente 10, 12, 14, 16 aminoácidos son particularmente eficaces para reducir la actividad de los RA y la síntesis de ADN. Dichos péptidos ejemplares se desvelan en la secuencia SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.4.

30 Los péptidos de la invención pueden comprender opcionalmente además uno o más aminoácidos en el extremo amino. En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, un péptido que además puede comprender opcionalmente uno o más aminoácidos en el extremo carboxi-terminal de los péptidos desvelados, o alternativamente, puede comprender además uno o más aminoácidos en ambos extremos del motivo antiandrógeno desvelado. Dichos aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales, derivados de aminoácidos o aminoácidos sustituidos. En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, que los aminoácidos pueden extender la longitud total de la secuencia de aminoácidos primaria del péptido 5, 10, 15, 20, incluso 25 o más aminoácidos adicionales en el extremo carboxi o en ambos extremos de los motivos de RA implicados en la interacción RA-Src descrita en el presente documento.

35 En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, que otros compuestos estéricamente similares pueden formularse para imitar las porciones clave de la estructura peptídica y que estos compuestos pueden tener el mismo uso que los péptidos de la invención en el tratamiento del cáncer y, en particular, carcinomas de células de próstata y de mama.

40 En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, un péptido que también puede caracterizarse por comprender al menos 5 o más restos e incluir dentro de su secuencia al menos dos o más restos de prolina.

45 Los péptidos pueden modificarse para su uso en terapéutica, por ejemplo, mediante el empleo de uno o más D-aminoácido(s) en lugar de L-aminoácido(s), mediante la adición de grupos en los extremos N o C, tales como mediante acilación, acetilación o aminación. También pueden estar encapsulados dentro de lípidos, nanocápsulas, complejos lipídicos y/o liposomas. También se pueden incorporar los péptidos en cápsulas de recubrimiento para liberación lenta.

50 La molécula derivada de péptido de la invención puede utilizarse como agente antitumoral, preferentemente contra cáncer de mama o de próstata o contra otros cánceres que expresan el receptor de andrógenos solo o junto con receptores de estradiol.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz de la molécula derivada de péptido como se reivindica.

5 En una realización preferida en la composición, el péptido, tal como se define en las reivindicaciones, se une a una molécula transportadora tal como BSA o KLH y/o comprende una composición lipídica tal como una partícula lipídica, una nanocápsula, un liposoma o vesículas lipídicas con un excipiente farmacéutico. Preferentemente, la composición comprende además al menos un segundo agente anticanceroso.

Los péptidos de la invención también pueden utilizarse para la preparación de un medicamento, también una vacuna. Otro objeto de la invención es un anticuerpo capaz de reconocer específicamente la molécula derivada de péptido, como se define en las reivindicaciones.

10 Un aspecto adicional de la invención es un polinucleótido, un vector recombinante, una célula hospedadora que comprende uno o más de las composiciones del péptido, polinucleótido o vector recombinante, como se define en las reivindicaciones. Cada uno de ellos también puede utilizarse en la preparación de formulaciones anticancerosas.

15 La invención proporciona un kit que comprende una o más de las composiciones de péptidos antiestrógenos develadas como se define en las reivindicaciones adecuadas para inyección parenteral, intramuscular, intravenosa u administración oral, nasal o tópica. El kit puede contener uno o más medicamentos adicionales, un peptidomimético u otro agente. Los péptidos tal como se definen en las reivindicaciones pueden utilizarse en la preparación de una vacuna.

20 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la actividad de los receptores de andrógenos en una célula que proporciona a la célula una cantidad de un péptido antiandrógeno, en el que la célula está en un cultivo.

En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, un procedimiento para reducir la asociación de receptor de andrógenos/Src.

25 En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, un procedimiento para tratar el cáncer en un animal. Este procedimiento generalmente comprende identificar un animal con cáncer tal como cáncer de próstata o de mama y administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de péptido antiandrógeno, que puede formularse en un excipiente o un liposoma u otro vehículo lipídico, y puede prepararse para la administración a través de cualquier medio convencional de liberación.

30 La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para matar una célula tumoral que comprende proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido antiestrógeno, como se define en las reivindicaciones. En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, un procedimiento para matar una célula tumoral comprendida dentro de un animal; generalmente implica identificar un animal sospechoso de tener cáncer y administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido antiandrógeno. La formulación de la invención también puede utilizarse en la prevención del desarrollo de células tumorales.

Composición de péptidos antiandrogénicos

35 La presente invención proporciona derivados de péptidos y, en realizaciones preferidas, sustancialmente purificados y ricos en prolina que tienen propiedades anticancerosas, como se define en las reivindicaciones. La expresión "péptidos purificados" como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición proteica, en la que los péptidos ricos en péptidos se purifican en cualquier grado con relación a su estado que se puede obtener de manera natural. Por lo tanto, un péptido o péptido purificado también se refiere a un péptido o proteína libre del entorno en el que se produce de manera natural.

40 Generalmente, "purificado" se referirá a la composición peptídica que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar diversos componentes no derivados de péptidos.

45 Cuando se utiliza la expresión "sustancialmente purificado", se refiere a una composición en la que el péptido forma el componente principal de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50 % de las proteínas en la composición o más. En realizaciones preferidas, una proteína sustancialmente purificada constituirá más del 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o incluso 99,9 % o más de la composición.

50 Un polipéptido o proteína que está "purifica hasta la homogeneidad", tal como se aplica en la presente invención, significa que el polipéptido o proteína tiene un nivel de pureza en el que el polipéptido o proteína está sustancialmente libre de otras proteínas y componentes biológicos. Por ejemplo, un polipéptido purificado a menudo estará lo suficientemente libre de otros componentes peptídicos para que la secuenciación degradativa se pueda llevar a cabo con éxito.

La presente invención se refiere particularmente a derivados de péptidos ricos en prolina como se define en las reivindicaciones tales como péptidos aislados de al menos cuatro o más restos de longitud, que incluyen hasta aquellos péptidos y que incluyen aproximadamente 50 o más aminoácidos, que comprenden las secuencias de

aminoácidos derivados de la fórmula general S1. Preferentemente, estos péptidos inhiben la asociación de RA al dominio Src-SH3 y son activos en el tratamiento de tumores y cánceres de próstata y de mama en un animal afectado, tal como un ser humano. La utilización de péptidos pequeños en terapias se prefiere por varias razones. Estos incluyen el bajo coste y la facilidad de preparación a gran escala, y la fiabilidad del producto. También son preferibles sus propiedades biológicas, tales como la facilidad con que los péptidos pueden penetrar en los tejidos, su baja inmunogenicidad, el hecho de que presentan una diana menor para las proteasas, proporcionando así una biodisponibilidad más larga y, además, se contempla que funcionarán eficazmente en la prevención de la interacción RA-Src y el funcionamiento como agentes terapéuticos antiandrógenos.

Sin embargo, aunque se prefiere para su uso en ciertas realizaciones, no existe un requisito general de que los péptidos aglutinantes SH3 ricos en prolina siempre se proporcionen en su estado más purificado. En este aspecto, cualquier procedimiento de purificación bien conocido por los expertos en la materia se puede emplear siempre que se alcance el nivel suficiente de pureza del péptido.

Se pueden modificar péptidos sintéticos por ejemplo, mediante el empleo de uno o más D-aminoácido(s) en lugar de L-aminoácido(s), mediante la adición de grupos a los extremos N o C, tales como acilación o aminación o mediante la encapsulación de péptidos dentro de lípidos, nanocápsulas, complejos lipídicos y/o liposomas o en un recubrimiento biocompatible diseñado para liberación lenta. La presente invención contempla vacunas para su uso en inmunización activa y pasiva. Estas vacunas se pueden preparar más fácilmente a partir de péptidos inmunogénicos preparados de una manera desvelada en el presente documento.

Segmentos de ácidos nucleicos

La presente invención también se refiere a segmentos de ADN, como se definen en las reivindicaciones, que se pueden aislar a partir de prácticamente cualquier fuente, que están libres de ADN genómico total y que codifican la totalidad o una porción de los nuevos péptidos desvelados en el presente documento. Los polinucleótidos que codifican la nueva especie peptídica pueden sintetizarse completamente *in vitro* utilizando procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Incluidos dentro de la expresión "segmento de ADN", se encuentran segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus y similares.

De forma similar, un segmento de ADN que comprende un gen que codifica un péptido antiandrógeno aislado o purificado como se define en las reivindicaciones se refiere a un segmento de ADN que puede incluir además de secuencias codificantes de péptidos, ciertos otros elementos tales como, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente lejos de otros genes que se producen de manera natural o secuencias que codifican proteínas. A este respecto, el término "gen" se utiliza por simplicidad para referirse a una unidad funcional que codifica proteínas, polipéptidos o péptidos. Como entenderán los expertos en la materia, este término funcional incluye no solo secuencias genómicas, que incluyen secuencias de ADN cromosómicas adicionales, sino también secuencias de operones y/o segmentos de genes diseñados por ingeniería genética que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos o péptidos

"Aislado sustancialmente lejos de otras secuencias codificantes" significa que el gen de interés, en este caso, un gen del polipéptido antiandrógeno, forma la parte significativa de la región de codificación del segmento de ADN, y que el segmento de ADN no contiene grandes porciones de ADN codificante de origen natural, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de operones. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN como se aisló originariamente, y no excluye genes, genes recombinantes, enlazadores sintéticos o regiones codificantes que luego se añaden al segmento mediante la mano del hombre.

En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican una especie de péptido antiestrógeno que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en la fórmula general S1 o en los ejemplos de polipéptidos de SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6, como se define en las reivindicaciones. Más preferentemente, la secuencia de ADN comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una especie de péptido antiandrógeno que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de al menos diez aminoácidos contigua a las expuestas en la fórmula general S1 o en los péptidos de SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6, como se define en las reivindicaciones.

La expresión "una secuencia esencialmente como se expone en la fórmula general S1 o en los ejemplos de polipéptidos de SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6" significa que la secuencia corresponde sustancialmente a una porción de la secuencia de la fórmula general S1 o en los ejemplos de polipéptidos de SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6 y tiene relativamente pocos aminoácidos que no son idénticos a, o un equivalente biológicamente funcional de, los aminoácidos de cualquiera de estas secuencias. La expresión "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la materia y se define adicionalmente en detalle en el presente documento. Por consiguiente, las secuencias que tienen entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 81 % y aproximadamente 90 %, o entre aproximadamente 91 % y aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos o equivalencia funcional a los aminoácidos de una cualquiera de las SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6.

Por consiguiente, las secuencias que tienen entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 81 % y aproximadamente 90 %, o entre aproximadamente 91 % y aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos o equivalencia funcional a los aminoácidos de una cualquiera de las SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6, serán secuencias que son "esencialmente como se exponen en una cualquiera de las SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias 5' o 3', y todavía ser esencialmente como se expone en una de las secuencias desveladas en el presente documento, siempre que la secuencia cumpla los criterios expuestos anteriormente, que incluyen el mantenimiento de la actividad biológica antiandrógena en lo que respecta a la expresión de péptidos. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean a cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que ocurren dentro de los genes.

Los segmentos de ácidos nucleicos de la presente invención, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, tales que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, siendo preferentemente limitada con la longitud total por la facilidad de preparación y utilización en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de ácidos nucleicos que incluyen un tramo corto contiguo que codifica la totalidad de la secuencia peptídica desvelada en la SEQ. ID. NO: 1 y/o la SEQ. ID. NO: 2 o que son idénticos o complementarios a las secuencias de ADN que codifican cualquiera de los péptidos desvelados en la SEQ. ID NO: 1 y la SEQ. ID NO: 2. Por ejemplo, las secuencias de ADN tales como de aproximadamente 30 nucleótidos, y que son de hasta aproximadamente 10.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 y aproximadamente 30 pares de bases de longitud (que incluyen todas las longitudes intermedias) también se consideran útiles.

Por lo tanto, los vectores recombinantes y los segmentos de ADN aislados pueden incluir diversas regiones codificantes de péptidos, regiones codificantes que llevan alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región codificante básica, o pueden codificar polipéptidos más grandes que, no obstante, incluyen estas regiones codificantes de péptidos o pueden codificar proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales que tienen secuencias de aminoácidos variantes.

En el presente documento se desvelan, pero no se reivindican, péptidos equivalentes biológicamente funcionales. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia de codones y la equivalencia funcional que se sabe que se producen de manera natural en las secuencias de ácidos nucleicos y las proteínas así codificadas. Alternativamente, se pueden crear proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que los cambios en la estructura de la proteína se pueden diseñar por ingeniería genética, basándose en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios diseñados por el hombre pueden introducirse a través de la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína o para probar mutantes con el fin de examinar la actividad a nivel molecular.

Si se desea, también se pueden preparar proteínas y péptidos de fusión, por ejemplo, en los que las regiones codificantes de péptidos se alinean dentro de la misma unidad de expresión con otras proteínas o péptidos que tienen funciones deseadas, tales como para fines de purificación o inmunodetección.

Los vectores recombinantes forman otros aspectos de la presente invención. Se consideran vectores particularmente útiles aquellos vectores en los que la porción de codificación del segmento de ADN, como se define en las reivindicaciones, se coloca bajo el control de un promotor. El promotor puede estar en la forma del promotor que está asociado de manera natural con un gen que codifica péptidos de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, tal como se puede obtener mediante el aislamiento de las secuencias 5' no codificantes situadas cadena arriba del segmento codificante o exón.

Segmentos de ADN como cebadores y sondas de hibridación

Además de su uso para dirigir la expresión de los péptidos de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, las secuencias de ácidos nucleicos contempladas en el presente documento también tienen una variedad de otros usos.

Por ejemplo, también tienen utilidad como sondas o cebadores en realizaciones de hibridación de ácidos nucleicos. La capacidad de dichas sondas de ácidos nucleicos para hibridarse específicamente con secuencias codificantes de péptidos antiandrógenos les permitirá utilizarse para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Sin embargo, se prevén otros usos, que incluyen la utilización de la información de las secuencias

para la preparación de cebadores de especies mutantes, o de cebadores para su uso en la preparación de otras construcciones genéticas.

Se contemplan particularmente moléculas de ácidos nucleicos que tienen regiones de secuencias que consisten en tramos de nucleótidos contiguos de 10-14, 15-20, 30, 50 o incluso de 100-200 nucleótidos o más, idénticos o complementarios a las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos desvelados como sondas de hibridación para su uso en, por ejemplo, transferencias de Southern y Northern. Generalmente, fragmentos más pequeños encontrarán uso en realizaciones de hibridación, en las que puede variarse la longitud de la región complementaria contigua, tal como entre aproximadamente 10-14 y aproximadamente 100 o 200 nucleótidos, pero pueden utilizarse tramos complementarios contiguos más grandes, de acuerdo con la longitud de secuencias complementarias que se desean detectar.

La utilización de una sonda de hibridación de aproximadamente 14 nucleótidos de longitud permite la formación de una molécula doble que es a la vez estable y selectiva. Sin embargo, generalmente se prefieren moléculas que tienen secuencias complementarias contiguas de tramos mayores de 14 bases de longitud, con el fin de aumentar la estabilidad y la selectividad del híbrido y, de ese modo, mejorar la calidad y el grado de las moléculas híbridas específicas obtenidas. Generalmente, se preferirá diseñar moléculas de ácidos nucleicos que tengan tramos complementarios de genes de 15 a 20 nucleótidos contiguos, o incluso más largos cuando se desee.

En determinadas realizaciones, será ventajoso emplear secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, en combinación con un medio apropiado, tal como una etiqueta, para determinar la hibridación. En la materia se conoce una amplia variedad de medios indicadores apropiados, que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros, tales como avidina/biotina, que son capaces de proporcionar una señal detectable. En realizaciones preferidas, es probable que se desee emplear una etiqueta fluorescente o una etiqueta enzimática, tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radioactivos u otros medioambientalmente no deseables. En el caso de una etiqueta enzimática, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden emplear para proporcionar medios visibles para el ojo humano o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con muestras complementarias que contienen ácidos nucleicos.

En general, se prevé que las sondas de hibridación descritas en el presente documento serán útiles como reactivos en hibridación en solución así como en realizaciones que emplean una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, el ADN (o ARN) de prueba se adsorbe o se fija de otro modo a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico fijo, monocatenario, se somete luego a hibridación específica con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares en función de los criterios particulares requeridos (que dependen de, por ejemplo, el contenido G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.).

Expresión de polipéptidos y vectores recombinantes

La invención también desvela y reivindica composiciones que comprenden cualquiera de los péptidos antiandrógenos desvelados, como se define en las reivindicaciones. La composición puede estar comprendida dentro de una o más células hospedadoras que expresan un segmento de ácidos nucleicos que codifica un péptido antiandrógeno, células hospedadoras recombinantes que expresan los péptidos o proteínas de fusión que comprenden los péptidos, suspensiones celulares, extractos, cuerpos de inclusión o cultivos de tejidos o extractos de cultivos que contienen los péptidos antiandrógenos desvelados, sobrenadante de cultivo, células alteradas, extractos celulares, lisados, homogeneizados y similares. Las composiciones pueden estar en forma acuosa o, alternativamente, en seco, semihúmedas o formas similares tales como pasta celular, granulados celulares o, alternativamente, secas por congelación, en polvo, liofilizadas, evaporadas o preparadas de otra manera similar en forma seca. Tales medios para preparar péptidos antiandrógenos son bien conocidos por los expertos en la materia de aislamiento y purificación de proteínas. En determinadas realizaciones, los péptidos antiandrógenos pueden purificarse, concentrarse, mezclarse con otros reactivos, o procesarse hasta una forma final deseada. Preferentemente, la composición comprenderá del aproximadamente 1 % al aproximadamente 90 % en peso del péptido antiandrógeno, y más preferentemente del aproximadamente 5 % al aproximadamente 50 % en peso.

En una realización preferida, las composiciones de péptidos antiandrógenos de la invención, como se define en las reivindicaciones, pueden prepararse mediante un procedimiento que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora que expresa un péptido antiandrógeno en condiciones eficaces para producir dicho péptido, y luego obtener el péptido de la célula. La obtención de dicho péptido antiandrógeno puede incluir además purificar, concentrar, procesar y mezclar el polipéptido dentro de uno o más reactivos. Preferentemente, el péptido antiandrógeno se obtiene en una cantidad de entre aproximadamente el 1 % al aproximadamente 90 % en peso, y más preferentemente del aproximadamente 5 % al aproximadamente 70 % en peso, e incluso más preferentemente del aproximadamente 10 % al aproximadamente 20 % al aproximadamente 30 %, o incluso hasta aproximadamente el 40 % o 50 % en peso.

En el presente documento se desvela, pero no se reivindica, un procedimiento para preparar una composición de péptido antiandrógeno. Dicho procedimiento generalmente implica las etapas de cultivar una célula hospedadora,

que expresa un péptido antiandrógeno en condiciones eficaces para producir el péptido y, luego, obtener el polipéptido así producido.

5 Los vectores plasmídicos recombinantes de la invención, como se define en las reivindicaciones, pueden utilizarse para transformar otras células bacterianas o eucariotas adecuadas para producir los polipéptidos antiandrógenos de la invención.

10 Las células hospedadoras eucariotas que incluyen NIH3T3, COS7 y CAO3, así como las células de levadura se consideran particularmente útiles en la preparación de las especies de péptidos. Asimismo, las células hospedadoras procariontes que incluyen células Gram-negativas tales como *E. coli*, *Pseudomonas spp.* y las Enterobacteraceae relacionadas y similares se consideran útiles en la preparación de los péptidos antiandrógenos de la invención, como se define en las reivindicaciones.

15 Se obtendrán ciertas ventajas posicionando el segmento de ADN codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo. Como se usa en el presente documento, un promotor recombinante o heterólogo pretende referirse a un promotor que normalmente no está asociado con un segmento de ADN que codifica un péptido antiandrógeno en su entorno natural. Tales promotores pueden incluir promotores normalmente asociados con otros genes y/o promotores aislados de cualquier célula bacteriana, viral o eucariota. Las células eucariotas preferidas son células animales, siendo las más preferidas las células de mamífero, particularmente las células humanas. Naturalmente, será importante emplear un promotor que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula, tejido, organismo, animal o célula hospedadora recombinante elegida para la expresión. La utilización de combinaciones de tipo promotor y célula para la expresión de proteínas es generalmente conocido por los expertos en la materia de la biología molecular, por ejemplo, véase Sambrook y col., 1989. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, o inducibles, y se pueden utilizar en las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

Kits terapéuticos y de diagnóstico

25 Los kits terapéuticos de la presente invención son kits que comprenden la proteína, péptido, inhibidor, gen, vector u otro efector de proteína de unión a péptido que contiene el péptido rico en prolina reivindicado. Dichos kits generalmente contendrán, en medios contenedores adecuados, una formulación farmacéuticamente aceptable de proteína, péptido, inhibidor, gen, vector u otro efector o vector de proteína de unión a péptido que contiene el péptido rico en prolina desvelado, expresando cualquiera de los anteriores en una formulación farmacéuticamente aceptable, que comprende opcionalmente otros agentes anticancerosos. El kit puede tener un medio contenedor individual, o puede tener un medio contenedor distinto para cada compuesto.

30 Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo particularmente preferida una solución acuosa estéril. Las composiciones mencionadas anteriormente también pueden formularse en una composición que se puede inyectar. En cuyo caso, el medio contenedor puede ser una jeringa, una pipeta u otro aparato similar, a partir del cual la formulación puede aplicarse a un área infectada del cuerpo, inyectarse en un animal o incluso aplicarse y mezclarse con los otros componentes del kit.

40 Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando se proporcionan reactivos o componentes como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otro medio contenedor. Cuando se proporciona un segundo agente terapéutico anticanceroso, el kit generalmente contendrá un segundo recipiente. Los kits también pueden comprender otros recipientes para un diluyente aceptable.

Procedimientos de liberación de ácidos nucleicos y transfección de ADN

45 En determinadas realizaciones, se contempla que los segmentos de ácidos nucleicos desvelados en el presente documento se utilizarán para transfectar células hospedadoras apropiadas, como se define en las reivindicaciones. La tecnología para la introducción de ADN en las células es bien conocida por los expertos en la materia. Se pueden considerar cuatro procedimientos generales para liberar un segmento nucleico en las células:

- (1) procedimientos químicos (Graham y VanDerEb, 1973);
- 50 (2) procedimientos físicos tales como microinyección (Capecchi, 1980), electroporación (Wong y Neumann, 1982; Fromm y col., 1985) y la pistola de genes (Yang y col., 1990);
- (3) vectores virales (Clapp, 1993; Eglitis y col., 1988; Eglitis y Anderson, 1988); y
- (4) mecanismos mediados por receptores (Curiel y col., 1991; Wagner y col., 1992).

Liposomas y nanocápsulas

55 En determinadas realizaciones, el inventor contempla la utilización de liposomas y/o nanocápsulas para la introducción de composiciones peptídicas, como se define en las reivindicaciones, en células hospedadoras. Dichas formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los

polipéptidos, productos farmacéuticos y/o anticuerpos desvelados en el presente documento. La formación y la utilización de liposomas es generalmente conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Couvreur y col., 1977, que describe la utilización de liposomas y nanocápsulas en la terapia antibiótica dirigida de infecciones y enfermedades bacterianas intracelulares). Más recientemente, los liposomas se desarrollaron con una estabilidad del suero y un tiempo de circulación mejorados (Gabizon y Papahadjopoulos, 1988; Allen y Choun, 1987).

Los dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

FIGURA 1A. Inhibición de la síntesis de ADN de células de cáncer de próstata humano mediante el péptido aglutinante Src-SH3 modelado a partir de RA (SEQ. ID NO.1). Se cultivaron células LNCaP que proceden del cáncer de próstata humano en medio sin rojo fenol añadido con suero tratado con carbón como se describió anteriormente (Migliaccio y col., 2000) y se trataron durante 24 horas con andrógeno sintético R1881 10 nM solo o en presencia de un exceso de 1000 veces de Casodex antiandrógeno o del péptido aglutinante SH3 (SH3, SEQ. ID. NO.1) 1 nM o del péptido Ss (secuencia mezclada: SEQ. ID. NO.7) 1 nM. Al final del tratamiento hormonal se ensayó la incorporación de BrdU en células no tratadas (control) o tratadas con R1881 solo (R1881) o en presencia de casodex (Cdx) o del péptido aglutinante SH3 (SH3, SEQ. ID NO.1) o de la secuencia de péptidos mezclada SEQ. ID NO.1 (Ss, SEQ. ID NO.7) como se informó (Castoria y col., 1999). Los datos se presentan como el porcentaje de células que incorporan BrdU, promediadas a partir de 6 experimentos.

FIGURA 1B. Inhibición de la síntesis de ADN de células de cáncer de mama humano estimulado por estradiol mediante péptidos aglutinantes SH3 derivados de RA (SEQ. ID NO.1). Las células MCF-7 procedentes de cáncer de mama humano se mantuvieron durante 3 días en medio sin rojo fenol que contenía suero tratado con carbón como se describió previamente y se trataron durante 24 horas con 17β estradiol 10 nM solo o en presencia de un exceso de 1000 veces del antiestrógeno ICI 182.780 o de 1 nM del péptido aglutinante SH3 SEQ. ID. NO. 1 o de la secuencia mezclada (Ss, SEQ. ID NO.7) del péptido de SEQ. ID NO.1. Al final del tratamiento hormonal se ensayó la incorporación de BrdU en las células no tratadas (control) o tratadas con estradiol solo (E2) o en presencia de ICI 182.780 (ICI) o del péptido derivado de RA (SH3) o de Ss. Los datos se informan como el porcentaje de células que incorporan BrdU, promediadas a partir de 6 experimentos.

FIGURA 1C. Inhibición de la síntesis de ADN de células de cáncer de próstata humano estimulado por EGF mediante péptidos aglutinantes SH3 modelados a partir de RA (SEQ. ID NO.1). Se cultivaron células LNCaP en medio sin rojo fenol añadido con suero tratado con carbón como se describió previamente y se trataron durante 24 horas con 100 ng/ml de EGF solo o en presencia de 10 μ M del antiestrógeno ICI 182.780 o con 1 nM del péptido derivado de RA (SH3-aglutinante) (SEQ. ID NO.1) o con la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7). Al final del tratamiento del factor de crecimiento se ensayó la incorporación de BrdU en las células no tratadas (control) o tratadas con EGF solo (EGF) o en presencia de ICI 182.780 (ICI) o del SH3-aglutinante (SH3) o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss). Los datos se informan como el porcentaje de células que incorporan BrdU.

FIGURA 1D. Inhibición de la síntesis de ADN de células de cáncer de mama humano estimulado por EGF mediante péptidos aglutinantes SH3 modelados a partir de RA (SEQ. ID NO.1). Se cultivaron células MCF-7 en medio sin rojo fenol añadido con suero tratado con carbón como se describió previamente y se trataron durante 24 horas con 100 ng/ml de EGF solo o en presencia de 10 μ M del antiestrógeno ICI 182.780 o de 1 nM del péptido derivado de RA (SH3-aglutinante) o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID. NO.7). Al final del tratamiento del factor de crecimiento, se ensayó la incorporación de BrdU en las células no tratadas (control) o tratadas con EGF solo (EGF) o en presencia de ICI 182.780 (ICI) o del SH3-aglutinante (SH3) o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss). Los datos se informan como el porcentaje de células que incorporan BrdU.

FIGURA 2A. Inhibición de la asociación de RA estimulada por andrógenos con Src mediante el péptido derivado de RA (aglutinante Src-SH3) (SEQ. ID NO.1). Células LNCaP de cáncer de próstata humano se dejaron sin estimular o estimularon durante 2 min con R1881 10 nM solo o en presencia de un exceso de 1000 veces de Casodex o de 1 nM del péptido aglutinante SH3 o de la secuencia mezclada de péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7). Se incubaron los lisados celulares con anticuerpos anti-Src, y se resolvieron las proteínas inmunoprecipitadas en SDS-PAGE y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Los filtros fueron luego borrados con anticuerpos antiSrc o antiRA humanos para detectar RA asociados con Src. Se revelaron los inmunocomplejos utilizando el kit de detección de ECL. Carril 1: células no estimuladas; Carril 2: células tratadas con R1881; Carril 3: células tratadas con R1881 en presencia de Casodex (Cdx); Carril 4: células tratadas con R1881 en presencia del péptido aglutinante SH3 (SH3, SEQ. ID NO.1); Carril 5: células tratadas con R1881 en presencia de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss, SEQ. ID NO.7).

FIGURA 2B. Inhibición de la asociación de RA estimulada por estrógenos con Src mediante el péptido aglutinante Src-SH3 derivado de RA (SEQ. ID NO.1). Células MCF-7 de cáncer de mama humano se dejaron sin estimular o se estimularon durante 2 min con 17β estradiol 10 nM solo o en presencia de un exceso de 1000 veces de ICI 182.780 o de 1 nM del péptido aglutinante SH3 o de la secuencia mezclada de péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7). Se

incubaron los lisados celulares con anticuerpos anti-Src, se resolvieron las proteínas inmunoprecipitadas en SDS-PAGE y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Los filtros fueron luego borrados con anticuerpos antiSrc o antiRA humanos para detectar RA asociados con Src. Se revelaron los inmunocomplejos utilizando el kit de detección de ECL. Carril 1: células no estimuladas; Carril 2: células tratadas con estradiol (E2); Carril 3: células tratadas con E2 en presencia ICI 182.780 (ICI); Carril 4: células tratadas con E2 en presencia del péptido aglutinante SH3 (SH3); Carril 5: células tratadas con estradiol en presencia de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss)

FIGURA 3A. Inhibición de la expresión de ciclina D1 inducida por andrógenos mediante el péptido aglutinante Src-SH3 derivado de RA (SEQ. ID NO.1). Las células MCF-7 y LNCaP en reposo se dejaron sin tratar o se trataron durante 8 horas con R1881 10 nM solo o en presencia del inhibidor LY 294.002 de PI3-quinasa 5 μ M o del aglutinante SH3 derivado de RA o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID. NO.7) 1 nM. Se resolvió la proteína de los lisados celulares en SDS-PAGE, luego se transfirió a filtros de nitrocelulosa. La ciclina D1 endógena se reveló utilizando anticuerpos apropiados. Carril 1: células no estimuladas; Carril 2: células tratadas con R1881; Carril 3: células tratadas con R1881 en presencia LY 294.002 (LY); Carril 4: células tratadas con R1881 en presencia del péptido (aglutinante SH3) derivado de RA (SH3); Carril 5: células tratadas con R1881 en presencia de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss). FIGURA 3B. Inhibición de la expresión de ciclina D1 inducida por estrógenos mediante el péptido aglutinante SH3 derivado de RA (SEQ. ID NO.1). Las células MCF-7 y LNCaP en reposo se dejaron sin tratar o se trataron durante 8 horas con 17 β estradiol 10 nM solo o en presencia del inhibidor LY 294.002 de PI3-quinasa 5 μ M o de 1 nM del aglutinante SH3 o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7). Se resolvió la proteína de los lisados celulares en SDS-PAGE, luego se transfirió a filtros de nitrocelulosa. La ciclina D1 endógena se reveló utilizando anticuerpos apropiados. Carril 1: células no estimuladas; Carril 2: células tratadas con estradiol; Carril 3: células tratadas con estradiol en presencias de LY 294.002 (LY); Carril 4: células tratadas con estradiol en presencia del péptido aglutinante SH3 (SH3); Carril 5: células tratadas con estradiol en presencia de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss).

FIGURA 4A. Inefectividad del péptido derivado de RA (aglutinante SH3) (SEQ. ID. NO.1) en la transcripción de genes regulados por el receptor de andrógenos en el cáncer de próstata (células LNCaP). Se transfectaron células LNCaP con un gen indicador que codifica el gen de luciferasa bajo el control de un elemento sensible a andrógenos (ARE 3416) (Castoria y col., 2003). Seis horas después de la transfección, se mantuvieron las células durante 24 horas más en ausencia o en presencia de R1881 10 nM solo o con un exceso de 1000 veces de Casodex o con el péptido aglutinante SH3 1 nM (SEQ. ID NO.1) o la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 1 nM (SEQ. ID. NO.7). Luego se ensayó la actividad luciferasa en lisados celulares. Barra 1: células no estimuladas; Barra 2: células tratadas con R1881; Barra 3: células tratadas con R1881 en presencia de Casodex (Cdx); Barra 4: células tratadas con R1881 en presencia del péptido aglutinante SH3 (SH3); Barra 5: células tratadas con R1881 en presencia de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss).

FIGURA 4B. Inefectividad del péptido derivado de RA (aglutinante SH3) (SEQ. ID. NO.1) en la transcripción de genes regulados por el receptor de estrógenos en el cáncer de mama (células MCF-7). Se transfectaron células MCF-7 con un gen indicador que codifica el gen de luciferasa bajo el control de un elemento sensible a estrógenos (vt-tk-LUC) (Castoria y col., 2003). Seis horas después de la transfección, se mantuvieron las células durante 24 horas más en ausencia o en presencia de 17 β estradiol (E2) 10 nM solo o con un exceso de 1000 veces de ICI 182.780 o con el péptido aglutinante SH3 1 nM (SEQ. ID NO.1) o la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 1 nM (SEQ. ID. NO.7). Luego se ensayó la actividad luciferasa en lisados celulares. Barra 1: células no estimuladas; Barra 2: células tratadas con E2; Barra 3: células tratadas con E2 en presencia ICI 182.780 (ICI); Barra 4: células tratadas con E2 en presencia del péptido aglutinante SH3 (SH3); Barra 5: células tratadas con E2 en presencia de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss).

FIGURA 5A Efecto del péptido aglutinante SH3 en células de cáncer de próstata humano *in vivo*. Se cultivaron células de cáncer de próstata LNCaP por vía subcutánea en ratones machos desnudos. Después de que el tumor alcanzara el tamaño de 200-400 mm³, se trataron los ratones con una inyección intraperitoneal de 200 μ l de solución de control (control) (círculos) o la misma solución que contenía 2 μ M del péptido aglutinante SH3 (SH3) de SEQ. ID NO.1 (cuadrados). El tratamiento comenzó al comienzo de la semana 0 y se administraron los péptidos en días alternos durante 4 semanas, utilizando 5 animales por grupo.

FIGURA 5B Efecto del péptido aglutinante SH3 en células de cáncer de mama humano *in vivo*. Se cultivaron células de cáncer de mama humano MCF-7 por vía subcutánea en ratones machos desnudos. Cuando los tumores tenían un tamaño de aproximadamente 1000 mm³, se trataron los ratones con una inyección intraperitoneal de 200 μ l de solución de control (control, círculos) o 200 μ l de la misma solución que contenía 2 μ M del péptido aglutinante SH3 de SEQ. ID NO.1 (SH3, cuadrados). El tratamiento comenzó al comienzo de la semana 0 y se administraron los péptidos en días alternos durante 5 semanas, utilizando 5 animales por grupo

FIGURA 6A. Efecto del péptido aglutinante SH3 sobre la expresión del antígeno Ki-67 y la apoptosis en células de cáncer de próstata humano. Los xenoinjertos de células LNCaP en ratones desnudos macho son los mismos que los utilizados en el experimento presentado en la figura 5A. Al final del tratamiento, se analizaron las muestras tumorales para determinar la expresión del antígeno Ki-67 y la apoptosis. El panel izquierdo muestra la expresión del antígeno Ki-67 como el porcentaje de células positivas para Ki-67 en ratones no tratados (control) y tratados con el péptido de SEQ. ID NO.1 (SH3). El panel derecho muestra las células positivas para el ensayo TUNEL observadas en campos

representativos.

5 FIGURA 6B. Efecto del péptido aglutinante SH3 sobre la expresión del antígeno Ki-67 y la apoptosis en células de cáncer de mama humano. Los xenoinjertos de células MCF-7 en ratones desnudos macho son los mismos que los utilizados en el experimento presentado en la figura 5B. Al final del tratamiento se analizaron las muestras tumorales para determinar la expresión del antígeno Ki-67 y la apoptosis. El panel izquierdo muestra la expresión del antígeno Ki-67 como el porcentaje de células positivas para Ki-67 en ratones no tratados (control) y tratados con el péptido de SEQ. ID NO.1 (SH3). El panel derecho muestra las células positivas para el ensayo TUNEL observadas en campos representativos.

Ejemplos

10 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplo 1: preparación del péptido aglutinante Src-SH3 derivado de RA (SEQ. ID NO.1) mediante síntesis química.

15 Se pueden preparar convenientemente de manera manual los péptidos 1 a 4 mediante la aplicación del procedimiento de fase sólida (Bodansky M y Bodansky A, 1995) y la química Fmoc/tBu (Fmoc: 9-fluorenil-metoxicarbonilo) que se describe ampliamente en la literatura científica (Carpino y Han, 1972; Fields y Noble, 1990) y es bien conocido por los expertos en la materia. Para agilizar y facilitar la preparación, pueden utilizarse sintetizadores de péptidos múltiples automáticos. También se puede utilizar convenientemente cualquier tipo de procedimiento químico o sintetizador mecánico con canales únicos o múltiples para llevar a cabo la síntesis, sin afectar a las propiedades biológicas de los compuestos finales.

20 La síntesis del péptido se realiza en una escala de 50 μ moles utilizando una resina derivatizada adecuadamente con un enlazador RINK capaz de proporcionar péptidos amida C-terminales (Rink, 1987). Una de tales resinas es el producto 4-(2',4'-dimetoxil) henil-Fmoc-aminometil)-fenoxi resina, malla de 100-200; copoliéstereno Di-vinilbenceno al 1 %, sustitución 0,50 mmol/g (catálogo de Novabiochem n.º 01-64-5026), también conocida como resina RINK AMIDE para los expertos en la materia. Se utiliza una cantidad de 100 mg de resina. La resina se coloca en un recipiente de reacción de polipropileno de 5 ml (RR) dotado de un septo de filtración en la parte inferior (catálogo de Shimadzu Corp., n.º 292-05250-02). En un protocolo típico, la resina se hincha durante 10 minutos bajo agitación y luego se enjuaga varias veces (al menos 4) con 1,0 ml de N,N-dimetilformamida seca (DMF, grado de síntesis peptídica, catálogo de LabScan, n.º H6533) mediante la eliminación del disolvente del fondo aplicando un ligero vacío. La resina se trata a continuación con 1,0 ml de una solución al 20 % v/v de piperidina (catálogo de BIOSOLVE LTD, n.º 16183301) en DMF durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación para eliminar el grupo Fmoc inicial y se lava varias veces (al menos 4) con 1,0 ml de DMF seca durante 2 minutos para eliminar el exceso de reactivo.

Luego, los siguientes 6 pasos se llevan a cabo posteriormente:

35 1. Se disuelven 250 μ moles (117 mg) de Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (catálogo de Novabiochem, 04-12-1026) en 500 μ l de DMF seca

2. El aminoácido protegido se preactiva con 400 μ l de solución A y 400 μ l de solución B durante 4 minutos bajo agitación a temperatura ambiente, en el que:

La solución A contiene:

40 tetrafluoroborato de 2-(1H-Benzotriazol-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio 0,5 M (TBTU, > 99 %, catálogo de Chem-Impex Intl, n.º 02056) y 0,5 M de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt, catálogo de SIGMA-ALDRICH, n.º H2006) en DMF.

La solución B contiene:

Di-isopropil-etilamina 1 M (DIEA, catálogo de SIGMA-ALDRICH, n.º D-3887) en DMF.

3. Se transfiere la solución en la resina y se agita durante 30 minutos.

45 4. Se elimina el reactivo al vacío y se lava la resina 4 veces con 1,0 ml de DMF seca.

5. Se trata de nuevo la resina con 1,0 ml de piperidina al 20 % v/v en DMF durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación para eliminar el Fmoc N-terminal.

6. Se lava la resina 3 veces con 1,0 ml de DMF.

50 A continuación, se repiten los pasos 1 a 6, cambiando en el paso 1 el correspondiente aminoácido protegido solicitado en la secuencia. Los derivados protegidos utilizados se informan en la siguiente Tabla II.

Tabla II. Aminoácidos protegidos comunes utilizados para la síntesis química del péptido de SEQ. ID NO.1 y cantidades requeridas.

AA	Derivado protegido.	Cantidad	Código
Ile	Fmoc-L-Ile-OH	88 mg (250 µmol)	catálogo de Novabiochem, 04-12-1024
Arg	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	161 mg (250 µmol)	catálogo de Novabiochem, 04-12-1145
Ala	Fmoc-L-Ala-OH	78 mg (250 µmol)	catálogo de Novabiochem, 04-12-1006
His	Fmoc-L-His(Trt)-OH	155 mg (250 µmol)	catálogo de Novabiochem, 04-12-1065
Pro	Fmoc-L-Pro-OH	84 mg (250 µmol)	catálogo de Novabiochem, 04-12-1031
Lys	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	117 mg (250 µmol)	catálogo de Novabiochem, 04-12-0069

Fmoc-L-Lys (Boc) -OH indica el derivado de lisina protegido: N-α-Fmoc-N-ε-t-Boc-L-lisina y el símbolo "t-Boc", indica el grupo protector t-butiloxycarbonilo; Fmoc-L-Ile-OH indica el derivado de isoleucina protegido: N-α-Fmoc-L-isoleucina; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH indica el derivado de arginina protegido: N-α-Fmoc-N^G-22,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonil-L-arginina; Fmoc-L-Ala-OH indica el derivado de alanina protegido: N-α-Fmoc-L-alanina; Fmoc-L-His(Trt)-OH indica el derivado de histidina protegido: N-α-Fmoc-N-im-tritil-L-histidina y el símbolo "trityl", indica el grupo protector t-fenilmetil; Fmoc-L-Pro-OH indica el derivado de prolina protegido: N-α-Fmoc-L-prolina.

- 5 Después de la eliminación del último grupo Fmoc, se acetila la resina mediante tratamiento con una solución 1,0 M en DMF seca de anhídrido acético (catálogo de Fluka, 45830), que contiene DIEA 1,0 M durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después de un enjuague extenso con DMF, se somete la resina a los siguientes lavados:

Disolvente	N.º de lavados	Volumen (ml)
DMF	3	4,0
MeOH*	3	4,0
Et ₂ O **	3	4,0

* Metanol (MeOH, catálogo de LabScan, n.º A3513), ** Etil Eter (Et₂O, catálogo de LabScan, n.º A3509E).

Se seca la resina aplicando una corriente de Nitrógeno y luego se pesa. El peso final de la resina es 280,0 mg.

- 10 Nuevamente, se preparan y se añaden a la resina 3,0 ml de una mezcla de TFA-H₂O-TIS (100:5:5, v/v/v) (TIS, triisopropilsilano, catálogo de SIGMA-ALDRICH n.º 23,378-1). Después de agitar durante 3 horas, se filtra la resina y se recoge la solución ácida directamente en un tubo de polipropileno de 15 ml que contiene 15 ml de Et₂O frío. Se separa el precipitado blanco por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y se descartan los disolventes orgánicos. Se lava el precipitado una vez con 5,0 ml de Et₂O frío y después de centrifugar se disuelve en 2,0 ml de H₂O desionizada y se liofiliza. El sólido blanco se pondera: 102 mg.
- 15

- El péptido liofilizado se puede purificar convenientemente mediante cromatografía de fase inversa utilizando sistemas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo, el sistema LC-8 proporcionado por Shimadzu Corp., equipado con columnas C18 de fase inversa preparativas disponibles en el mercado, tales como las columnas ID C18 Jupiter de 25x2,1 cm (catálogo Phenomenex n.º 00G-4053-P0) proporcionadas por Phenomenex. Los gradientes típicos para la purificación de péptidos hacen uso de disolventes tales como H₂O desionizada, ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA, catálogo de Sigma-Aldrich, n.º 91700) y acetonitrilo (CH₃CN, catálogo de LabScan, n.º C2503), TFA al 0,1 % y son de una concentración típica de CH₃CN al 5 %, de TFA del 0,1 % al 60 % durante 35 minutos con un caudal de operación típico de 20 ml/min. Estos procedimientos son muy conocidos por los expertos en la materia y proporcionarán péptidos purificados con niveles de pureza de hasta 95-99 % según se determina mediante análisis de HPLC analítica en columnas RP18 comercialmente analíticas, tales como la columna ID RP-18 Phenomenex Jupiter, de 250x4,6 mm (catálogo de
- 20
- 25

Phenomenex n.º 00G-4053-E0). Los gradientes son desde CH₃CN al 5 %, TFA del 0,1 % hasta 60 % durante 35 minutos, con un flujo típico de 1,0 ml/min. La monitorización se logra típicamente mediante la utilización de un detector UV-vis implementado en los sistemas de HPLC y ajustado a una longitud de onda típica de 214 nm.

5 El péptido final se caracteriza convenientemente por procedimientos de espectrometría de masas, tales como MALDI-TOF y ESI-MS. En un ejemplo típico, el peso molecular experimental (PM) determinado con un espectrómetro de masas ESI-MS es de 1189,5 unidades de masa atómica (uma), de acuerdo con el valor teórico de 1189,68 uma (especies monoisotópicas).

Ejemplo 2: efecto antitumoral "in vitro" del péptido de SEQ. ID NO.1 aglutinante Src-SH3 derivado de RA

10 Se ha demostrado que el tratamiento de LNCaP del cáncer de próstata humano con andrógeno sintético R1881 10 nM estimula fuertemente la síntesis de ADN. Por lo tanto, se cultivan rutinariamente células LNCaP en CO₂ al 5 % en aire en medio RPMI 1640 (GIBCO) complementado con rojo fenol, L-glutamina 2 mM (GIBCO), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 µl/ml), insulina (Humulin 10,2 U.I./ml, Roche) y suero de ternera fetal al 10 %. Se siembran las células en cubreobjetos prerrecubiertos con gelatina a aproximadamente el 40 % de confluencia y se mantienen en RPMI-1640 sin rojo fenol que contiene insulina y suero de ternera despojado de carbón para asegurar una contaminación esteroide mínima o nula (Shi y col., 1994) durante 3 días. Después, se tratan las células LNCaP durante 24 horas con 10 nM del andrógeno sintético R1881 (Astra-Zeneca) solo o en presencia de un exceso molar de 1000 veces de Casodex antiandrógeno (Astra-Zeneca) o con los péptidos indicados.

20 Los resultados presentados en la figura 1A, promediados a partir de seis ensayos diferentes, muestran que el andrógeno aumenta de 20 a 54 % la tasa de incorporación de BrdU. La incorporación estimulada por la hormona se reduce fuertemente (25 % de la incorporación de BrdU residual) por el péptido aglutinante SH3 a una concentración de 1 nM (SH3). El efecto del péptido SH3 se comparó con el de Casodex antiandrógeno puro, que redujo en una extensión similar la síntesis de ADN (21 % de la incorporación residual de BrdU). También se utilizó un péptido sintético que corresponde a la secuencia mezclada de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7) (Ss). La adición de este péptido durante la estimulación androgénica de las células tiene solo un efecto inhibitor insignificante sobre la síntesis de ADN dependiente de hormonas (48 % de la incorporación de BrdU residual). Además de los péptidos mencionados anteriormente, se probaron péptidos de SEQ. ID NO.2-SEQ. ID NO.4. El efecto inhibitor no fue más fuerte que el del péptido de SEQ. ID NO.1.

30 El efecto del péptido de SEQ. ID NO.1 también se probó en la síntesis de ADN estimulada por estradiol de células MCF-7 de cáncer de mama humano. Se cultivaron rutinariamente células MCF-7 en CO₂ al 5 % en aire en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM,GIBCO) complementado con rojo fenol, L-glutamina 2 mM (GIBCO), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 µl/ml), hidrocortisona 3,75 ng/ml, insulina (Humulin 10,2 U.I./1, Roche) y suero de ternera fetal al 5 %. A continuación, se siembran las células en cubreobjetos prerrecubiertos con gelatina a aproximadamente el 40 % de confluencia y se mantienen en DMEM sin rojo fenol que contiene insulina y suero de ternera despojado de carbón durante 3 días. Después, se tratan las células MCF-7 durante 24 horas con 17β estradiol 10 nM (SIGMA, Mo) solo o en presencia de un exceso molar de 1000 veces del antiestrógeno ICI 182.780 (Astra-Zeneca) o con los péptidos indicados.

40 Los resultados presentados en la figura 1B, promediados a partir de seis ensayos diferentes, muestran que el estradiol (E₂) aumenta de 8 a 61 % la tasa de incorporación de BrdU. La incorporación estimulada por la hormona se reduce significativamente (23 % de la incorporación de BrdU residual) por el péptido aglutinante SH3 (SH3) a una concentración de 1 nM. El efecto del péptido SH3 es comparable con el del antiestrógeno puro ICI 182.780 que anuló la síntesis de ADN inducida por estrógenos (7 % de la incorporación residual de BrdU). La secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss) no tiene un efecto significativo sobre la síntesis de ADN inducida por estrógenos.

45 El péptido de SEQ. ID NO.1 finalmente se analiza en cuanto a su capacidad para reducir o inhibir la síntesis de ADN inducida por EGF en células LNCaP de cáncer de próstata humano (1C) y MCF-7 (1D). Se cultivan las células LNCaP y MCF-7 como se describió anteriormente, luego se siembran en cubreobjetos. Después, se estimulan las células con 100 ng/ml de EGF altamente purificado (Boehring, CA) en ausencia o en presencia del péptido de SEQ. ID NO.1 1 nM.

50 En la figura 1C, se puede observar que el EGF estimula la incorporación de BrdU del 8 al 21 %. La adición del péptido reduce a 5,8 % la incorporación de BrdU, similar al antiestrógeno puro, ICI 182.780 (7 % de incorporación residual). La secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss) tiene un pequeño efecto sobre la incorporación de BrdU (15 % de incorporación residual). En células MCF-7, como se muestra en la figura 1D, EGF también estimula la incorporación de BrdU (de 6 a 36 %); la adición del péptido reduce al 13 % la incorporación de BrdU, e ICI 182.780 al 9 % de la incorporación residual. Por el contrario, la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss) no reduce la incorporación de BrdU (48 % de la incorporación)

PROCEDIMIENTOS

La síntesis de ADN se ensaya en células individuales mediante un pulso de 6 h con BrdU (Boehring) 100 µM (concentración final). Se fijan las células en cubreobjetos y se incuban con mAbs anti-BrdU de ratón conjugados con

fluoresceína (1:1 en PBS) diluidos (clon BMC9318 de Boheringer Mannheim Co., IN), luego se lavan tres veces con PBS. Los anticuerpos de ratón se revelan utilizando anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados con rojo Texas diluidos (1:200 en PBS) (Calbiochem, CA). Todos los cubreobjetos se lavan tres veces en PBS, se invierten y se montan en Moviol (Calbiochem, CA) sobre portaobjetos de vidrio. Se analizan las diapositivas utilizando un microscopio de fluorescencia Axiophot (Zeiss).

Ejemplo 3: inhibición de la asociación de RA estimulada por andrógenos con Src mediante el péptido derivado de RA (aglutinante Src-SH3) (SEQ. ID NO.1)

Se ha demostrado que RA unidos a hormonas interactúan con el dominio SH3 de quinasa Src probablemente a través de un estiramiento con prolina (Migliaccio y col., 2000). Como consecuencia de esta interacción, se activan la quinasa y las rutas de señalización cadena abajo y, finalmente, se activa la síntesis de ADN. La utilización de secuencias peptídicas pequeñas que imitan el dominio de RA implicado en esta interacción debería ser capaz de inhibir por competencia la asociación RA-Src y bloquear la síntesis de ADN. Para probar esta hipótesis se cultivan rutinariamente células LNCaP en CO₂ al 5 % en aire en medio RPMI 1640 (GIBCO) complementado con rojo fenol, L-glutamina 2 mM (GIBCO), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 µl/ml), insulina (0,2 U.I./ml) y suero de ternera fetal al 10 %. Las células se mantienen en RPMI 1640 sin rojo fenol y se complementan con glutamina, penicilina, gentamicina e insulina como se indica anteriormente y que contiene suero de ternera fetal despojado de carbón al 10 % durante 4 días más. Después, se estimulan las células con R1881 10 nM solo o en presencia de un exceso de 1000 veces de Casodex anti-andrógeno o de 1 nM del péptido de SEQ. ID NO.1 o de 1 nM de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7) durante 2 minutos, y se lisan. Los lisados celulares se someten a inmunoprecipitación utilizando anticuerpos monoclonales de ratón anti-Src (Clon 327, Oncogene Science, Manhasset, NY). Las proteínas inmunoprecipitadas se resuelven en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 % y, a continuación, se transfieren a filtros de nitrocelulosa. Se incuban los filtros con anticuerpos anti-Src o anticuerpos monoclonales antiRA de ratón. Se revelan los inmunocomplejos en los filtros de nitrocelulosa utilizando anticuerpos anti-ratón unidos a peroxidasa con un sustrato quimioluminiscente (Pierce Chemicals, IL). Como era de esperar, en células tratadas con hormonas, el RA es coimmunoprecipitado por anticuerpos anti-Src (Figura 2A, Carril 2). La asociación entre RA y Src se anula cuando las células LNCaP se estimulan con hormona en presencia de Casodex (Carril 3). De forma similar, el RA no es coimmunoprecipitado por anticuerpos anti-Src en células tratadas con andrógenos y el péptido aglutinante SH3. Por el contrario, la asociación de Src-RA estimulada por la hormona solo se ve afectada ligeramente por el tratamiento con la misma concentración de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss, SEQ. ID NO.7).

PROCEDIMIENTOS

Preparación de lisados de células. Se suspenden las células en 1 ml de tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM, pH 7,40, que contiene MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,5 % y se deja en agitación suave durante 2 minutos, a 4 °C. Luego, se centrifugan las suspensiones a aproximadamente 800 g durante 30 minutos y se recoge el sobrenadante y se utiliza para inmunoprecipitación.

Ejemplo 4: inhibición de la asociación de RE estimulada por estrógenos con Src mediante el péptido (aglutinante Src-SH3) derivado de RA (SEQ. ID NO.1).

Se ha demostrado previamente que RE junto con RA forman un complejo ternario con Src (Migliaccio y col., 2000). La inhibición de la interacción de RE o RA con Src conduce a la interrupción de este complejo ternario y la inhibición de la señalización mediada por Src. Por lo tanto, la inhibición de la interacción RA-Src por el péptido(s) aglutinante(s) SH3 también debería suprimir la asociación de REα con Src y la transducción de señal inducida por estradiol. Para abordar este punto, se cultivan células MCF-7 que proceden de cáncer de mama en CO₂ al 5 % en aire en medio DMEM (GIBCO) complementado con rojo fenol, L-glutamina 2 mM (GIBCO), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 µl/ml), hidrocortisona (3,75 ng/ml), insulina (0,2 U.I./ml) y suero de ternera fetal al 5 %. Luego las células se mantienen en DMEM sin rojo fenol y se complementan con glutamina, penicilina, gentamicina e insulina como se indica anteriormente y que contiene suero de ternera fetal despojado de carbón al 5 % durante 4 días más. Después, se estimulan las células con 17β estradiol 10 nM solo o en presencia de un exceso de 1000 veces del antiestrógeno ICI 182.780 o de 1 nM del péptido de SEQ. ID NO.1 o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO. 1 durante 3 minutos y se lisan. Los lisados celulares se someten a inmunoprecipitación utilizando anticuerpos monoclonales de ratón anti-Src (Oncogene Science, Manhasset, NY). Las proteínas inmunoprecipitadas se resuelven en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 % y, a continuación, se transfieren a filtros de nitrocelulosa. Se incuban los filtros con anticuerpos anti-Src o anticuerpos monoclonales antiRA de ratón. Se revelan los inmunocomplejos en los filtros de nitrocelulosa utilizando anticuerpos anti-ratón unidos a peroxidasa con un sustrato quimioluminiscente como se describe anteriormente.

Como era de esperar, en células tratadas con hormonas, el RE se coimmunoprecipita con anticuerpos anti-Src (Figura 2B, Carril 2). La asociación entre el RE y Src se anula cuando las células MCF-7 se estimulan con hormona en presencia de ICI 182.780 (Carril 3). El RE no es coimmunoprecipitado por anticuerpos anti-Src en células tratadas con andrógenos y el péptido aglutinante SH3 a una concentración de 1 nM. La asociación de Src-RE solo se ve afectada ligeramente por el tratamiento con la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 a 1 nM (Ss).

Ejemplo 5: inhibición de la expresión de ciclina-d estimulada por andrógenos por el péptido AR-Y (aglutinante Src-SH3) (SEQ. ID NO.1) en células de cáncer de próstata (LNCaP) y de cáncer de mama (MCF-7).

5 Los receptores de estrógenos y andrógenos estimulan Src, que a su vez activa las vías de la fosfatidil-3-quinasa (PI3-K) (Castoria y col., 2000). La activación de PI3-K conduce a la fosforilación de PKB/quinasa Akt que da como resultado una expresión aumentada de Ciclina D1. Esto impulsa a las células dependientes de hormonas hacia la transición G1/S del ciclo celular (Castoria y col., 2000). La inhibición de Src o PI3-K causa la acumulación de células en la fase G1 y el bloqueo de la síntesis de ADN. Por lo tanto, los péptidos aglutinantes SH3 podrían utilizarse para inhibir la expresión de la ciclina D1 dependiente de quinasa Src y PI-3K. Para verificar esta posibilidad, se agrega el péptido aglutinante SH3 (SEQ. ID NO.1) a las células MCF-7 y LNCaP estimuladas con el andrógeno. Se cultivan rutinariamente las células MCF-7 y LNCaP como se describió anteriormente. Después, se mantienen las células durante al menos 4 días en medio sin rojo fenol complementado como se describió anteriormente y se añade suero de ternera fetal tratado con carbón revestido con dextrano para minimizar la concentración de esteroides. Luego, se tratan las células con R1881 10 nM solo o en presencia del péptido aglutinante SH3 1 nM (SH3, SEQ. ID NO. 1) o 1 nM de la secuencia modificada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7) (Ss) durante 6 horas, luego, se lisan y se someten a western blot utilizando anticuerpos anticiclina D1 (Figura 3A, panel superior e inferior). Como era de esperar, el andrógeno estimula la expresión de ciclina D1 en células MCF-7 y LNCaP. El inhibidor de PI3-K, LY 294.002, a una concentración de 5 μ M y el inhibidor de Src, PP2 (no mostrado), anulan la expresión de ciclina estimulada por hormona. La adición del péptido aglutinante SH3 1 nM (SEQ. ID NO.1) (SH3) también suprime la inducción de ciclina D mediante R1881 mientras que la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss) solo reduce parcialmente este efecto.

Ejemplo 6: inhibición de la expresión de ciclina-d1 estimulada por estrógenos por el péptido (aglutinante Src-SH3) (SEQ. ID NO.1) derivado de RA en células de cáncer de próstata (LNCaP) y de mama (MCF-7).

25 Para probar el efecto del péptido aglutinante SH3 (SEQ. ID NO.1) sobre la expresión de ciclina D1 estimulada por estrógenos, se añade este péptido a células LNCaP y MCF-7 estimuladas con 17 β -estradiol 10 nM (Figura 3B). Se cultivan rutinariamente las células MCF-7 y LNCaP como se describió anteriormente. Después, se mantienen las células durante al menos 4 días en medio sin rojo fenol complementado como se describió anteriormente y se añade suero de ternera fetal tratado con carbón revestido con dextrano para minimizar la contaminación de esteroides. Luego, se tratan las células con 17 β estradiol 10 nM solo o en presencia del inhibidor de PI-3K LY 294.002 (5 μ M) o del péptido aglutinante SH3 1 nM (SEQ. ID NO.1) o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (SEQ. ID NO.7) 1 nM durante 6 horas (Figura 3B, paneles superior e inferior), luego, se lisan y se someten a western blot utilizando anticuerpos anticiclina D1 como se describió anteriormente. Como el andrógeno, 17 β estradiol estimula la expresión de ciclina D1. El inhibidor de PI3-K, LY 294.002, también anula, en este caso, la expresión de ciclina estimulada por hormona. El péptido aglutinante SH3 1 nM (SEQ. ID NO.1) (SH3) suprime completamente la inducción de ciclina D mediante estrógeno mientras que el péptido mezclado de SEQ. ID NO.1 (Ss) tiene un pequeño efecto.

Ejemplo 7. Inefectividad en la transcripción génica dependiente del receptor de andrógenos del péptido (aglutinante Src-sh3) derivado de RA (SEQ. ID NO.1) en células de cáncer de próstata (LNCaP) y cáncer de mama (MCF-7).

40 Los receptores esteroidales generalmente se conocen como factores de transcripción activados por ligandos. Por lo tanto, es importante evaluar si el efecto antiandrógeno del péptido aglutinante SH3 implica la actividad transcripcional del receptor de andrógenos. Se transfectan células LNCaP, mantenidas en CO₂ al 5 % en aire en medio RPMI 1640 (GIBCO) complementado con rojo fenol, L-glutamina 2 mM (GIBCO), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 μ l/ml), insulina y suero de ternera fetal al 10 %, con un gen indicador diseñado mediante ingeniería genética en un vector de expresión pSG5 con el gen luciferasa bajo el control de un elemento sensible a andrógenos (ARE3416) (Verrijdt y col., 2000). Seis horas después de la transfección, se reemplazó el medio por medio fresco y se dejaron las células durante 24 horas más en ausencia o en presencia de R1881 10 nM solo o con un exceso de 1000 veces de Casodex o con el péptido aglutinante SH3 1 nM (SEQ. ID NO.1) o con la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 1 nM (SEQ. ID. NO.7). Se evalúan los lisados de células para la actividad de luciferasa. El mismo experimento se repite para analizar el efecto del péptido antiandrógeno en la actividad transcripcional del receptor de estrógenos en células de cáncer de mama humano. Se transfectan células MCF-7, mantenidas en CO₂ al 5 % en aire en medio DMEM (GIBCO) complementado con rojo fenol, L-glutamina 2 mM (GIBCO), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 μ l/ml), hidrocortisona (3,75 ng/ml), insulina (0,2 U.I./ml) y suero de ternera fetal al 5 %, con un gen indicador QUALE clonado en un vector de expresión pSG5 con el gen luciferasa bajo el control de un elemento sensible a estrógenos. Finalmente, se evalúan los lisados de células para la actividad de luciferasa.

La figura 4A muestra la actividad de luciferasa en células LNCaP no tratadas (barra 1), en células estimuladas con R1881 solo (barra 2) o en presencia de exceso de Casodex (barra 3), o del péptido SH3 (SH3) (barra 4) o del péptido mezclado de SEQ. ID NO.1 (Ss) (barra 5).

60 La figura 4B muestra la actividad de luciferasa en células MCF-7 no tratadas (barra 1), en células estimuladas con 17 β estradiol solo (barra 2) o en presencia de exceso de ICI 182.780 (barra 3), o del péptido de SEQ. ID NO. 1

(SH3) (barra 4) o de la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 (Ss) (barra 5).

Se puede observar que mientras que el antiandrógeno convencional inhibe completamente la transcripción inducida por andrógenos del gen indicador, ni el péptido SH3 ni la secuencia mezclada del péptido de SEQ. ID NO.1 afectan la actividad transcripcional de los RA.

5 **Ejemplo 8. Efectos antitumorales "in vivo" del péptido aglutinante Src-SH3 derivado de RA (SEQ. ID NO. 1)**

10 Dado que los resultados de los estudios de crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* pueden ser divergentes, se ha estudiado la respuesta del crecimiento de las células LNCaP y MCF-7 al péptido antiandrógeno *in vivo*. Se suspenden células LNCaP, cultivadas en condiciones rutinarias descritas anteriormente, en solución de Matrigel al 50 % (vol/vol) en PBS estéril (pH 7,4) y se inyectan por vía subcutánea en la región dorsal posterior a $2,5 \times 10^6$ células/ratones atímicos masculinos (ratones CD, Charles-River) sin cebado hormonal.

15 Después de 14-21 días, se distribuyen aleatoriamente animales con tumores de tamaño similar para el tratamiento con el péptido aglutinante SH3, SEQ. ID NO.1, o con vehículo solo durante 5 semanas adicionales. El tratamiento se inicia con tumores de aproximadamente 200-400 mm³ de tamaño. Se miden los volúmenes tumorales de los xenoinjertos de células LNCaP con o sin tratamiento mediante una pinza y se registran de acuerdo con la fórmula $D \times d^2 \times 0,5$, en la que D es la longitud y d es el ancho del tumor.

20 Para el tratamiento de cada animal con el péptido, se administran intraperitonealmente a los ratones 200 µl del péptido de SEQ. ID NO.1 aglutinante SH3 20 nM disuelto en DMSO al 0,1 % o la misma cantidad de vehículo solo en días alternos. Dichos estudios son especialmente importantes para evaluar la eficacia de los péptidos como posibles agentes terapéuticos en las células de cáncer de próstata y de mama humano, que expresan los niveles de receptores de andrógenos que se encuentran comúnmente en malignencias humanas. La dosis, el tipo y el tamaño de estos péptidos (fórmula general S1 y SEQ. ID NO.1 a SEQ. ID NO.6) y la ruta de liberación de los péptidos son factores que pueden determinarse utilizando una habilidad normal en la materia.

La figura 5A muestra la tasa de crecimiento de los xenoinjertos de las células LNCaP en ratones macho desnudos tratados con el péptido aglutinante SH3 (SH3) o con vehículo solo (control).

25 Los autores observaron que en este modelo, la masa tumoral fue significativamente menor en el grupo tratado con SH3 en comparación con el grupo control. No se encuentra diferencia entre el peso de los ratones tratados con la solución del vehículo o el péptido (datos no mostrados). El efecto de los péptidos antiandrogénicos también se analiza en los xenoinjertos de las células MCF-7 de cáncer de mama establecidos en ratones desnudos (figura 5B). En este caso, se suspenden células MCF-7, cultivadas previamente como se describió anteriormente, en solución de Matrigel al 50 % (vol/vol) en PBS estéril y se inyectan por vía subcutánea a $2,5 \times 10^6$ células/animal en ratones machos atímicos. Después de 14-21 días, se distribuyen aleatoriamente animales con tumores de tamaño similar para el tratamiento con el péptido aglutinante SH3, SEQ. ID. NO.1, o con vehículo solo durante 5 semanas adicionales. Los tumores al comienzo del tratamiento miden aproximadamente 1000 mm³. Se administran intraperitonealmente a los ratones 200 µl del péptido aglutinante SH3 20 nM en DMSO al 0,1 % o el mismo volumen de vehículo solo en días alternos. Los volúmenes tumorales del xenoinjerto de células cancerosas MCF-7 con o sin tratamiento se miden y registran como se informó anteriormente. No se encuentra diferencia de peso corporal entre los ratones control o los ratones tratados con el péptido.

40 De forma similar a lo que se observó para el modelo de los xenoinjertos de las células LNCaP, los autores también encontraron en el modelo de los xenoinjertos de las células MCF-7 que la masa tumoral era menor en el grupo tratado con SH3 en comparación con el grupo control. No se encuentra diferencia entre el peso de los ratones tratados con la solución del vehículo o el péptido (datos no mostrados).

45 Al final del tratamiento, se sacrifican los animales y se analizan las muestras tumorales para determinar el antígeno Ki67 y las células apoptóticas. En resumen, se cortan las secciones de cada muestra a 3-5 micras, montado sobre vidrio y secado durante la noche a 37 °C. Todas las secciones se desparafinizan en xileno, se rehidratan a través de una serie graduada de alcohol y se lavan en PBS. Este tampón se utiliza para todos los lavados posteriores y para la dilución de anticuerpos. Se realiza un examen con microscopio de luz después de teñir con hematoxilina/eosina y hematoxilina/Van Gieson. Para inmunohistoquímica, las secciones de tejido se calientan dos veces en un horno de microondas durante 5 minutos cada una a 700 W en tampón de citrato (pH 6) y luego se procesan con el procedimiento estándar de estreptavidina-biotina-inmunoperoxidasa (DAKO Universal Kit, DAKO Corporation, Carpinteria, California, USA). El Ki67 antihumano de conejo de DAKO se utiliza a una dilución 1:100. Se incubó el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. La diaminobenzidina se utiliza como el cromógeno final y la hematoxilina como la contratinción nuclear. Se realizan controles negativos para cada sección de tejido omitiendo el anticuerpo primario. Los controles positivos incluidos en cada experimento consisten en tejido que previamente se ha demostrado que expresa el antígeno de interés. Dos observadores evalúan el patrón de tinción de las dos proteínas por separado y puntúan la expresión de la proteína en cada muestra escaneando toda la sección y estimando el número de células positivas visibles para el campo de alta potencia 10X20. El nivel de concordancia, expresado como porcentaje, de acuerdo entre los observadores, es del 92 %. En las muestras restantes, se obtiene la puntuación después de la revisión y el acuerdo colegial. Se realiza la reacción de TUNEL

utilizando el kit Apoptag a base de peroxidasa (Oncor, Gaithersburg, MD, USA). Se detectan células positivas de TUNEL con diaminobenzidina y H₂O₂ de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Dos observadores evalúan el patrón de tinción de las dos proteínas por separado y puntúan la expresión de la proteína en cada muestra escaneando toda la sección y estimando el número de núcleos positivos visibles para el campo de alta potencia 10X20. El nivel de concordancia, expresado como porcentaje, de acuerdo entre los observadores, es del 100 %.

Los autores observaron en muestras de xenoinjerto tumoral de LNCaP una reducción significativa en el porcentaje de células positivas al antígeno Ki-67 ($P < 0,002$, figura 6A, panel izquierdo) y un aumento significativo en el número de células positivas para TUNEL ($P < 0,009$, figura 6A, panel derecho) en el grupo tratado con SH3 en comparación con el grupo control. Se encontró un resultado similar para las muestras de xenoinjerto tumoral de MCF-7 (figura 6B panel izquierdo y derecho).

Ejemplo 9: preparación de composiciones de anticuerpos

Los péptidos sintéticos y péptidos recombinantes descritos anteriormente pueden utilizarse en la generación de una respuesta inmune en un animal o un ser humano y para la preparación de anticuerpos específicos para estos epítomos. La preparación de vacunas y anticuerpos es bien conocida por los expertos en la materia como se describió en el presente documento anteriormente. En resumen, los nuevos péptidos de la presente invención pueden utilizarse como antígenos en animales de la siguiente manera:

Cada péptido puede estar acoplado a la hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés keyhole limpet hemocyanin) y utilizarse para inmunizar subcutáneamente ratones BALB/c. Las inyecciones iniciales contienen 250 µg de proteína y se refuerzan los ratones 7 semanas más tarde con 250 µg del respectivo péptido acoplado a la KLH y luego se sangran 1 semana después. Se prueban los anticuerpos policlonales producidos por los ratones inyectados por su capacidad para reconocer el antígeno peptídico en un ensayo ELISA. Los Abs también se analizan en cuanto a su capacidad para inhibir la síntesis de ADN inducida por RA.

Referencias

- Allen, Choun 1987 FEBS Lett. 223: 42-46
- Bodansky M, Bodansky A 1995 The practice of peptide synthesis (2ª ed.), Springer Verlag, Berlin
- Boonyaratanakornkit V. y col., 2001 Mol Cell, 8: 269-280
- Capecchi C 1980 Cell, 22(2):479-488,.
- Carpino LA, Han GY 1972 J. Org. Chem. 37: 3404-3409
- Castoria G, Barone MV, D1 Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A y Auricchio F 1999 EMBO J. 18: 2500-2510
- Chodak GW, y col., 1992 J Urol 147:798-803
- Clapp 1993 Clin. Perinatol., 20(1): 155-168
- Couvreur, Tulkens, Roland, Trouet, Speiser 1977 FEBS Lett. 84(2):323-326
- Couvreur 1988 Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5:1-20
- Curiel, y col., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(19):8850-8854
- Dawson NA, Vogelzang NJ 2000 Secondary hormonal therapy. In: Resnick MI, Thompson MI, eds. Advanced therapy of prostate disease. Hamilton, Ontario: BC Decker; 378-384
- Denis LJ, Griffiths K 2000 Sem Surg Oncol 18:52-74
- Eglitis, Anderson 1988 6(7): 608-614,.
- Eglitis, y col., 1988 Avd. Exp. Med. Biol. 241:19-27,.
- Fields GB, Noble RL 1990 Int. J. Pep Prot Res 35: 161-214
- Fowler JE, Whitmore WF 1982 Cancer 49:1373-1377
- Fromm, Taylor, Walbot, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(17):5824-5828
- Gabizon, Papahadjopoulos 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6949-6953
- Graham FL y van der Eb AJ, 1973 Virology 54(2): 536-539
- Hobisch A, y col., 1996 Prostate 28:129-135
- Kay BK y col., 2000 FASEB J: 14, 231-235
- Lee D 2003 Clin Prostate Cancer 2: 13-14
- Migliaccio A, y col., 2000 EMBO J, 19: 5406-5417
- Migliaccio A, y col., 1996 EMBO J. 15: 1292-1300
- Migliaccio A, y col., 2005 Cancer Res, 65: 10585-10593.
- Mohler JL, y col., 1996 Clin Cancer Res 2:889-895
- Moinfar F, y col., 2003 Cancer 98: 703-711
- Moss GP 1996 Pure and Applied Chemistry 68: 2193-2222
- Rink H 1987 Tetrahedron Lett. 28: 3787-3790
- Roy AK, y col., 1999 Vit. Horm. 55:309-352
- Sadi MV, Walsh PC, Barrack ER 1991 Cancer 67: 3057-3064
- Schatzl G, Madersbacher S, Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Haitel A, Vutuc C, Micksche M, Marberger M 2002 Prostate 52:130-138
- Shi, Liu, Lippman, Dickson, 1994 Human Reprod., 9: 162-173
- Siiteri PK, Wilson JD 1974 J Clin. Endocrinol. Metab 38:113-125

Tam JP, Spetzler JC, 1997 *Methods Enzymol.* 289: 612-37
Tuchscherer G y Mutter M, 1996 *Pure&App/.* *Chem.*; 68, 11: 2153-2162
van der Kwast TH, Schalken J, Ruizeveld de Winter JA, van Vroonhoven CCJ, Mulder E, Boersma W, Trapman J
1991 *Int J Cancer* 48:189-193
5 Verrijdt y col. 2000 *J. Biol. Chem* 275: 12298-12305
Wagner E., y col., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3410-3414
Williams JC y col. 1998 *TIBS*: 23, 179-184
Wong y Neumann 1982 *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 107(2): 584-587
Yang y col. 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568-9572,

10

REIVINDICACIONES

1. Una molécula derivada de péptido aislada o purificada o parcialmente purificada que presenta la fórmula general:



5 en la que X es H, o un grupo acetilo o cualquier aminoácido natural o secuencia de aminoácidos provista con un grupo NH₂ libre o al menos derivado de acetilo; Y es un grupo OH o un grupo NH₂; "n" es un número entero de 1 a 10 y "m" es un número entero de 1 a 3; y en la que la secuencia de aminoácidos de la molécula derivada de péptido se selecciona del grupo que consiste en:

10 Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 1);
 Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 2);
 Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 3); y
 Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys (SEQ. ID NO. 4).

2. La molécula derivada de péptido, de acuerdo con la reivindicación 1, capaz de inhibir o evitar la interacción del receptor de andrógenos (RA) con el dominio SH3 de la tirosina quinasa Src.

15 3. La molécula derivada de péptido, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene actividad antitumoral *in vitro* o *in vivo*.

4. La molécula derivada de péptido, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

20 Ac-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂;
 Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂;
 Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂; y
 Ac-Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-His-Pro-His-Ala-Arg-Ile-Lys-NH₂.

5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz de la molécula derivada de péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

25 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que (i) dicho péptido puede unirse a una molécula transportadora y/o estar comprendido en una composición lipídica con un excipiente farmacéutico; y/o (ii) la composición comprende al menos un segundo agente anticanceroso.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la molécula transportadora es BSA o KLH.

30 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición lipídica es una partícula lipídica, una nanocápsula, un liposoma o vesículas lipídicas.

9. Una molécula derivada de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso como un medicamento.

10. La molécula derivada de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso como un agente antitumoral.

35 11. La molécula derivada de péptido de acuerdo con la reivindicación 10 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso contra (i) cáncer de mama o de próstata y/o (ii) otros cánceres que expresan receptores de andrógenos solos o junto con receptores de estradiol.

12. Uso de la molécula derivada de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento.

40 13. Uso de una molécula derivada de péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medicamento es para el tratamiento de (i) cáncer de mama o de próstata y/o (ii) otros cánceres que expresan receptores de andrógenos solos o junto con receptores de estradiol.

45 15. Un anticuerpo capaz de reconocer específicamente una molécula derivada de péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

16. Un kit que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, unido operativamente a una etiqueta detectable y a reactivos de inmunodetección en recipientes únicos o múltiples.

17. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido o un vector recombinante que expresa un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
18. Células hospedadoras de mamífero, de ser humano o de bacterias que contienen la secuencia de ácidos nucleicos o el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 17.
- 5 19. Un procedimiento *in vitro* para matar una célula cancerosa, que incluye una célula de cáncer de mama o de próstata, que comprende proporcionar a la célula una molécula derivada de péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

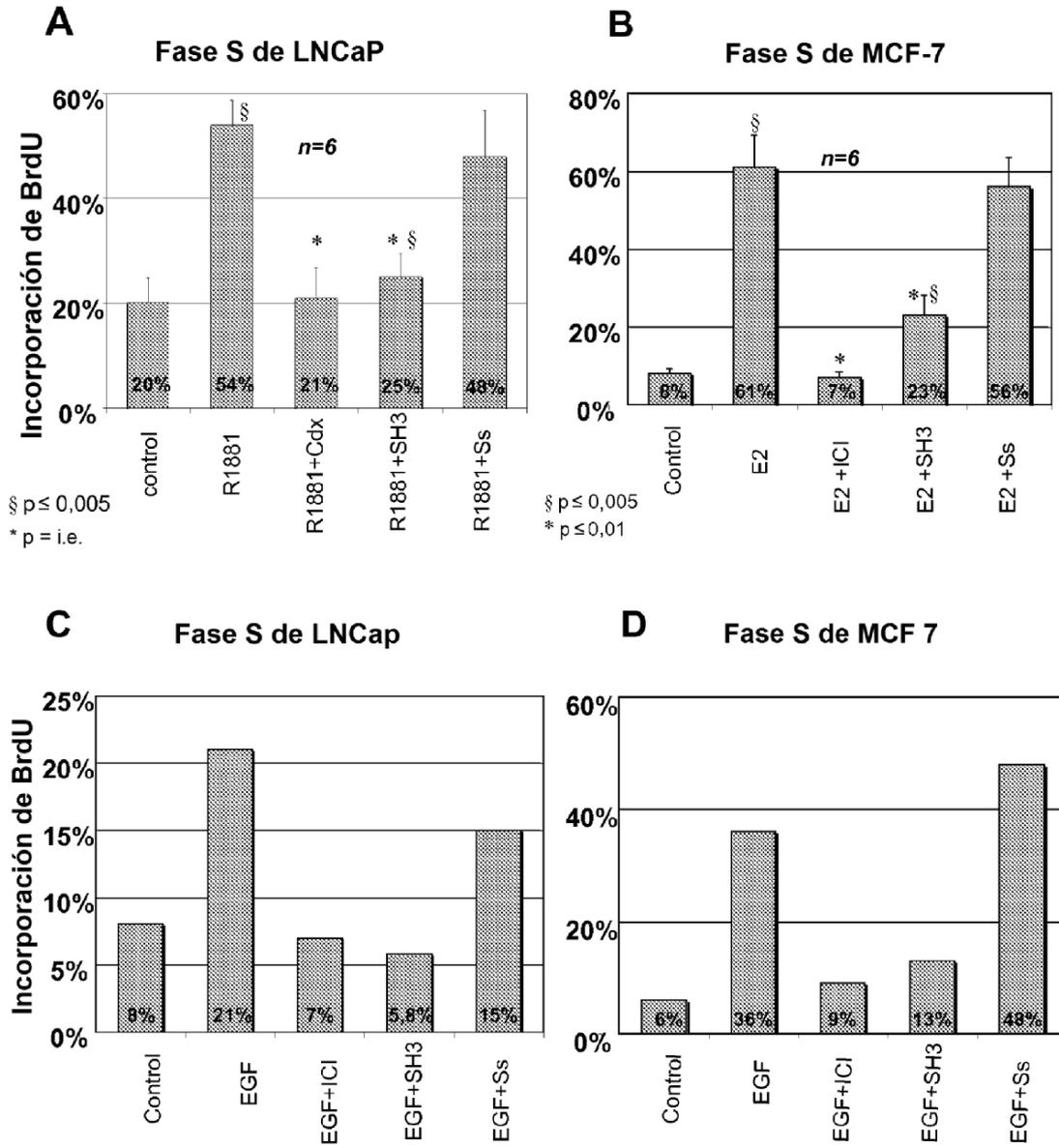


Fig. 1

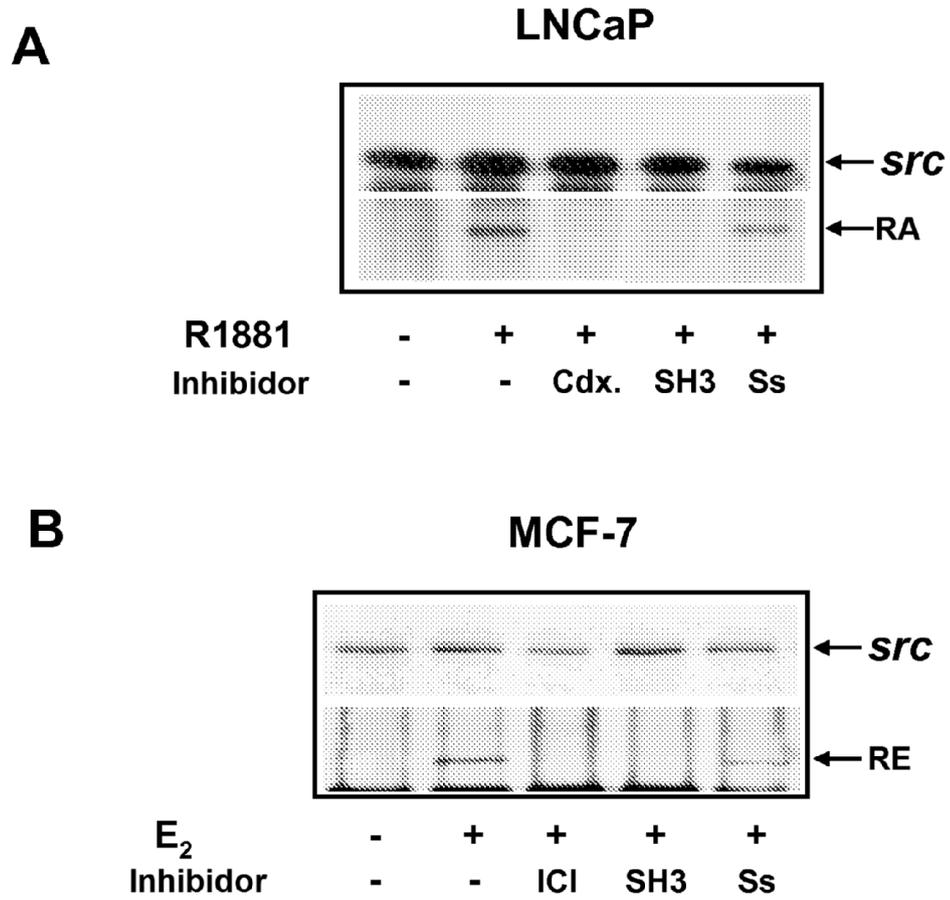


Fig. 2

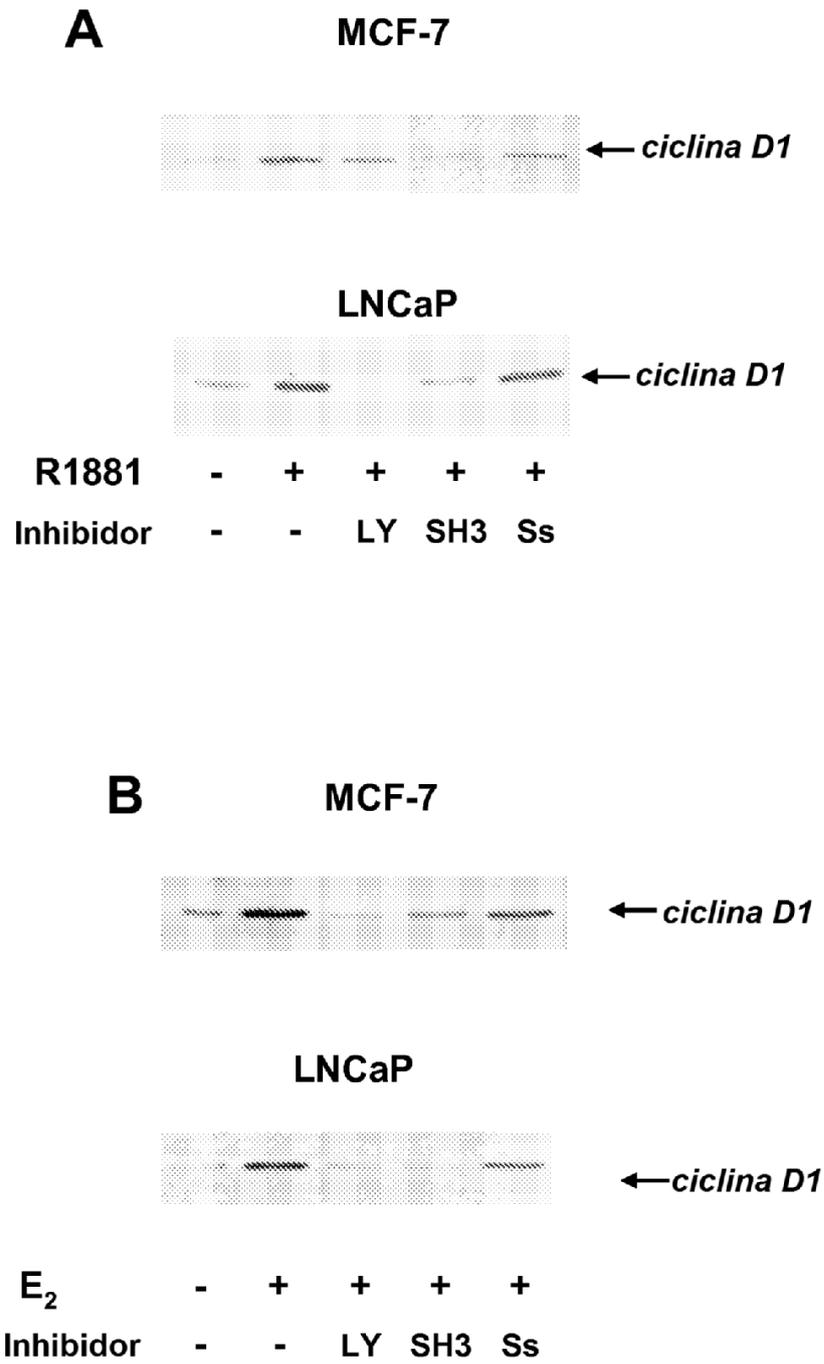


Fig. 3

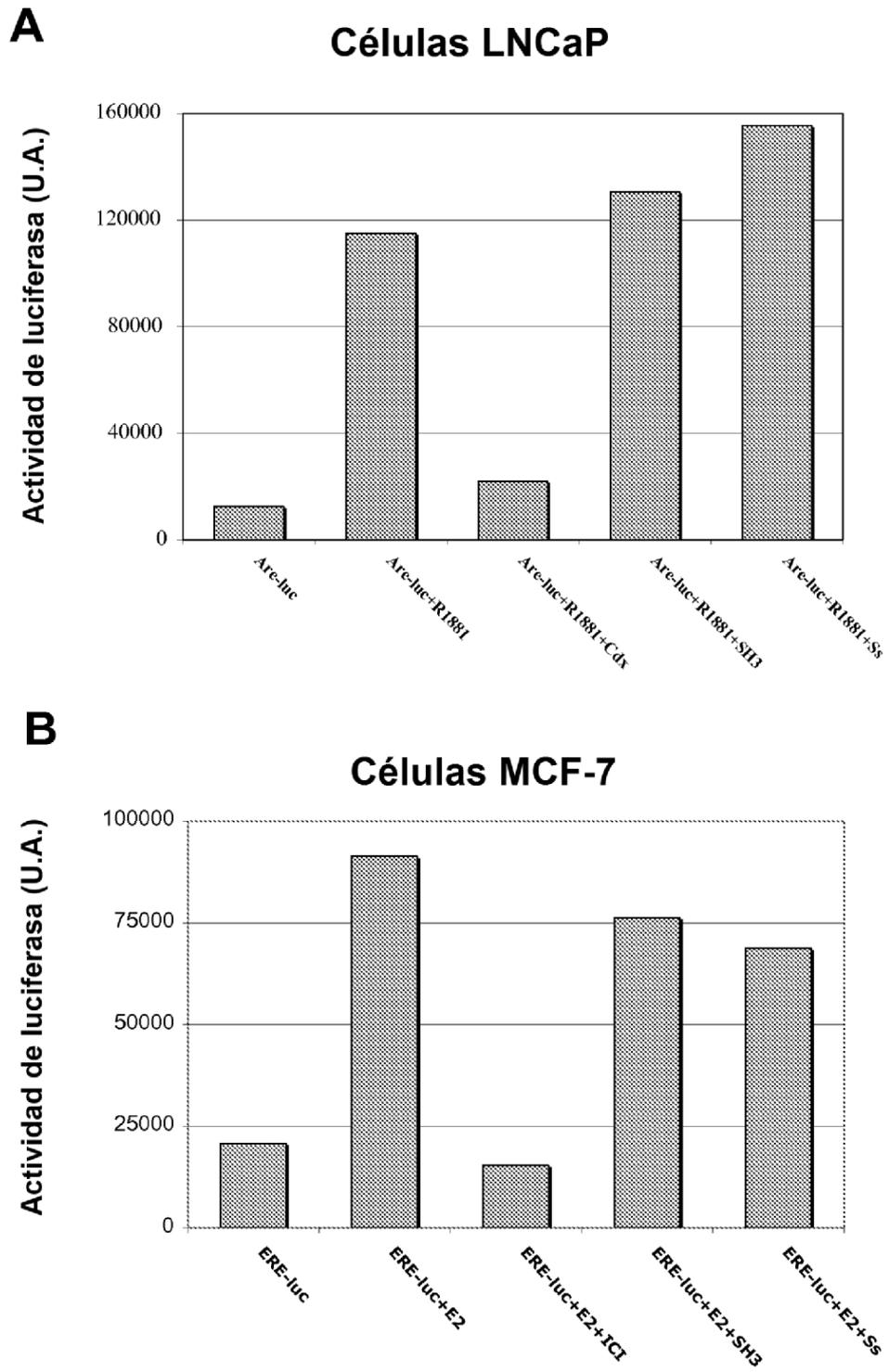


Fig.4

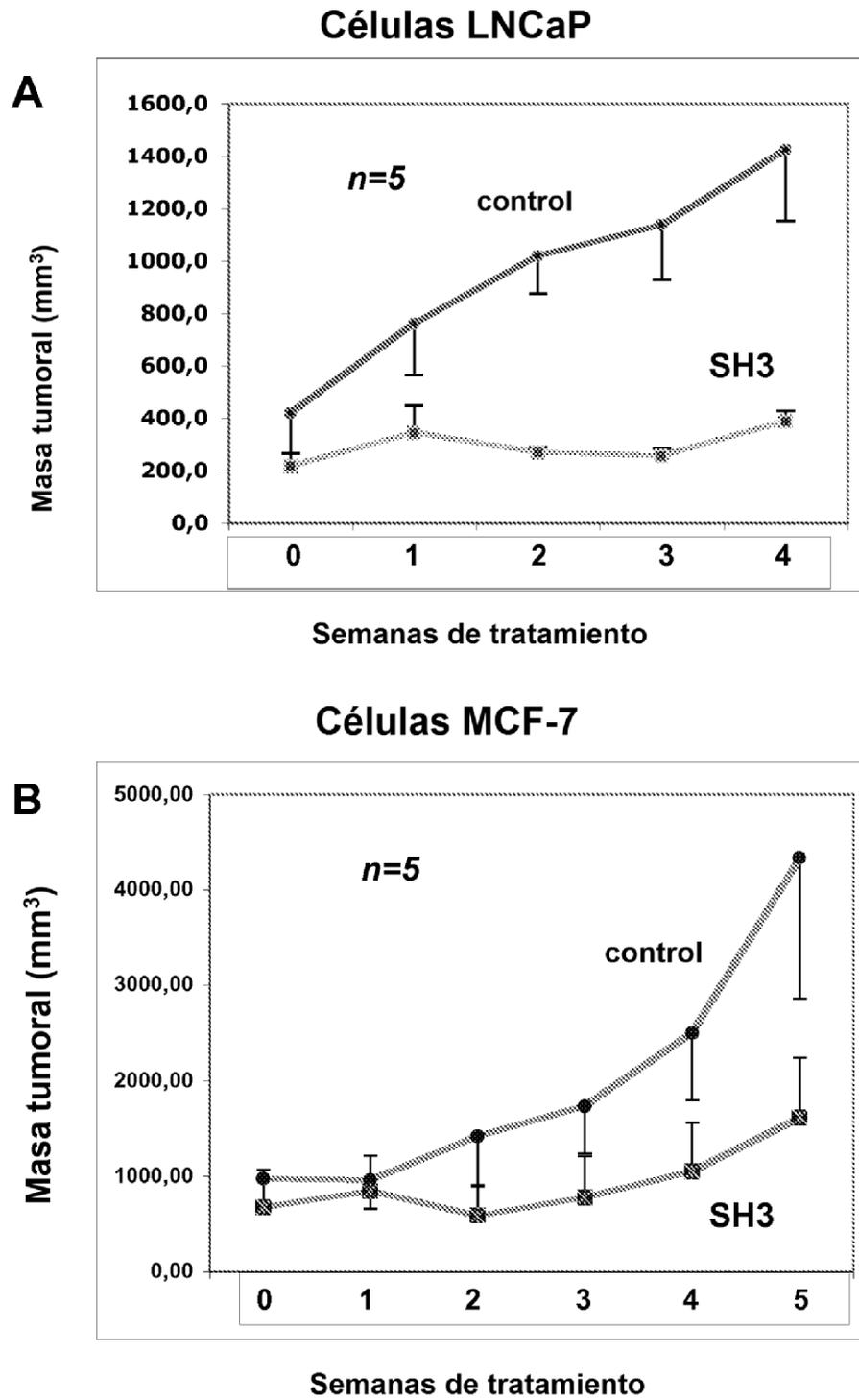


Fig. 5

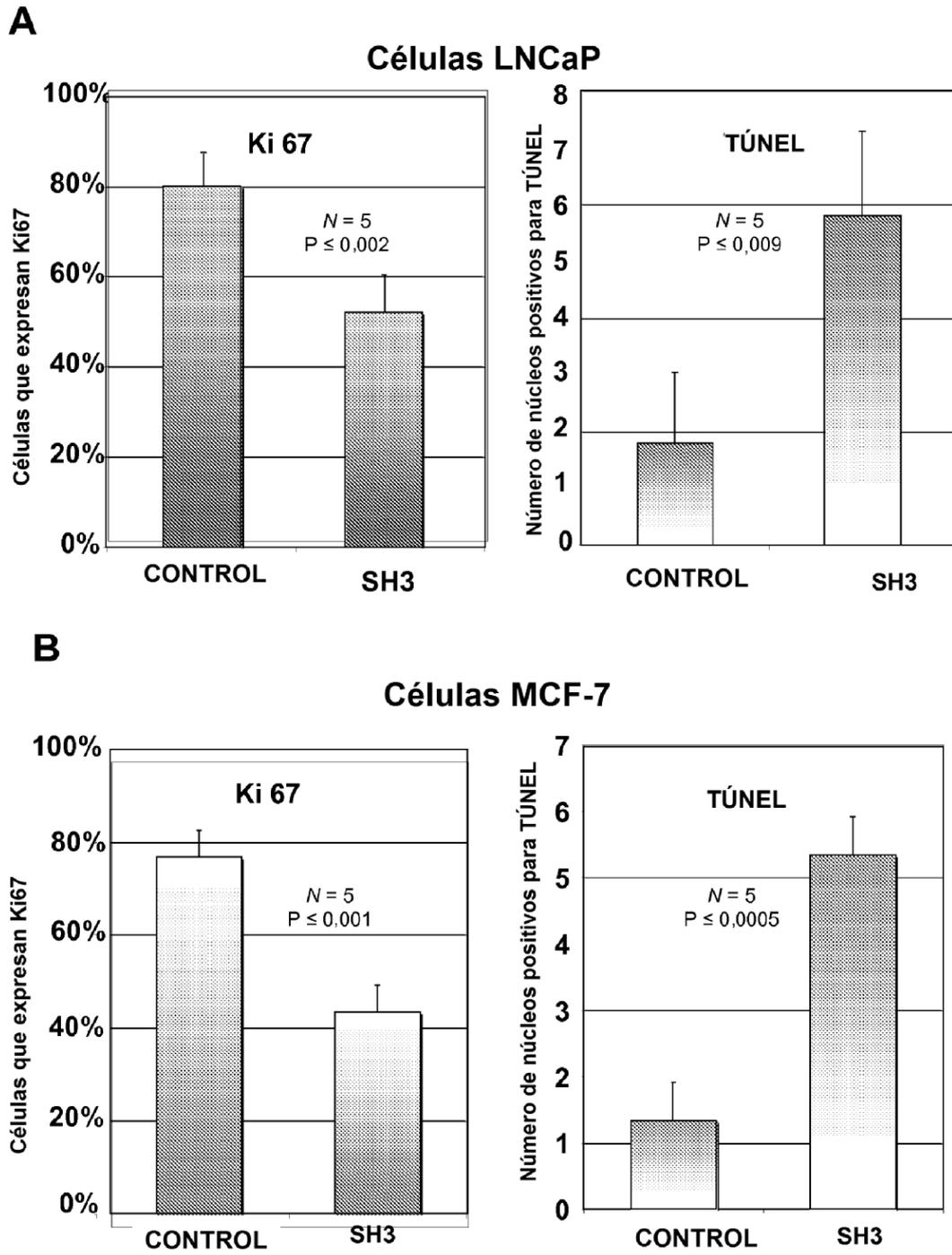


Fig. 6