

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 446**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2014 PCT/IL2014/050822**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2014 E 14846055 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3046929**

54 Título: **Péptidos derivados de ERK y usos de los mismos**

30 Prioridad:

17.09.2013 US 201361878633 P

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

21.06.2019

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
at the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SEGER, RONY y
PLOTNIKOV, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 717 446 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 derivados de ERK y usos de los mismos

La presente invención se refiere, en general, a péptidos derivados de quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK, por sus siglas en inglés) que se pueden utilizar para tratar el cáncer.

5 La cascada de quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK) es una vía de señalización intracelular que regula los procesos celulares, tales como la proliferación y la diferenciación. Al ser un componente de señalización central, su desregulación está implicada en diversas patologías, en particular el cáncer. De hecho, recientemente se desarrollaron inhibidores tanto de Rafs como de MEK1/2 dentro de la cascada, pero a pesar de la participación generalizada de ERK en la inducción y el mantenimiento de los cánceres, estos inhibidores demostraron ser
10 beneficiosos casi solamente en los melanomas mutados con B-Raf. Además, la mayoría de los melanomas sensibles desarrollan resistencia a los inhibidores de Raf/MEK en el espacio de varios meses de tratamiento. La falta de efecto en muchos tipos de cáncer y los mecanismos de resistencia adquirida se están ahora investigando y se demuestra que a menudo implican la inhibición de los bucles de retroalimentación negativos dependientes de ERK. Por consiguiente, esta inhibición permite la hiperactivación de los componentes de señalización aguas arriba que evitan la cascada de ERK inhibida. Por lo tanto, inhibir la cascada de ERK sin afectar a los bucles de retroalimentación debería resultar en un fármaco contra el cáncer más general.

Una de las etapas claves en la transmisión de señales extracelulares es la translocación nuclear de ERK. En las células en reposo, la mayor parte de ERK se localiza en el citoplasma debido al anclaje a las proteínas citoplasmáticas, pero la estimulación provoca una translocación nuclear rápida y masiva de una gran parte de las moléculas de ERK. El mecanismo molecular de la translocación implica el primer cambio conformacional dependiente de la fosforilación de TEY, que resulta en el desprendimiento de las moléculas de ERK de sus anclajes. Esto expone a la ERK a una fosforilación adicional en dos residuos Ser dentro de una señal de translocación nuclear (NTS). La fosforilación de la NTS permite que la importina (Imp) de tipo beta, Imp7, se una y, por consiguiente, induzca la translocación nuclear de las quinasas. Esta rápida translocación permite la fosforilación y activación de
25 muchas proteínas nucleares que son importantes para la inducción y regulación de procesos celulares.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 20100099627 enseña 18 péptidos de aminoácidos que son capaces de prevenir la translocación de ERK en el núcleo.

ZEHORAI I ET AL , se refiere a "La localización subcelular de MEK y ERKA nueva señal de translocación nuclear (NTS) pavimenta una vía al núcleo", MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 314, nº 2, ISSN 0303-7207, (20100127), páginas 213 – 220, (20090503).
30

YOHANNES MEBRATU ET AL, se refiere a "Cómo la activación de ERK controla la proliferación celular y la muerte celular: ¿Es la localización subcelular la respuesta ?", CELL CYCLE, US, (20090415), vol. 8, nº 8, doi:10.4161/cc.8.8.8147, ISSN 1538-4101, páginas 1168-1175.

ALEXANDER PLOTNIKOV ET AL se refiere a "La translocación nuclear de ERK 1/2 como un objetivo anti-cáncer", NATURE COMMUNICATIONS, (20150330), vol. 6.
35

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un péptido aislado que no tiene más de 20 aminoácidos de longitud que comprende una secuencia tal como se recoge en SEQ ID NO: 4, en donde X₁ y X₂ son cualquier aminoácido, siendo el péptido capaz de prevenir la translocación de la quinasa 1/2 (ERK) regulada por señales extracelulares en el núcleo.
40

Preferiblemente, el péptido aislado es de 17 aminoácidos de longitud.

Preferiblemente, los X₁ y X₂ se seleccionan, cada uno independientemente, del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y serina.

Preferiblemente, el péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-3, 6 y 7.
45

Preferiblemente, el péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 6.

La presente invención proporciona, además, una composición de materia que comprende el péptido aislado, unido a un agente de penetración celular.

Preferiblemente, el agente de penetración celular comprende ácido mirístico.

50 Preferiblemente, el agente de penetración celular es un péptido de penetración celular.

Preferiblemente, el péptido aislado unido a dicho péptido de penetración celular no es más largo que 30

aminoácidos.

La presente invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende este péptido o esta composición de materia como el agente activo y un soporte farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona, además, este péptido aislado para uso en el tratamiento del cáncer.

- 5 La presente invención proporciona, además, esta composición de materia para uso en el tratamiento del cáncer.

Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino.

Preferiblemente, el cáncer es melanoma.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de aspectos de la divulgación. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica aspectos de la invención.

En los dibujos:

- 15 Las FIGs. 1A-F ilustran que el péptido EPE previene la translocación nuclear de ERK1. Células A2352 (A), MDA-MB-231 (B), HeLa (C), T47D (D), NHEM-AD (E) y HB2 (F) se privaron de suero, se trataron previamente con los péptidos EPE, péptido Scr (10 μ M, 2 h) DMSO y luego se estimularon con TPA (250 nM, 15 min) o se dejaron sin tratar (NS) como control. Las células se tiñeron con Ab (siglas inglesas de anticuerpo) α ERK1/2 y DAPI. Barra de escala - 15 μ m.

- 20 Las FIGs. 2A-F ilustran que el péptido EPE previene la fosforilación NTS de ERK1/2, la interacción de ERK1 con importina7 y la activación de dianas nucleares ERK1/2. (A) El péptido EPE evita la interacción ERK1/2-importina7. Las células HeLa se privaron de suero (0,1%, 16 horas), se trataron previamente con péptido EPE, péptido revuelto (10 μ M, 2 horas) o DMSO, y luego se estimularon con TPA (250 nM, 15 min). ERK1 se precipitaron con Ab α ERK1/2; importina7 co-inmunoprecipitada con ERK1 fue detectada por WB con Ab α importina7. (B) El péptido EPE impide la fosforilación de NTS y Elk1 de ERK1/2, pero no de RSK1. Células T47D, HeLa, MDA-MB-231 y A2352 se privaron de suero (0,1%, 16 horas), se trataron previamente con péptido EPE, péptido revuelto (10 μ M, 2 horas) o control DMSO, y luego se estimularon con TPA (250 nM, tiempos indicados). Los extractos celulares se sometieron a análisis de transferencia Western con los Abs indicados. (C) El péptido EPE inhibe la fosforilación de c-Myc y Elk1 en melanomas B-Raf. Células A2158 y A2352 se trataron con péptido revuelto y EPE durante dos horas y luego se estimularon con la concentración indicada de TPA durante 30 min. Los extractos celulares se sometieron a análisis de transferencia Western con los Abs indicados. (D) Cuantificación de algunos de los resultados en B y C. Las barras representan la diferencia múltiplo entre los péptidos revueltos y EPE en la fosforilación de las proteínas indicadas después de la estimulación con TPA. Los resultados son la media de dos o tres experimentos. (E) El péptido EPE no afecta a la fosforilación de AKT a corto plazo. Los mismos extractos descritos en B se sometieron a análisis de transferencia Western utilizando Abs anti pAKT y gAKT. (F) El péptido EPE no afecta a la fosforilación de AKT a largo plazo. Células HeLa se trataron con el EPE o péptido revuelto (10 μ M) o DMSO durante los tiempos indicados, después de lo cual se sometieron a un análisis de transferencia Western utilizando Abs anti pAKT y gAKT.
- 30
- 35

- Las FIGs. 3A-B ilustran que el péptido EPE previene la proliferación de cáncer pero no de células normales. (A) Efecto del péptido EPE sobre la proliferación de diversas líneas celulares. Se trataron dieciséis líneas celulares inmortalizadas de cáncer y cuatro "normales" con EPE o péptidos revueltos tal como se describió anteriormente. Las células viables se analizaron con azul de metileno a las 48 o 72 horas después de la siembra celular. Los datos de al menos tres experimentos independientes se presentan como porcentaje de la cantidad de células viables/número de células inicial, en que el número de células inicial se consideró como 100. (B) Comparación de los efectos del péptido EPE y el inhibidor de Raf PLX4032 en la viabilidad de las células. Células NHEM-Ad, LOXIMVI, A2352, Hela MDA-MB-231 y DU-145 se trataron con péptido EPE, péptido revuelto, (10 μ M), PLX4032 (1 μ M), control DMSO, o ningún tratamiento con FCS al 1%. El número de células se detectó como anteriormente. Los gráficos presentan la cinética del crecimiento celular en los tiempos indicados. Todos los experimentos se repitieron 3 veces por triplicado.
- 40
- 45

- Las FIGs. 4A-B ilustran que el péptido EPE previene la proliferación de células de melanoma resistentes. (A) Células de melanoma A2352 resistentes a los inhibidores de PLX4032 (B-Raf) o U0126 (MEK) se trataron con DMSO, EPE o péptido Scr (10 μ M), U0126 (10 μ M), PLX4032 (1 μ M), wortmanina (0.5 μ M) o Taxol (25 μ g/ml). Presentado como porcentaje de células viables a las 72 h/número de células inicial. (B) Melanomas resistentes de pacientes. Dos líneas de melanoma resistentes a vemurafenib, A4132 y A4168, se cultivaron en FCS al 1% y se trataron con medio que contenía DMSO, péptido EPE (10 μ M), PLX4032 (1 μ M), PD-184352 (5 μ M) o tratamiento combinado de péptido EPE (10 μ M) más PLX4032 (1 μ M), administrando medio reciente cada 24 horas durante el experimento de 96 horas. Se realizó un ensayo con azul de metileno para cuantificar las células viables. Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado. Los datos presentados como cambio múltiplo. (*) $p < 0,01$, (#) $p < 0,05$ con respecto al control DMSO.
- 50
- 55

- Las FIGs. 5A-D ilustran que el péptido EPE conduce a la apoptosis de células cancerosas mutantes B-Raf. (A) El péptido EPE afecta a la morfología de células tratadas. Las células indicadas se trataron con los péptidos EPE o Scr, DMSO o taxol durante 72 h, y se fotografiaron con un microscopio óptico. (B) El péptido EPE induce apoptosis en células de melanoma detectadas por TUNEL. Las líneas celulares indicadas se trataron como en A durante 24 h. La apoptosis se detectó mediante tinción con TUNEL. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopio de fluorescencia. (C) Cuantificación de B. El gráfico de barras representa el porcentaje de células apoptóticas calculado en 10 campos diferentes. (D) El péptido EPE induce la apoptosis de células de melanoma detectadas por escisión de PARP. Las líneas celulares indicadas se trataron como en (A) durante 24 h. Los extractos celulares se sometieron a transferencia Western con Ab α PARP.
- Las FIGs. 6A-B ilustran que el péptido EPE previene el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos. Se inocularon ratones CD-1 inmunológicamente deficientes con células MDA-MB-231, LOXIMVI y HCT-116, y ratones SKID se inocularon con células A2352. Tras el establecimiento de los tumores, los ratones se trataron por vía intravenosa con el DMSO, así como con los péptidos EPE o Scr en las dosis indicadas, 3 veces por semana. Los resultados son la media de 5 ratones en cada uno de los grupos experimentales. Las dimensiones X, Y, Z de los tumores se midieron con un calibrador y el volumen se calculó en consecuencia. Los resultados son medias de 5 ratones en cada uno de los grupos experimentales. La importancia de todos los experimentos fue al menos $P < 0,001$. (B) El péptido EPE previene la recurrencia del tumor en el xenoinjerto de melanoma. Ratones SCID se inocularon con células A2352. Tras el establecimiento de tumores, los ratones se trataron por vía intravenosa con 15 mg/kg de péptido EPE ($n = 7$) o por vía intraperitoneal con 15 mg/kg de PLX4032 ($n = 5$), a la dosis indicada 3 veces por semana. El tamaño del tumor se registró al mismo tiempo utilizando un calibrador. Después de 3 semanas de tratamiento, los ratones se mantuvieron para una evaluación adicional, controlando cualquier recidiva tumoral de los xenoinjertos de melanoma tratados eficazmente. El experimento concluyó 110 días después de la inoculación (11 semanas después del último tratamiento) y se evaluó el estado general de los animales. sac = sacrificado, recur = recurrencia, met = metástasis.
- Las FIGs. 7A-B ilustran la distribución intracelular del péptido derivado de NTS. Células HeLa se privaron de suero y se trataron durante los tiempos indicados con péptido SPS conjugado con biotina en su extremo C y con TAT (Figura 7B) o ácido mirístico (Figura 7A) en su extremo N. La distribución intracelular del péptido se visualizó utilizando un microscopio fluorescente. Barra de escala 15 μ m.
- Las FIGs. 8A-B ilustran que el péptido EPE no afecta a la translocación de JNK o p38 en el núcleo. (A) El péptido EPE no afecta a la translocación nuclear de JNK2 y p38. Células HeLa se privaron de suero, se trataron previamente con los péptidos EPE o Scr, y luego se estimularon con TPA (250 nM, 15 min), anisomicina (Anis, 10 μ g/ml, 15 min) durante los tiempos indicados, o se dejaron sin tratar como control (NT). Las células se tiñeron con los Abs α p38 o α JNK y DAPI. Barra de escala - 15 μ m. (B) Extractos de células tratadas como en A se analizaron mediante transferencia Western con los Abs indicados.
- Las FIGs. 9A-B ilustran la respuesta a la dosis de los péptidos EPE en la proliferación de células de melanoma. Células de melanoma LOXIMVI (Figura 9A) y A2352 (Figura 9B) se trataron con las dosis indicadas de los péptidos EPE o Scr. Presentada como porcentaje de células viables a las 72 h/número de células inicial.
- Las FIGs. 10A-B ilustran que el péptido EPE provoca la localización citoplasmática de ERK en xenoinjertos. Figura 10A: Fotografías que ilustran que los péptidos EPE y Scr, así como los xenoinjertos de MDA-MB-231 y LOXIMVI tratados con DMSO se inmunotifieron con el Ab α ERK. La Figura 10B presenta gráficos de barras que representan el número de células con tinción ERK citoplasmática/nuclear calculada en 10 campos microscópicos aleatorios.
- La FIG. 11 ilustra que la translocación nuclear de ERK1/2 es inhibida por péptidos derivados de NTS.
- Las FIGs. 12A-D ilustran que el péptido EPE inhibe la translocación nuclear de ERK1/2. Células A2352 (Figura 12A), HeLa (Figura 12B), MDA-MB-231 (Figura 12C) o LOXIMVI (Figura 12D) privadas de suero (FCS al 0,1%, 16 h) se pretrataron con péptidos EPE o revueltos (10 μ M, 2 h). Las células se estimularon luego con EGF (50 ng/ml) o se dejaron sin tratar, y luego se recogieron. El fraccionamiento subcelular del citoplasma y el núcleo se realizó como se indica a continuación, y las fracciones se sometieron a un análisis de transferencia Western con los Abs indicados. El fraccionamiento subcelular se realizó de la siguiente manera: las células recogidas se resuspendieron en 200 μ l de tampón H que contenía Nonidet P-40 al 0,1%. Los lisados se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron inmediatamente para producir sobrenadantes que contenían la fracción citosólica. Las proteínas nucleares se extrajeron resuspendiendo los sedimentos nucleares en 200 μ l de tampón de extracción, esperando en hielo durante 5 min, breve tratamiento con ultrasonidos (2 x 5 s, 40 W, 4°C), mezcladura vigorosa y centrifugación. Tanto las fracciones citosólicas como las nucleares se sometieron a transferencia Western.
- Las FIGs. 13A-C ilustran que el péptido EPE tiene un efecto similar en la translocación nuclear de ERK1 y ERK2. Células de melanoma B-Raf A2185 (A) y A2352 (B) se privaron de suero (16 horas, FBS al 0,1%) y luego se trataron previamente con los péptidos EPE (10 μ M, 2 horas) o se dejaron sin tratar. Luego, las células se estimularon con TPA (100 μ M, 20 min) o se dejaron sin tratar (NS) DMSO como control. Las células se tiñeron con Abs anti ERK1 (Santa Cruz, C16) o anti ERK2 (C14, Santa Cruz) y DAPI. (C) La cuantificación del número de células, en las que ERK1 o ERK2 se localizaron principalmente (> 80%) en el núcleo se realizó contando 5 campos que contenían 100

células por campo.

Las FIGs. 14A-B ilustran que el péptido EPE reduce la expresión y la fosforilación de c-FOS en células A2352. (A) Efecto del péptido EPE sobre c-Fos. Las células A2352 se privaron de suero (0,1%, 16 horas), se trataron previamente con péptido EPE o péptido revuelto (10 μ M, 2 horas) y luego se estimularon con TPA (50 y 100 nM, 60 min) o se dejaron sin tratar (NS). Los extractos celulares se sometieron a análisis de transferencia Western con los Abs indicados. Los Abs anti g-c-FOS y p-c-FOS se adquirieron de Santa Cruz (CA). (B) Cuantificación de los resultados en el TPA de 100 nM en A.

Las FIGs. 15A-B ilustran que el péptido EPE previene la acumulación/translocación nuclear de ERK1/2 en células de melanoma resistentes a PLX4032. A2352 que se hicieron resistentes a PLX4032 (tal como se describe en Material y Métodos) y A4132. Las células de melanoma resistentes a PLX4032 del paciente se privaron de suero (16 horas, 0,1%), se trataron previamente con péptido EPE o revuelto (10 μ M, 2 horas) y luego se estimularon con TPA (100 nM, 20 min) o se dejaron sin tratar (NT) como control. Las células se tiñeron con el Ab α ERK1/2 y DAPI.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención se refiere a péptidos derivados de quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK) que se pueden utilizar para tratar el cáncer.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o de llevarse a cabo de diversas maneras.

La señalización de ERK1/2 desempeña un papel crucial en la inducción de la proliferación, así como en el desarrollo y el progreso del cáncer. Inhibidores de la cascada de ERK (p. ej., vemurafenib y trametinib) sirven como fármacos contra el cáncer. Sin embargo, la mayoría de estos agentes solo tienen un efecto limitado en los tumores malignos humanos, e incluso los inhibidores más efectivos afectan solo a un número limitado de cánceres. Además, estos inhibidores pueden tener efectos secundarios graves, incluida la inducción de cáncer de piel, y los cánceres tratados (es decir, el melanoma) desarrollan resistencia a los fármacos dentro de los 6-8 meses. Muchas de las deficiencias de los inhibidores actuales están probablemente mediadas por la reducción de los bucles de retroalimentación negativos.

Los autores de la presente invención intentaron prevenir la translocación nuclear de ERK1/2, evitando así la proliferación dependiente de ERK pero no los bucles de retroalimentación negativos inducidos por ella. Los autores de la presente invención sintetizaron numerosos péptidos basados en la señal de translocación nuclear de ERK y demostraron que eran capaces de inhibir de manera eficiente y específica la interacción de ERK con Imp7, evitando con ello la translocación nuclear de ERK, sin cambiar la actividad de AKT que generalmente se ve potenciada por la inhibición de los bucles de retroalimentación negativos relacionados con ERK.

Se demostró que el péptido basado en EPE inhibe la translocación nuclear estimulada de ERK en todas las líneas celulares examinadas; sin embargo, su efecto sobre la proliferación celular varió en diferentes líneas celulares. El efecto más notable del péptido fue en las células de melanoma B-Raf, que sufrieron una apoptosis unas pocas horas después del tratamiento (Figuras 5A-D).

La aplicación del péptido a células cultivadas indujo la apoptosis de las células de melanoma, mientras que inhibía la proliferación/supervivencia de otras células cancerosas, incluidas las células de melanoma resistentes a PLX4032 y U0126 (Figura 4); sin embargo, no tuvo efecto sobre la proliferación de células inmortalizadas (Figuras 3A-B). Cuando se utiliza en modelos de xenoinjerto, la aplicación sistémica del péptido EPE inhibió el crecimiento de tumores derivados de mama, colon y melanoma, y erradicó el crecimiento de xenoinjertos de melanoma de paso bajo (Figuras 6A-D y 10A-B).

Por lo tanto, se describe un péptido aislado que no tiene más de 20 aminoácidos y que comprende una secuencia al menos 95% homóloga a la secuencia GQLNHILGILGX₁PX₂QED (SEQ ID NO: 4), en donde X₁ y X₂ son cualquier aminoácido, siendo el péptido capaz de prevenir la translocación de quinasa1/2 extracelular regulada por señales extracelulares (ERK) en el núcleo.

La frase "ser capaz de prevenir la translocación de quinasa1/2 (ERK) regulada por señales extracelulares en el núcleo" se refiere a la capacidad de regular a la baja la cantidad de ERK de translocación desde el citoplasma al núcleo en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más. Métodos para detectar si un péptido es capaz de prevenir la translocación de ERK se describen en la sección de Ejemplos que figura más adelante.

El péptido de este aspecto de la presente divulgación puede tener una longitud de 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

El péptido tiene una secuencia de aminoácidos que es típicamente homóloga al menos en un 94 % o idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4, homóloga en un 95 % o idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4,

homóloga en un 96 % o idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4, al menos homóloga en un 97 % o idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4, al menos homóloga en un 98 % o idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4, al menos homóloga en un 99 % o idéntica a la secuencia como se establece en SEQ ID NO: 4 u homóloga en un 100 % o idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4 determinada utilizando el software estándar proteína-proteína BLAST [blastp] del NCBI.

Tal como se mencionó, X_1 y X_2 en SEQ ID NO: 4 pueden ser cualquier aminoácido (tal como se especifica más adelante en esta memoria). De acuerdo con un aspecto, X_1 y X_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y serina. Por ejemplo, los X_1 y X_2 pueden ser ambos ácido glutámico. Por ejemplo, los X_1 y X_2 pueden ser ambos ácido aspártico. Por ejemplo, los X_1 y X_2 pueden ser ambos serina. Por ejemplo, X_1 puede ser ácido glutámico y X_2 puede ser ácido aspártico o X_1 puede ser ácido aspártico y X_2 puede ser ácido glutámico. De acuerdo con otro aspecto, ni X_1 ni X_2 son alanina.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, el péptido es al menos un 94 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, un 95 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, un 96 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, al menos un 97 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, al menos un 98 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, al menos un 99 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 o un 100 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 según se determina utilizando el software estándar de proteína-proteína BLAST [blastp] del NCBI, en donde la serina en la posición X_1 y X_2 no es reemplazable por otro aminoácido.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, el péptido es al menos un 94 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, un 95 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, un 96 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, al menos un 97 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, al menos un 98 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, al menos un 99 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o un 100 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 según se determina utilizando el software estándar de proteína-proteína BLAST [blastp] del NCBI, en donde la alanina en la posición X_1 y X_2 no es reemplazable por otro aminoácido.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, el péptido es al menos un 94 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, un 95 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, un 96 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, al menos un 97 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, al menos un 98 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, al menos un 99 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6 o un 100 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6 según se determina utilizando el software estándar de proteína-proteína BLAST [blastp] del NCBI, en donde el ácido glutámico en la posición X_1 y X_2 no es reemplazable por otro aminoácido.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, el péptido es al menos un 94 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 (GQLNHILGILGDPDQED), un 95 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, un 96 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, al menos un 97 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, al menos un 98 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, al menos un 99 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 o un 100 % homólogo o idéntico a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 según se determina utilizando el software estándar de proteína-proteína BLAST [blastp] del NCBI, en donde el ácido aspártico en la posición X_1 y X_2 no es reemplazable por otro aminoácido.

Los péptidos que no son 100% homólogos a las secuencias descritas en esta memoria pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones conservativas o no conservativas.

La expresión "sustitución conservativa", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al reemplazo de un aminoácido presente en la secuencia nativa en el péptido por un aminoácido que se produce de forma natural o no natural o un peptidomimético que tiene propiedades estéricas similares. En el caso de que la cadena lateral del aminoácido nativo a reemplazar sea polar o hidrofóbica, la sustitución conservativa debe ser con un aminoácido que se produce de forma natural, un aminoácido que se produce de forma no natural o con un resto peptidomimético que también es polar o hidrofóbico (además de tener las mismas propiedades estéricas que la cadena lateral del aminoácido reemplazado).

Dado que los aminoácidos que se producen de forma natural se agrupan típicamente de acuerdo con sus propiedades, las sustituciones conservativas por aminoácidos que se producen de forma natural pueden determinarse fácilmente teniendo en cuenta el hecho de que, de acuerdo con la divulgación, se consideran sustituciones conservativas el reemplazo de aminoácidos cargados por aminoácidos no cargados estéricamente similares.

Para producir sustituciones conservativas por aminoácidos que se producen de forma no natural, también es posible

utilizar análogos de aminoácidos (aminoácidos sintéticos) bien conocidos en la técnica. Un peptidomimético de los aminoácidos que se producen de forma natural está bien documentado en la bibliografía conocida por el experto en la materia.

5 Cuando se realicen sustituciones conservativas, el aminoácido de sustitución debe tener el mismo o un grupo funcional similar en la cadena lateral que el aminoácido original.

La frase "sustituciones no conservativas", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al reemplazo del aminoácido como está presente en la secuencia original por otro aminoácido que se produce de forma natural o no natural, que tiene diferentes propiedades electroquímicas y/o estéricas. Por lo tanto, la cadena lateral del aminoácido de sustitución puede ser significativamente más grande (o más pequeña) que la cadena lateral del aminoácido nativo que se está sustituyendo y/o puede tener grupos funcionales con propiedades electrónicas significativamente diferentes a las del aminoácido que está siendo sustituido. Ejemplos de sustituciones no conservativas de este tipo incluyen la sustitución de fenilalanina o ciclohexilmetilglicina por alanina, isoleucina por glicina o -NH-CH[(-CH₂)₅-COOH] -CO- por ácido aspártico. Las sustituciones no conservativas que caen dentro del alcance de la presente divulgación son aquellas que constituyen un polipéptido que es capaz de prevenir la translocación de ERK en el núcleo.

Preferiblemente, los péptidos de la presente divulgación están típicamente desprovistos de la secuencia Leu-ácido aspártico.

Además, preferiblemente el aminoácido N terminal del péptido es glicina.

El término "péptido", tal como se utiliza en esta memoria, abarca péptidos nativos (productos de degradación, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (péptidos sintéticamente sintetizados típicamente), así como peptoides y semipeptoides, que son análogos de péptidos que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean más estables mientras están en un cuerpo o sean más capaces de penetrar en las células. Modificaciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación del enlace peptídico, modificaciones de la cadena principal y modificación del residuo. Métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd. Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Detalles adicionales a este respecto se proporcionan en esta memoria más adelante.

Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) dentro del péptido pueden estar sustituidos, por ejemplo, con enlaces amida N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces éster (-C(=O)-O-), enlaces cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces sulfinilmetileno (-S(=O)-CH₂-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo (p. ej., metilo), enlaces amina (-CH₂-NH-), enlaces sulfuro (-CH₂-S-), enlaces etileno (-CH₂-CH₂-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), dobles enlaces olefínicos fluorados (-CF=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", naturalmente presente en el átomo de carbono.

35 Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varios (2-3) enlaces al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden estar sustituidos con aminoácidos aromáticos no naturales, tales como el ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic), naftilalanina, derivados de Phe metilados en el anillo, derivados halogenados de Phe u O-metil-Tyr.

40 Los péptidos de algunos aspectos de la invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (p. ej., ácidos grasos, hidratos de carbono complejos, etc.).

El término "aminoácido" o "aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos que se producen de forma natural; esos aminoácidos a menudo se modifican post-traduccion in vivo, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, pero no se limitan a ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto D- como L-aminoácidos.

Las Tablas 1 y 2 que figuran a continuación enumeran los aminoácidos que se producen de forma natural (Tabla 1) y los aminoácidos no convencionales o modificados (p. ej., sintéticos, Tabla 2), que se pueden utilizar con algunos aspectos de la divulgación.

50

Tabla 1

Símbolo de una letra	Abreviatura de tres letras	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina

ES 2 717 446 T3

N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido Glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina
X	Xaa	Cualquier aminoácido como antes

Tabla 2

Código	Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional
Hyp	hidroxiprolina	Orn	ornitina
Norb	carboxilato de aminonorbornilo	Abu	ácido α -aminobutírico
Cpro	carboxilato de aminociclopropano	Dala	D-alanina
Narg	N-(3-guanidinopropil)glicina	Darg	D-arginina
Nasn	N-(carbamilmetil)glicina	Dasn	D-asparagina
Nasp	N-(carboximetil)glicina	Dasp	ácido D-aspártico
Ncys	N-(tiometil)glicina	Dcys	D-cisteína
Nglu	N-(2-carbamiletal)glicina	Dglu	D-glutamina
Nglu	N-(2-carboxietil)glicina	Dglu	ácido D-glutámico
Nhis	N-(imidazoliletal)glicina	Dhis	D-histidina
Nile	N-(1-metilpropil)glicina	Dile	D-isoleucina
Nleu	N-(2-metilpropil)glicina	Dleu	D-leucina
Nlys	N-(4-aminobutil)glicina	Dlys	D-lisina
Nmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Dmet	D-metionina
Norn	N-(3-aminopropil)glicina	Dorn	D-ornitina
Nphe	N-bencilglicina	Dphe	D-fenilalanina
Nser	N-(hidroximetil)glicina	Dpro	D-prolina
Nthr	N-(1-hidroxietil)glicina	Dser	D-serina

ES 2 717 446 T3

Nhtrp	N-(3-indoliletil)glicina	Dthr	D-treonina
Ntyr	N-(p-hidroxifenil)glicina	Dtrp	D-triptófano
Nval	N-(1-metiletil)glicina	Dtyr	D-tirosina
Nmgly	N-metilglicina	Dval	D-valina
Nmala	L-N-metilalanina	Dnmala	D-N-metilalanina
Nmarg	L-N-metilasparagina	Dnmasn	D-N-metilasparagina
Nmasp	ácido L-N-metilaspartico	Dnmasp	aspartato de D-N-metilo
Nmcys	L-N-metilcisteína	Dnmcys	D-N-metilcisteína
Nmglu	L-N-metilglutamina	Dnmglu	D-N-metilglutamina
Nmglu	ácido L-N-metilglutámico	Dnmglu	glutamato de D-N-metilo
Nmhis	L-N-metilhistidina	Dnmhis	D-N-metilhistidina
Nmile	L-N-metilisoleucina	Dnmile	D-N-metilisoleucina
Nmleu	L-N-metil-leucina	Dnmleu	D-N-metil-leucina
Nmlys	L-N-metil-lisina	Dnmlys	D-N-metil-lisina
Nmmet	L-N-metilmetionina	Dnmmet	D-N-metilmetionina
Nmorn	L-N-metilornitina	Dnmorn	D-N-metilornitina
Nmphe	L-N-metilfenilalanina	Dnmphe	D-N-metilfenilalanina
Nmpro	L-N-metilprolina	Dnmpro	D-N-metilprolina
Nmser	L-N-metilserina	Dnmser	D-N-metilserina
Nmthr	L-N-metiltreonina	Dnmthr	D-N-metiltreonina
Nmtrp	L-N-metilriptófano	Dnmtrp	D-N-metilriptófano
Nmtyr	L-N-metilrosina	Dnmtyr	D-N-metilrosina
Nmval	L-N-metilvalina	Dnmval	D-N-metilvalina
Nmle	L-N-metilorleucina	Nle	L-norleucina
Nmva	L-N-metilorvalina	Nva	L-norvalina
Nmetg	L-N-metil-etilglicina	Etg	L-etilglicina
Nmtbug	L-N-metil-t-butilglicina	Tbug	L-t-butilglicina
Nmlphe	L-N-metil-homofenilalanina	Hphe	L-homofenilalanina
Nmanap	N-metil- α -naftilalanina	Anap	α -naftilalanina
Nmpen	N-metilpenicilamina	Pen	penicilamina
Nmgabu	γ -aminobutirato de N-metilo	Gabu	ácido γ -aminobutírico
Nmchexa	N-metil-ciclohexilalanina	Chexa	ciclohexilalanina
Nmcpen	N-metil-ciclopentilalanina	Cpen	ciclopentilalanina
Nmaabu	α -amino- α -metilbutirato de N-metilo	Aabu	α -amino- α -metilbutirato
Nmaib	α -amino-isobutirato de N-metilo	Aib	ácido α -aminoisobutírico
Marg	L- α -metilarginina	Dmarg	D- α -metilarginina
Masn	L- α -metilasparagina	Dmasn	D- α -metilasparagina
Masp	L- α -metilaspartato	Dmasp	D- α -metilaspartato
Mcys	L- α -metilcisteína	Dmcys	D- α -metilcisteína
Mglu	L- α -metilglutamina	Dmglu	D- α -metilglutamina

Mglu	L- α -metilglutamato	Dmglu	ácido D- α -metilglutámico
Mhis	L- α -metilhistidina	Dmhis	D- α -metilhistidina
Mile	L- α -metilisoleucina	Dmile	D- α -metilisoleucina
Mleu	L- α -metil-leucina	Dmleu	D- α -metil-leucina
Mlys	L- α -metil-lisina	Dmlys	D- α -metil-lisina
Mmet	L- α -metilmetionina	Dmmet	D- α -metilmetionina
Morn	L- α -metilornitina	Dmorn	D- α -metilornitina
Mphe	L- α -metilfenilalanina	Dmphe	D- α -metilfenilalanina
Mpro	L- α -metilprolina	Dmpro	D- α -metilprolina
Mser	L- α -metilserina	Dmser	D- α -metilserina
Mthr	L- α -metiltreonina	Dmthr	D- α -metiltreonina
Mtrp	L- α -metiltriptófano	Dmtrp	D- α -metiltriptófano
Mtyr	L- α -metiltirosina	Dmtyr	D- α -metiltirosina
Mval	L- α -metilvalina	Dmval	D- α -metilvalina
Mnva	L- α -metilnorvalina	Ncbut	N-ciclobutilglicina
Metg	L- α -metiletilglicina	Nchep	N-cicloheptilglicina
Mtbug	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Nchex	N-ciclohexilglicina
Mhphe	L- α -metil-homofenilalanina	Ncdec	N-ciclododecilglicina
Manap	α -metil- α -naftialanina	Ncdod	N-ciclododecilglicina
Mpen	α -metilpenicilamina	Ncoct	N-ciclooctilglicina
Mgabv	γ -aminobutirato de α -metilo	Ncpro	N-ciclopropilglicina
Mchexa	α -metil-ciclohexilalanina	Ncund	N-cicoundecilglicina
Mcpen	α -metil-ciclopentilalanina	Naeg	N-(2-aminoetil)glicina
Nubhm	N-(N-2,2-difeniletíl)carbamilmetil-glicina	Nbhm	N-(2,2-difeniletíl)glicina
Nubhe	N-(N-3,3-difenilpropil)carbamilmetil-glicina	Nbhe	N-(3,3-difenilpropil)glicina
Tic	ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico	Nmbc	1-carboxi-1-(2,2-difeniletilamino)ciclopropano
pThr	fosfotreonina	pSer	fosfoserina
	O-metil-tirosina	pTyr	fosfotirosina
	Hidroxil-lisina		ácido 2-aminoadípico

Los péptidos de algunos aspectos de la divulgación se utilizan preferiblemente en una forma lineal, aunque se apreciará que en los casos en los que la ciclación no interfiera gravemente en las características del péptido, también se pueden utilizar formas cíclicas del péptido.

- 5 Dado que los presentes péptidos se utilizan preferiblemente en agentes terapéuticos o de diagnóstico que requieren que los péptidos estén en forma soluble, los péptidos de algunos aspectos de la divulgación incluyen preferiblemente uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales, que incluyen, pero no se limitan a serina y treonina, que son capaces de aumentar la solubilidad del péptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

Ejemplos de modificaciones adicionales incluyen la amidación C-terminal.

- 10 Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de los péptidos ERK, uno solo, una porción o incluso todos los aminoácidos en el péptido pueden ser D-aminoácidos que no son susceptibles a la actividad proteolítica enzimática y pueden mejorar en conjunto el uso de los péptidos de la divulgación como productos farmacéuticos. Los péptidos de la presente divulgación se pueden unir (covalentemente o no covalentemente) a un agente penetrante.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente penetrante" se refiere a un agente que potencia la translocación de cualquiera de los péptidos unidos a través de una membrana celular.

De acuerdo con un aspecto, el agente penetrante es un péptido y está unido a la ERK (ya sea directamente o no directamente) a través de un enlace peptídico. Preferiblemente, el agente penetrante está unido al extremo N del péptido derivado de ERK.

Típicamente, los agentes penetrantes peptídicos tienen una composición de aminoácidos que contiene una alta abundancia relativa de aminoácidos cargados positivamente, tales como lisina o arginina, o tienen secuencias que contienen un patrón alternativo de aminoácidos polares/cargados y aminoácidos hidrofóbicos no polares.

A modo de ejemplo no limitativo, se pueden utilizar secuencias de péptidos penetrantes en las células (CPP, por sus siglas en inglés) con el fin de potenciar la penetración intracelular. Los CPPs pueden incluir versiones cortas y largas del dominio de transducción de proteínas (PTD) de la proteína TAT del VIH, tal como, por ejemplo, YARAAARQARA (SEQ ID NO: 5), YGRKKRR (SEQ ID NO: 8), YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 9) o RRQRR (SEQ ID NO: 10)]. Sin embargo, la divulgación no está tan limitada, y se puede utilizar cualquier agente penetrante adecuado, como es conocido por los expertos en la técnica.

Cuando los péptidos de la presente divulgación se unen a péptidos que penetran en las células, se contempla que el péptido de longitud completa no sea mayor que 25 aminoácidos, no sea mayor que 26 aminoácidos, no sea mayor que 27 aminoácidos, no sea mayor que 28 aminoácidos, no sea mayor que 29 aminoácidos o no sea mayor que 30 aminoácidos.

Otro método para potenciar la penetración celular es a través de la miristoilación N-terminal. En esta modificación de proteínas, un grupo miristoilo (derivado del ácido mirístico) se une covalentemente a través de un enlace amida al grupo alfa-amino de un aminoácido N-terminal del péptido.

Los péptidos de algunos aspectos de la divulgación pueden sintetizarse mediante cualquier técnica que sea conocida por los expertos en la técnica de la síntesis de péptidos. Para la síntesis de péptidos en fase sólida se puede encontrar un resumen de las muchas técnicas en J. M. Stewart y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 y J. Meienhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 2, p. 46, Academic Press (Nueva York), 1973. Para la síntesis de soluciones clásicas, véase G. Schroder y K. Lupke, *The Peptides*, vol. 1, Academic Press (Nueva York), 1965.

En general, estos métodos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos adecuadamente protegidos a una cadena peptídica en crecimiento. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido está protegido por un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido o derivado puede unirse entonces a un soporte sólido inerte o utilizarse en solución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) adecuadamente protegido, en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. El grupo protector se separa luego de este residuo de aminoácido recién añadido y luego se añade el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido), y así sucesivamente. Después de que todos los aminoácidos deseados han sido enlazados en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) se separan de forma secuencial o concurrente, para proporcionar el compuesto peptídico final. Mediante la simple modificación de este proceso general, es posible añadir más de un aminoácido a la vez a una cadena en crecimiento, por ejemplo, al acoplar (en condiciones que no racemizan los centros quirales) un tripéptido protegido con un dipéptido adecuadamente protegido para formar, después de la desprotección, un pentapéptido, y así sucesivamente. Una descripción adicional de la síntesis de péptidos se describe en la patente de EE.UU. N° 6.472.505.

Un método preferido para preparar los compuestos peptídicos de algunos aspectos de la divulgación implica la síntesis de péptidos en fase sólida.

La síntesis de péptidos a gran escala se describe en Andersson *Biopolymers* 2000; 55(3):227-50.

Dado que los péptidos de la presente divulgación son capaces de inhibir específicamente las actividades nucleares de ERK sin modular sus actividades citoplásmicas, estos péptidos pueden utilizarse para inhibir las actividades nucleares de ERK (p. ej., la proliferación) sin dañar otras actividades citoplásmicas relacionadas con la ERK en las células. Por lo tanto, los péptidos de este aspecto de la presente divulgación pueden servir como agente terapéutico para enfermedades hiperproliferativas, tales como el cáncer, sin tener los efectos secundarios de otros inhibidores de ERK.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos descritos en esta memoria, para tratar con ello el cáncer.

Ejemplos de cánceres que pueden tratarse con los inhibidores del proteasoma específicos para 19S de este aspecto de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a carcinoma adrenocortical hereditario; cáncer de vejiga; cáncer de mama; cáncer de mama ductal; cáncer de mama, intraductal invasivo; cáncer de mama, esporádico;

5 cáncer de mama, susceptibilidad a; cáncer de mama, tipo 4; cáncer de mama, tipo 4; cáncer de mama-1; cáncer de mama-3; cáncer de mama y ovario; linfoma de Burkitt; carcinoma cervical; adenoma colorrectal; cáncer colorrectal; cáncer colorrectal, no poliposis hereditaria, tipo 1; cáncer colorrectal, no poliposis hereditaria, tipo 2; cáncer colorrectal, no poliposis hereditaria, tipo 3; cáncer colorrectal, no poliposis hereditaria, tipo 6; cáncer colorrectal, no poliposis hereditaria, tipo 7; dermatofibrosarcoma protuberante; carcinoma endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico, fibrosarcoma, glioblastoma multiforme; tumores glómicos, múltiples; hepatoblastoma; cáncer hepatocelular; carcinoma hepatocelular; leucemia, linfoblástica aguda; leucemia, mielóide aguda; leucemia, mielóide aguda con eosinofilia; leucemia aguda no linfocítica; leucemia, mielóide crónica; síndrome de Li-Fraumeni; liposarcoma, cáncer de pulmón; cáncer de pulmón de células pequeñas; linfoma no Hodgkin; síndrome de la familia del cáncer linfático II; tumor de células germinales masculinas; leucemia de mastocitos; tiroides medular; meduloblastoma; melanoma, melanoma maligno, meningioma; neoplasia endocrina múltiple; mieloma múltiple, tumor maligno mielóide, predisposición a; mixosarcoma, neuroblastoma; osteosarcoma; cáncer de ovarios; cáncer de ovarios, seroso; carcinoma de ovarios; tumores ováricos del cordón sexual; cáncer de páncreas; tumores endocrinos pancreáticos; paraganglioma familiar no cromafínico; pilomatricoma; tumor hipofisario, invasivo; adenocarcinoma de próstata; 10 cáncer de próstata; carcinoma de células renales, papilar, familiar y esporádico; retinoblastoma; síndrome de predisposición rabdoide, familiar; tumores rabdoides; rhabdomyosarcoma; cáncer de pulmón de células pequeñas; sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, cabeza y cuello; leucemia linfoblástica aguda de células T; síndrome de Turcot con glioblastoma; tilosis con cáncer de esófago; carcinoma de cérvix uterino, tumor de Wilms, tipo 2; y tumor de Wilms, tipo 1, y similares.

20 De acuerdo con un aspecto específico, el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de cuello uterino.

De acuerdo con otro aspecto, el melanoma es melanoma resistente a PLX4032 y/o U0126.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en esta memoria con otros componentes químicos tales como soportes y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En esta memoria, la expresión "ingrediente activo" se refiere a los péptidos descritos en esta memoria responsables del efecto biológico.

30 En lo sucesivo, las expresiones "soporte fisiológicamente aceptable" y "soporte farmacéuticamente aceptable", que se pueden utilizar indistintamente, se refieren a un soporte o un diluyente que no provoca una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

35 En esta memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos de excipientes, sin limitación, incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

40 Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como en la cavidad intratecal, intraventricular directa, intracardíaca, p. ej., en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, inyecciones intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

45 Alternativamente, la composición farmacéutica se puede administrar de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la composición farmacéutica directamente en la región del tejido de un paciente.

Composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procesos convencionales de mezcladura, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

50 Composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

55 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de sal fisiológica. Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos soportes permiten que la composición farmacéutica se formule en forma de tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas, suspensiones y similares, para la ingesta oral por parte de un paciente. Preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden hacer utilizando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, fécula de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para uso en un dispensador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en esta memoria puede formularse para administración parenteral, p. ej., mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis con opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos pueden prepararse como suspensiones de inyección apropiadas a base de agua o aceite. Disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., una solución a base de agua, estéril y apirógena, antes de su uso.

La composición farmacéutica de la presente divulgación también puede formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, p. ej., bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente divulgación incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de ingredientes activos (péptido) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej., cáncer) o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la vista de la descripción detallada proporcionada en esta memoria.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo in vitro y celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para lograr una concentración o un título, tal como se detalla más adelante. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos.

- 5 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en esta memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares in vitro, en cultivos celulares o animales experimentales, tal como se detalla más adelante. Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. El médico individual puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en función del estado del paciente. (Véase, p. 10 ej., Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1, pág. 1).

- 15 La cantidad y el intervalo de dosis pueden ajustarse individualmente para garantizar que los niveles de sangre o tejido del ingrediente activo sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración mínima efectiva, MEC – por sus siglas en inglés). La MEC variará para cada una de las preparaciones, pero puede estimarse a partir de datos in vitro. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden utilizar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

- 20 Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola administración o de una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que puede durar desde varios días hasta varias semanas o hasta que se realice la cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del criterio del médico que prescribe, etc.

- 25 Tal como se mencionó, se pueden utilizar varios modelos animales para testar la eficacia de los péptidos de la presente divulgación. Un modelo de ratón transgénico para el cáncer (p. ej., cáncer de mama), tal como el modelo erb (Shah N., et al., 1999, Cancer Lett. 146: 15-2; Weistein E.J., et al., 2000, Mol. Med. 6: 4-16) o el modelo MTV/myc (Stewart TA et al., 1984, Cell, 38: 627-637), el modelo c-myc (Leder A., et al., 1986, Cell, 45: 485-495), el modelo v-Ha-ras o c-neu (Elson A y Leder P, 1995, J. Biol. Chem. 270: 26116-22) se pueden utilizar para testar la capacidad de los péptidos de la presente divulgación para suprimir el crecimiento del tumor in vivo.

- 30 Para la formación de tumores sólidos, a ratones atímicos pueden inyectarse células cancerosas humanas o animales (p. ej., ratón), tales como las derivadas de cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata o cáncer de tiroides, y después de la formación de tumores cancerosos, los ratones pueden someterse a la administración intra-tumoral y/o sistémica de los péptidos.

- 35 Las siguientes líneas celulares (provistas de sus números de acceso de ATCC) se pueden utilizar para cada uno de los tipos de modelo de cáncer:

Para el cáncer de mama:

Líneas celulares de cáncer de mama humano - MDA-MB-453 (ATCC N° HTB-131), MDA-MB-231 (ATCC N° HTB-26), BT474 (ATCC N° HTB-20), MCF-7 (ATCC N° HTB-22), MDA-MB-468.

Para el cáncer de ovarios:

- 40 **Líneas celulares de cáncer de ovario humano** - SKOV3 (ATCC N° HTB-77), OVCAR-3 HTB-161), OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8 e IGROV1;

Para el cáncer de próstata:

Líneas celulares de cáncer de próstata humano - DU-145 (ATCC N° HTB-81), PC-3 (ATCC N° CRL-1435);

Para el cáncer de tiroides:

- 45 **Líneas celulares de cáncer de tiroides derivadas de seres humanos** - FTC-133, KI, K2, NPA87, K5, WR082-1, AR089-1, DR081-1;

Para el cáncer de pulmón:

- 50 **Células de carcinoma de pulmón de ratón LL/2 (LLC1) (carcinoma de pulmón de Lewis)** - Estas células derivan de un ratón con un tumor que resulta de una implantación de carcinoma de pulmón de Lewis primario. Las células son tumorigénicas en ratones C57BL, expresan el antígeno H-2b y se utilizan ampliamente como modelo para la metástasis y para estudiar los mecanismos de los agentes quimioterapéuticos del cáncer (Bertram JS, et al., 1980, Cancer Lett. 11: 63-73; Sharma S, et al. 1999, J. Immunol. 163: 5020-5028).

Para el melanoma:

Células B16-F10 de ratón (Melanoma) - las células derivan de un melanoma de ratón (C57BL/6J) (Briles EB, et al., 1978, J. Natl. Cancer Inst. 60: 1217-1222).

5 Las células cancerosas se pueden cultivar en un medio de cultivo de tejidos, tal como DMEM, con L-glutamina 4 mM ajustado para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y 4,5 g/L de glucosa, complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10%, de acuerdo con procedimientos conocidos (p. ej., tal como se describe en los protocolos ATCC).

10 **Formación de tumores en modelos animales mediante la administración de células cancerosas** - Ratonés atímicos *nu/nu* (p. ej., ratones hembras) se pueden adquirir de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los tumores pueden formarse por inyección subcutánea (s.c.) de células cancerosas (p. ej., 2×10^6 células en 100 μ l de PBS por ratón). Luego se deja que los tumores crezcan *in vivo* durante varios días (p. ej., 6-14 días) hasta que alcancen un tamaño detectable de aproximadamente 0,5 cm de diámetro. Se apreciará que la inyección de células cancerosas en un modelo animal puede realizarse en el órgano del cual se deriva la línea celular (p. ej., tejido mamario para cáncer de mama, ovario para cáncer de ovarios) o se puede inyectar en un tejido irrelevante como el pata trasera del ratón.

15 Para testar el efecto de los péptidos de la presente divulgación sobre la inhibición del crecimiento del tumor, los agentes pueden administrarse al modelo animal que porta el tumor localmente en el sitio del tumor o sistémicamente, mediante inyección intravenosa de infusión, p. ej., a través de la vena de la cola. El tiempo de administración puede variar desde inmediatamente después de la inyección de la línea celular cancerosa (p. ej., por administración sistémica) o en períodos de tiempo predeterminados después de la aparición del tumor sólido (p. ej., hasta el sitio de formación del tumor, cada 3 días durante 3 - 10 veces, tal como se describe en Ugen KE et al., Cancer Gene Ther. 9 de junio de 2006; [Epub antes de la impresión]).

Se apreciará que la administración también puede efectuarse utilizando una construcción de ácido nucleico diseñada para expresar el agente peptídico (p. ej., un vector viral), pADN desnudo y/o liposomas.

25 Los tamaños de los tumores se miden de dos a tres veces por semana. Los volúmenes de los tumores se calculan utilizando la longitud y la anchura del tumor (en milímetros). El efecto del tratamiento se puede evaluar comparando el volumen del tumor utilizando análisis estadísticos, tales como el ensayo *t* de Student. Además, los análisis histológicos se pueden realizar utilizando marcadores típicos para cada tipo de cáncer.

30 De acuerdo con otro aspecto, los agentes de la presente divulgación se administran conjuntamente o se formulan conjuntamente con otros agentes quimioterapéuticos y/o agentes antiinflamatorios conocidos. Además, pueden administrarse con otras terapias conocidas, que incluyen, pero no se limitan a quimioterapia, radioterapia, fototerapia y terapia fotodinámica, cirugía, terapia nutricional, terapia ablativa, radioterapia y quimioterapia combinadas, braquiterapia, terapia con haz de protones, inmunoterapia, terapia celular y radioterapia quirúrgica con haz de fotones.

35 Ejemplos de otros agentes quimioterapéuticos que pueden administrarse conjuntamente/formularse conjuntamente con los agentes de la presente invención incluyen, pero no se limitan a Acivicina; Aclarubicina; Acodazol Hidrocloruro; Acronina; Adriamicina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametatrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramycin; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Bisantreno Hidrocloruro; Bisnafida Dimesilato; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sodio; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimero; Carboplatino; Carmustina; Carubicina Hidrocloruro; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Crisnatol Mesilato; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Daunorubicina Hidrocloruro; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Dezaguanina Mesilato; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Doxorubicina Hidrocloruro; Droloxifeno; Droloxifeno Citrato; Dromostanolona Propionato; Duazomicina; Edatrexato; Eflornitina Hidrocloruro; Elsamitricina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Epirubicina Hidrocloruro; Erbulozol; Esorubicina Hidrocloruro; Estramustina; Estramustina Fosfato Sódico; Etanidazol; Etopósido; Etopósido Fosfato; Etoprina; Fadrozol Hidrocloruro; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fludarabina Fosfato; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Gemcitabina Hidrocloruro; Hidroxiurea; Idarubicina Hidrocloruro; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1b; Iproplatino; irinotecán Hidrocloruro; Lanreotida Acetato; Letrozol; Leuprolida Acetato; Liarozol Hidrocloruro; Lometrexol Sodio; Lomustina; Losoxantrona Hidrocloruro; Masoprocol; Maitansina; Mecloretamina Hidrocloruro; Megestrol Acetato; Melengestrol Acetato; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedpa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Mitoxantrona Hidrocloruro; Ácido Mifofenólico; Nocodazol; Nogalamina; Ormaplatino; Oxisurano; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Peplomicina Sulfato; Perfosfamida; Pipobromano; Pipsulfan; Piroxantrona Hidrocloruro; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sodio; Porfomicina; Predinimustina; Procarbazona Hidrocloruro; Puomicina; Puomicina Hidrocloruro; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Safingol Hidrocloruro; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sodio; Esparsomicina; Espirogermanio Hidrocloruro; Espiromustina; Espiroplatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Sulofenur; Talisomicina; Taxol; Tecogalan Sodio; Tegafur; Teloxantrona Hidrocloruro; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona;

5 Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofuirina; Tirapazamina; Topotecan Hidrocloruro; Toremifeno Citrato; Trestolona Acetato; Triciribina Fosfato; Trimetrexato; Trimetrexato Glucuronato; Triptorelina; Tubulozol Hidrocloruro; Uracilo Mostaza; Uredopa; Vapreotida; Verteporfina; Vinblastina Sulfato; Vincristina Sulfato; Vindesina; Vindesina Sulfato; Vinepidina Sulfato; Vinglicinato Sulfato; Vinleurosina Sulfato; Vinorelbina Tartrato; Vinrosidina Sulfato; Vinzolidina Sulfato; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Zorubicina Hidrocloruro. Agentes antineoplásicos adicionales incluyen los descritos en el Capítulo 52, Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner), y la introducción al mismo, 1202-1263, "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, Octava Edición, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division).

10 Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también se pueden acomodar mediante un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser del etiquetado aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU. para fármacos recetados o de un folleto de producto aprobado. Composiciones que comprenden una preparación de la divulgación formulada en un soporte farmacéutico compatible también se pueden preparar, disponer en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, tal como se detalla adicionalmente arriba.

15 El término "tratar" se refiere a inhibir, prevenir o detener el desarrollo de una patología (enfermedad, trastorno o afección) y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que pueden utilizarse diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología, y de manera similar, pueden utilizarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "prevenir" se refiere a evitar que se produzca una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que puede estar en riesgo de contraer la enfermedad, pero a quien aún no se ha diagnosticado que tiene la enfermedad.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "sujeto" incluye mamíferos, preferiblemente seres humanos de cualquier edad que padecen la patología. Preferiblemente, este término abarca individuos que están en riesgo de desarrollar la patología.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos y las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "incluyendo", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a".

35 La expresión "consiste en" significa "que incluyen y se limitan a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, el método o la estructura reivindicado.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, retardar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

45 Se aprecia que determinadas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de aspectos separados, también pueden proporcionarse en combinación en un único aspecto. A la inversa, también se pueden proporcionar diversas características de la divulgación, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, por separado o en cualquier sub-combinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la divulgación. Determinadas características descritas en el contexto de diversos aspectos no deben considerarse características esenciales de esos aspectos, a menos que el aspecto sea inoperante sin esos elementos.

Diversos aspectos y aspectos de la presente invención, tal como se describe anteriormente en esta memoria y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones que figura más adelante, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

55

Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos que, junto con las descripciones anteriores, ilustran algunos aspectos de la divulgación de una manera no limitativa.

En general, la nomenclatura utilizada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Técnicas de este tipo se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías, tales como las que se recogen en las patentes de EE.UU. N.ºs 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); innumerables disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

Materiales y métodos

Péptidos: Los 4 péptidos utilizados fueron: (i) Scr - NILSQELPHSGDLQIG (SEQ ID NO: 1); (ii) SPS - GQLNHILGILGSPSQED (SEQ ID NO: 2); (iii) APA - GQLNHILGILGAPAQED (SEQ ID NO: 3); y (iv) EPE - GQLNHILGILGEPEQED (SEQ ID NO: 6). Cada uno de ellos se conjugó en su extremo N con una secuencia TAT modificada (YARAAARQARA²² SEQ ID NO: 5), o con ácido mirístico²³ y se amidó en el extremo C. Para estudiar la tasa de absorción, el péptido SPS se conjugó con lisina-biotina en su extremo C. Todos los péptidos se adquirieron de "Peptide 2" (Chantilly, VA, EE.UU.), tenían una pureza de más del 85% y se mantuvieron como solución madre de DMSO 100 mM a -20°C, hasta su uso.

Células: Se cultivaron células HeLa (derivadas de cáncer cervical), MDA-MB-231 (cáncer de mama transformado por Ras), T47D (cáncer de mama Her2 y Ras negativo), DU-145 y PC-3 (cáncer de próstata) en medio DMEM o RPMI con suero de bovino fetal (FBS) al 10%. Las células inmortalizadas, no transformadas, de ovario de hámster chino (CHO) se cultivaron en DMEM/F-12 + FBS al 10%. Se obtuvieron las células HCT-116 (cáncer de colon), UACC-62 (línea de melanoma estable con B-Raf y muchas otras mutaciones oncogénicas), HOP62 (cáncer de pulmón) y NCI-H23 (cáncer de pulmón) de NCI-60 adquirido por La Unidad de Servicio Biológico de nuestro Instituto. Se utilizaron células de melanoma primario de paso bajo (menos de 10) con mutación B-Raf (A2185, A2352, A2024) y células mamarias inmortalizadas no transformadas (HB2). Líneas celulares de melanoma establecidas que portan la mutación B-Raf (A2577, A2600, LOXIMVI) fueron de ATCC y también se utilizaron células A2058. Todas estas células de melanoma se cultivaron en RPMI complementado con FBS al 10%; y las células HB2 se cultivaron en el mismo medio complementado con 10 µg/ml de insulina y 0,5 µg/ml de hidrocortisona. Células MCF-10A de mama inmortalizadas, no transformadas (ATCC) se cultivaron en DMEM/F12 con suero de caballo donante al 5%, 20 ng/ml de EGF, 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona y 100 ng/ml de cólera toxina (todos los reactivos de Sigma, Israel).

Reactivos y Anticuerpos: Acetato de tetradecanoil forbol (TPA), EGF, avidina-FITC y TGF-diamino-2-fenilindol (DAPI), 3,3'-diaminobencidina (DAB) se obtuvieron de Sigma (St Louis, MI). Los Abs anti Elk1 (gElk1) y gRSK1 generales fueron de Santa Cruz Biotechnology (CA, EE.UU.). Abs anti pElk-1 (Ser383), PARP-1, pAKT (Ser473) y pRSK (Ser381) fueron de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE.UU.). El Ab anti Imp7 era de Abnova (Taipei, Taiwán). Los Abs anti (pTEY-ERK), gERK, gAKT, gp38, pp38 (TGY), gJNK y pJNK (TPY) fueron de Sigma (Rehovot, Israel). Los Abs anti fosfo SPS-ERK policlonales y monoclonales se produjeron en la Unidad de Servicio Biológico del Instituto de Ciencias Weizmann (Rehovot, Israel). Los conjugados de Ab fluorescentes secundarios fueron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). El Ab secundario conjugado a peroxidasa (Simple Stained Max PO) era de Nichirei Biosciences (Japón).

Microscopía de Fluorescencia: Células se fijaron en paraformaldehído al 3% en PBS (20 min, 23°C), y luego se

permeabilizaron y bloquearon con Triton X-100 al 0,2% en PBS-BSA (2%) durante 20 min a 23°C. Las células fijadas se incubaron secuencialmente con Abs apropiados (diluidos en 10 µg/ml de BSA/PBS) durante 1 h, seguido de Abs Cy-2 o secundario conjugado con rodamina y DAPI (diluido en BSA/PBS, 1:200) durante 1 h. Para seguir la localización subcelular de los péptidos conjugados con biotina, las células se incubaron con Avidina-FITC (diluida en BSA/PBS 1:400) y DAPI. Las rodajas se analizaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón, 600 aumentos).

Transferencia Western y co-inmunoprecipitación: (i) *Preparación de extractos celulares para Transferencia Western:* las células se aclararon dos veces con PBS enfriado con hielo y se rasparon en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA; 137 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,4), 10% de glicerol, Triton X-100 al 1%, desoxicolato al 0,5%, SDS al 0,1%, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM y 20 µM de leupeptina). Los extractos se centrifugaron (20.000 xg, 15 min, 4°C) y los sobrenadantes se analizaron adicionalmente mediante transferencia Western. Los borrones se desarrollaron con Abs anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante. (ii) *Co-inmunoprecipitación:* las células se aclararon dos veces con PBS enfriado con hielo y se rasparon en tampón H (β-glicerofosfato 50 mM (pH 7,3), EGTA 1,5 mM, EDTA 1 mM, ditiotretitol 1 mM, vanadato de sodio 0,1 mM, benzamidina 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de pepstatina). Los extractos se trataron con ultrasonidos (50 W, 2x 7 s) y se centrifugaron (15.000 xg, 15 min, 4°C). Los extractos celulares se incubaron durante la noche con los Abs apropiados preconjugados en perlas de A/G (1 h, 23°C). Posteriormente, las perlas se lavaron 3 veces con tampón de lavado de co-inmunoprecipitación (HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl₂ 2 mM), EGTA 2 mM, NaCl 150 mM y Triton-X-100 al 0,1%) y una vez con PBS, y se sometieron a análisis de transferencia Western.

Ensayos de morfología y apoptosis (TUNEL): Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio en una placa de 12 pocillos al 25% de confluencia con medio que contenía FCS al 1%. Los péptidos (EPE o Scr), DMSO o U0126 en una concentración final de 10 µM se añadieron después de 4 h (considerado como tiempo "0"). La tinción de TUNEL se realizó a las 24 h después del tratamiento de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, Nutley, NJ, EE.UU.). En resumen, se retiró el medio y las células se fijaron con 3% de paraformaldehído (1,5 h, 23°C). Las células se aclararon dos veces con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y citrato de sodio al 0,1% durante 2 min en hielo. Las células se aclararon dos veces con PBS y se añadieron 28 µl de la mezcla de reacción TUNEL (25 µl de marcador TUNEL, 2,5 µl de la enzima TUNEL y 0,1 mg/ml de DAPI) directamente encima del portaobjetos y las células se incubaron durante 16 h en una caja húmeda a 37°C. Los cubreobjetos se aclararon tres veces con PBS y se montaron en portaobjetos de microscopio. Los portaobjetos se secaron y luego se sometieron a adquisición de imágenes mediante un microscopio de fluorescencia. Para el ensayo de morfología, las células se sembraron en aproximadamente el 25% de confluencia en placas de 6 cm con medio que contenía FCS al 1%. Los péptidos (EPE y Scr) o DMSO o U0126 en una concentración final de 10 µM, se añadieron después de 4 h (considerado tiempo 0), 24 h y 48 h. Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio óptico (Olympus BX51) después de 72 h.

Ensayo de proliferación: Todas las células, excepto MCF-10A, se sembraron en placas de células de 12 pocillos en medio de FBS al 1%. Las células MCF-10A se sembraron en su medio completo diluido 5 veces. DMSO, péptido Scr, péptido EPE o U0126 (concentración final de 10 µM en cada caso) se añadieron cuatro horas más tarde a los pocillos apropiados. Todos los días se cambió el medio por uno nuevo que contenía los mismos agentes. El número de células viables se midió mediante un ensayo de Azul de Metileno a las 72 h después de la siembra celular. Poco después, las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 2 h a 23°C, se lavaron una vez con tampón borato 0,1 M a pH 8,5 y se tiñeron con Azul de Metileno al 1% en tampón borato 0,1 M durante 10 min. El color se extrajo mediante la adición de HCl 0,1 M durante 3 h a 23°C y se examinó a 595 nm. Para experimentos a lo largo del tiempo, las células viables se midieron a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después de la siembra celular. Para los experimentos de respuesta a la dosis, los autores de la invención trataron las células con 0,1, 1, 3, 10 o 30 µM de péptidos durante 72 h, tal como se describe arriba.

Preparación y proliferación de células de melanoma resistentes a inhibidores: Células A2352 se complementaron con PLX4032 (inhibidor de B-Raf, 1 µM) o U0126 (inhibidor de MEK, 10 µM) durante 45 días. Las células que sobrevivieron a esta presión inhibitoria fueron tratadas con los siguientes agentes: DMSO, péptido Scr, péptido EPE, U0126 (concentración final de 10 µM cada uno), PLX-4032 (1 µM), wortmanina (inhibidor de PI3K, 0,5 µM), o Taxol (25 ng/ml) y se sometió a un ensayo de proliferación tal como se describe arriba.

Estudios en animales: Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Ciencias Weizmann (Rehovot, Israel). Ratones hembras CD-1 inmunológicamente deficientes (Harlan), de 5-6 semanas de edad, fueron inoculados s.c. en la región del flanco con 2×10^6 células MDA-MB-231, LOXIMVI o HCT-116 en 150 µl de PBS. Ratones SCID hembras (Harlan), de 5-6 semanas de edad, fueron inoculados s.c. en la región del flanco con 10^7 células A2352 en una mezcla de 150 µl de PBS con matrigel (2:1). Se permitió que los tumores se desarrollaran al tamaño de 5-6,5 mm de diámetro ($50 \sim 110 \text{ mm}^3$ de volumen) y luego los animales fueron asignados al azar a diferentes grupos de tratamiento. Los péptidos (stock 100 mM en DMSO) se diluyeron a la concentración necesaria en PBS y se hirvieron durante 5 minutos. Luego, se administraron DMSO, péptidos Scr o EPE mediante inyección i.v. en la vena de la cola (150 µl/ratón, 3 veces por semana). Las dimensiones del tumor se midieron con un calibrador deslizante digital. El volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula: $V = D_1 \times D_2 \times D_3 \times \pi/6$, en que D_1 , D_2 , D_3 - representan los tres diámetros de crecimiento mutuamente ortogonales. Para evaluar cualquier signo de toxicidad sistémica, se controló el peso corporal y se registró al final del

experimento.

Histología e inmunohistoquímica: Se extrajeron xenoinjertos de tumores, pulmones, hígados, riñones y corazones de animales de diferentes grupos de tratamiento y se sometieron a análisis histológico mediante tinción de portaobjetos de tejido embebidos en 5 µm de parafina con H&E y examen por microscopio óptico. Los xenoinjertos de tumores MDA-MB-231 y LOXIMVI se sometieron a análisis inmunohistoquímico utilizando Abs αgERK. Brevemente, los bloques de tumores embebidos en parafina después de diferentes tratamientos se cortaron a un grosor de 4 µm y se tiñeron con Abs de ERK, seguido de segundos anticuerpos conjugados con peroxidasa y la tinción con DAB. Los campos representativos de cada espécimen se fotografiaron con aumentos x20 y x40.

Análisis estadístico: Las imágenes digitales se procesaron con el software Adobe Photoshop 7.0. Las diferencias estadísticas se analizaron utilizando el ensayo *t* de Student de dos colas.

Resultados

El péptido EPE inhibe la translocación de ERK: La translocación nuclear de ERK es un paso clave en la mediación de la proliferación celular, mientras que solo tiene una influencia menor en otros procesos celulares. Se encontró que la translocación estimulada de ERK requiere la unión de su NTS fosforilada con Imp7. Para evitar esta interacción, los autores de la presente invención utilizaron un péptido derivado de NTS (GQLNHILGILGSPSQED, SPS-SEQ ID NO: 2) que podría competir con la unión. Para ser efectivo, el péptido necesitaría penetrar rápidamente a través de la membrana celular y permanecer en el citoplasma durante un tiempo determinado. Para alcanzar este objetivo, los autores de la presente invención examinaron dos formas conocidas para permitir la penetración de péptidos: la secuencia²² de TAT viral modificada o el ácido mirístico (Myr;²³), ambos en el extremo N del péptido. Utilizando péptidos biotinilados con cada uno de los conductores, se encontró que ambos inducían una penetración eficaz en células HeLa, pero el péptido Myr permaneció más tiempo en el citoplasma que el péptido con la secuencia TAT (Figuras 7A-B).

Los autores de la presente invención se comprometieron a examinar el efecto del péptido en la translocación nuclear de ERK1/2. El tratamiento de células HeLa con el péptido SPS evitó la translocación nuclear inducida por TPA de ERK, que fue similar a la inhibición por el inhibidor de MEK U0126 (Figura 1A). A continuación, se comparó la eficacia del péptido con péptidos similares en los que el motivo SPS se reemplazó por residuos fosfomiméticos (EPE) o no fosforilables (APA). El efecto inhibitorio del péptido EPE fue más intenso que el de los otros dos (Figuras 8A-B), probablemente debido a que el péptido EPE imita mejor la ERK unida a Imp7; por lo tanto, el estudio continuó solo con este péptido. La repetición de los experimentos con células T47D, MDA-MB-231, A2352 y dos células inmortalizadas no transformadas: melanocitos (NHEM-Ad) y mama (HB2) revelaron un efecto similar (Figuras 1A-F), lo que apunta a la generalidad del efecto. La misma tendencia de inhibición se observó también con el fraccionamiento subcelular (Figuras 12A-D). No se observaron diferencias significativas entre la inhibición de ERK1 y ERK2 (Figuras 13A-C). Además, el efecto fue específico para ERK, ya que el péptido no afectó a la translocación de otras MAPK (Figuras 9A-B), ni a la de AKT (datos no mostrados).

Efectos moleculares del péptido EPE: A continuación, los autores de la presente invención se comprometieron a identificar el mecanismo mediante el cual el péptido EPE evita la translocación nuclear de ERK. Tal como se esperaba del origen del péptido EPE, se encontró que su adición a células HeLa impidió la interacción de Imp7 con ERK cuando se examinó mediante co-inmunoprecipitación con Abs anti Imp7 (Figura 2A). Se examinó el efecto del péptido sobre la señalización intracelular de cuatro líneas celulares distintas. Tal como se esperaba, no se detectó efecto alguno del péptido sobre las actividades citoplásmicas, incluida la fosforilación activadora de ERK-TEY o la actividad aguas abajo de RSK (Figura 2B). Además, incluso la fosforilación de NTS por parte de CK2, que se produce en el citosol, solo se vio ligeramente afectada a pesar del sitio de fosforilación de CK2 de consenso dentro del péptido. Esta falta de efecto puede sugerir que los sitios de unión de CK2 e Imp7 al NTS no son idénticos, y apoyan firmemente la especificidad del péptido a la interacción ERK-Imp7. Es importante destacar que el péptido no tuvo efecto en la fosforilación basal o estimulada de AKT, ya sea poco después de la estimulación o en períodos de tiempo más largos después del tratamiento (Figuras 2E, F), lo que indica que los bucle de retroalimentación negativos de las células no se vieron afectados por el péptido. Finalmente, aunque el péptido no tuvo efectos citoplásmicos, inhibió la fosforilación del factor de transcripción Elk1, que es un objetivo nuclear de ERK1/2 (Figura 2B), la fosforilación de c-Myc (Figura 2C) y, en menor grado, la expresión y la fosforilación de c-Fos (Figuras 14A-B). Este efecto en los objetivos nucleares varió entre las líneas celulares, (20-45% en Elk1, Figura 2D), y no era tan acusado para c-Fos, probablemente debido a otros componentes de señalización, independientes de ERK1/2 en algunas células.

Los efectos del péptido EPE en células cultivadas: Dado que la actividad nuclear de ERK1/2 es crítica para la proliferación celular, los autores de la presente invención examinaron el efecto del péptido EPE sobre la proliferación/supervivencia de diferentes líneas celulares derivadas del cáncer e inmortalizadas. Primero, se encontró que las condiciones de administración óptimas del péptido EPE (en las que presentaba el efecto máximo en células HeLa y T47D en comparación con un control de péptidos revueltos (Scr)) eran de 10 µM, administradas cada 24 h en medio reciente (Figuras 9A-B). A continuación, los autores de la presente invención examinaron el efecto del péptido sobre la proliferación de diferentes líneas celulares medidas 72 h después de la administración del péptido (Figura 3A). Curiosamente, la respuesta de las diferentes células al péptido se puede clasificar en cuatro

tipos. El primero fue una reducción profunda en el número de células, que se observó en células de melanoma con B-Raf oncogénico (melanoma de B-Raf). En el segundo grupo, incluidas las células derivadas de cáncer de mama, próstata y cérvix, el péptido impidió el crecimiento celular, pero no redujo el número de células iniciales. El tercer grupo que incluía otros melanomas, células derivadas de cáncer de próstata y pulmón presentó una pequeña disminución en el crecimiento celular en comparación con un control peptídico, y un cuarto grupo que incluía células inmortalizadas, no transformadas, no respondió al péptido en absoluto. Una comparación adicional entre los efectos del péptido EPE y PLX4032 sobre la viabilidad de algunas de las líneas celulares (Figura 3B), reveló que en los melanocitos no transformados (NHEM-Ad) el péptido EPE no tiene efecto significativo alguno, a pesar del fuerte efecto inhibitorio de PLX4032. Por otra parte, el péptido EPE era capaz de reducir la viabilidad de las células de melanoma transformadas con N-Ras LOXIMVI que no son sensibles a PLX4032, tal como se informó anteriormente. En todas las demás líneas celulares transformadas examinadas, el efecto del péptido EPE fue al menos tan bueno, o incluso mejor, que el de PLX4032. Juntos, estos resultados demuestran los efectos superiores del péptido EPE en el tratamiento de diversos cánceres sin afectar a las células no transformadas.

Efecto del péptido EPE en células de melanoma resistentes: El principal problema con el uso de inhibidores de B-Raf y MEK en la clínica es el desarrollo de resistencia a los fármacos después de 6 a 8 meses. Dado que el punto de influencia del péptido EPE se encuentra aguas abajo de los otros dos fármacos, los autores de la presente invención examinaron si podría afectar a las células de melanoma resistentes a los inhibidores de Raf y MEK. Para este propósito, se generaron células resistentes a PLX-4032 y U0126 añadiendo el inhibidor a la línea de melanoma A2352 durante 6 semanas. Las células supervivientes proliferaron más lentamente en presencia de los inhibidores, pero recuperaron un crecimiento normal cuando se retiraron los inhibidores. Al utilizar estas células, se encontró que el péptido EPE era capaz de reducir el crecimiento celular, aunque este efecto no fue tan impresionante como se observó en las no resistentes (Figura 4A).

Se observaron efectos similares en dos células de melanoma de paso bajo de pacientes resistentes a vemurafenib (Figura 4B). Tal como se esperaba, el péptido EPE redujo la cantidad de ERK1/2 nuclear tanto antes como después de la estimulación (Figuras 15A-B). No se detectaron efectos significativos de los péptidos en la activación de AKT (datos no mostrados), lo que indica que los efectos no se producen a través de los bucles de retroalimentación negativos citosólicos. Por lo tanto, los resultados actuales indican que las células de melanoma resistentes son altamente sensibles al péptido EPE.

Dado que la inhibición de la cascada MAPK a menudo da como resultado la activación de bucles de retroalimentación negativos y la estimulación de la vía PI3K/AKT, esta vía también se examinó en las células resistentes. Los resultados no demuestran cambio significativo alguno en la influencia del inhibidor de PI3K, lo que indica que la resistencia probablemente no se debía a la PI3K y al péptido EPE hecho funcionar a través de una vía distinta. También se demostró que el efecto no se debe a un cambio en el sistema de resistencia a múltiples fármacos, ya que se encontró que Taxol era igual de eficaz en células no resistentes como en las resistentes. Por lo tanto, los resultados actuales indican claramente que el péptido EPE es capaz de afectar a las células resistentes a través de la inhibición de la maquinaria aguas abajo.

El péptido EPE induce la apoptosis del melanoma: El efecto del péptido EPE en la morfología celular se visualizó utilizando la microscopía óptica. Si bien no se observó efecto alguno en la mayoría de las líneas celulares examinadas, el péptido cambió la apariencia de las células de melanoma B-Raf al inducir la ruptura de la célula ya 24 horas después del tratamiento (Figura 5A). También se observó una apariencia similar, aunque más débil, con el inhibidor de MEK U0126, lo que indica que es probable que este efecto sea dependiente de MEK/ERK. Este cambio en la morfología se asemejaba a la muerte celular, que se informó anteriormente que ocurría al inhibir la cascada ERK en el melanoma B-Raf. De hecho, al utilizar TUNEL (Figura 5B, C) o PARP-1 (Figura 5D) como marcador para la apoptosis, se encontró que el cambio morfológico se correlacionaba con una apoptosis mejorada. Este efecto apoptótico fue específico para melanomas mutados con B-Raf y, en estas células, fue tan fuerte como la apoptosis inducida por Taxol. No se detectó apoptosis en las otras líneas celulares examinadas, a pesar de su clara capacidad para someterse a una muerte celular inducida por Taxol o H₂O₂.

El efecto del péptido EPE en los xenoinjertos de cáncer: Los autores de la presente invención examinaron entonces el efecto del péptido EPE en el crecimiento de tumores en modelos de xenoinjerto (Figura 6A). Para este propósito, los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño de ~ 60 mm³ y solo entonces el péptido se administró sistémicamente inyectándolo en una formulación adecuada en la vena de la cola de los ratones. Al utilizar modelos de xenoinjerto de este tipo en ratones inmunológicamente deficientes, se observó una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de MDA-MB-231, LOXIMVI, y hasta cierto punto, también en HCT-116. Sorprendentemente, se observó un efecto aún más fuerte del péptido con un xenoinjerto del melanoma B-Raf de bajo pase A2352 en ratones SCID. En este modelo, el péptido irradió completamente el melanoma en el espacio de 2 las semanas posteriores a la administración en la vena de la cola. Ninguno de los animales tratados exhibió cambio significativo alguno en el peso, la morfología de los órganos u otros efectos relacionados con la toxicidad. Además, el tratamiento no afectó al tamaño o a la estructura de los riñones, hígados y corazones que fueron inspeccionados al término del experimento. Curiosamente, la estructura de los pulmones no se vio afectada tampoco, aunque se encontraron focos metastásicos en ratones tratados con vehículo y péptido Scr, pero no los ratones tratados con péptido EPE (no mostrado).

Con el fin de verificar que el péptido EPE funcionaba efectivamente al prevenir la translocación nuclear, se extirparon secciones de tumores de xenoinjerto de los animales tratados al final de los experimentos y se tiñeron con anticuerpo (Ab) anti-ERK. Tal como se esperaba, se encontró que el péptido EPE previno una translocación de este tipo en los xenoinjertos de MDA-MB-231 y LOXIMVI tratados. En muestras de los xenoinjertos tratados con control, se encontró ERK en todas las células, con cierta preferencia al núcleo, mientras que en los xenoinjertos tratados con péptido EPE, ERK se localizó casi exclusivamente en el citoplasma (Figuras 10A-B). Estos hallazgos apoyan la idea de que la retención citoplasmática de ERK es la causa del efecto específico del péptido EPE. Por lo tanto, la prevención de la translocación nuclear de ERK1/2, que no afecta a la actividad citoplásmica de la cascada, puede servir como una buena herramienta para prevenir el desarrollo del cáncer, con menos efectos secundarios que los inhibidores actualmente utilizados de la cascada de ERK1/2.

El principal problema con el uso de inhibidores de B-Raf y MEK en la clínica es el desarrollo de resistencia después de 6 a 8 meses, lo que resulta en la recurrencia de tumores y metástasis. Con el fin de estudiar la recurrencia de la enfermedad después del péptido EPE en comparación con el tratamiento con PLX4032, los ratones que portaban xenoinjertos A2352 fueron tratados con ambos reactivos. Ambos tratamientos demostraron ser beneficiosos para reducir el tamaño de los tumores iniciales de ~ 80 mm³. El tratamiento del péptido EPE resultó en una desaparición completa de los tumores de todos los ratones en un plazo de 10-23 días (Figura 6B), mientras que el tratamiento con PLX4032 resultó en una desaparición completa en tres ratones (13-23 días después del tratamiento) y dos ratones con tumores pequeños. Después de la administración del último tratamiento, los ratones se mantuvieron para un seguimiento adicional y una evaluación de la condición del melanoma hasta durante 11 semanas. Ninguno de los ratones tratados con péptido EPE (N = 7) mostró recurrencia tumoral alguna, y todos ellos, así como otros 5 animales en un experimento repetido, permanecieron sanos hasta 11 semanas después del tratamiento. Por otro lado, tal como se esperaba, en algunos (3 de 5) de los ratones tratados con PLX4032, el tumor recurrió, y uno de ellos pareció desarrollar resistencia en el espacio de los 13 días de tratamiento y posteriormente exhibió un crecimiento masivo del tumor. Estos resultados indican que el tratamiento con péptido EPE puede prevenir la resistencia y la recurrencia del tumor mejor que la de PLX4032.

Bibliografía

1. Wortzel, I. y Seger, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* **2**, 195-209, doi:10.1177/1947601911407328 (2011).
2. Keshet, Y. y Seger, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* **661**, 3-38, doi:10.1007/978-1-60761-795-2_1 (2010).
3. Morrison, D. K. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a011254 (2012).
4. Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. y Seger, R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1619-1633, doi:S0167-4889(10)00322-8.
5. Osborne, J. K., Zaganjor, E. y Cobb, M. H. Signal control through Raf: in sickness and in health. *Cell Res* **22**, 14-22, doi:10.1038/cr.2011.193 (2012).
6. Flaherty, K. T. *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 809-819, doi:10.1056/NEJMoa1002011 (2010).
7. Flaherty, K. T. *et al.* Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* **367**, 107-114, doi:10.1056/NEJMoa1203421 (2012).
8. Su, F. *et al.* RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* **366**, 207-215, doi:10.1056/NEJMoa1105358 (2012).
9. Callahan, M. K. *et al.* Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment. *N Engl J Med* **367**, 2316-2321, doi:10.1056/NEJMoa1208958 (2012).
10. Solit, D. B. y Rosen, N. Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N Engl J Med* **364**, 772-774, doi:10.1056/NEJMciabr1013704 (2011).
11. Lito, P. *et al.* Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell* **22**, 668-682, doi:10.1016/j.ccr.2012.10.009 (2012).
12. Mirzoeva, O. K. *et al.* Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Res* **69**, 565-572 (2009).
13. Wee, S. *et al.* PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers. *Cancer Res* **69**, 4286-4293 (2009).

14. Yao, Z. y Seger, R. The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments. *Biofactors* **35**, 407-416 (2009).
15. Chen, R. H., Sarnecki, C. y Blenis, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**, 915-927 (1992).
- 5 16 Chuderland, D. y Seger, R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* **29**, 57-74 (2005).
17. Chuderland, D., Konson, A. y Seger, R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol Cell* **31**, 850-861 (2008).
- 10 18. Plotnikov, A., Chuderland, D., Karamansha, Y., Livnah, O. y Seger, R. Nuclear ERK translocation is mediated by protein kinase CK2 and accelerated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol*, doi:MCB.05424-11
19. Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A. y Seger, R. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol Cell Endocrinol* **314**, 213-220, doi:S0303-7207(09)00260-3.
- 15 20. Formstecher, E. *et al.* PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* **1**, 239-250 (2001).
21. Casar, B., Pinto, A. y Crespo, P. ERK dimers and scaffold proteins: unexpected partners for a forgotten (cytoplasmic) task. *Cell Cycle* **8**, 1007-1013 (2009).
22. Gomez-Cabrero, A. *et al.* Use of transduction proteins to target trabecular meshwork cells: outflow modulation by profilin I. *Mol Vis* **11**, 1071-1082 (2005).
- 20 23. Nelson, A. R., Borland, L., Allbritton, N. L. y Sims, C. E. Myristoyl-based transport of peptides into living cells. *Biochemistry* **46**, 14771-14781, doi:10.1021/bi701295k (2007).
24. Poulikakos, P. I. *et al.* RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**, 387-390, doi:10.1038/nature10662 (2011).
- 25 25. Jiang, C. C. *et al.* Apoptosis of human melanoma cells induced by inhibition of B-RAFV600E involves preferential splicing of bimS. *Cell death & disease* **1**, e69, doi:10.1038/cddis.2010.48 (2010).
26. VanBrocklin, M. W., Verhaegen, M., Soengas, M. S. & Holmen, S. L. Mitogen-activated protein kinase inhibition induces translocation of Bmf to promote apoptosis in melanoma. *Cancer Res* **69**, 1985-1994, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3934 (2009).
- 30 27. Beck, D. *et al.* Vemurafenib Potently Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in BRAFV600E Melanoma Cells. *Sci Signal* **6**, ra7, doi:10.1126/scisigna.12003057 (2013).
28. Rapp, U. R., Gotz, R. y Albert, S. BuCy RAFs drive cells into MEK addiction. *Cancer Cell* **9**, 9-12, doi:10.1016/j.ccr.2005.12.022 (2006).
29. Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* **483**, 100-103, doi:10.1038/nature10868 (2012).
- 35 30. Su, F. *et al.* Resistance to selective BRAF inhibition can be mediated by modest upstream pathway activation. *Cancer Res* **72**, 969-978, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1875 (2012).
31. Aksamitiene, E. *et al.* Prolactin-stimulated activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases is controlled by PI3-kinase/Rac/PAK signaling pathway in breast cancer cells. *Cell Signal* **23**, 1794-1805, doi:10.1016/j.cellsig.2011.06.014 (2011).
- 40 32. Zmajkovicova, K. *et al.* MEK1 Is Required for PTEN Membrane Recruitment, AKT Regulation, and the Maintenance of Peripheral Tolerance. *Mol Cell*, doi:10.1016/j.molcel.2013.01.037 (2013).
33. Smith, E. R. *et al.* Nuclear entry of activated MAPK is restricted in primary ovarian and mammary epithelial cells. *PLoS ONE* **5**, e9295, doi:10.1371/journal.pone.0009295 (2010).

45 Listado de secuencias

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd. Seger, Rony Plotnikov, Alexander

<120> PEPTIDOS DERIVADOS DE ERK Y USOS DE LOS MISMOS

- <130> 60167
- <150> US 61/878,633
- <151> 2013-09-17
- <160> 10
- 5 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> péptido sintético (Scr)
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ile | Leu | Ser | Gln | Glu | Leu | Pro | His | Ser | Gly | Asp | Leu | Gln | Ile | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
- <210> 2
- 15 <211> 17
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> péptido sintético (SPS)
- 20 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gln | Leu | Asn | His | Ile | Leu | Gly | Ile | Leu | Gly | Ser | Pro | Ser | Gln | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
- Asp**
- <210> 3
- <211> 17
- <212> PRT
- 25 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> péptido sintético (APA)
- <400> 3
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gln | Leu | Asn | His | Ile | Leu | Gly | Ile | Leu | Gly | Ala | Pro | Ala | Gln | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
- 30 **Asp**
- <210> 4
- <211> 17
- <212> PRT
- 35 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Un péptido capaz de prevenir la translocación de quinasa / 2 (ERK) regulada por señal extracelular en el núcleo
- <220>
- 40 <221> misc_feature
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <220>
- <221> misc_feature
- 45 <222> (14)..(14)

ES 2 717 446 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 4

Gly Gln Leu Asn His Ile Leu Gly Ile Leu Gly Xaa Pro Xaa Gln Glu
1 5 10 15

Asp

<210> 5

5 <211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Un ejemplo de una secuencia de péptido que penetra en las células (CPP)

10 <400> 5

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (EPE)

<400> 6

Gly Gln Leu Asn His Ile Leu Gly Ile Leu Gly Glu Pro Glu Gln Glu
1 5 10 15

Asp

20 <210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido sintético (DPD)

<400> 7

Gly Gln Leu Asn His Ile Leu Gly Ile Leu Gly Asp Pro Asp Gln Glu
1 5 10 15

Asp

<210> 8

<211> 7

30 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Un ejemplo de una secuencia de péptido que penetra en las células (CPP)

<400> 8

35 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg
1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40 <220>

<223> Un ejemplo de una secuencia de péptido que penetra en las células (CPP)

<400> 9

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 10

<211> 5

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Un ejemplo de una secuencia de péptido que penetra en las células (CPP)

<400> 10

Arg Arg Gln Arg Arg
1 5

10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que no tiene más de 20 aminoácidos de longitud que comprende una secuencia tal como se recoge en SEQ ID NO: 4, en donde X_1 y X_2 son cualquier aminoácido, siendo el péptido capaz de prevenir la translocación de la quinasa 1/2 (ERK) regulada por señales extracelulares en el núcleo.
- 5 2. El péptido aislado de la reivindicación 1, que es de 17 aminoácidos de longitud.
3. El péptido aislado de la reivindicación 1, en donde X_1 y X_2 se seleccionan, cada uno independientemente, del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y serina.
4. El péptido aislado de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2-3, 6 y 7.
- 10 5. El péptido aislado de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 6.
6. Una composición de materia que comprende el péptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, unido a un agente de penetración celular.
7. La composición de materia de la reivindicación 6, en donde el agente de penetración celular comprende ácido mirístico.
- 15 8. La composición de materia de la reivindicación 6, en donde dicho agente de penetración celular es un péptido de penetración celular.
9. La composición de materia de la reivindicación 8, en donde dicho péptido aislado unido a dicho péptido de penetración celular no es más largo que 30 aminoácidos.
- 20 10. Una composición farmacéutica que comprende los péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, como el agente activo y un soporte farmacéuticamente aceptable.
11. El péptido aislado de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento del cáncer.
12. La composición de materia de las reivindicaciones 6-9, para uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 13. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición de materia para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino.
14. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición de materia para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el cáncer es melanoma.

FIG. 1A

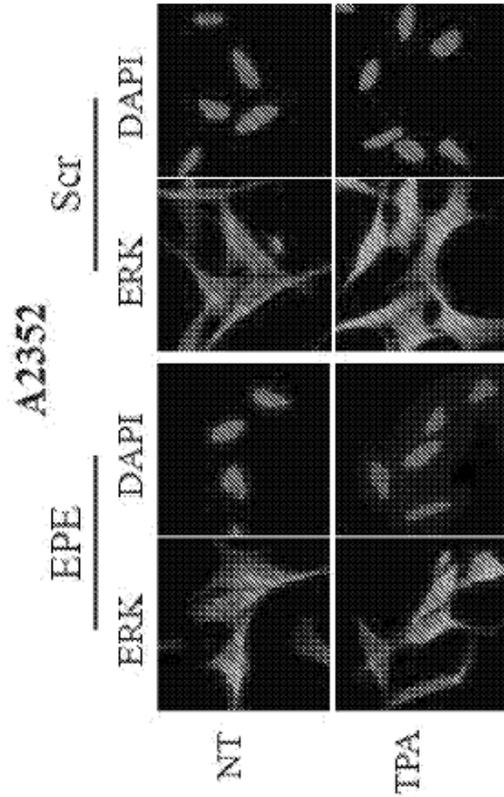


FIG. 1B

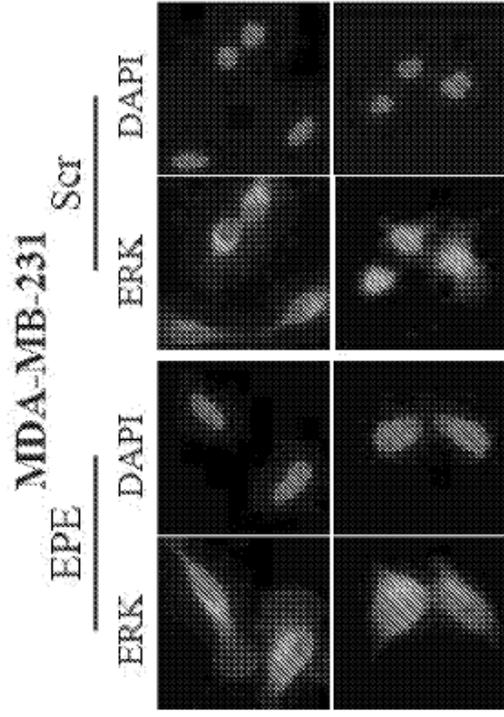


FIG. 1D

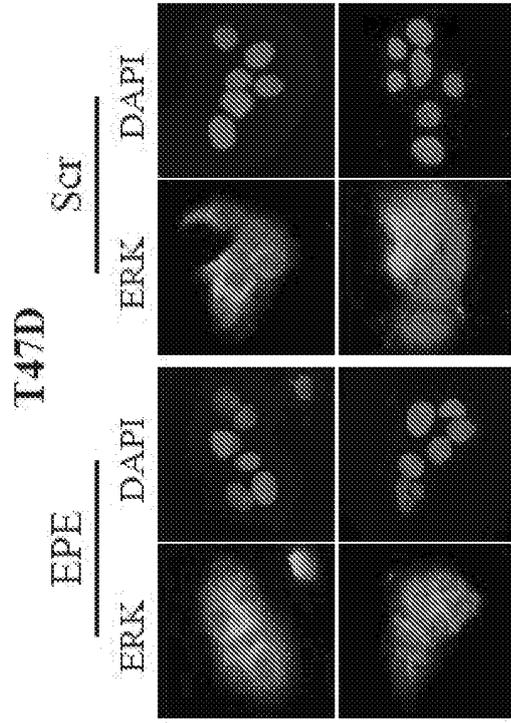


FIG. 1C

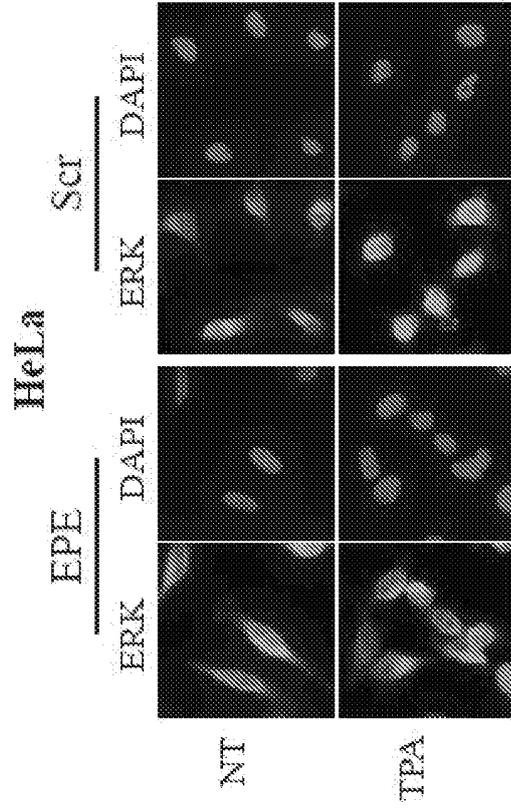


FIG. 1E

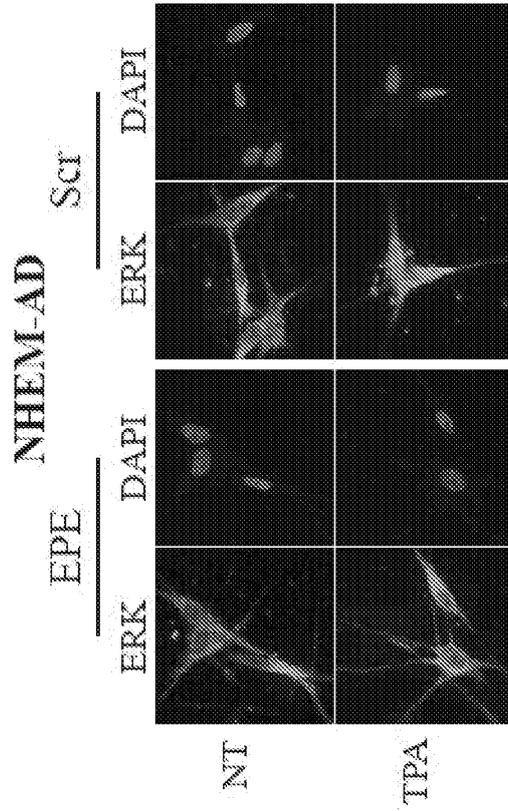


FIG. 1F

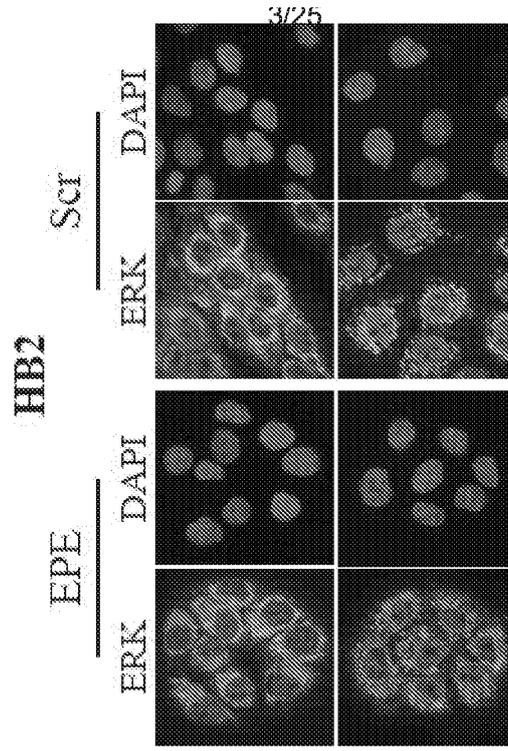


FIG. 2A

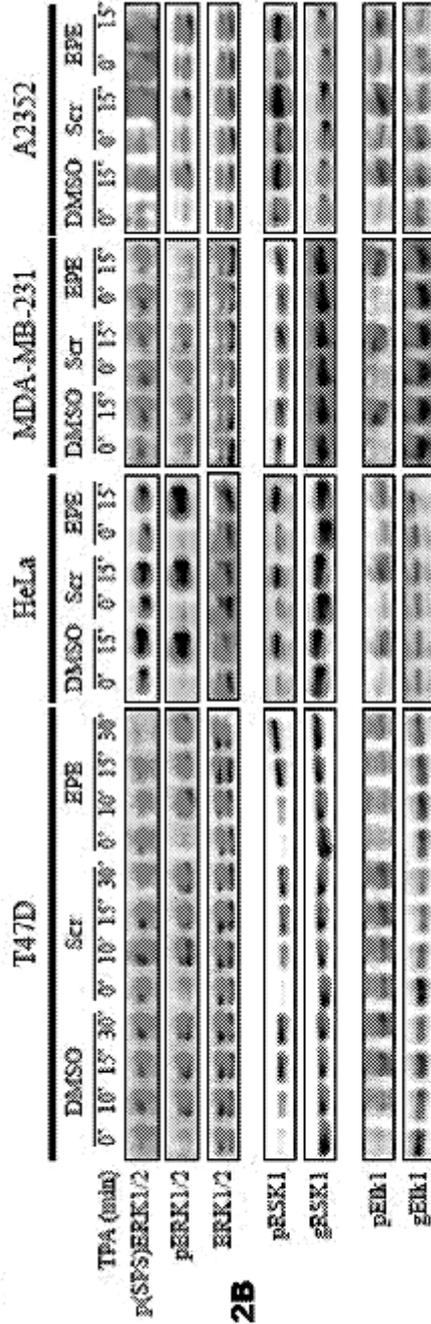
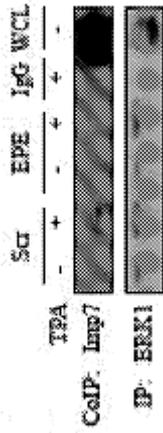


FIG. 2B

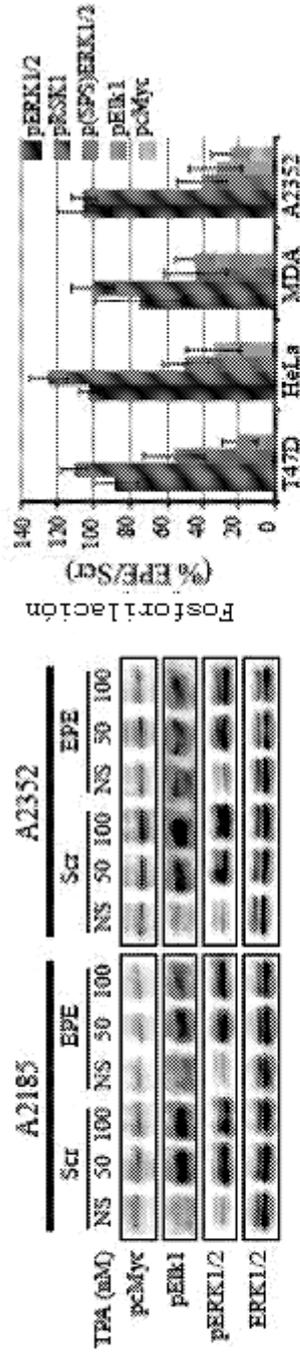


FIG. 2C

FIG. 2D

FIG. 2E

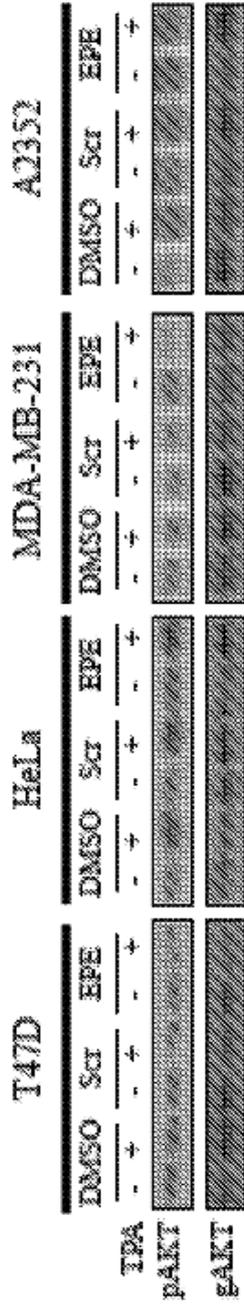


FIG. 2F

FIG. 3A

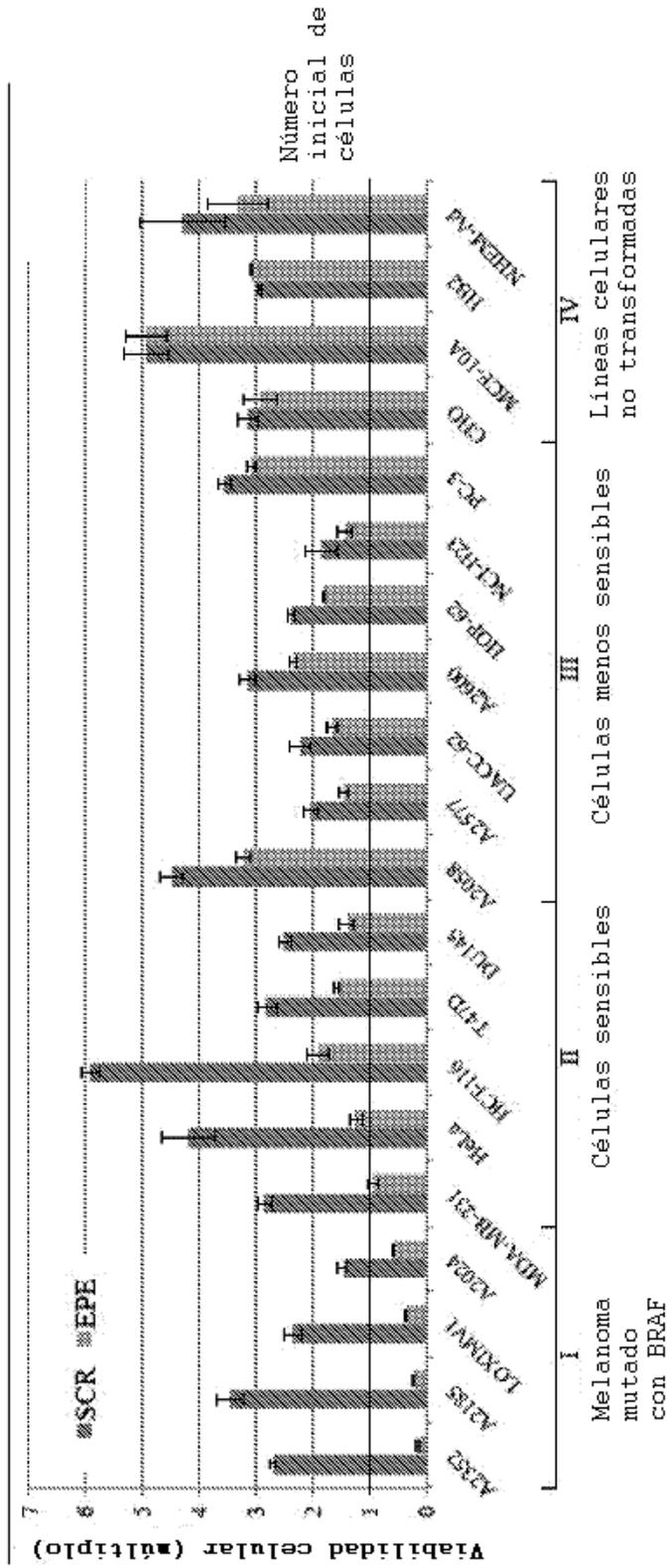
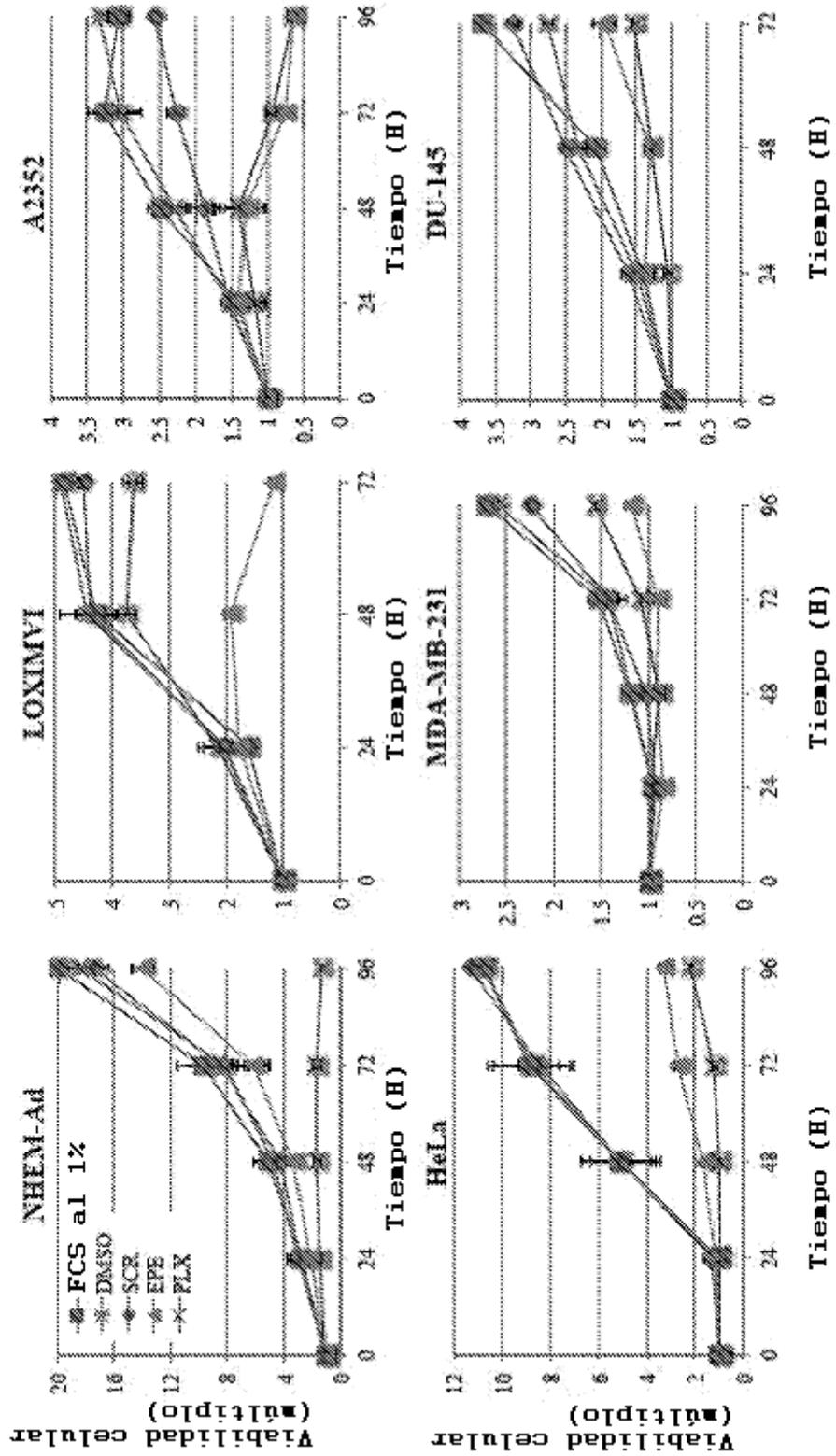


FIG. 3B



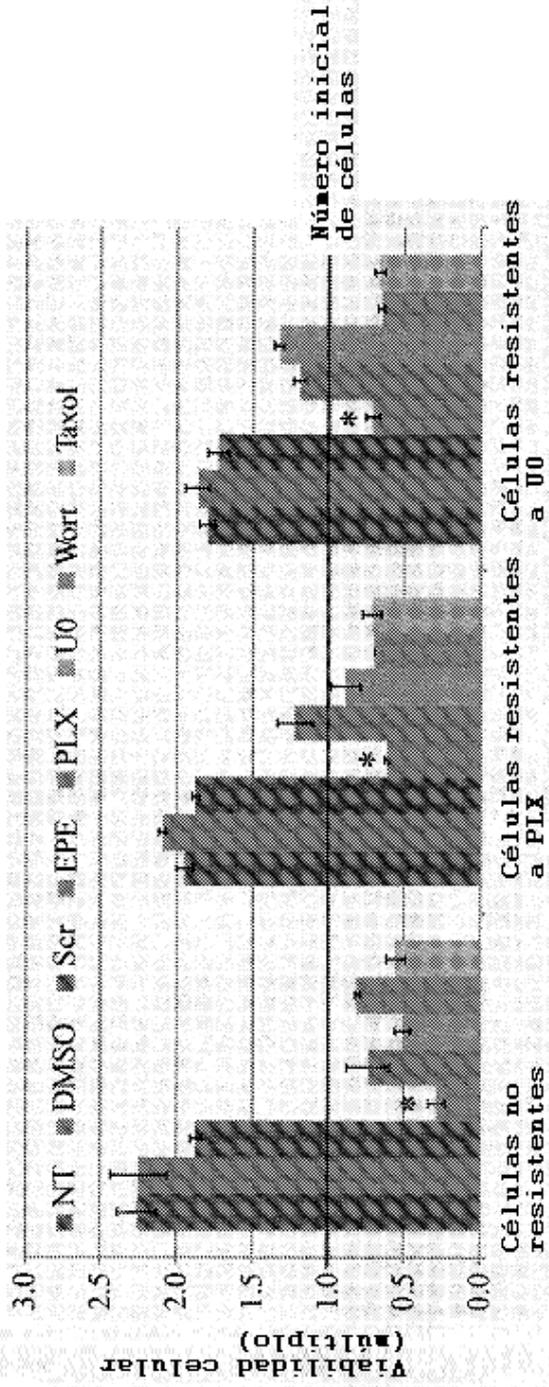


FIG. 4A

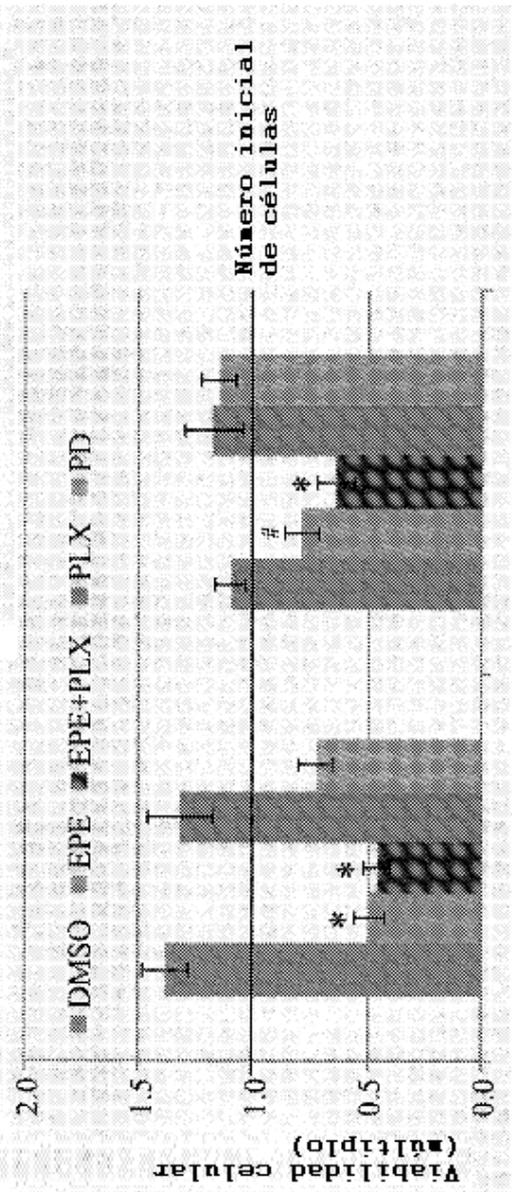


FIG. 4B

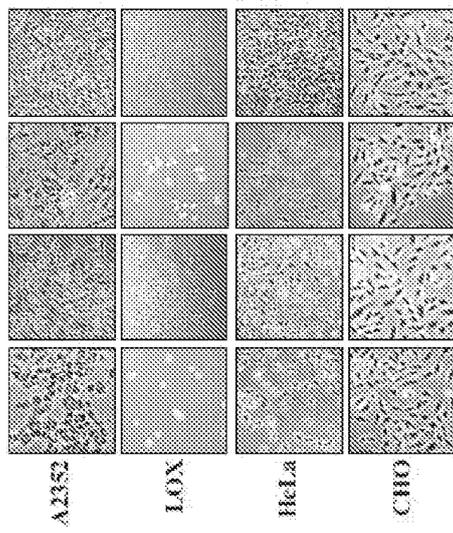


FIG. 5A

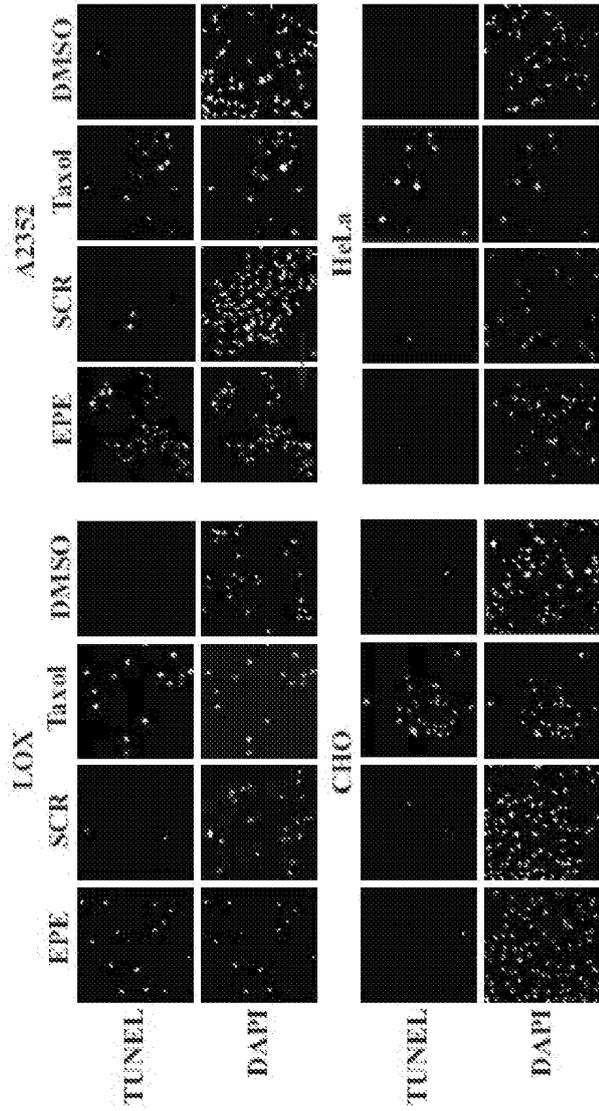


FIG. 5B

FIG. 5C

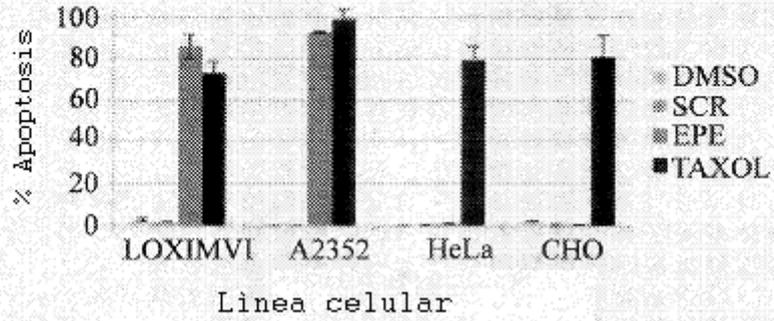
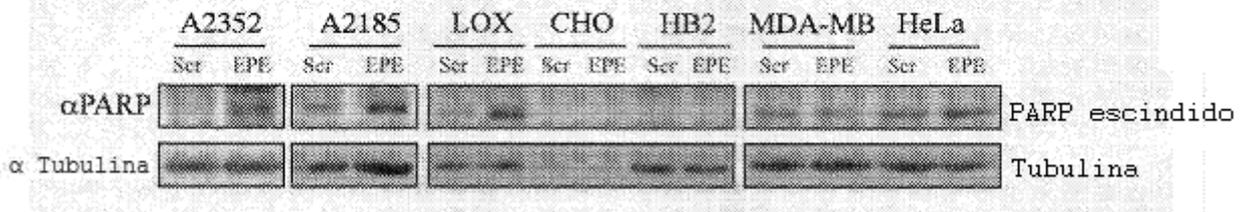


FIG. 5D



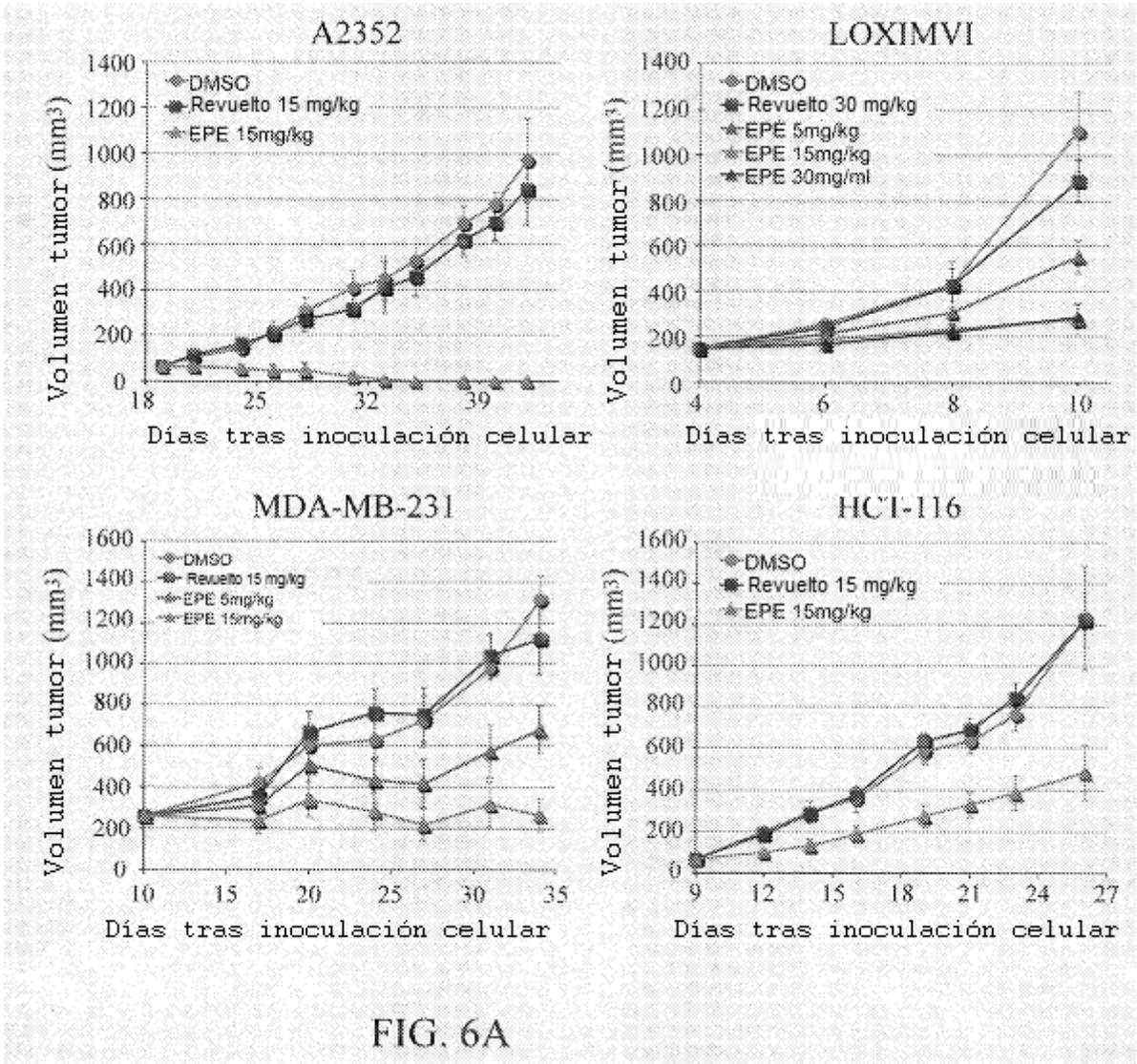


FIG. 6B

A2352

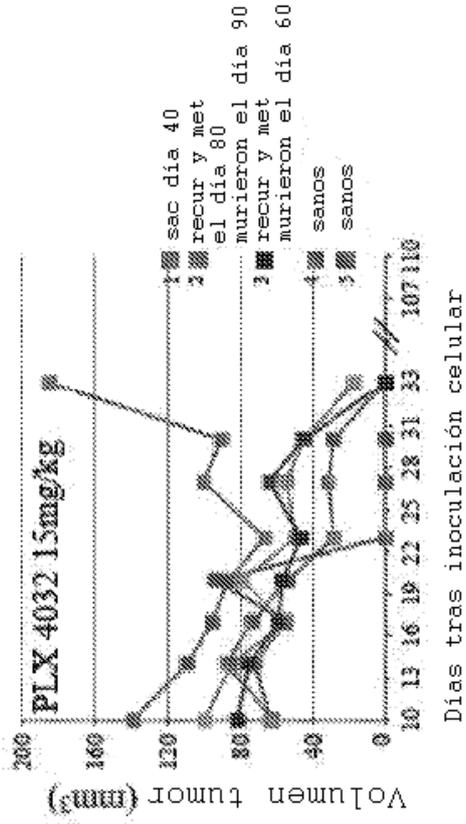
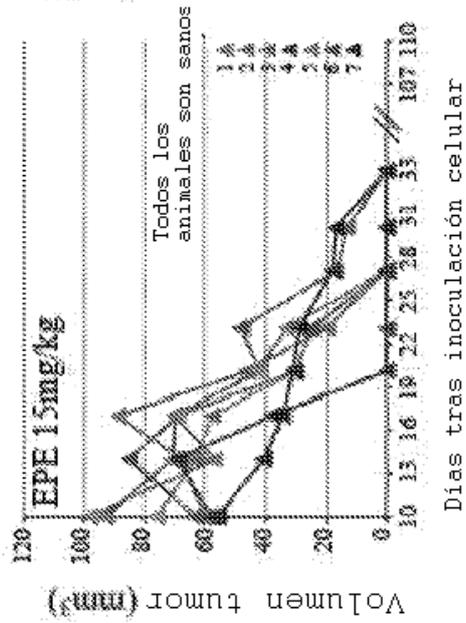
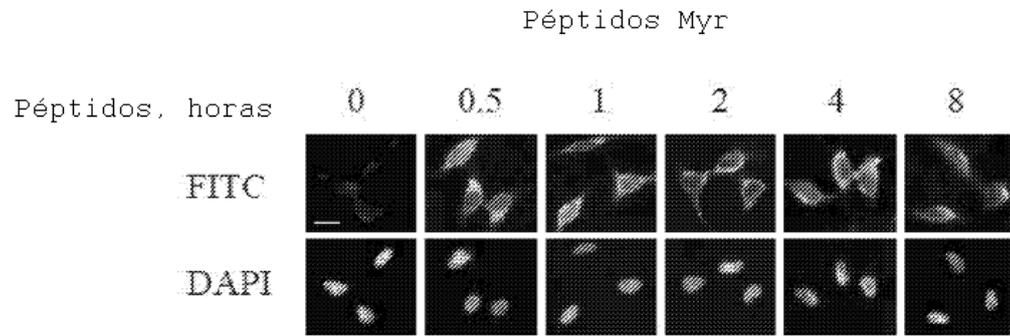


FIG. 7A



Péptidos Tat

FIG. 7B

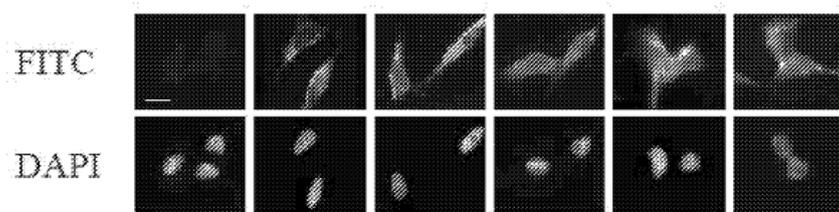


FIG. 8A

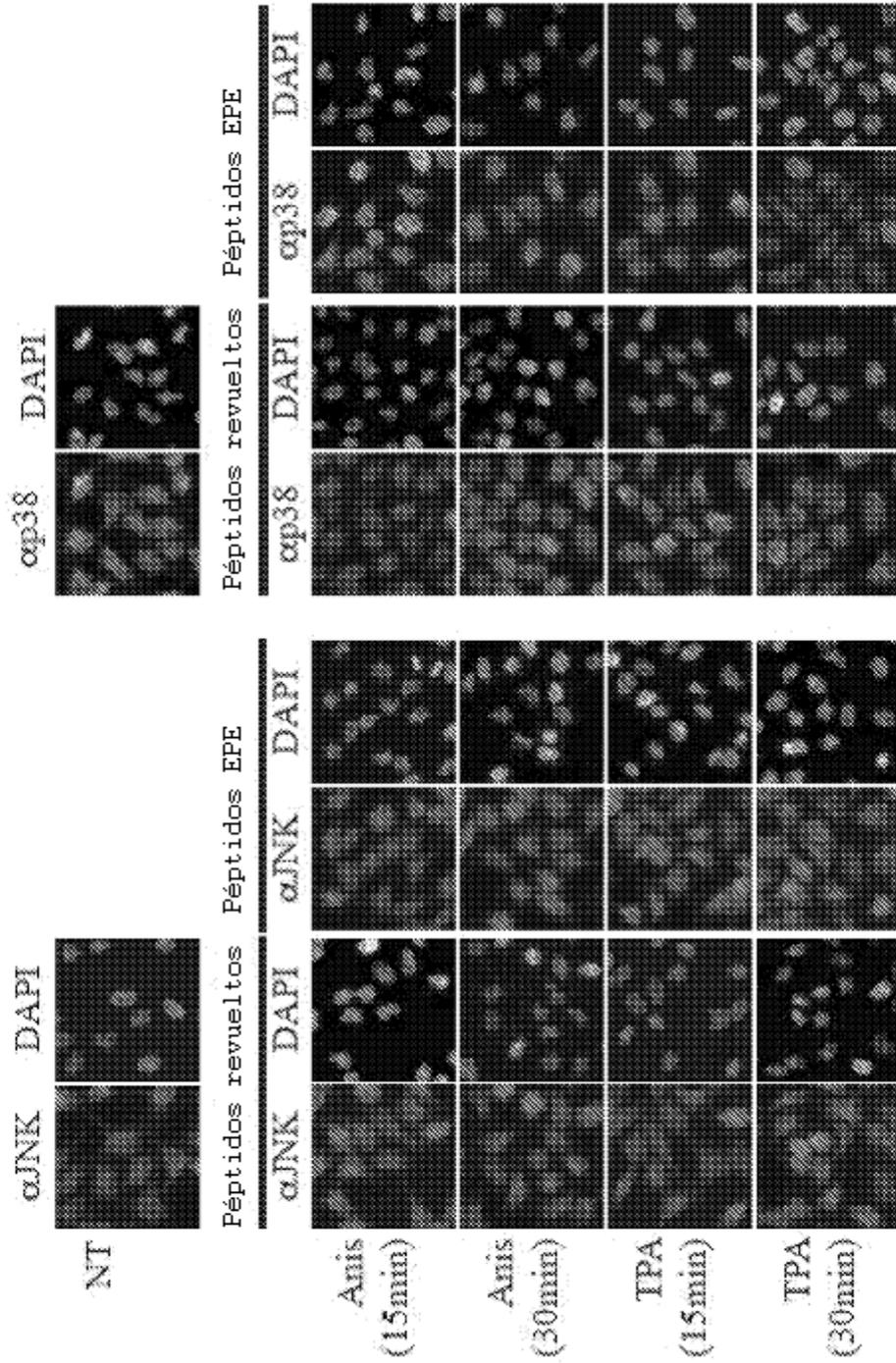


FIG. 8B

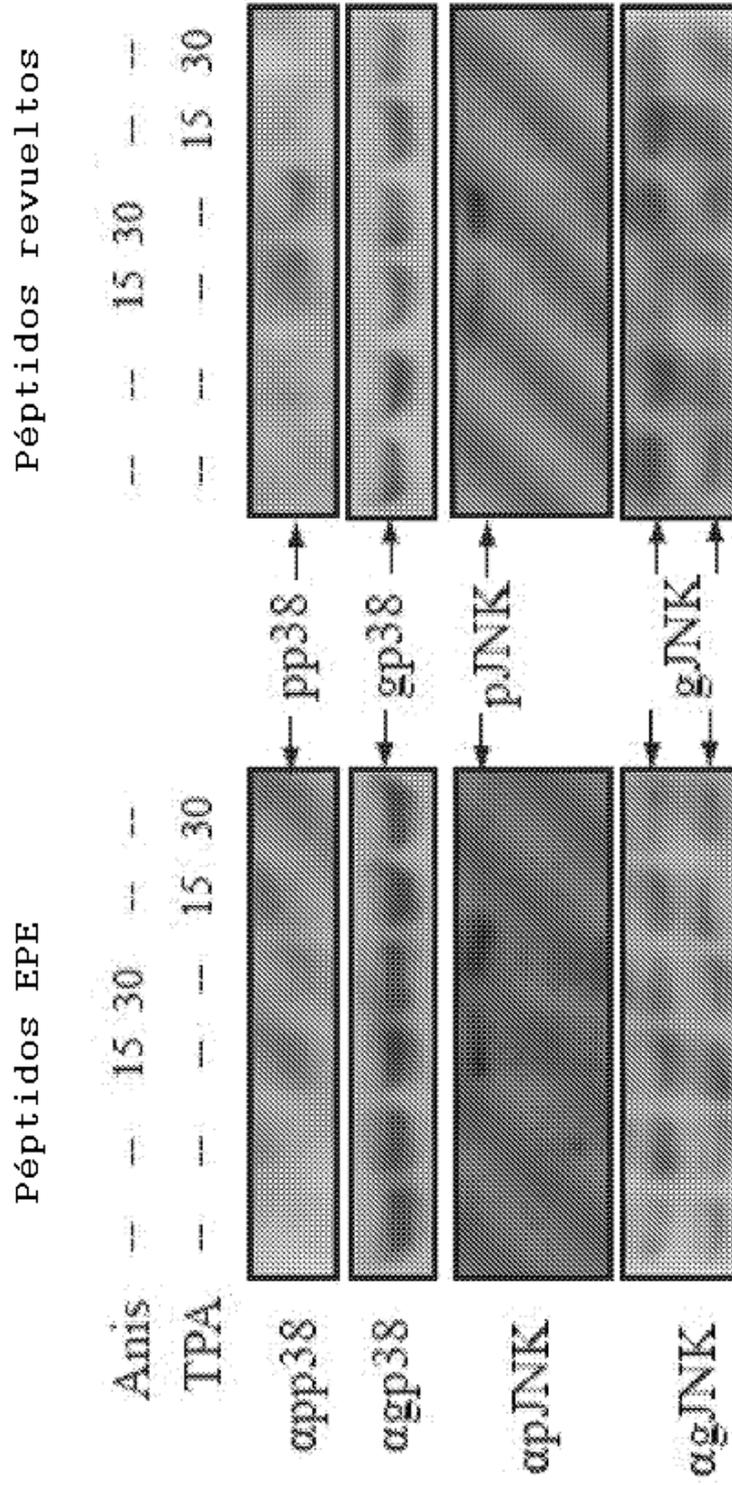


FIG. 9A

LOXIMVI

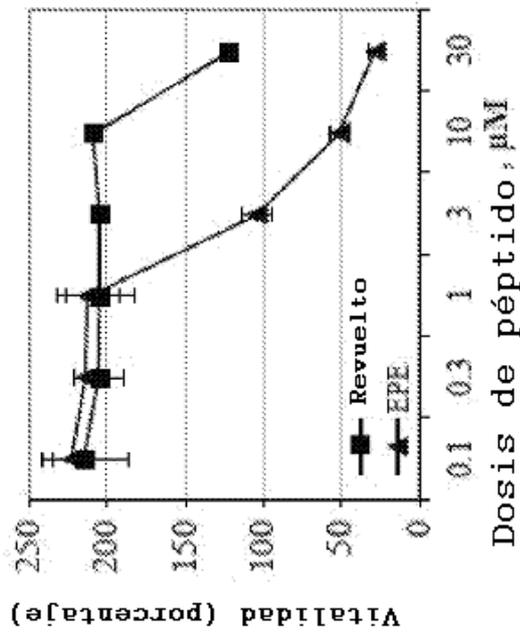
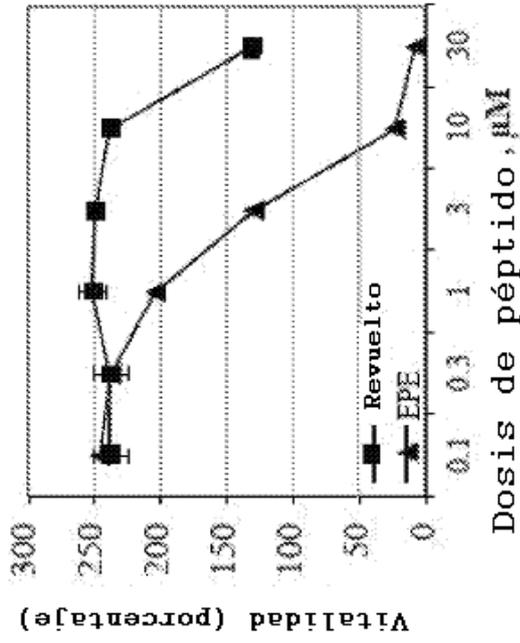
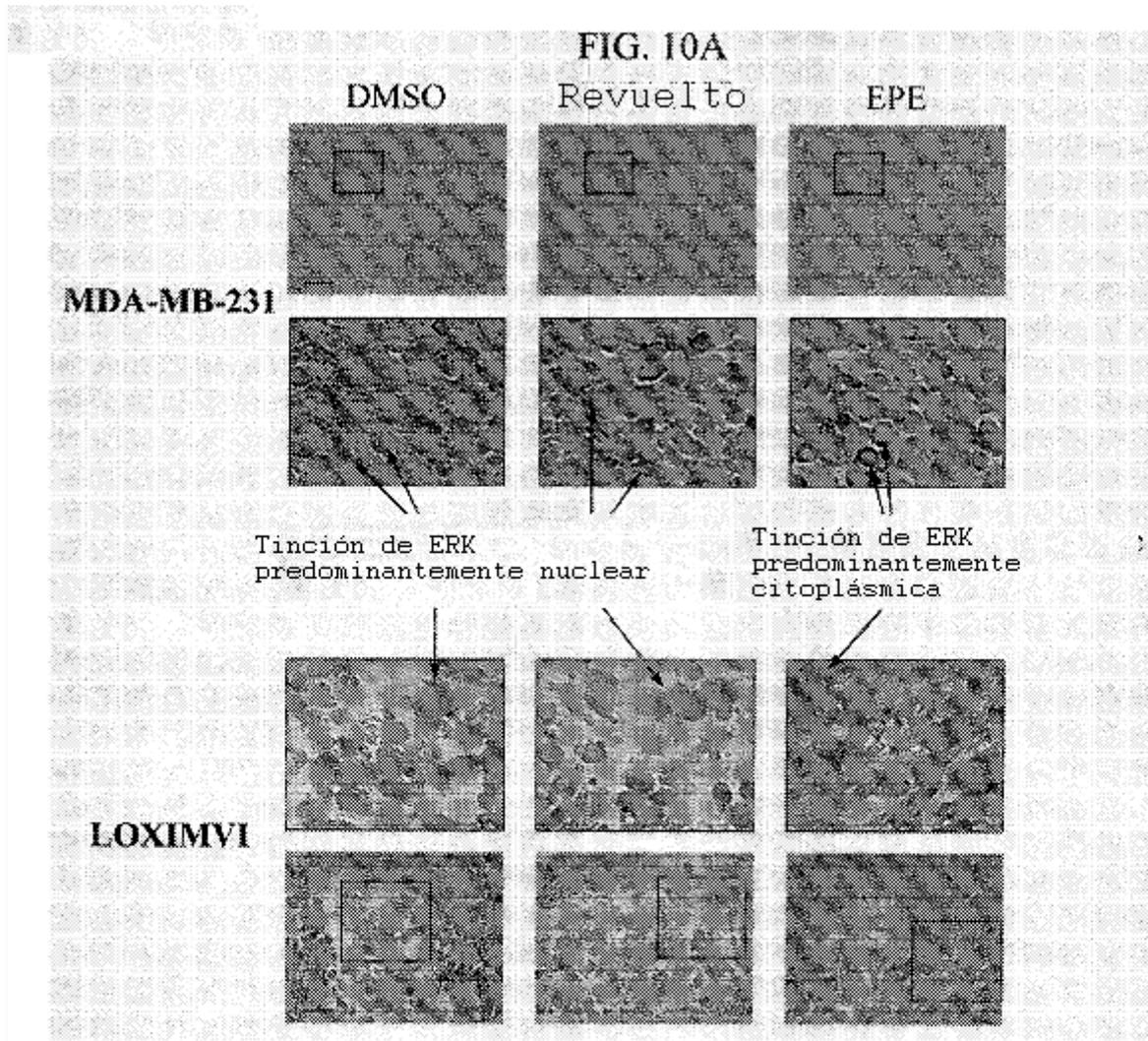


FIG. 9B

A2352





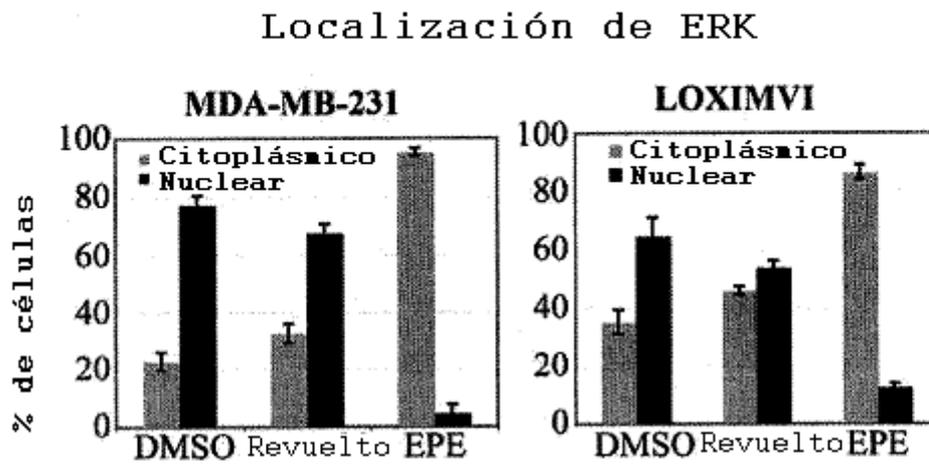


FIG. 10B

FIG. 11

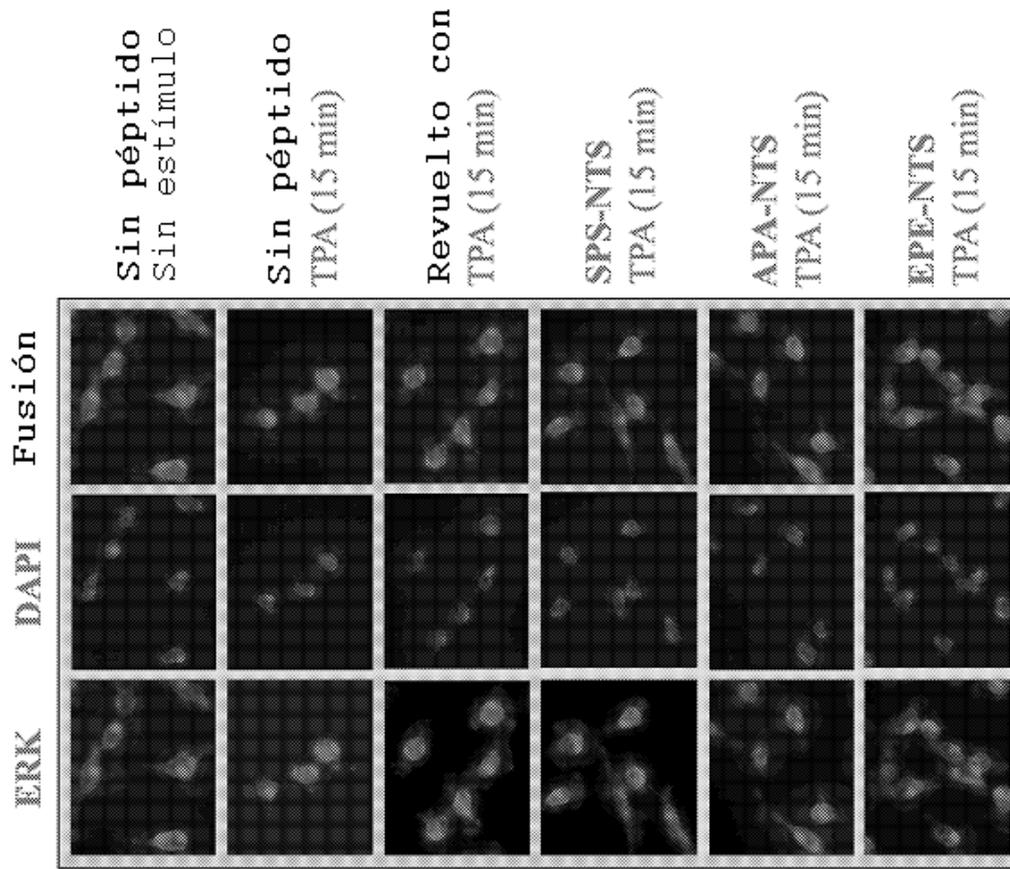


FIG. 12A

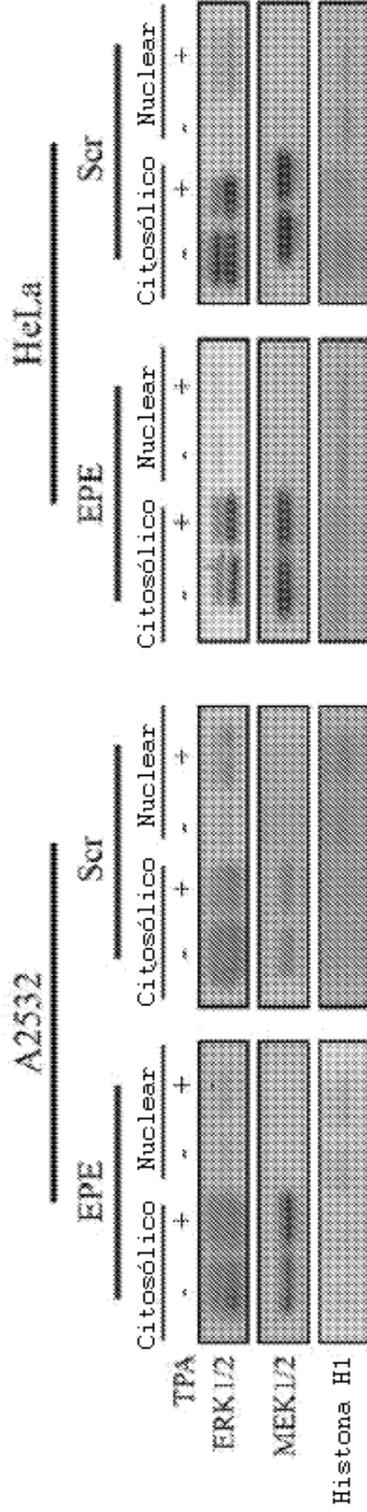


FIG. 12B

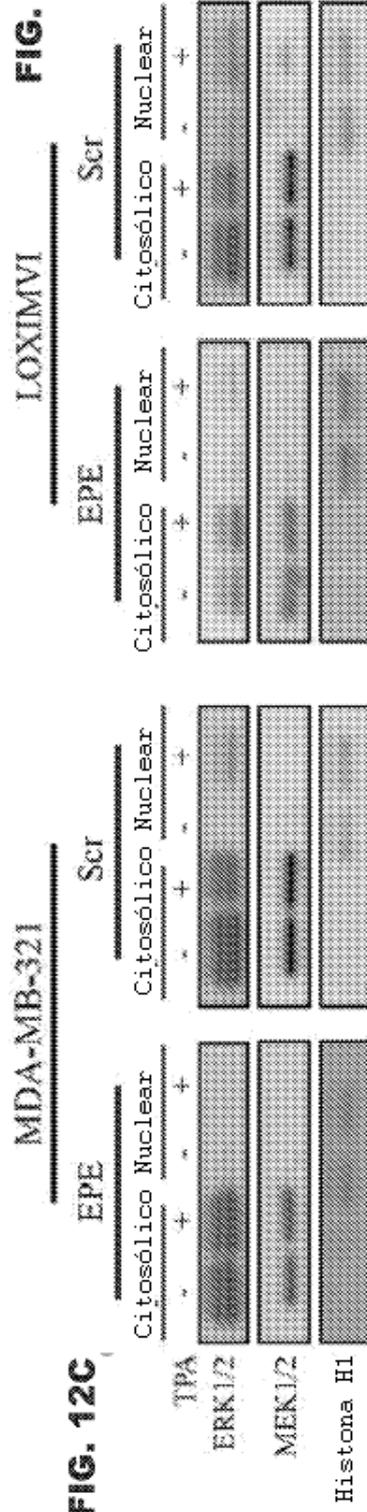


FIG. 12C

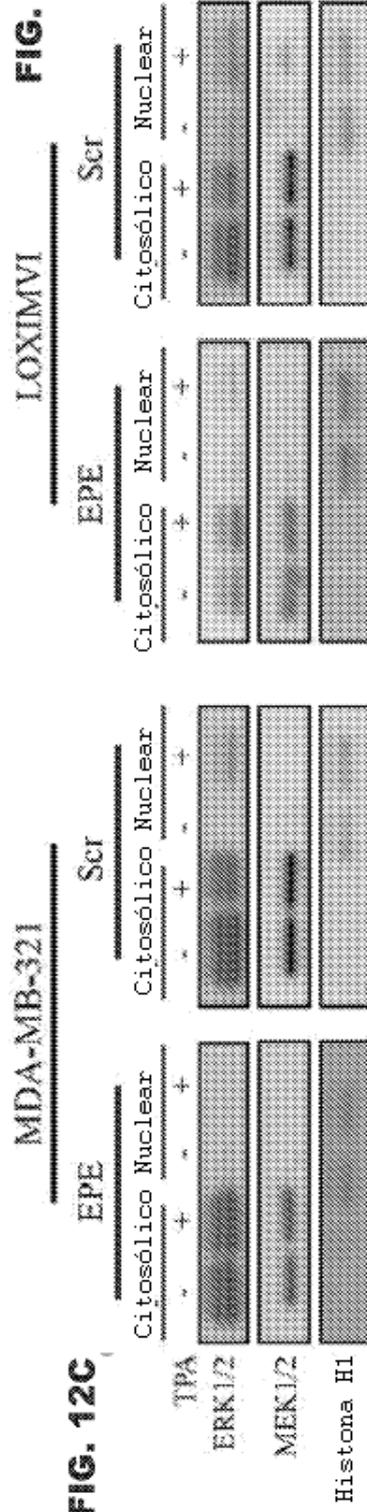


FIG. 12D

FIG. 13A

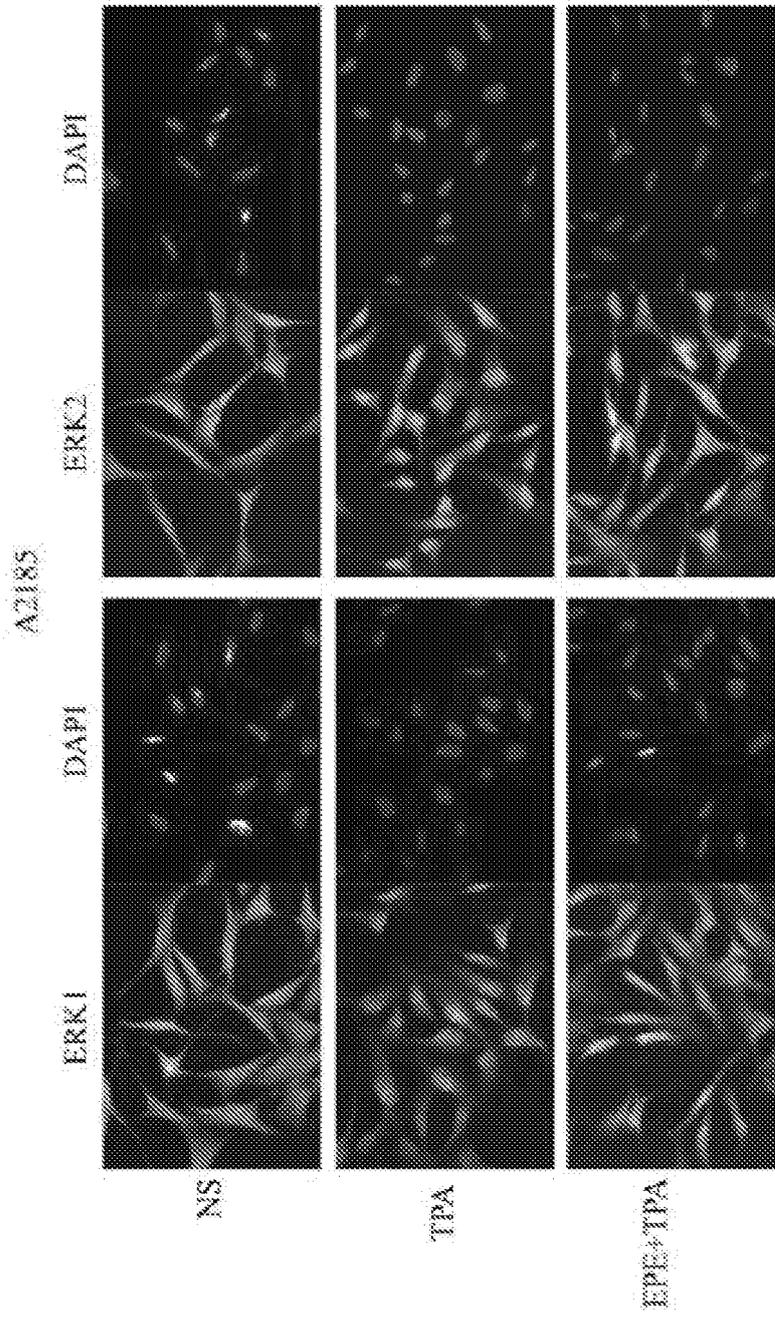
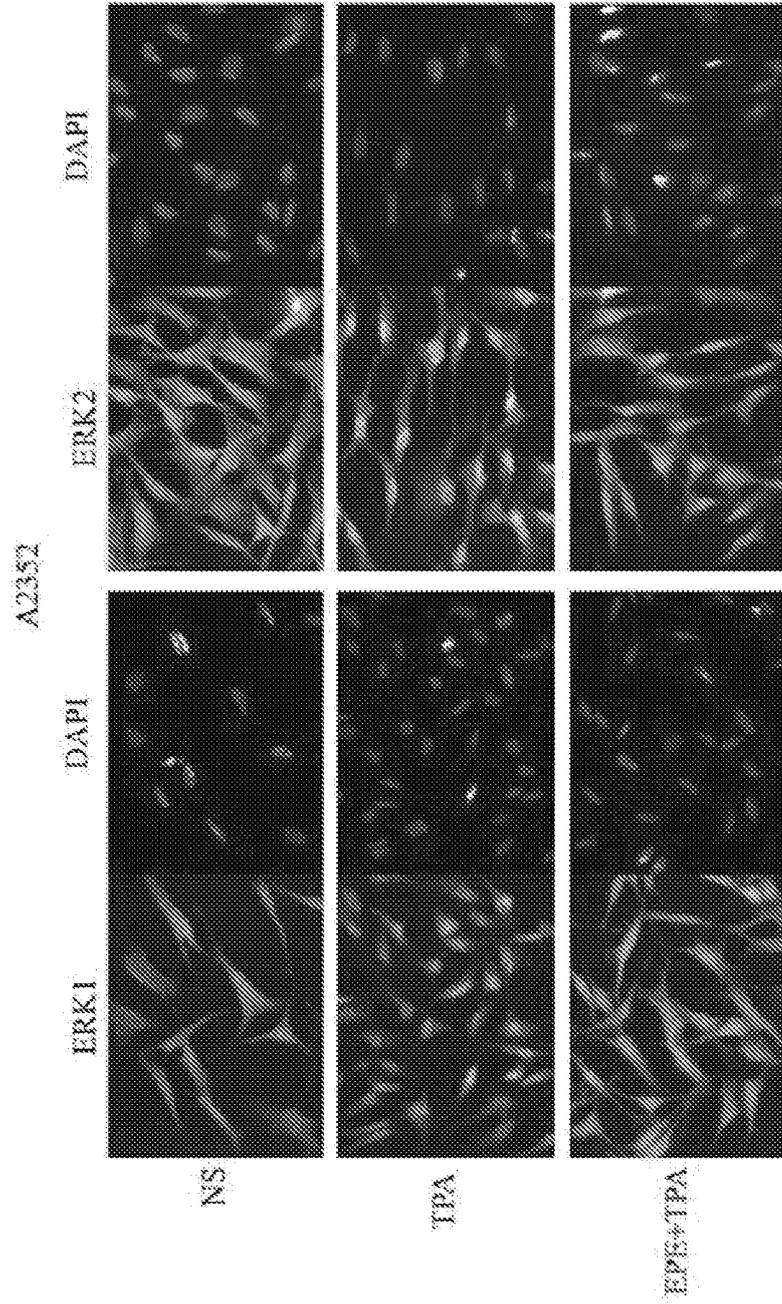


FIG. 13B



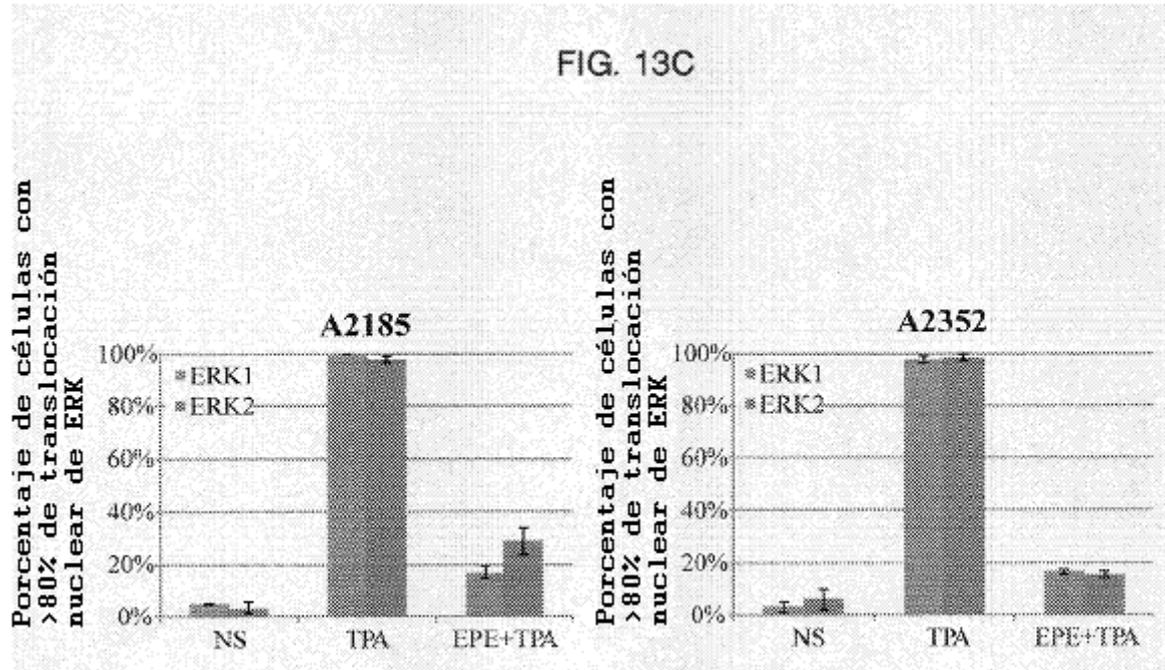


FIG. 14B

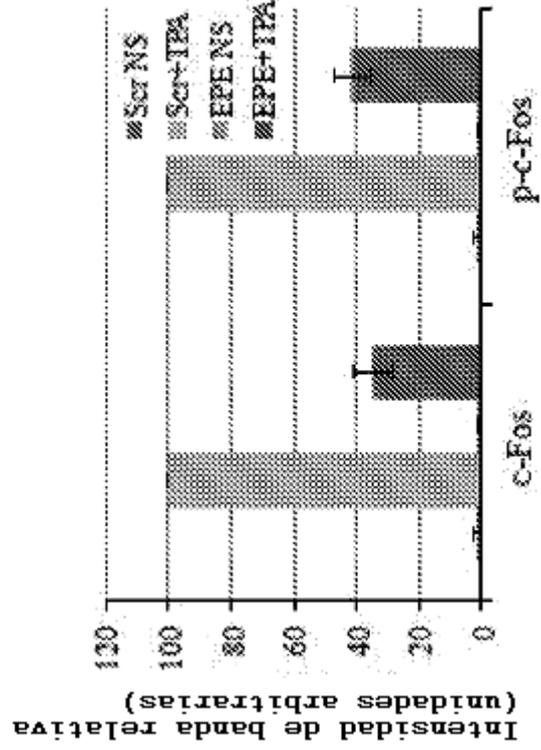
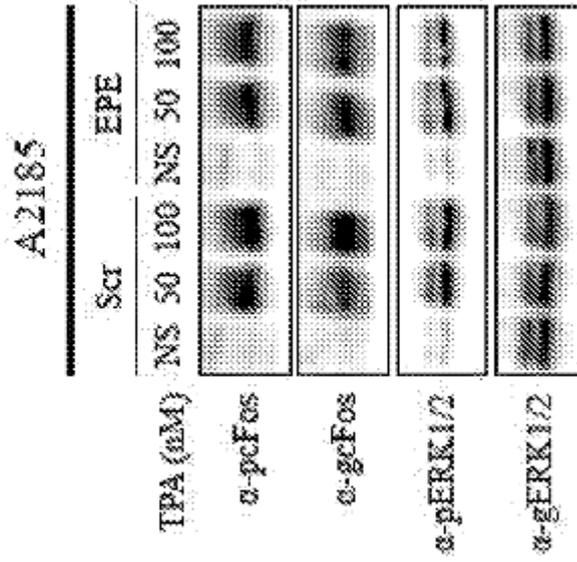


FIG. 14A



Resistente a A2352 PLX

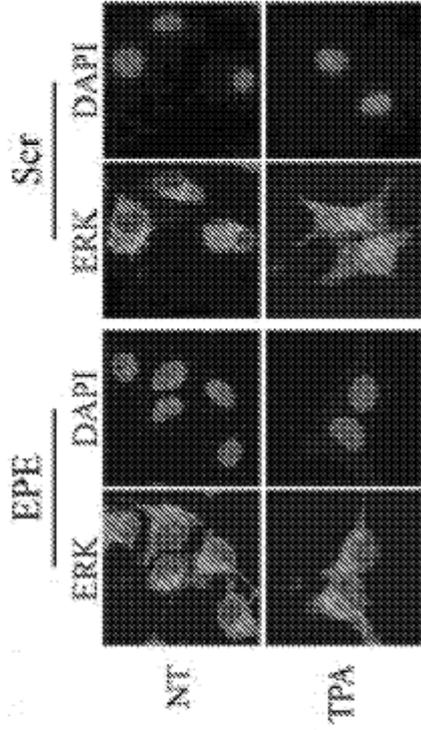


FIG. 15A

A4132

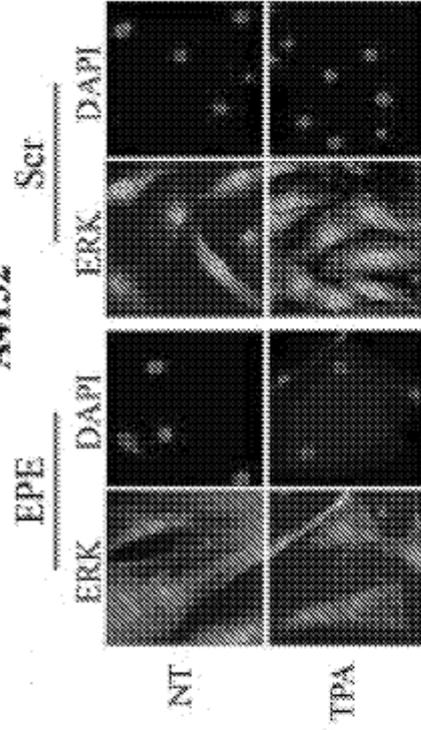


FIG. 15B