

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 515**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2014 PCT/EP2014/059315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14180889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2014 E 14722204 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2994533**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

07.05.2013 EP 13382167

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

29.11.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
ONCOLÒGICA DE VALL HEBRON (100.0%)
Natzaret, 115
08035 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**SOUCEK, LAURA y
BEAULIEU, MARIE-EVE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 733 515 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

Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al uso médico del polipéptido Omomyc para el tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

10 El fármaco ideal para el cáncer debería dirigirse a una función no redundante continuamente necesaria para el mantenimiento del tumor, pero dispensable para el mantenimiento y función de cualquier tejido normal. Por tanto, la lógica más común es dirigirse a productos génicos que están específicamente mutados en cáncer, basándose en que estas moléculas mutantes deberían ser los “conductores” más probables del cáncer y, quizá, menos críticos para los tejidos normales. Por estas razones, se ha concentrado mucha atención en catalogar las lesiones recurrentes en tipos específicos de cáncer. Desafortunadamente, hay varios problemas a este enfoque. En primer lugar, la mayoría de los cánceres humanos sólidos pasan por episodios de inestabilidad genómica y muestran un ruido mutacional que puede oscurecer las mutaciones “conductoras” y sus rutas efectoras relacionadas. En segundo lugar, los cánceres son el resultado final de un proceso que implica transiciones a través de múltiples cuellos de botella evolutivos. Cada cuello de botella puede requerir un tipo específico de mutación cuya función es posteriormente dispensable para el mantenimiento del tumor y, por consiguiente, no una buena diana terapéutica después de ese punto en la evolución del tumor.

25 Myc es una proteína con cremallera de leucina y hélice-bucle-hélice básica (b-HLH-LZ, del inglés *basic helix-loop-helix leucine zipper*) implicada en el control del crecimiento y del cáncer, que funciona en una red con las proteínas Max, Mad y Mnt estructuralmente relacionadas. Los dímeros Myc/Max activan la transcripción génica e inducen la proliferación celular o apoptosis. Los complejos Mad/Max y Mnt/Max actúan como represores y producen la detención del crecimiento y diferenciación celulares. Todos los dímeros reconocen el mismo sitio consenso de ADN, la caja E CACGTG.

30 Myc está estrechamente regulada en células normales, donde sus niveles son mayores en proliferación y menores en no proliferación. La actividad de Myc anormalmente alta y/o desregulada está implicada causalmente en la mayoría de los cánceres y con frecuencia asociada con tumores agresivos, poco diferenciados y angiogénicos. La desregulación de la expresión de Myc se debe a la sobreexpresión mediante amplificaciones de genes, pérdida de control transcripcional, degradación alterada o estabilización aumentada. Esto produce proliferación anómala, supervivencia aumentada, cambios en el metabolismo, angiogénesis e inflamación, todo lo cual representa distintivos principales del cáncer. Estudios múltiples sustentan el papel crucial de Myc en regir los aspectos intracelulares y extracelulares de la tumorigénesis, lo que sugiere que dirigirse a su función sería terapéuticamente valioso.

35 Se sabe que la regulación por disminución de myc a través de un inhibidor de bromodominio BET, produce la regresión de múltiples tipos de tumores (Delmore, J. E., et al., 2011, *Cell*, 146: 904–917). Aunque este enfoque muestra buen potencial, presenta algunas limitaciones tales como toxicidad y numerosos efectos inespecíficos.

45 Muchas moléculas pequeñas que desestabilizan la interacción Myc/Max han mostrado baja especificidad en la célula (Prochownik, E. V. y Vogt, P. K., 2010, *Genes Cancer* 1, 650-659).

50 Sin embargo, un inhibidor de Myc aún no está disponible clínicamente y su diseño presenta varias advertencias: la primera es que Myc es un factor de transcripción nuclear, que, por consiguiente, es más difícil de alcanzar que las moléculas de membrana o citoplasmáticas; la segunda es que Myc no tiene un “sitio activo” enzimático al cual dirigirse; y por último, la familia Myc comprende 3 proteínas diferentes, c-, N- y L-Myc, que en ciertas condiciones, son funcionalmente redundantes, de modo que todas ellas requieren inhibición simultánea. Además, ha habido preocupaciones de que la inhibición de Myc induciría efectos secundarios importantes inhibiendo la proliferación de tejidos normales. Por todas estas razones, la fabricación de un fármaco inhibidor de Myc supone un reto.

55 Omomyc es un mutante dominante negativo de MYC que comprende el dominio b-HLH-LZ de Myc y que contiene cuatro sustituciones de aminoácidos en la cremallera de leucina de Myc (Soucek, L. et al., 1998, *Oncogene* 17, 2463-2472; Soucek, L. et al. (2002), *Cancer Res* 62: 3507-3510). Las sustituciones de aminoácidos E61T, E68I, R74Q y R75N confieren especificidad de dimerización alterada a la proteína, que conserva la capacidad de unirse a su compañero natural Max para formar homodímeros y heterodímeros con c-, N- y L-Myc de tipo silvestre (no mutado).

60 Debido a estas propiedades, Omomyc puede prevenir las funciones de transactivación génica dependiente de Myc tanto *in vitro* como *in vivo* anulando la capacidad de Myc de unirse a su sitio de unión de reconocimiento de ADN, la caja E (Savino, M. et al., 2011, *PLoS One* 6, e22284; Soucek, L. et al. (2004), *Cell Death Differ* 11, 1038 1045). Al mismo tiempo, Omomyc potencia fuertemente la apoptosis inducida por Myc de una manera dependiente del nivel

de expresión de Myc y por tanto fortalece la actividad de transrepresión de Myc. Por tanto, Omomyc impide la unión de Myc a cajas E de promotores y la transactivación de genes diana mientras que conserva la unión dependiente de Miz-1 a promotores y la transrepresión. En presencia de Omomyc, el interactoma de Myc se canaliza a la represión y su actividad cambia de pro-oncogénica a supresora de tumores.

Los ratones TRE-Omomyc;CMVrtTA, en los que la expresión de Omomyc está controlada por un elemento promotor que responde a tetraciclina y el transactivador ampliamente expresado rtTA está dirigido por un promotor de CMV, muestran alta expresión de Omomyc en la mayoría de los tejidos después de la administración de doxiciclina (Soucek et al., 2008, Nature, 455: 679-683). Estos ratones se cruzaron con el modelo murino bien establecido de tumorigénesis pulmonar LSL-Kras^{G12D}. Solo 3 días de expresión de Omomyc fueron suficientes para producir una drástica reducción del volumen de los tumores y al cabo de una semana los animales carecen básicamente de tumores. De forma importante, aunque otros tejidos en división, tales como la piel, los testículos y el intestino, mostraron velocidades de proliferación significativamente reducidas durante el tratamiento, y mostraron un cierto grado de atrofia, los ratones no mostraron signos obvios de malestar o enfermedad. Además, los efectos secundarios de la inhibición de Myc, resultantes de la expresión de Omomyc, son completamente reversibles y desaparecen tras la interrupción del tratamiento.

Hasta ahora, a pesar de que se ha demostrado que la expresión de Omomyc es una estrategia eficaz de inhibición de Myc *in vivo*, se ha aplicado solamente utilizando un enfoque de terapia génica. De hecho, Omomyc es un péptido considerado como demasiado voluminoso e inadecuado para suministrar al compartimento celular deseado (Montagne M. et al., PLoS One. 2012;7:e32172. doi: 10.1371/journal.pone.0032172), Savino M. et al., PLoS One. 2011; 6:e22284. doi: 10.1371/journal.pone.0022284) y Genes Dev., 2011, 25: 895-7. doi: 10.1101/gad.2053311).

Por otra parte, se predice que Omomyc muestra poca capacidad para atravesar barreras fisiológicas debido a sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas (por ejemplo, la hidrofobicidad, como se predice utilizando el gráfico de hidropatía de Kyte & Doolittle, Kyte J., Doolittle R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132). Además, a pesar de la presencia de varios restos de arginina en la región básica de Omomyc, los algoritmos más recientes que predicen la capacidad espontánea de penetración celular de los péptidos, no predicen que Omomyc posea tal propiedad (Gautam et al. Journal of Translational Medicine 2013, 11:74).

Por lo tanto, sería ventajoso proporcionar enfoques terapéuticos para el tratamiento del cáncer basados en dominios b-HLH-LZ capaces de transducirse a través de la membrana celular de células eucariotas e inhibir la transactivación génica dependiente de Myc.

Breve compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, que tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 mayor que 70 %, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o adición de un aminoácido y/o de la eliminación de uno o más aminoácidos y/o de la sustitución conservativa de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 y en donde la variante funcionalmente equivalente del mismo puede dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez que se encuentra en el núcleo, siendo capaz de translocarse a través de la membrana celular y de la envoltura nuclear para su uso en medicina, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o en una variante funcionalmente equivalente del mismo, que tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 mayor que 70 %, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o adición de un aminoácido y/o de la eliminación de uno o más aminoácidos y/o de la sustitución conservativa de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 y en donde la variante funcionalmente equivalente del mismo puede dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez que se encuentra en el núcleo, siendo capaz de translocarse a través de la membrana celular y de la envoltura nuclear, para uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. (A) Las imágenes de fluorescencia de células A549 incubadas durante 2 horas con Omomyc-FITC a 37 °C muestran que Omomyc-FITC se localiza en el núcleo y el citoplasma. (B) Tinción de Hoescht de los núcleos. (C) Contraste de fase.

Figura 2. Células incubadas con 10 uM de Omomyc o Max* se contaron y tiñeron con anexina V y PI. (A) Número total de células A549 tratadas con PBS, Omomyc o Max. (B) Porcentaje de células muertas teñidas con PI. (C) Porcentaje de células vivas (no teñidas). (D) Porcentaje de células positivas para anexina V.

Figura 3. (A) Espectros de dicroísmo circular (DC) registrados a 20 °C para las proteínas purificadas c-Myc*, Max* y Omomyc (32 µM) que muestran que Omomyc tiene una estructura plegada más similar a la de Max* que

Myc* (mgrad, miligrados). (B) Desnaturalización térmica estudiada por dicroísmo circular a 1 °C/min para las proteínas purificadas c-Myc*, Max* y Omomyc que muestran que Omomyc tiene una estructura plegada más estable que la de Max* (°m, miligrados a la longitud de onda especificada de 222 nm).

5 **Figura 4.** Cuantificación de fluorescencia de imágenes de microscopía confocal de células A549 fijadas con PFA al 4 % después de 2 horas de incubación a 37 °C con Omomyc o Max* a diferentes concentraciones de péptido (5, 10 y 25 µM) (30-80 células contadas por imagen). UA, unidades arbitrarias.

10 **Figura 5.** Cuantificación de fluorescencia de imágenes de microscopía confocal de células A549 vivas después de 20 minutos de incubación con Omomyc o Max* (20 µM). UA, unidades arbitrarias.

Figura 6. Tinción con violeta cristal de células de adenocarcinoma de pulmón A549 y H1650 tratadas con péptido Omomyc o Max* 25 µM durante los tiempos indicados.

15 **Figura 7.** Cuantificación de la inhibición de la proliferación mediante tinción con violeta cristal de células de adenocarcinoma de pulmón A549 y H1650 tratadas con péptido Omomyc o Max* 25 µM durante los tiempos indicados.

20 **Figura 8.** Respuesta a la dosis de células A549 a Omomyc y Max* mediante cuantificación con tinción de violeta cristal.

Figura 9. Cuantificación de la proliferación de células de glioma U87 tratadas con péptido Omomyc o Max* a 25 µM.

25 **Figura 10.** (A) Pulmón de animales sin tratar (izquierda) y tratados (derecha) 10 minutos después de la administración intranasal del péptido fluorescente Omomyc (dosis única de 37,5 mg/kg). (B) Cerebro de animales sin tratar (izquierda) y tratados (derecha) 10 minutos después de la administración intranasal del péptido fluorescente Omomyc (dosis única de 37,5 mg/kg).

30 **Figura 11.** Tratamiento de adenocarcinoma de pulmón con PBS o con Omomyc por administración intranasal. (A) Tasa proliferativa de tumores. (B) Densidad celular.

35 **Figura 12.** Medición del % de área tumoral después del tratamiento de adenocarcinoma de pulmón con PBS o con Omomyc por administración intranasal.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que, sorprendentemente, Omomyc es capaz de transducirse eficazmente a través de membranas celulares y translocarse al núcleo, en donde ejerce su efecto supresor de tumores. Por tanto, Omomyc es un auténtico dominio de transducción de proteínas (PTD, del inglés *Protein Transduction Domain*). Por tanto, por primera vez, Omomyc puede utilizarse por sí mismo como un fármaco anti-Myc sin necesidad de utilizar vehículos para el suministro del polipéptido al citoplasma de la célula o utilizar enfoques de terapia génica para el suministro a la célula del ácido nucleico que codifica Omomyc. Esto permite el uso del polipéptido Omomyc para el tratamiento de enfermedades asociadas con proliferación celular desregulada tales como cáncer. Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que Omomyc tiene varias ventajas en comparación con el dominio bHLHZ de Max (Max*):

- Omomyc muestra mayor capacidad de penetración celular en comparación con Max* en diferentes tipos de células y a diferentes concentraciones (ejemplo 6)
- Omomyc es térmicamente más estable que Max* y esto es una clara ventaja para el diseño de fármacos (ejemplo 5)
- Omomyc es más eficaz que Max* tanto impidiendo el crecimiento de las células (ejemplo 8) como aumentando la muerte de células cancerosas (ejemplo 4).

55 Además, Omomyc es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (ejemplo 9 y figura 10B) y de ejercer su efecto terapéutico *in vivo* (ejemplo 10).

Usos terapéuticos de Omomyc

60 La presente invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, que corresponde a Omomyc, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer.

65 En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, que tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 mayor que 70 %, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o de la adición de un aminoácido y/o de la eliminación de uno o más aminoácidos y/o de la sustitución conservativa de uno o más

aminoácidos con respecto al polipéptido de SEQ ID NO: 1 y en donde la variante funcionalmente equivalente del mismo puede dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez que se encuentra en el núcleo, siendo capaz de translocarse a través de la membrana celular y de la envoltura nuclear para su uso en medicina, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o en una variante funcionalmente equivalente del mismo, que tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 mayor que 70 %, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o de la adición de un aminoácido y/o de la eliminación de uno o más aminoácidos y/o de la sustitución conservativa de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 y en donde la variante funcionalmente equivalente del mismo puede dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez que se encuentra en el núcleo, siendo capaz de translocarse a través de la membrana celular y a través de la envoltura nuclear, para uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse.

15 El polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de la proteína Omomyc. El término "Omomyc" como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que consiste en una versión mutada del dominio bHLHZip de Myc que lleva las mutaciones E61T, E68I, R74Q y R75N (en donde la numeración de las posiciones mutadas se da con respecto a la secuencia de la región de Myc correspondiente a los aminoácidos 365-454 del polipéptido como se define con el número de registro NP_002458 en la base de datos del NCBI, publicación del 27 de junio de 2012). A continuación se muestra la secuencia de c-Myc proporcionada en la base de datos del NCBI con el número de registro NP_002458, en donde la región de la que deriva Omomyc se muestra subrayada:

1 mdffrvvenq qppatmplnv sftnrnydld ydsvqpyfyc deeenfyqqq qqselsppap
 61 sediwkkfel lptpplspsr rsglcspsyv avtpfslrgd ndggggsfst adqlemvtel
 121 lggdmvnqsf icdpddetfi kniiiqdcmw sgfsaaaklv seklasyqaa rkdsqspnpa
 181 rghsvcstss lylqdlstaa secidpsvfv pyplndssp kscasqdssa fspssdslls
 241 stesspqgsp eplvlheetp pttssdsee qedeeidv svekrqapgk rsesgspag
 301 ghskpphspl vlkrchvsth qhnyappst rkdypaakrv kldsvrvlrq isnnrkctsp
 361 rssdteenvk rrthnvlerq rrnelkrsff alrdqipele nnekapkvvi lkkatayils
 421 vqaeeqklis eedllrkrre qlkhkleqlr nsca (SEQ ID NO:2)

25 A continuación se muestra el polinucleótido que codifica Omomyc (SEQ ID NO: 3) y la secuencia polipeptídica correspondiente (SEQ ID NO: 1), en donde los tripletes subrayados y en negrita corresponden a esas posiciones que están mutadas con respecto a Myc:

¹ACC GAG GAG AAT GTC AAG AGG CGA ACA CAC AAC GTC TTG GAG CGC CAG

¹*Thr Glu Glu Asn Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln*

⁴⁹AGG AGG AAC GAG CTA AAA CGG AGC TTT TTT GCC CTG CGT GAC CAG ATC

¹⁷*Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile*

30 ⁹⁷CCG GAG TTG GAA AAC AAT GAA AAG GCC CCC AAG GTA GTT ATC CTT AAA

³³*Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys*

¹⁴⁵AAA GCC ACA GCA TAC ATC CTG TCC GTC CAA GCA GAG ACG CAA AAG CTC

⁴⁹*Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Thr Gln Lys Leu*

¹⁹³ATT TCT GAA ATC GAC TTG TTG CGG AAA CAA AAC GAA CAG TTG AAA CAC

⁶⁵*Ile Ser Glu Ile Asp Leu Leu Arg Lys Gln Asn Glu Gln Leu Lys His*

²⁴¹AAA CTT GAA CAG CTA CGG AAC TCT TGT GCG TAA

⁸¹*Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Cys Ala End*

5 Omomyc también contiene el dominio M2 de c-Myc, que tiene la secuencia RQRRNELKRSF (SEQ ID NO: 49) (véase Dang y Lee, Mol.Cell. Biol., 1988, 8:4048-4054) (doble subrayado anteriormente), y que corresponde a una señal de localización nuclear.

10 Omomyc se caracteriza en que muestra capacidad de dimerización aumentada con las tres proteínas Myc oncogénicas (c-Myc, N-Myc y L-Myc). Omomyc puede derivar del dominio bHLHZip de cualquier proteína Myc conocida en la técnica, siempre que se conserven las mutaciones que producen el efecto supresor de tumores. Por tanto, el Omomyc que puede utilizarse en la presente invención puede derivar de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferentemente, la proteína Omomyc deriva de la proteína Myc humana (número de registro NP_002458, publicación del 27 de junio de 2012).

15 El término "Myc", como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de factores de transcripción que incluye c-Myc, N-Myc y L-Myc. La proteína Myc activa la expresión de muchos genes mediante la unión a la secuencia consenso CACGTG (secuencias de caja potenciadora o cajas E y reclutando histona acetiltransferasas o HAT). Sin embargo, Myc también puede actuar como un represor transcripcional. Uniéndose al factor de transcripción Miz-1 y desplazando al coactivador p300, inhibe la expresión de genes diana de Miz-1. Myc también
20 tiene un papel directo en el control de la replicación del ADN.

25 El dominio bHLH-LZ de Myc o cremallera de leucina y hélice-bucle-hélice de región básica se refiere a una región que determina la dimerización de Myc con la proteína Max y la unión a los genes diana de Myc. Esta región corresponde a los aminoácidos 365-454 de Myc humano y se caracteriza por dos hélices alfa conectadas por un bucle (Nair, S. K., & Burley, S. K., 2003, Cell, 112: 193-205).

30 La expresión "variante funcionalmente equivalente", cuando se refiere a Omomyc, se refiere a cualquier polipéptido resultante de la delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de SEQ ID NO: 1 o resultante de la modificación química del polipéptido de SEQ ID NO: 1 y que sustancialmente conserva la actividad supresora tumoral del polipéptido Omomyc. El experto en la materia entenderá que la conservación de la actividad supresora tumoral de Omomyc requiere que la variante pueda dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez se encuentra en el núcleo, que pueda translocarse a través de la membrana celular y que pueda translocarse a través de la envoltura nuclear.

35 Las variantes funcionalmente equivalentes adecuadas de Omomyc incluyen polipéptidos que consisten esencialmente en el polipéptido de SEQ ID NO: 1. En este contexto, "que consiste esencialmente en" significa que la molécula especificada no contendría ninguna secuencia adicional que altere la actividad de Omomyc.

40 Las variantes funcionales adecuadas del péptido de direccionamiento son las que muestran un grado de identidad de aproximadamente mayor del 25 % de identidad de secuencia de aminoácidos, tal como el 25 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, con respecto al péptido de SEQ ID NO: 1. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina utilizando algoritmos y métodos informáticos muy conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente utilizando el algoritmo BLASTP, como se ha descrito previamente [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 1990;215: 403-410]. En una realización
45 preferida, la identidad de secuencia se determina a lo largo de toda longitud completa del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o a lo largo de la longitud completa de la variante o de ambas.

Las variantes funcionalmente equivalentes del polipéptido Omomyc también pueden incluir modificaciones postraduccionales, tales como glucosilación, acetilación, isoprenilación, miristoilación, procesamiento proteolítico, etc.

5 De forma alternativa, las variantes funcionales adecuadas del péptido de direccionamiento son aquellas en las que una o más posiciones en el polipéptido Omomyc contienen un aminoácido que es una sustitución conservativa del aminoácido presente en la proteína Omomyc mencionada anteriormente. Las “sustituciones conservativas de aminoácidos” son el resultado de sustituir un aminoácido por otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares. Por ejemplo, cada uno de los 6 grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), serina (S) treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) 10 asparragina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). La selección de dichas sustituciones conservativas de aminoácidos está dentro de la capacidad del experto en la materia y se describe, por ejemplo, en Dordo et al. et al., (J. Mol. Biol, 1999, 217;721-739) y en Taylor et al., (J. Theor. Biol., 1986, 119:205-218).

15 Se entenderá que las variantes funcionalmente equivalentes de Omomyc contienen mutaciones en posiciones correspondientes a las mutaciones E61T, E68I, R74Q y R75N encontradas en la proteína Omomyc derivada de c-Myc humano. La posición en la que deben producirse dichas mutaciones en la variante funcionalmente equivalente puede determinarse mediante un alineamiento múltiple de secuencia de diferentes secuencias de Myc e identificarse mediante el alineamiento de esas posiciones correspondientes a las posiciones 61, 68, 74 y 75 en la secuencia de Omomyc derivada de c-Myc humano.

20 Un alineamiento múltiple de secuencias es una extensión de alineamientos por pares para incorporar más de dos secuencias a la vez. Los métodos de alineamiento múltiple alinean todas las secuencias en un conjunto de interrogantes determinado. Un programa de alineamiento múltiple de secuencias preferido (y su algoritmo) es ClustalW, Clustal2W o ClustalW XXL (véase, Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680). Una vez comparadas (alineadas) las secuencias de c-Myc de diferentes organismos y de la variante, como se describe en el presente documento, el experto en la materia puede identificar fácilmente las posiciones en cada una de las secuencias correspondientes a las posiciones e introducir en la variante de Omomyc las mutaciones correspondientes a las mutaciones E61T, E68I, R74Q y R75N encontradas en Omomyc derivada de c-Myc humano.

Como ensayos adecuados para determinar si un polipéptido puede considerarse como una variante funcionalmente equivalente de Omomyc se incluyen, sin limitación:

- 35 - Ensayos que miden la capacidad del polipéptido de formar complejos diméricos con Max y Myc, tales como los ensayos basados en la expresión de un gen indicador, como se describe en Soucek et al. (Oncogene, 1998, 17: 2463 - 2472) así como PLA (ensayo de ligamiento de proteínas) o coinmunoprecipitación.
- 40 - Ensayos que miden la capacidad del polipéptido de unirse al sitio de reconocimiento de Myc/Max en el ADN (el sitio CACGTG), tal como el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés *electrophoretic mobility shift assay*) descrito en Soucek et al. (citados anteriormente).
- 45 - Ensayos que miden la capacidad de reprimir la transactivación inducida por Myc, tal como el ensayo basado en la expresión de un gen indicador bajo el control de sitios de unión de ADN específicos para Myc/Max como describen Soucek et al (citados anteriormente).
- 50 - Ensayos basados en la capacidad del polipéptido de inhibir el crecimiento de células que expresan el oncogén myc, como describen Soucek et al (citados anteriormente).
- Ensayos que miden la capacidad del polipéptido de aumentar la apoptosis inducida por myc, tal como los ensayos descritos por Soucek et al. (Oncogene, 1998, 17: 2463 - 2472). Además, para evaluar la apoptosis en una célula, puede utilizarse cualquier ensayo comúnmente conocido en la técnica, tal como la tinción con Hoechst, la tinción con yoduro de propidio (PI, *Propidium Iodine*) o tinción con Anexina V), azul de tripán, escalera/fragmentación de ADN y TUNEL.

55 En una realización preferida, se considera que un polipéptido es una variante funcionalmente equivalente de Omomyc si en uno o más de los ensayos anteriores muestra una actividad que es al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % la de Omomyc nativo.

60 Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de Omomyc también pueden transducir células después de que la variante se ponga en contacto con dicha célula. Se entenderá que las variantes funcionalmente equivalentes de Omomyc contienen el dominio de transducción de proteínas encontrado en Omomyc nativo u otro dominio de transducción de proteínas funcional.

65 En la presente memoria descriptiva, la expresión “secuencia peptídica de penetración celular”, se utiliza indistintamente con las siglas “CPP, del inglés *cell penetrating peptide*” o “PTD, *protein transducing domain*, dominio de transducción de proteínas”. Dicha secuencia se refiere a una cadena peptídica de longitud variable que dirige el transporte de una proteína al interior de una célula. El proceso de suministro en la célula, se produce comúnmente por endocitosis, pero el péptido también puede internalizarse en la célula mediante translocación de membrana directa. Normalmente, las secuencias CPP tienen una composición de aminoácidos que, o bien contiene una

abundancia relativa alta de aminoácidos cargados positivamente, tales como lisina o arginina, o tiene secuencias que contienen un patrón alternante de aminoácido polar/cargado y aminoácido no polar, hidrófobo. Como ejemplos de CPPs (secuencias peptídicas de penetración celular) que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen, sin limitación, la secuencia CPP encontrada en la proteína *antennapedia* de *Drosophila* (RQIKWIFQNRRMKWKK. SEQ ID NO: 4), la secuencia CPP encontrada en la proteína de unión a ADN VP22 del herpesvirus simple 1 (HSV-1) (DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRPRRVE, SEQ ID NO: 5), la secuencia CPP of Bac-7 (RRIRPRPRLPRPRRPLPFPRPG; SEQ ID NO: 6), las secuencias CPP del péptido TAT del VIH-1 que consiste en los aminoácidos 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 7), los aminoácidos 48-60 (GRKKRRQRRRTPQ, SEQ ID NO: 8), los aminoácidos 47-57 (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 9); la secuencia CPP del péptido S413-PV (ALWKTLKKVLKAPKKKRKV; SEQ ID NO: 10), la secuencia CPP de penetratina (RQIKWIFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 11), la secuencia CPP de SynB1 (RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SEQ ID NO: 12), la secuencia CPP de SynB3 (RRLSYSRRRF; SEQ ID NO:13), la secuencia CPP de PTD-4 (PIRRRKKLRRLK; SEQ ID NO: 14), la secuencia CPP de PTD-5 (RRQRRTSKLMKR; SEQ ID NO: 15), la secuencia CPP de recubrimiento-(35-49) del FHV (RRRRNRTRNRNRVR; SEQ ID NO: 16), la secuencia CPP de la proteína Gag-(7-25) del BMV (KMTRAQRRAARRNRWTAR; SEQ ID NO: 17), la secuencia CPP de la proteína Rex-(4-16) del HTLV-II (TRRQRTRRRNR; SEQ ID NO:18), la secuencia CPP de D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 19), la secuencia CPP de R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SEQ ID NO: 20), la secuencia CPP de MAP (KLALKLALKLALALKLA; SEQ ID NO: 21), la secuencia CPP de SBP (MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKY; SEQ ID NO: 22), la secuencia CPP de FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKY; SEQ ID NO: 23), la secuencia CPP de MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKY-cya; SEQ ID NO: 24), la secuencia CPP de MPG(ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKY-cya; SEQ ID NO: 25), la secuencia CPP de Pep-1 (ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKY-cya; SEQ ID NO: 26), la secuencia CPP de Pep-2 (ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKY-cya; SEQ ID NO: 27), una secuencia de poliarginina que tiene la estructura R_N (en donde N varía entre 4 y 17), la secuencia GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 28), la secuencia RRRRRRLR (SEQ ID NO: 29), la secuencia RRQRRTS KLMKR (SEQ ID NO: 30); Transportano GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 31); KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALCKEA (SEQ ID NO: 32); RQIKWIFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 33), la secuencia YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 34); la secuencia RKKRRQRR (SEQ ID NO: 35); la secuencia YARAAARQARA (SEQ ID NO: 36); la secuencia THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 37); la secuencia GGRRARRRRRRR (SEQ ID NO: 38).

Como ensayos adecuados para determinar si un polipéptido conserva la capacidad de translocación de la membrana celular de Omomyc se incluyen, sin limitación, ensayos que miden la capacidad del polipéptido de transducir células en cultivo, tal como el ensayo mostrado en el ejemplo 3 de la presente invención. Este ensayo se basa en poner en contacto el polipéptido con las células en cultivo y detectar la presencia del polipéptido en una localización intracelular. En una realización preferida, la detección del polipéptido de la invención se realiza por microscopía de fluorescencia.

En una realización preferida, se considera que un polipéptido es una variante funcionalmente equivalente de Omomyc si es capaz de transducir una célula diana al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de una manera tan eficaz como Omomyc nativo.

Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de Omomyc también pueden alcanzar los núcleos de las células transducidas después de que la variante se ponga en contacto con dicha célula. Se entenderá que las variantes funcionalmente equivalentes de Omomyc contienen la SLN (señal de localización nuclear) encontrada en Omomyc nativo u otra SLN funcional.

La expresión "señal de localización nuclear", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 4-20 restos de aminoácidos de longitud, que sirve para dirigir una proteína al núcleo. Normalmente, la secuencia de localización nuclear es rica en aminoácidos básicos y en la técnica se conocen bien secuencias ejemplares (Gorlich D. (1998) EMBO 5.17:2721-7). En algunas realizaciones, la SLN se selecciona del grupo que consiste en la SLN del antígeno T grande de SV40 (PKKKRKY, SEQ ID NO: 39); la SLN de nucleoplasmina (KRPAATKKAGQ AKKKK, SEQ ID NO: 40); la SLN de CBP80 (RRRHSDENDGGQPHKRRK, SEQ ID NO: 41); la SLN de la proteína Rev del VIH-I (RQARRNRRRWE, SEQ ID NO: 42); la SLN de la proteína Rex del HTLV-I (MPKTRRRPRRSQRKRPT, SEQ ID NO: 43); la SLN de hnRNP A (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPGYGGGGQYFKPRNQGGY, SEQ ID NO: 44); la SLN de rpL23a (VSHKHKKIRTSPFTTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLDHY, SEQ ID NO: 45). En una realización de la invención, la señal de localización nuclear comprende el motivo K (K/R) X (K/R) (SEQ ID NO: 46).

Como ensayos adecuados para determinar si un polipéptido es una variante funcionalmente equivalente de Omomyc en cuanto a su capacidad para translocarse a través de la membrana celular, incluyen el marcaje doble de una célula con un reactivo específico para el polipéptido y con un colorante (tal como el colorante DAPI o Hoechst) que marca específicamente el núcleo de la célula. En el ejemplo 6 de la presente invención se muestran ensayos de este tipo. En una realización preferida, la detección del polipéptido de la invención se realiza por microscopía confocal o por microscopía de fluorescencia.

En una realización preferida, se considera que un polipéptido es una variante funcionalmente equivalente de

Omomyc, si es capaz de translocarse al núcleo de las células tumorales diana al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de una manera tan eficaz como Omomyc nativo.

5 Como variantes adecuadas, que son funcionalmente equivalentes, y que no forman parte de la invención, se incluyen los polipéptidos Omomyc*TAT y Omomyc*LZArg definidos a continuación:

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Omomyc*TAT	47	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVI LKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCAGRKK RRQRRR
Omomyc*LZArg	48	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVI LKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCARRRR RRLR

10 Según la invención, el polipéptido Omomyc, o su variante funcionalmente equivalente, se utilizan para la prevención o el tratamiento del cáncer en un sujeto. Se entenderá que el uso preventivo o terapéutico según la invención implica el uso directo del polipéptido Omomyc, o de su variante funcionalmente equivalente. Por tanto, los usos preventivos o terapéuticos según la invención, no implican la administración del ácido nucleico que codifica Omomyc, o su variante funcionalmente equivalente.

15 “Prevención” se entiende como la administración de un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, según el primer aspecto de la invención, o de un medicamento que lo contiene, en un estadio inicial o temprano de la enfermedad, o también para prevenir su inicio.

20 El término “tratamiento” se utiliza para indicar la administración de un polipéptido de SEQ ID NO: 1, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, según el primer aspecto de la invención, o de un medicamento que lo contiene, para controlar la evolución de la enfermedad antes o después de que los signos clínicos hayan aparecido. Se entiende que el control de la evolución de la enfermedad se refiere a los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero sin limitación, la reducción de los síntomas, la reducción de la duración de la enfermedad, la estabilización de los estados patológicos (impidiendo específicamente un deterioro adicional), el retraso de la evolución de la enfermedad, la mejoría del estado patológico y la remisión (tanto parcial como completa). El control de la evolución de la enfermedad también implica una prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en caso de no aplicar el tratamiento.

30 El término “cáncer” se refiere a una enfermedad caracterizada por la división celular incontrolada (o por un aumento de la supervivencia o resistencia a la apoptosis), por la capacidad de dichas células de invadir otros tejidos cercanos (invasión) o por la propagación a otras áreas del cuerpo donde las células no están normalmente localizadas (metástasis) a través de los vasos linfáticos y sanguíneos. Dependiendo de si los tumores se propagan o no por invasión y metástasis, estos se clasifican como benignos o malignos: los tumores benignos son tumores que se pueden propagarse por invasión o metástasis, es decir, solo crecen localmente; mientras que los tumores malignos son tumores que pueden propagarse por invasión y metástasis. Los usos médicos según la presente invención, son
35 útiles para el tratamiento de tumores locales y malignos. Como se usa en el presente documento, el término cáncer incluye, pero sin limitación, siguientes tipos de cáncer: cáncer de mama; cáncer de las vías biliares; cáncer vesical; cáncer cerebral, incluyendo glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias hematológicas, incluyendo leucemia linfocítica y mielógena aguda; linfoma/leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T; leucemia de células pilosas; 40 leucemia mielógena crónica; mieloma múltiple; leucemias asociadas con sida y leucemia/linfoma de linfocitos T adultos; neoplasias intraepiteliales incluyendo enfermedad de Bowen y enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas incluyendo la enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer bucal incluyendo carcinoma de células escamosas; cáncer ovárico incluyendo los que surgen de células epiteliales, células estromales, células germinales y células mesenquimatosas; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer 45 rectal; sarcomas incluyendo leiomiomas, rhabdomiomas, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel incluyendo melanoma, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basales y cáncer de células escamosas; cáncer testicular incluyendo tumores germinales tales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores estromales y tumores de células germinales; cáncer tiroideo incluyendo adenocarcinoma tiroideo y carcinoma medular; y cáncer renal incluyendo adenocarcinoma y tumor de Wilms. El 50 experto en la materia conocerá otros cánceres. En una realización preferida, el cáncer tratado es cáncer de pulmón, preferentemente, adenocarcinoma de pulmón, más preferentemente un adenocarcinoma de pulmón dirigido por KRas.

55 Los autores de la presente invención también han observado que Omomyc, o la variante funcionalmente equivalente del mismo, puede disminuir la proliferación celular independientemente de si el cáncer muestra expresión o actividad aumentada de la proteína Myc.

Un "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que tiene un cáncer o que muestra un síntoma o cáncer, o que corre el riesgo de tener un cáncer o mostrar un síntoma de cáncer. Como sujetos (pacientes) adecuados se incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o un perro). Los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos, están incluidos.

La dosis apropiada de Omomyc, o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, que va a utilizarse según la invención, dependerá de diferentes factores tales como el tipo de cáncer que se va a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, si la composición se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al péptido o al polipéptido, y del criterio del médico tratante.

La cantidad de polipéptido de SEQ ID NO: 1, o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, un nivel de dosis apropiado variará generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente al día, que puede administrarse en dosis únicas o múltiples. Preferentemente, el nivel de dosis será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg al día; más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg al día. Un nivel de dosis adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 250 mg/kg al día, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg/kg al día, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg al día. En este intervalo la dosis puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg al día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 100 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que se va a tratar. Los compuestos pueden administrarse en una pauta de 1 a 4 veces al día, preferentemente una o dos veces al día.

El polipéptido de SEQ ID NO: 1, o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, puede administrarse por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, vía tópica, por inhalación o vía parenteral, de modo que se incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica deseada. La vía de administración preferida de dichas composiciones farmacéuticas es la vía endovenosa. En otra realización, la vía de administración es la vía intranasal.

En una realización, el Omomyc, o la variante funcionalmente equivalente del mismo, se prepara con transportadores que protegerán a dicho polipéptido de la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como vinilacetato de etileno, polanhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procesos para preparar dichas formulaciones estarán claros para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse en el comercio en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

A pesar de que Omomyc, y sus variantes funcionalmente equivalentes, pueden translocarse a través de membranas biológicas, es posible formular Omomyc, o cualquiera de sus variantes funcionalmente equivalentes, en nanopartículas. Las nanopartículas pueden contribuir a conservar la integridad del polipéptido en los líquidos biológicos hasta que alcanza el órgano diana. Además, las nanopartículas también pueden modificarse de modo que incluyan fracciones que permitan el direccionamiento de la nanopartícula a un órgano de interés. De esta manera, Omomyc, o la variante funcionalmente equivalente del mismo, puede administrarse cerca del órgano diana, lo que facilita el acceso de Omomyc al interior de las células donde se requiere su actividad biológica.

Por tanto, en otra realización, Omomyc, o cualquiera de sus variantes funcionalmente equivalentes, se proporcionan formando parte de una nanopartícula.

Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier material que tenga un tamaño comprendido en el intervalo de 1 a 1 000 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen tamaños en el intervalo de 2 a 200 nm, preferentemente en el intervalo de 2 a 150 nm, e incluso más preferentemente en el intervalo de 2 a 100 nm. Las nanopartículas que pueden utilizarse en la presente invención incluyen materiales a nanoescala tales como una nanopartícula basada en lípidos, una nanopartícula superparamagnética, una nanocapa, un nanocristal semiconductor, un punto cuántico, una nanopartícula basada en polímero, una nanopartícula basada en silicio, una nanopartícula basada en sílice, una nanopartícula basada en metal, un fullereno y un nanotubo.

La administración dirigida puede realizarse mediante la adición de ligandos sin comprometer la capacidad de las nanopartículas de suministrar su carga útil de polipéptido. Se contempla que esto permitirá el suministro en células, tejidos y órganos específicos. La especificidad de direccionamiento de los sistemas de suministro basados en ligandos, se basa en la distribución de los receptores del ligando en diferentes tipos de células. El ligando de direccionamiento puede estar asociado de manera covalente o no covalente con una nanopartícula, y puede conjugarse a las nanopartículas mediante una variedad de métodos como los comentados en el presente documento.

Como ejemplos de proteínas o péptidos que pueden utilizarse para dirigir las nanopartículas se incluyen transferrina, lactoferrina, TGF- β , factor de crecimiento nervioso, albúmina, péptido Tat del VIH, péptido RGD e insulina, así como otros.

5 Se entenderá que la formulación de Omomyc, o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, en una nanopartícula, no está destinada o no está solamente destinada a facilitar el acceso de Omomyc al interior de la célula, sino a proteger a Omomyc de la degradación y/o a facilitar el direccionamiento de la nanopartícula al órgano de interés.

10 Conjugados de Omomyc y proteínas de fusión que comprenden Omomyc

En el documento también se desvelan conjugados que incluyen una primera región que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y una segunda región que comprende una fracción química que facilita la captación celular del polipéptido. Como ejemplos de fracciones químicas para aumentar la captación celular se incluyen, pero sin limitación: un grupo hidrófobo (por ejemplo, un lípido o ácido graso), un dominio de transducción de proteínas y ciertos quelatos metálicos.

La presencia de fracciones químicas adicionales en la molécula de Omomyc produce conjugados que muestran mayor capacidad para translocarse a través de membranas biológicas con respecto a Omomyc sin modificar, produciendo de esta manera una mayor actividad supresora tumoral.

Por tanto, también se desvela un conjugado que comprende:

- (i) el polipéptido de SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y
- (ii) una fracción química que facilita la captación celular del polipéptido.

El término “conjugado”, como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más compuestos que están unidos entre sí de manera covalente, de tal manera que en el conjugado se conserva la función de cada compuesto.

30 En una divulgación preferida, los conjugados desvelados comprenden al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más fracciones químicas que facilitan la captación celular del polipéptido o de la variante funcionalmente equivalente del mismo.

En otra divulgación, la fracción química que facilita la captación celular del polipéptido es un lípido o un ácido graso.

Un ácido graso generalmente es una molécula que comprende una cadena carbonada con una fracción ácida (por ejemplo, ácido carboxílico) en un extremo de la cadena. La cadena carbonada de un ácido graso puede tener cualquier longitud, sin embargo, se prefiere que la longitud de la cadena carbonada sea de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más átomos de carbono, y cualquier intervalo derivable en ellos. En ciertas divulgaciones, la longitud de la cadena carbonada es desde 4 a 18 átomos de carbono en la parte de la cadena del ácido graso. En ciertas divulgaciones, la cadena carbonada del ácido graso puede comprender un número impar de átomos de carbono, sin embargo, en ciertas divulgaciones puede preferirse un número par de átomos de carbono en la cadena. Un ácido graso que comprende solo enlaces sencillos en su cadena carbonada se denomina saturado, mientras que un ácido graso que comprende al menos un doble enlace en su cadena se denomina insaturado. El ácido graso puede estar ramificado, aunque en una divulgación preferible, no está ramificado. Los ácidos grasos específicos incluyen, pero sin limitación, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linolénico, ácido esteárico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido araquídico, ácido palmitoleico, ácido araquidónico.

50 En una divulgación preferida, la fracción química que facilita la captación celular del polipéptido es una secuencia peptídica de penetración celular, en cuyo caso, el conjugado es una proteína de fusión que comprende Omomyc o la variante funcionalmente equivalente del mismo y la secuencia peptídica de penetración celular.

La expresión “proteína de fusión” se refiere a proteínas generadas por tecnología génica que consiste en dos o más dominios funcionales derivados de diferentes proteínas. Se puede obtener una proteína de fusión por medios convencionales, por ejemplo, mediante expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en una célula adecuada. Se entenderá que el péptido de penetración celular se refiere a un péptido de penetración celular que es diferente del péptido de penetración celular que forma parte del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o de la variante funcionalmente equivalente del mismo.

Las expresiones “polipéptido de SEQ ID NO: 1”, “variante funcionalmente equivalente del polipéptido de SEQ ID NO: 1” y “péptido de penetración celular” se han descrito en detalle en el contexto de los usos médicos de la invención y son igualmente aplicables en el contexto de la proteína de fusión.

65 En una divulgación preferida, dicho péptido de penetración celular no es el péptido de penetración celular de Omomyc endógeno.

En una divulgación, la secuencia peptídica de penetración celular se fusiona al extremo N del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o de la variante funcionalmente equivalente del mismo. En otra divulgación, el péptido de penetración celular se fusiona al extremo C del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o de la variante funcionalmente equivalente del mismo.

5 En divulgaciones preferidas, las proteínas de fusión como las desveladas comprenden, además del propio péptido de penetración celular encontrado en el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más péptidos de penetración celular adicionales.

10 En otra divulgación preferida, los conjugados o las proteínas de fusión como se desvela, comprenden el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo y comprenden además una señal de localización nuclear en el extremo N o en el C. La expresión "señal de localización nuclear (SLN)" se ha descrito en el contexto de los usos terapéuticos de la invención y es igualmente aplicable a las proteínas de fusión desveladas en el presente documento. Se apreciará que la SLN adicional se refiere a una SLN que es diferente de la SLN endógena encontrada en Omomyc o en la variante funcionalmente equivalente del mismo. La SLN adicional puede ser igual o diferente a la SLN endógena encontrada en Omomyc o en la variante funcionalmente equivalente del mismo.

20 En una divulgación, la SLN es una de las SLN que aparece de forma endógena en la secuencia de Myc, tal como el péptido M1 (PAAKRVKLD, SEQ ID NO: 50) o el péptido M2 (RQRRNELKRSF, SEQ ID NO: 49) (véase Dang y Lee, citados anteriormente).

25 En divulgaciones preferidas, los conjugados o las proteínas de fusión que se desvelan comprenden, además de la SLN endógena encontrada en el polipéptido de SEQ ID NO: 1, o en la variante funcionalmente equivalente del mismo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 SLN.

30 El experto en la materia entenderá que puede ser deseable que la proteína de fusión comprenda además uno o más péptidos flexibles que conecten el polipéptido de SEQ ID NO: 1, o la variante funcionalmente equivalente del mismo, a la secuencia peptídica de penetración celular y/o a la SLN. Por tanto, en una divulgación particular, el polipéptido desvelado está directamente conectado a la secuencia peptídica de penetración celular. En otra divulgación particular, el polipéptido desvelado está conectado a la secuencia peptídica de penetración celular a través de un péptido flexible. En una divulgación particular, el péptido desvelado está directamente conectado a la secuencia peptídica de penetración celular y a la SLN. En otra forma de realización particular, el polipéptido de la invención está conectado a la secuencia peptídica de penetración celular a través de un primer enlazador peptídico flexible y a la SLN a través de un segundo enlazador peptídico flexible.

40 Como se usa en el presente documento, las expresiones "péptido flexible", "péptido espaciador" o "péptido enlazador", se refieren a un péptido que une de manera covalente dos proteínas o fracciones, pero que no forma parte de ningún polipéptido, lo que permite que se muevan entre sí sin producir ningún efecto perjudicial sustancial sobre la función de la proteína o la fracción. Por tanto, el enlazador flexible no afecta a la actividad supresora tumoral de la secuencia de Omomyc, a la actividad de penetración celular del péptido de penetración celular o a la capacidad de localización nuclear de la SLN.

45 El péptido flexible comprende al menos un aminoácido, al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cuatro aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos seis aminoácidos, al menos siete aminoácidos, al menos ocho aminoácidos, al menos nueve aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos, al menos 18 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 35 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 45 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos. En algunas divulgaciones el péptido flexible permitirá el movimiento de una proteína con respecto a la otra para aumentar la solubilidad de la proteína y/o para mejorar su actividad. Las regiones enlazadoras adecuadas incluyen una región de poliglicina, la secuencia GPRRRR (SEQ ID NO: 51) de combinaciones de restos de glicina, prolina y alanina.

55 En algunas divulgaciones, la proteína de fusión desvelada puede comprender una fracción química adicional que incluye, entre otros, grupos fluorescentes, biotina, polietilenglicol (PEG), análogos de aminoácidos, aminoácidos no naturales, grupos fosfato, grupos glucosilo, marcadores radioisótopos y moléculas farmacéuticas. En otras divulgaciones, el polipéptido heterólogo puede comprender uno o más grupos químicamente reactivos incluyendo, entre otros, cetona, aldehído, restos de Cys y de Lys.

60 En una divulgación particular, los conjugados o las proteínas de fusión que se desvelan, comprenden una etiqueta unida al conjugado o al dominio C-terminal o N-terminal de dicha proteína de fusión o su variante. Dicha etiqueta generalmente es un péptido o una secuencia de aminoácidos que puede utilizarse en el aislamiento o la purificación de dicha proteína de fusión. Por tanto, dicha etiqueta puede unirse a uno o más ligandos, por ejemplo, uno o más ligandos de una matriz de afinidad tal como un soporte o perla de cromatografía con alta afinidad. Un ejemplo de

dicha etiqueta es una etiqueta de histidina (etiqueta His o HT, *his tag*), tal como una etiqueta que comprende 6 restos de histidina (His6 o H6), que puede unirse a una columna de níquel (Ni²⁺) o cobalto (Co²⁺) con alta afinidad. La etiqueta de His tiene la característica deseable de que puede unirse a sus ligandos en condiciones que son desnaturalizantes para la mayoría de las proteínas y destructivas para la mayoría de las interacciones de tipo proteína-proteína. Por tanto, puede utilizarse para eliminar la proteína cebo etiquetada con H6 después de la destrucción de las interacciones de tipo proteína-proteína en las que el cebo ha participado.

Como ejemplos ilustrativos adicionales, no limitantes, de etiquetas útiles para el aislamiento o la purificación de una proteína de fusión se incluyen la etiqueta Arg, la etiqueta FLAG (DYKDDDDK; SEQ ID NO:52), etiqueta Estrep (WSHPQFEK, SEQ ID NO:53), un epítipo que puede ser reconocido por un anticuerpo, tal como una etiqueta c-myc (reconocido por un anticuerpo anti-myc), etiqueta HA (YPYDVPDYA, SEQ ID NO:54), etiqueta V5 (GKPIPNLLGLDST, SEQ ID NO:55), etiqueta SBP, etiqueta S, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, etiqueta glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, Nusa, TrxA, DsbA, etiqueta Avi, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 60:523-525), una secuencia de aminoácidos tal como AHGHRP (SEQ ID NO: 56) o PIHDHDHPLVHSGMTCXXC (SEQ ID NO:57), β-galactosidasa y similares.

La etiqueta puede utilizarse, si se desea, para el aislamiento o la purificación de dicha proteína de fusión.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al conjugado o proteína de fusión según la divulgación para su uso en medicina.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al conjugado o proteína de fusión según la divulgación para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso del conjugado o la proteína de fusión según la divulgación para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a la administración del conjugado o de la proteína de fusión según la divulgación para su uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer en un sujeto.

En una divulgación preferida, el cáncer que va a prevenirse o tratarse es un cáncer inducido por Myc. En otra divulgación preferida, el cáncer que va a prevenirse o tratarse es un cáncer asociado con una mutación en el gen *KRAS*. En una divulgación, la mutación en el gen *KRAS* es una mutación en la glicina en la posición 12, en la glicina en la posición 13 o en la glutamina en la posición 61. En una divulgación más preferida, la mutación se selecciona del grupo que consiste en la mutación G12S, la mutación G12V, la mutación G13D, la mutación G12C, la mutación G12R, la mutación G12F, la mutación G12I, la mutación G13C, la mutación G13R o la mutación Q61L.

Los términos “medicamento”, “prevención”, “tratamiento”, “cáncer” y la expresión “cáncer inducido por Myc”, se han definido previamente y también se aplican a esta divulgación.

Composiciones antitumorales

El inesperado descubrimiento de que el polipéptido Omomyc puede translocarse a través de membranas biológicas y ejercer su actividad supresora tumoral cuando se proporciona como un polipéptido abre la posibilidad de formular Omomyc con otros fármacos antitumorales. Por tanto, en otro aspecto, la presente divulgación también proporciona composiciones que contienen, juntas o por separado, un primer componente seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) Omomyc,
- (ii) una variante funcionalmente equivalente del mismo,
- (iii) un conjugado o una proteína de fusión como se desvela,

y, como un segundo componente, un compuesto antitumoral.

El primer componente de las composiciones según la divulgación incluye un polipéptido según la SEQ ID NO: 1, una variante funcionalmente equivalente del mismo o una proteína de fusión según la divulgación. Los polipéptidos, las variantes funcionalmente equivalentes del polipéptido de SEQ ID NO: 1 y las proteínas de fusión adecuados, se han descrito anteriormente en el contexto de los métodos terapéuticos según la divulgación y también pueden aplicarse a las composiciones según la divulgación.

Como se usa en el presente documento, “agente antitumoral” se entiende como dicho compuesto biológico o químico que trata tumores o impide su formación. En una divulgación preferida dicho agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente antimetastásico y un agente antiproliferativo.

- Como se usa en la presente divulgación, la expresión “agente citotóxico” se refiere a un agente que puede fomentar la muerte celular y que tiene la capacidad para reducir el crecimiento, detener el crecimiento o destruir células y, particularmente, células que proliferan rápidamente y, aún más particularmente, células tumorales. La muerte celular puede estar causada por cualquier mecanismo, tal como, por ejemplo, apoptosis, aunque no está limitado a esta causa, por la inhibición del metabolismo, la interferencia con la organización del citoesqueleto o la modificación química del ADN. La expresión agente citotóxico comprende cualquier agente de quimioterapia incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos y similares; toxinas; enzimas; citocinas; radioisótopos o agentes de radioterapia.
- La expresión “agentes de quimioterapia” se entiende como compuestos químicos tales como, sin limitación, antibióticos antraciclinas tales como doxorubicina y daunorubicina, taxanos tales como Taxol™ y docetaxel, alcaloides de la vinca tales como vincristina y vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecano, idarrubicina, mitomicina C, oxaliplatino, raltitrexed, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxano o mitramicina.
- Se entiende que una “toxina” es un agente tóxico que se conjuga con el polipéptido o con la proteína de fusión según la divulgación, formando una inmunotoxina. La conjugación de determinadas toxinas con dicho polipéptido o con dicha proteína de fusión reduce la toxicidad de las anteriores, lo que permite su uso como agentes terapéuticos, ya que de otra manera serían demasiado tóxicas. La unión entre la toxina y el polipéptido como se desvela o entre la toxina y la proteína de fusión como se desvela, se realiza químicamente, conservando su actividad biológica. Su separación generalmente se produce en los lisosomas de las células diana de modo que la unión química mencionada solo se rompe en el medio ácido celular encerrado proporcionado por los lisosomas. Las toxinas útiles en el contexto de la presente divulgación son toxinas vegetales, toxinas bacterianas, toxinas de origen fúngico o animal y fragmentos de las mismas, tales como, sin limitación, la cadena A de ricina, saponina, la cadena A de la difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, α -sarcina, proteínas A de *Leurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.
- En el contexto de la presente invención, por “enzimas” se entiende que son enzimas activadoras de toxinas o de fármacos, tales como, sin limitación, la fosfatasa alcalina que activa al etopósido y a la doxorubicina; la carboxipeptidasa G2 que activa a mostazas de nitrógeno; la beta-lactamasa que activa a la doxorubicina, al paclitaxel y a la mitomicina.
- Por “citoquinas” se entiende que son péptidos de distintos tamaños y pesos moleculares que sintetizan las células del sistema inmunitario con el fin de regular la respuesta inmunitaria, y pueden ser hormonas, factores de crecimiento, factores de necrosis, etc. Pueden ser de origen natural o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencia natural. Su conjugación con anticuerpos da lugar a inmunocitocinas. Las citocinas útiles en la presente divulgación son, sin limitación, factor TNF alfa, INF-gamma, factor GM-CSF o IL-2.
- Por “radioisótopos” se entiende que son isótopos radioactivos tales como, sin limitación, ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{125}I , ^{111}In .
- Un “agente antiangiogénico” se entiende que es una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, la angiogénesis.
- Como agentes antiangiogénicos que pueden conjugarse con el polipéptido según la divulgación o con la proteína de fusión según la divulgación se incluyen, sin limitación, un agente antiangiogénico seleccionado del grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, dextrometorfano ácido acético, dimetilxantenona ácido acético, endostatina, IM-862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticuerpos anti-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleuquina 12, IM862, amilorida, angiostatina, angiostatina KI-3, angiostatina KI-5, captopril, DL-alfa-difluorometilornitina, DL-alfa-difluorometilornitina HCl, endostatina, fumagilina, herbimicina A, 4-hidroxiifenilretinamida, juglona, laminina, laminina hexapéptido, laminina pentapéptido, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de ribonucleasa de placenta, suramina, trombospondina, anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibidores de tirosina cinasas de bajo peso molecular de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inhibidores de mTOR (por ejemplo, Torisel); interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU1248, vitaxina; inhibidores de PDGFR (por ejemplo Gleevec); NM3 y 2-ME2; péptidos cíclicos tales como cilengitida.
- Se entiende que un “agente antimetastásico” es una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la metástasis, es decir, la propagación a distancia, fundamentalmente a través del torrente linfático o sanguíneo, de las células que producen cáncer, y el crecimiento de nuevos tumores en los sitios de destino de dicha metástasis.

Se entiende que un “agente antiproliferativo” es una sustancia química o biológica que puede prevenir o inhibir la formación o el crecimiento de tumores. Como agentes antiproliferativos se incluyen pero sin limitación a (i) antimetabolitos, tales como antimetabolitos del ácido fólico (aminopterina, denopterina, metotrexato, edatrexato, trimetrexato, nolatrexed, lometrexol, pemetrexed, raltitrexed, piritrexim, pteropterina, leucovorina, 10-propargil-5,8-dideazafolato (PDDF, CB3717)), análogos de purina (cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina) y análogos de pirimidina (capecitabina, citarabina o ara-C, decitabina, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, doxifluridina, floxuridina y gemcitabina) (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos tales como alcaloides de la vinca de tipo vindesina, vincristina, vinblastina, vinorelbina; taxanos tales como paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™); colchicina (NSC 757), tiocolchicina (NSC 361792), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), y alocolchicina (NSC 406042); halicondrina B (NSC 609395); dolastatina 10 (NSC 376128); maitansina (NSC 153858); rizoxina (NSC 332598); epotilona A, epotilona B; discodermolida; estramustina; nocodazol, (iii) hormonas y antagonistas de las mismas, tales como tamoxifeno, toremifeno, anastrozol, arzoxifeno, lasofoxifeno, raloxifeno, nafoxidina, fulvestrant, aminoglutetimida, testolactona, atamestano, exemestano, fadrozol, formestano, letrozol, goserelina, leuprorelina o leuprólido, buserelina, histrelina, megestrol y fluoximisterona; (iv) agentes biológicos, tales como vectores víricos, interferón alfa e interleucinas; (v) compuestos basados en platino tales como carboplatino, cisplatino [cis-diaminodicloroplatino, (CDDP)], oxaliplatino, iroplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, tetraplatino, satraplatino (JM216), JM118 [cis-aminodicloro (II)], JM149 [cis-aminodicloro (ciclohexilamina) trans dihidroxoplatino (IV)], JM335 [trans aminodicloro dihidroxoplatino (IV)], transplatino, ZD0473, cis, trans, cis-Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OCC₃H₇)₂Cl, malanato-1,2-diaminociclohexanoplatino(II), 5-sulfosalicilato-trans-(1,2-diaminociclohexano)platino(II) (SSP), poli-[(trans-1,2-diaminociclohexano)platino]-carboxiamilosa (POLY-PLAT) y 4-hidroxi-sulfonilfenilacetato(trans-1,2-diaminociclohexano) platino(II) (SAP) y similares y (vi) fármacos alquilantes de ADN tales como mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo y triazenos, incluyendo, pero sin limitación, ciclofosfamida (Cytosan™), busulfán, improsulfán, piposulfán, pipobromán, melfalán (L-sarcolisina), clorambucilo, mecloretamina o mustina, uramustina o mostaza de uracilo, novembicina, fenesterina, trofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), clorozotocina, fotemustina, nimustina, ranimustina, semustina (metil-CCNU), estreptozocina, tiotepa, trietilenmelamina, trietilentiofosforamina, procarbazona, altretamina, dacarbazina, mitozolomida y temozolomida.

30 Composiciones farmacéuticas

En el documento también se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados y las proteínas de fusión de la divulgación o las composiciones según la divulgación. Por tanto, en otro aspecto, en el documento se desvela una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente activa del conjugado o de la proteína de fusión según la divulgación y un soporte farmacéuticamente activo (primera composición farmacéutica de la divulgación). En otro aspecto, en el documento se desvela una composición farmacéutica que comprende una composición farmacéuticamente activa de la composición según la divulgación y un soporte farmacéuticamente activo (segunda composición farmacéutica según la divulgación).

40 Como se usa en la presente divulgación, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a una formulación que se ha adaptado para administrar una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, a un grupo de células, a un órgano, a un tejido o a un animal en el que la división celular es incontrolada, tal como cáncer.

45 La primera composición farmacéutica de la divulgación contiene una cantidad farmacéutica eficaz de un conjugado o de una proteína de fusión como se desvela en el presente documento. Los conjugados y las proteínas de fusión adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación incluyen cualquiera de las proteínas de fusión mencionadas anteriormente en el párrafo conjugados y proteínas de fusión de Omomyc de la divulgación.

50 La segunda composición farmacéutica de la divulgación contiene una cantidad farmacéutica eficaz de una composición según la divulgación y un soporte farmacéuticamente activo. La segunda composición de la divulgación comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1, una variante funcionalmente equivalente del mismo o una proteína de fusión como se desvela. Las variantes funcionalmente equivalentes adecuadas del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o las proteínas de fusión adecuadas para su uso en las segundas composiciones farmacéuticas según la divulgación son como se han definido anteriormente en los usos terapéuticos de la divulgación o en proteínas de fusión como se desvela, respectivamente.

60 La expresión “cantidad farmacéutica eficaz”, como se usa en el presente documento, se entiende como una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico, y que puede determinar el experto en la materia por medios usados comúnmente. La cantidad del polipéptido Omomyc, de la variante funcionalmente equivalente del mismo o de la proteína de fusión o del compuesto antitumoral que se puede combinar en las composiciones farmacéuticas según la divulgación variará dependiendo del sujeto y del modo de administración particular. Los expertos en la materia apreciarán que las dosis también pueden determinarse siguiendo las directrices de Goodman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición (1996), apéndice II, págs. 1707-1711 y de Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, décima edición (2001), apéndice II, págs. 475-493.

La dosis apropiada del principio o principios activos en la composición farmacéutica dependerá del tipo de cáncer que se vaya a tratar, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si la composición se administra para fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de los antecedentes clínicos del paciente y de la respuesta al péptido o al polipéptido y del criterio del médico. La cantidad de polipéptido de SEQ ID NO: 1, de la variante funcionalmente equivalente del mismo, de la proteína de fusión, se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, un nivel de dosis apropiado será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente al día que se puede administrar en dosis únicas o múltiples. Preferentemente, el nivel de dosis será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg al día; más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg al día. Un nivel de dosis adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 250 mg/kg al día, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg/kg al día, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg al día. En este intervalo, la dosis puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg al día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 100 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que se va a tratar. Los compuestos se pueden administrar en una pauta de 1 a 4 veces al día, preferentemente una o dos veces al día.

En el caso de las segundas composiciones farmacéuticas según la divulgación, que contienen un primer componente seleccionado del polipéptido de SEQ ID NO: 1, una variante funcionalmente equivalente del mismo y una proteína de fusión como se desvela y un segundo componente que es un agente antitumoral, la composición se puede presentar como una única formulación (por ejemplo, como un comprimido o una cápsula que comprende una cantidad fija de cada uno de los componentes) o puede, por otra parte, presentarse como formulaciones distintas que se combinan después para la administración conjunta, secuencial o individual. Las composiciones de la divulgación también incluyen la formulación como un kit de partes en donde los componentes se formulan por separado, pero se envasan en el mismo envase. Los expertos en la materia apreciarán que, en el caso de la segunda composición farmacéutica como se desvela, la formulación de los diferentes componentes puede ser similar, en otras palabras, puede formularse de manera similar (en comprimidos o píldoras), lo que permite su administración por la misma vía. En el caso en el que los diferentes componentes como se desvela, se formulan por separado, los dos componentes se pueden presentar en un blíster. Cada blíster contiene los fármacos que se deben consumir durante el día. Si los fármacos se deben administrar varias veces al día, los fármacos correspondientes a cada administración se pueden colocar en diferentes secciones del blíster, preferentemente, registrando en cada sección del blíster, el momento del día en el que se deben administrar. De forma alternativa, los componentes de la composición como se desvela se pueden formular de manera diferente de modo que los diferentes componentes se administren de manera diferente. Por tanto, es posible que el primer componente se formule como un comprimido o una cápsula para su administración oral y el segundo componente se formule para su administración intravenosa o viceversa. La proporción entre los componentes que son parte de las composiciones usadas en la segunda composición farmacéutica como se desvela, la puede ajustar el experto en la materia dependiendo del agente antitumoral usado en cada caso particular, así como de la indicación deseada. Por tanto, la divulgación contempla composiciones en las que la relación entre las cantidades de los dos componentes puede variar de 50:1 a 1:50, en particular de 20:1 a 1:20, de 1:10 a 10:1 o de 5:1 a 1:5.

La primera y segunda composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden contener uno o varios compuestos adicionales para la prevención y/o el tratamiento de patologías en las que hay una división celular incontrolada, tal como cáncer. Dichos compuestos adicionales, tales como agentes antitumorales, pueden formar parte de la composición farmacéutica como entidades independientes.

La primera y segunda composiciones farmacéuticas como se desvela también contienen uno o varios excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende que es una sustancia terapéuticamente inactiva que va a utilizarse para incorporar el principio activo y que es aceptable para el paciente desde el punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad.

El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables depende de la forma farmacéutica deseada. El experto en la materia conoce los excipientes farmacéuticamente aceptables (Faulí y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Dichas composiciones se pueden preparar por medio de los métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica. ("Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, EE UU).

La primera y segunda composiciones farmacéuticas como se desvela se pueden administrar por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, vía tópica, por inhalación o vía parenteral, de modo que los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica deseada estarán incluidos. La vía de administración preferida de dichas composiciones farmacéuticas es la vía endovenosa.

Por "vía oral" se entiende que es la composición farmacéutica incorporada en el organismo después de la deglución.

En una divulgación particular, la composición farmacéutica de la divulgación puede estar en una forma farmacéutica adecuada para su administración por vía oral, ya sea sólida o líquida. Las formas farmacéuticas adecuadas para su administración por vía oral pueden ser comprimidos, cápsulas, jarabes o soluciones, y pueden contener cualquier excipiente convencional conocido en la técnica, tales como aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol o polivinilpirrolidona; agentes de relleno, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para compresión, por ejemplo, estearato de magnesio; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tal como lauril sulfato de sodio. Las composiciones orales sólidas se pueden preparar por medio de procesos convencionales de mezcla, relleno o compresión. Pueden utilizarse operaciones repetitivas de mezcla para distribuir completamente el agente activo en esas composiciones que utilizan cantidades altas de agentes de relleno. Dichas operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos se pueden preparar, por ejemplo, por medio de granulación húmeda o seca, y opcionalmente recubriéndolos según los procesos conocidos en la práctica farmacéutica común, particularmente con un recubrimiento entérico.

Por otra parte, por “vía tópica” se entiende que es una administración por una vía no sistémica, e incluye la aplicación de una composición farmacéutica como se desvela externamente en la epidermis, en la cavidad bucal y la instilación de dicha composición en los oídos, ojos y nariz, y en la que no entra significativamente en el torrente sanguíneo. Por “vía sistémica” se entiende que es la administración por vía oral, vía intravenosa, vía intraperitoneal y vía intramuscular. La cantidad de anticuerpo necesaria para el efecto terapéutico o profiláctico naturalmente variará según el anticuerpo seleccionado, la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se va a tratar, y el paciente.

Por “inhalación” se entiende que es la administración por vía intranasal y por inhalación oral. Las formas farmacéuticas adecuadas para dicha administración, tal como una formulación en aerosol o un inhalador con dosis medidas, se pueden preparar por medio de técnicas convencionales. En una realización, la vía de administración es la vía intranasal.

Como se usa en el presente documento, el término “parenteral”, incluye la administración por vía intravenosa, vía intraperitoneal, vía intramuscular o vía subcutánea. Las formas farmacéuticas subcutáneas, intramusculares e intravenosas de la administración parenteral son generalmente preferidas.

En un aspecto, la primera y segunda composiciones farmacéuticas como se desvela se pueden adaptar para su administración parenteral, tal como soluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles en la forma farmacéutica apropiada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua), o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para su administración por vía intravenosa, algunos soportes adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril, y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de preparación y conservación, y se debe proteger de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El soporte debe ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable, tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede alcanzar por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomersal y similares. En la mayoría de los casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares; polialcoholes tales como manitol, sorbitol; o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse por la inclusión de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente mencionados, según se necesite, seguido por la esterilización por filtración a través de membranas estériles. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de los ingredientes requeridos de entre los previamente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los procesos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que dan lugar a un polvo con el ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución estéril previamente filtrada del mismo.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden administrar adecuadamente por medio de infusión pulsada, por ejemplo, con dosis decrecientes de la composición. Preferentemente, la dosis se administra por medio de inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es aguda o crónica.

En una divulgación, la primera o segunda composiciones farmacéuticas como se desvela, se preparan con soportes que protegerán dicho polipéptido de una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros

biocompatibles biodegradables tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procesos para preparar dichas formulaciones estarán claros para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

5 Las composiciones de liberación sostenida también incluyen preparaciones de cristales de anticuerpos resuspendidos en formulaciones adecuadas que pueden mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones, cuando se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal, pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan mediante métodos conocidos tales como los indicados en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; y en los documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

15 A pesar de que Omomyc y los conjugados y las proteínas de fusión que contienen Omomyc, pueden translocarse a través de membranas biológicas, el experto en la materia entenderá que también puede ser conveniente formular los conjugados o las proteínas de fusión que comprenden Omomyc, en nanopartículas. Las nanopartículas pueden contribuir a preservar la integridad del polipéptido en los líquidos biológicos hasta que alcanzan el órgano diana. Además, en el caso de composiciones que comprenden un agente antitumoral, la encapsulación de la composición puede disminuir los efectos secundarios causados por el agente antitumoral. Por último, también se pueden modificar nanopartículas para incluir fracciones que permitan el direccionamiento de la nanopartícula a un órgano de interés.

20 Por tanto, en otra divulgación, las composiciones farmacéuticas desveladas comprenden los conjugados, las proteínas de fusión y las composiciones según la divulgación que forman parte de una nanopartícula.

25 Como nanopartículas adecuadas que pueden utilizarse en el contexto de la presente divulgación se incluyen materiales a nanoescala tales como una nanopartícula basada en lípidos, una nanopartícula superparamagnética, una nanocapa, un nanocristal semiconductor, un punto cuántico, una nanopartícula basada en polímero, una nanopartícula basada en silicio, una nanopartícula basada en sílice, una nanopartícula basada en metal, un fullereno y un nanotubo.

30 El suministro dirigido puede realizarse mediante la adición de ligandos sin comprometer la capacidad de las nanopartículas de suministrar sus cargas útiles de polipéptidos. Se contempla que esto permita el suministro a células, tejidos y órganos específicos. La especificidad de direccionamiento de los sistemas de suministro basados en ligandos, se basa en la distribución de los receptores de los ligandos en tipos celulares diferentes. El ligando de direccionamiento puede estar asociado de manera no covalente o covalente con la nanopartícula, y se puede conjugar a la nanopartícula mediante una variedad de métodos como se comenta en el presente documento.

35 Los ejemplos de proteínas o péptidos que pueden utilizarse para dirigir nanopartículas incluyen transferrina, lactoferrina, TGF- β , factor de crecimiento nervioso, albúmina, péptido Tat del VIH, péptido RGD e insulina, así como otros.

40 La primera y segunda composiciones farmacéuticas como se desvela, se pueden formular con un soporte farmacéuticamente aceptable. En una divulgación preferida, el soporte no permite el suministro directo de la proteína de fusión o de la composición al citoplasma de las células, es decir, el soporte no es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de las células diana. Como se usa en el presente documento "soporte" quiere decir cualquier sustancia que sirve para mejorar el suministro y la eficacia del principio activo en la composición farmacéutica. Los ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. Los soportes farmacéuticamente aceptables pueden comprender además pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumenten la vida útil o eficacia de la proteína de fusión o de las composiciones que forman parte de las composiciones farmacéuticas. En la bibliografía se conocen bien ejemplos de soportes apropiados (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Los ejemplos de soportes, sin limitación, son una serie de sacáridos tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; una serie de almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; una serie de celulosas, tales como celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica e hidroxipropilmetilcelulosa; y una serie de rellenos tales como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, se puede añadir un disgregante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o alginato de sodio.

45 La primera y segunda composiciones farmacéuticas como se desvela, son adecuadas para la administración en cualquier tipo de mamífero, preferentemente un ser humano.

60 La invención se detalla a continuación mediante los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y de ninguna manera limitantes para el ámbito de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

5 Ejemplo 1

Expresión de la construcción de Omomyc en medio rico o en medio mínimo M9

10 Para la producción de Omomyc en medio rico, 1 l de medio 2YT que contenía ampicilina se inoculó con *Escherichia coli* químicamente competente BL21-AI™ One Shot® (Life Technologies) transformada con la construcción Omomyc-pET-3a, se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,8. La expresión de la proteína se indujo con 10 ml de solución de arabinosa, incubando a 37 °C durante 12 horas. De forma alternativa, para la producción de Omomyc en medio mínimo M9, la *E. coli* transformada se inoculó con la construcción Omomyc-pET-3a en 1 l de medio mínimo M9 que contenía cloranfenicol y ampicilina con BL21-CodonPlus (Stratagene) y se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,8. La expresión de la proteína se indujo con 1 ml de solución 1000 X de IPTG. El cultivo celular se incubó con agitación a 250 rpm durante 12 horas a 37 °C.

20 El cultivo bacteriano se centrifugó a 10 000 rpm, a una temperatura de 4 °C durante 5 minutos en un rotor SLA-1500 utilizando frascos de 250 ml. El cultivo se centrifugó secuencialmente para combinar el equivalente de 1 l de cultivo por frasco.

25 Para verificar la correcta expresión de la proteína, se recogió una alícuota de 1 ml de los cultivos y se midió su DO₆₀₀. Se centrifugaron 800 µl de dicha alícuota a 16 060 xg durante 1 minuto y el sobrenadante se desechó. El precipitado se resuspendió en un volumen de tampón de Laemmli IB equivalente a (0,1 x valor de DO₆₀₀) µl para garantizar las mismas cantidades de extracto de células lisadas en cada muestra y facilitar la comparación entre células antes y después de la expresión de la proteína. A continuación, las muestras se mezclaron con un vórtice, se sometieron a ultrasonido durante 5 segundos a la máxima potencia, se congelaron en nitrógeno líquido y, por último, se hirvieron durante 2 minutos (repetido 3 veces) antes de cargarlas en un gel de SDS-PAGE de acrilamida al 16,5% desnaturante. Después de la electroforesis se realizó tinción con azul de Coomassie o inmunotransferencia Western. El tampón de Laemmli IB se optimizó para permitir la solubilización de los cuerpos de inclusión y garantizar la migración y separación de las proteínas adecuadas para visualizar la expresión de Omomyc.

35 Ejemplo 2

Purificación del b-HLH-LZ de Omomyc

40 Los sedimentos celulares se suspendieron en 3 ml de tampón de lisis por gramo de sedimento con agitación vorticial. Se añadieron 150 µl de solución de Triton por gramo de precipitado celular. La viscosidad de la suspensión se redujo mediante ultrasonido en hielo, a una potencia de 15 durante 6 x 15 segundos utilizando un homogeneizador ultrasónico.

45 A continuación, se añadió el equivalente de 100 µl/g de sedimento de cultivo de DNasa I pancreática bovina seguido de una incubación de 60 minutos a 37 °C con agitación a 50 rpm. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 12 000 xg (13 000 rpm en un rotor SS34 en una Sorvall RC 5B Plus, utilizando frascos de centrifuga de 35 ml), a una temperatura de 4 °C para sedimentar los cuerpos de inclusión, así como los complejos de alto peso molecular tales como paredes celulares, ribosomas y ADN genómico no degradado. Los lípidos, las proteínas solubles, los aminoácidos, los azúcares y los ácidos nucleicos que constituían el sobrenadante se desechó después de la centrifugación.

50 Los cuerpos de inclusión sedimentados se disolvieron con agitación vorticial con 15 ml de la parte A del tampón de rotura Bul. Este tampón ácido, de alta fuerza iónica y desnaturante, permite la disolución completa de la construcción de Omomyc de los cuerpos de inclusión y permite la eliminación de complejos de alto peso molecular y ADN residual por centrifugación.

55 La solución de cuerpos de inclusión 1:1 se diluyó con la parte B del tampón de rotura Bull. Después de eso, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 30 000 xg (19 000 rpm en un rotor SS34 en una Sorvall RC 5B Plus) a 4 °C.

60 El sobrenadante se purificó por cromatografía de intercambio catiónico en 5 columnas de intercambio catiónico de 5 ml (columnas HiTrap™ SP Sepharosa HP de GE Healthcare o el equivalente) montadas en serie en un sistema de FPLC. En primer lugar, la columna se lavó con 2 volúmenes de columna (VC) de tampón B de FPLC a un caudal de 5 ml/min. A continuación, la columna se equilibró con 5 VC (125 ml) de tampón A de FPLC a un caudal de 2,5 ml/min. El sobrenadante (equivalente a un máximo de 9 g de sedimento celular por carga) se cargó a 2,5 ml/min. Inmediatamente después de cargar el sobrenadante, la columna se lavó con 75 ml (3 VC) de tampón U8, a un caudal de 2,5 ml/min. Se lava con 1 VC de tampón A. A continuación, se añadieron a la columna 3 VC de tampón B

al 10 %. La elución de Omomyc se realizó con un gradiente de tampón B del 10-35 % en 50 ml (0,5%/ml) a 2,5 ml/min en fracciones de 2,5 ml. En estas condiciones, Omomyc eluyó a una concentración de NaCl de aproximadamente 1,5 M (es decir, ~30 % v/v del gradiente) con una pureza del 90 %.

5 Las fracciones que contenían la construcción pura se agruparon y se desalaron en 5 columnas consecutivas de desalado HiTrap™ de GE Healthcare (o el equivalente) equilibradas con tampón de desalado TFA a un caudal de 3,0 ml/min. Las fracciones agrupadas se inyectaron (volumen máximo de 7,5 ml por inyección) y la elución se siguió con un detector de DO₂₈₀. La proteína eluyó en los primeros 15 ml después de la inyección. Las siguientes fracciones que mostraban valores bajos de DO₂₈₀ y alta conductividad se desecharon. Este método permite
10 recuperar un porcentaje de ~95 % de proteína desalada al 98-99 %.

La proteína purificada se puede concentrar bien por centrifugación en filtros de centrifugación Amicon®Ultra Ultracel®-3K (Millipore™) o el equivalente, o por liofilización. Para la concentración utilizando Amicon®Ultra, hay que seguir las indicaciones del fabricante. De forma alternativa, para la liofilización, hay que añadir acetonitrilo al 50 %
15 v/v a las fracciones desaladas, congelar en nitrógeno líquido y liofilizar. La proteína liofilizada espumosa obtenida puede pesarse y volver a disolverse a 100 µl/mg en acetonitrilo al 50 % v/v que contiene TFA al 0,05 % v/v, dividirse en partes alícuotas de 1 a 10 mg por tubo Eppendorf y volver a liofilizarse.

Los rendimientos son de aproximadamente 25 mg/ml de cultivo en medio rico y de 15 mg/ml de cultivo en medio mínimo M9.

Ejemplo 3

Omomyc se transduce en células A459

25 El objeto de los autores de la invención era demostrar que las células tratadas con Omomyc mostraban que, incluso después de un tiempo tan reducido, Omomyc ya alcanzaba el núcleo.

La expresión y purificación de Omomyc se realizó como se muestra en los ejemplos 1 y 2.

30 Las células A549 (ATCC) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %. Para la microscopía de fluorescencia, 20 000 células A549 se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 12,7 mm (0,5 pulgadas) y se hicieron cultivar durante 16 horas. Se añadió medio reciente complementado con péptido Omomyc (35 µM) y se incubó
35 durante 2 horas a 37 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron en paraformaldehído al 3 % y se observaron al microscopio.

La figura 1 muestra que Omomyc puede funcionar como un dominio de transducción de proteínas transduciendo a través de la membrana celular y translocándose al núcleo.

40

Ejemplo 4

Omomyc reduce el número de células A549 viables e induce la apoptosis

45 Se incubaron células A549 en placas de 24 pocillos durante un periodo de 72 horas con Max* u Omomyc 10 µM. Max* se obtuvo como se describe en Montagne M. et al. (Montagne M. et al. 2012. PLoS One, 7(2):e32172). Las células se recogieron y tiñeron con anexina V y PI según el protocolo del fabricante (Kit Tali® de Apoptosis A10788, Life Technologies) y la fluorescencia se cuantificó utilizando un citómetro basado en imágenes Tali®.

50 En este estudio, los autores de la presente invención, muestran que Omomyc es más eficaz reduciendo el número de células A549 viables que el dominio bHLHZ de Max (figura 2 A y C). Consecuentemente, el porcentaje de células muertas/apoptóticas es mayor después del tratamiento con el péptido Omomyc que con el péptido Max* (figuras 2B y D).

Ejemplo 5

El péptido Omomyc está más plegado que c-Myc* y, desde el punto de vista térmico, es más estable que Max* y que c-Myc* en solución

60 Los polipéptidos que son estables desde el punto de vista térmico, son ventajosos en aquellas circunstancias en las que el polipéptido tiene que formularse como una composición farmacéutica. Por tanto, se determinó la estabilidad térmica comparativa de Omomyc y Max*.

65 El gen Omomyc se expresó como se describe en el **ejemplo 1** y se purificó como en el **ejemplo 2** anteriormente. La purificación de Max* se llevó a cabo como se describe en detalle en Beaulieu M.E. et al., 2013 (Methods Mol Biol, 1012:7-20). En resumen, se transformaron bacterias BL21-DE3-pLys con un vector de expresión pET3a que

5 contenía el inserto de Max*, y se cultivaron como se ha descrito anteriormente. La inducción se llevó a cabo con IPTG (0,6 mM) durante 4 horas, después de lo cual las células se recogieron. Después de la lisis con el tampón de lisis y centrifugación a 30 000 x g, el extracto de proteína solubilizado se purificó utilizando cromatografía de intercambio catiónico y se desaló como se ha descrito anteriormente. Las proteínas purificadas y liofilizadas se resuspendieron en KH₂PO₄ 50 mM, KCl 50 mM, DTT 5 mM (el pH se ajustó utilizando KOH 1N o HCl 1N).

10 Se realizaron mediciones de dicroísmo circular como se describe en Beaulieu M.E. et al., 2012 (J Mol Recognit, 25(7):414-26), utilizando una concentración de proteína de 32 µM. Los espectros de DC se registraron a 20 °C y se realizó la desnaturalización térmica a 1 °C/min (figuras 3A y 3B), monitorizando a una longitud de onda de 222 nm para medir el contenido helicoidal (que refleja el estado plegado, estructurado) de la proteína.

Ejemplo 6

Omomyc penetra en los núcleos de una manera más eficaz que Max*

15 En resumen, los péptidos Omomyc y Max* purificados se marcaron con fluoresceína-maleimida (FITC) mediante un resto de cisteína C-terminal modificado. Después de la purificación y evaluación de la presencia de un único marcador fluorescente por molécula de proteína mediante espectrometría de masas, se añadieron diferentes concentraciones de proteína (5 µM, 10 µM o 25 µM) a células A549 (adenocarcinoma de pulmón con mutante K-Ras) cultivadas en RPMI que contenía suero al 0,5 % y se incubaron durante 2 horas a 37 °C antes de lavarlas tres veces con PBS y fijarlas en PFA al 4 % durante 10 minutos, teñirlas con Hoechst 1,5 µg/ml durante 10 minutos y montarlas en portaobjetos de microscopía. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que Omomyc penetra en los núcleos de las células A549 de manera más eficaz que Max* a concentraciones de 5, 10 y 25 µM (datos no mostrados). La intensidad de fluorescencia nuclear se cuantificó utilizando ImageJ, con de 30 a 80 células contadas por imagen. En la figura 4 se muestra la cuantificación de la penetración celular observada para Omomyc y Max* en células A549 fijadas.

20 La capacidad de penetración celular superior de Omomyc sobre Max* se confirmó a una concentración de 20 µM en células vivas (para evitar posibles artefactos de fijación) después de 20 minutos de incubación. En resumen, se añadieron Omomyc y Max* marcados con FITC a células en cultivo A549 en RPMI que contenía suero al 0,5 % y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C antes de lavarlas tres veces con PBS y montarlas con medio de montaje que contenía Hoechst. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que Omomyc penetra en los núcleos de las células A549 vivas de manera más eficaz que Max* a 20 µM (datos no mostrados). La intensidad de fluorescencia nuclear se cuantificó utilizando ImageJ, con de 30 a 80 células contadas por imagen. En la figura 5 se muestra la cuantificación de la penetración celular observada para Omomyc y Max* en células A549 vivas.

Ejemplo 7

La entrada de Omomyc se produce a través de un proceso dependiente de ATP

30 Se mostró que Max* penetraba en las células a través de un proceso dependiente de ATP, que podía bloquearse disminuyendo la temperatura a 4 °C. Un mecanismo similar está implicado en la capacidad de penetración celular de Omomyc. Durante 2 horas, se incubaron células A549 con péptido marcado con FITC 20 µM y se fijaron con PFA al 4 %, antes de lavarlas tres veces y montarlas en portaobjetos de microscopía utilizando medio de montaje que contenía Hoechst. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que la entrada de Omomyc podía bloquearse disminuyendo la temperatura a 4 °C.

Ejemplo 8

Omomyc reduce el número total de células de manera más eficaz que Max*

50 En resumen, células de adenocarcinoma pulmonar A549 y H1650 se incubaron con los péptidos Omomyc o Max* 25 µM en RPMI que contenía suero al 5 % y se fijaron en el tiempo indicado (2 días o 4 días) con PFA al 4 % seguido de tinción con violeta cristal (violeta cristal al 0,5 % en metanol al 25 % durante 10 minutos) y de un lavado de al menos tres veces con agua. Tanto Omomyc como Max* impidieron el crecimiento de las células, pero Omomyc era más eficaz en hacerlo (figura 6). Las células teñidas con violeta cristal se disolvieron en ácido acético al 10 % y la solución resultante se diluyó 1:4 en H₂O y se cuantificó midiendo la absorbancia a DO₅₉₅. La cuantificación de la inhibición de la proliferación por violeta cristal mostró que Omomyc era claramente más eficaz que Max* para reducir la proliferación de células H1650 (células de adenocarcinoma pulmonar con EGFR mutante) cuando se usó a la concentración de 25 µM durante 6 días (figura 7).

60 Para calcular la CI₅₀ de Omomyc y Max*, se trataron células A549 con la concentración de péptido indicada en medio de cultivo que contenía suero al 5 % y se teñieron con violeta cristal como se ha descrito anteriormente. La cuantificación se realizó como se ha descrito anteriormente. La figura 8 muestra la respuesta a la dosis de células A549 a Omomyc frente a Max* que muestra que Omomyc tiene menor CI₅₀ que Max* (es decir, Omomyc necesita una dosis menor comparada con Max* para reducir el número de células a la mitad). Específicamente, la CI₅₀ para Omomyc es de 1,2 µM y la CI₅₀ para Max* es de 2,6 µM.

El efecto de Omomyc sobre la proliferación de células se ensayó en células de glioma U87. Se incubaron células de glioma U87 con péptidos Omomyc o Max* (concentración final de 25 µM) en DMEM que contenía suero al 5 % durante 48 horas. Las células se tripsinizaron y se contaron utilizando el contador celular Tali (Life technologies Inc.). La figura 9 muestra que Omomyc reduce la proliferación de células de glioma U87 de manera más eficaz que Max*.

5

Ejemplo 9

Omomyc alcanza eficazmente tejido pulmonar y cerebral después de la administración intranasal

A través de administración intranasal, se trataron animales con una sola dosis de 37,5 mg/kg de Omomyc, o los animales no recibieron dicho tratamiento (se trataron con PBS). Diez minutos después de la administración intranasal, se detectó el péptido fluorescente. El pulmón de los animales tratados se mostraba fluorescente como una consecuencia de la localización de Omomyc (figura 10A). Esto demuestra que el péptido Omomyc puede administrarse a animales por instilación intranasal y alcanzar de manera eficaz el pulmón. El cerebro de los mismos animales descritos en la figura anterior también se mostraba fluorescente (figura 10B). Es obvio que el péptido Omomyc fluorescente podía pasar la barrera hematoencefálica (BHE) y alcanzar el cerebro.

15

Ejemplo 10

El péptido Omomyc tiene un efecto terapéutico *in vivo*

Administrado como un péptido por vía intranasal, Omomyc reduce la proliferación en un modelo de ratón de adenocarcinoma pulmonar dirigido por KRas. Los inventores utilizaron un modelo de ratón de tumorigénesis dirigida por KRas (el modelo LSLKRasG12D). En resumen, para inducir la expresión de la proteína mutante KRas-G12D específicamente en los pulmones, se instilaron ratones de 8 semanas de vida con un adenovirus que expresaba Cre recombinasa (AdenoCre). Cuando los ratones desarrollaron adenocarcinoma de pulmón (18 semanas después de la infección), los animales se trataron diariamente por vía intranasal, durante tres días, con el péptido Omomyc (15 mg/kg en un volumen de 35 µl). Omomyc redujo la tasa de proliferación de tumores (tinción de Ki67; figura 11A) y redujo la densidad celular (figura 11B).

25

30

El péptido Omomyc también reduce la carga tumoral *in vivo* después de 1 semana de tratamiento. Utilizando el mismo modelo de ratón y las condiciones experimentales como se las descritas anteriormente, los animales se trataron diariamente, durante 1 semana, con 15 mg/kg de péptido. Se midió el % de área tumoral utilizando ImageJ. La figura 12 muestra que Omomyc reduce la carga tumoral en un modelo en ratón de adenocarcinoma pulmonar dirigido por KRas.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIO PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIO ONCOLOGICA DE VALL HEBRON

40

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> P9495PC00

45

<150> EP 13382167

<151> 07-05-2013

<160> 57

50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 90

<212> PRT

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OMOMYC

60

<400> 1

ES 2 733 515 T3

Thr Glu Glu Asn Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln
 1 5 10 15

Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile
 20 25 30

Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Thr Gln Lys Leu
 50 55 60

Ile Ser Glu Ile Asp Leu Leu Arg Lys Gln Asn Glu Gln Leu Lys His
 65 70 75 80

Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 85 90

<210> 2
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met
 1 5 10 15

Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp

10

ES 2 733 515 T3

			20					25					30			
Ser	Val	Gln	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Cys	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gln	
		35					40					45				
Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Ile	
	50					55					60					
Trp	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	
65					70					75					80	
Arg	Ser	Gly	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Val	Thr	Pro	Phe	Ser	
				85					90					95		
Leu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Thr	Ala	Asp	
			100					105						110		
Gln	Leu	Glu	Met	Val	Thr	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Met	Val	Asn	Gln	
		115					120					125				
Ser	Phe	Ile	Cys	Asp	Pro	Asp	Asp	Glu	Thr	Phe	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	
	130					135					140					
Ile	Gln	Asp	Cys	Met	Trp	Ser	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	
145					150					155					160	
Ser	Glu	Lys	Leu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Arg	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	
				165					170					175		
Pro	Asn	Pro	Ala	Arg	Gly	His	Ser	Val	Cys	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Tyr	
			180					185						190		
Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Cys	Ile	Asp	Pro	Ser	Val	
		195					200					205				
Val	Phe	Pro	Tyr	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Cys	Ala	
	210					215					220					
Ser	Gln	Asp	Ser	Ser	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Ser	Asp	Ser	Leu	Leu	Ser	
225					230					235					240	
Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Pro	Gln	Gly	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	His	
				245					250					255		
Glu	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	
			260					265					270			

ES 2 733 515 T3

Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro
 275 280 285

Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys
 290 295 300

Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His
 305 310 315 320

Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 325 330 335

Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
 340 345 350

Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
 355 360 365

Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
 370 375 380

Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
 405 410 415

Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 420 425 430

Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
 435 440 445

Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 450

<210> 3

<211> 273

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica OMOMYC

10

<400> 3

ES 2 733 515 T3

accgaggaga atgtcaagag gogaacacac aacgtcttgg agcgccagag gaggaacgag 60
 ctaaaacgga gcttttttgc cctgcgtgac cagatcccgg agttggaaaa caatgaaaag 120
 gcccccaagg tagttatcct taaaaaagcc acagcataca tcctgtccgt ccaagcagag 180
 acgcaaaagc tcatttctga aatcgacttg ttgcggaaac aaaacgaaca gttgaaacac 240
 aaacttgaac agctacggaa ctcttgtgog taa 273

5 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CPP encontrada en la proteína de *Drosophila antennapedia*
 <400> 4

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

15 <210> 5
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CPP encontrada en la proteína de unión a ADN VP22 del herpesvirus simple 1 (HSV-1)
 <400> 5

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
 20 25 30

Val Glu

30 <210> 6
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CPP de Bac-7

35 <400> 6

Arg Arg Ile Arg Pro Arg Pro Pro Arg Leu Pro Arg Pro Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Pro Leu Pro Phe Pro Arg Pro Gly
 20

40 <210> 7

ES 2 733 515 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Secuencia CPP de la proteína TAT del VIH-1 (aminoácidos 49-57)

<400> 7

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

10
<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Secuencia CPP de la proteína TAT del VIH-1 (aminoácidos 48-60)

<400> 8

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Thr Pro Gln
1 5 10

20
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Secuencia CPP de la proteína TAT del VIH-1 (aminoácidos 47-57)

30
<400> 9

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

35
<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Secuencia CPP del péptido S413-PV

<400> 10

Ala Leu Trp Lys Thr Leu Leu Lys Lys Val Leu Lys Ala Pro Lys Lys
1 5 10 15

Lys Arg Lys Val
20

45
<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Secuencia CPP de penetratina

<400> 11

ES 2 733 515 T3

Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

5 <210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CPP de SynB1
 <400> 12

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

15 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CPP de SynB3
 <400> 13

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
1 5 10

25 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CPP de PTD-4
 <400> 14

Pro Ile Arg Arg Arg Lys Lys Leu Arg Arg Leu Lys
1 5 10

35 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia CPP de PTD-5
 <400> 15

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
1 5 10

45 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

ES 2 733 515 T3

<223> Secuencia CPP de recubrimiento de FHV (aminoácidos 35-49)

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
1 5 10 15

5

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia CPP de Gag de BMV (aminoácidos 7-25)

<400> 17

15

Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg

<210> 18

<211> 13

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CPP de Rex de HTLV-II (aminoácidos 4-16)

25

<400> 18

Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
1 5 10

<210> 19

30

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Secuencia CPP de D-Tat

<400> 19

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

40

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Secuencia CPP de R9-Tat

<400> 20

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

50

<210> 21

<211> 17

ES 2 733 515 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Secuencia CPP de MAP

<400> 21

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu Lys Leu
1 5 10 15

Ala

10 <210> 22
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia CPP de SBP

<400> 22

20 **Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly**
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 23
 <211> 27
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CPP de FBP

30 <400> 23

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

35 <210> 24
 <211> 27
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CPP de MPG

45 <400> 24

ES 2 733 515 T3

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

5 <210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CPP de MPG (ENLS)
 <400> 25

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val
 20 25

15 <210> 26
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CPP de Pep-1
 <400> 26

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

25 <210> 27
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CPP de Pep-2
 35 <400> 27

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

40 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 733 515 T3

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu
 20 25 30

Ala

5 <210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CPP

<400> 33
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

15 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CPP

<400> 34
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

25 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CPP

<400> 35
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
 1 5

35 <210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia CPP

<400> 36
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

45 <210> 37

ES 2 733 515 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia CPP

<400> 37
 Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia CPP

<400> 38
 Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

20

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de SLN del antígeno T grande de SV40

30

<400> 39
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

<210> 40
 <211> 16
 <212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de SLN de nucleoplasmina

40

<400> 40
 Lys Arg Pro Ala Ala Ile Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15

45

<210> 41
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia de SLN de CBP80

<400> 41

ES 2 733 515 T3

<400> 45

Val His Ser His Lys Lys Lys Lys Ile Arg Thr Ser Pro Thr Phe Thr
1 5 10 15

Thr Pro Lys Thr Leu Arg Leu Arg Arg Gln Pro Lys Tyr Pro Arg Lys
20 25 30

Ser Ala Pro Arg Arg Asn Lys Leu Asp His Tyr
35 40

5 <210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de SLN

<220>
<221> VARIANTE
15 <222> (2)..(2)
<223> /sustituir="R o K"

<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> VARIANTE
25 <222> (4)..(4)
<223> /sustituir="R o K"

<400> 46

Lys Xaa Xaa Xaa
1

30 <210> 47
<211> 101
<212> PRT
213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> OMOMYC TAT

40 <400> 47

ES 2 733 515 T3

Met Thr Glu Glu Asn Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln
 20 25 30

Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu
 35 40 45

Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Thr Gln Lys
 50 55 60

Leu Ile Ser Glu Ile Asp Leu Leu Arg Lys Gln Asn Glu Gln Leu Lys
 65 70 75 80

His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Cys Ala Gly Arg Lys Lys Arg
 85 90 95

Arg Gln Arg Arg Arg
 100

<210> 48
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> OMOMYC LZArg

10

<400> 48

Met Thr Glu Glu Asn Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln
 20 25 30

Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu
 35 40 45

Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Thr Gln Lys
 50 55 60

Leu Ile Ser Glu Ile Asp Leu Leu Arg Lys Gln Asn Glu Gln Leu Lys
 65 70 75 80

His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Cys Ala Arg Arg Arg Arg Arg
 85 90 95

Arg Leu Arg

ES 2 733 515 T3

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio M2
 <400> 49
 Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe
 10 1 5 10
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido M1
 <400> 50
 Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
 20 1 5
 <210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 30
 <400> 51
 Gly Pro Arg Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Etiqueta Flag
 40
 <400> 52
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Etiqueta Strep
 50
 <400> 53
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5
 55
 <210> 54
 <211> 9

ES 2 733 515 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Etiqueta HA

<400> 54

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

10 <210> 55
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Etiqueta V5

<400> 55

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1 5 10

20 <210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Etiqueta peptídica

<400> 56

Ala His Gly His Arg Pro
 1 5

30 <210> 57
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Etiqueta peptídica

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50 <400> 57

Pro Ile His Asp His Asp His Pro His Leu Val Ile His Ser Gly Met
 1 5 10 15

Thr Cys Xaa Xaa Cys
 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, que tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 mayor que 70 %, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o de la adición de un aminoácido y/o de la eliminación de uno o más aminoácidos y/o de la sustitución conservativa de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 y en donde la variante funcionalmente equivalente del mismo puede dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez que se encuentra en el núcleo, siendo capaz de translocarse a través de la membrana celular y a través de la envoltura nuclear, para su uso en medicina, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse.
- 10
- 15 2. Un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, que tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 mayor que 70 %, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o de la adición de un aminoácido y/o de la eliminación de uno o más aminoácidos y/o de la sustitución conservativa de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 y en donde la variante funcionalmente equivalente del mismo puede dimerizar con Myc e inhibir su actividad una vez que se encuentra en el núcleo, siendo capaz de translocarse a través de la membrana celular y a través de la envoltura nuclear, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse.
- 20
- 25 3. El polipéptido, o la variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo va a administrarse sin utilizar vehículos para el suministro del polipéptido al citoplasma de la célula.
4. El polipéptido o la variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la variante funcionalmente equivalente es un polipéptido resultante de la inserción o de la adición de un aminoácido con respecto al polipéptido de SEQ ID NO: 1.

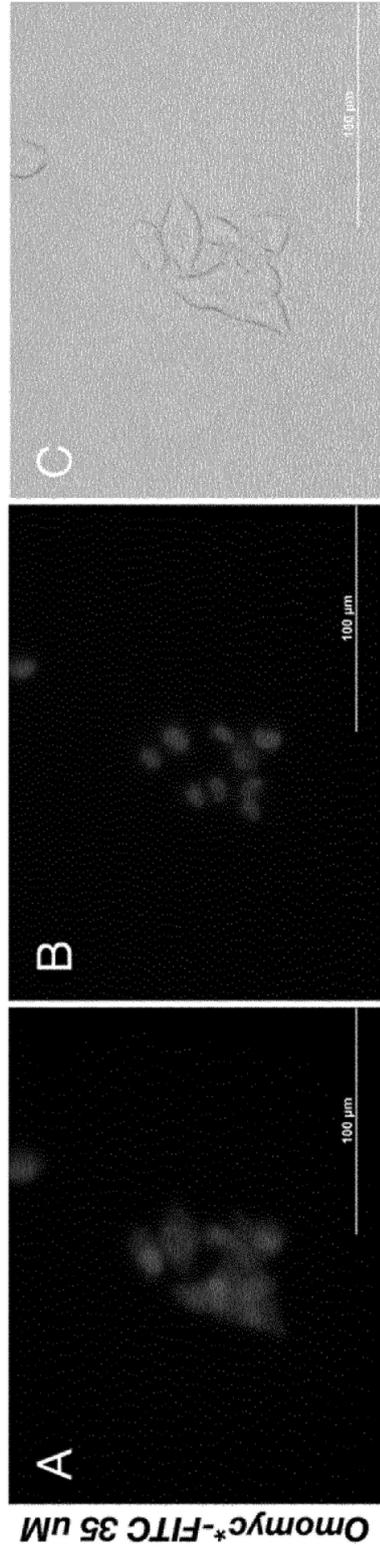
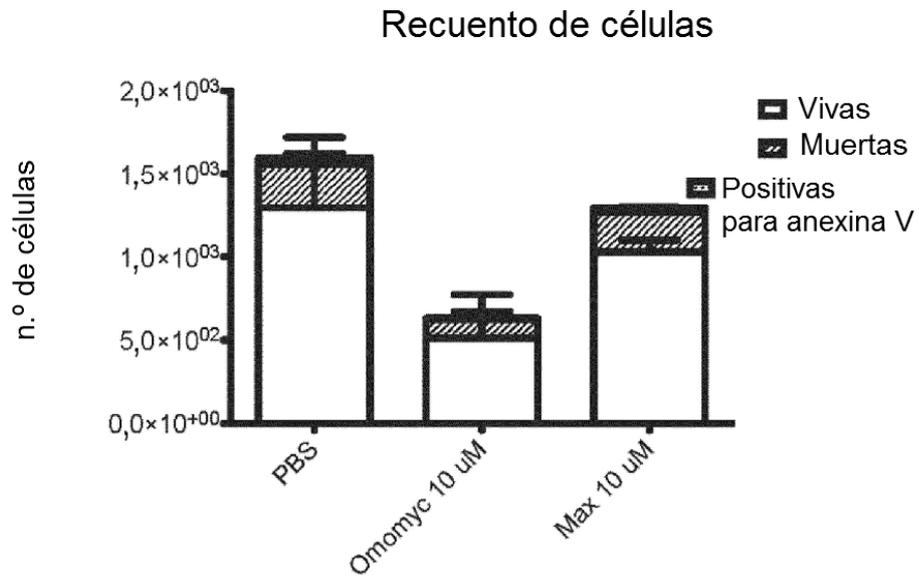


Fig. 1

A



B

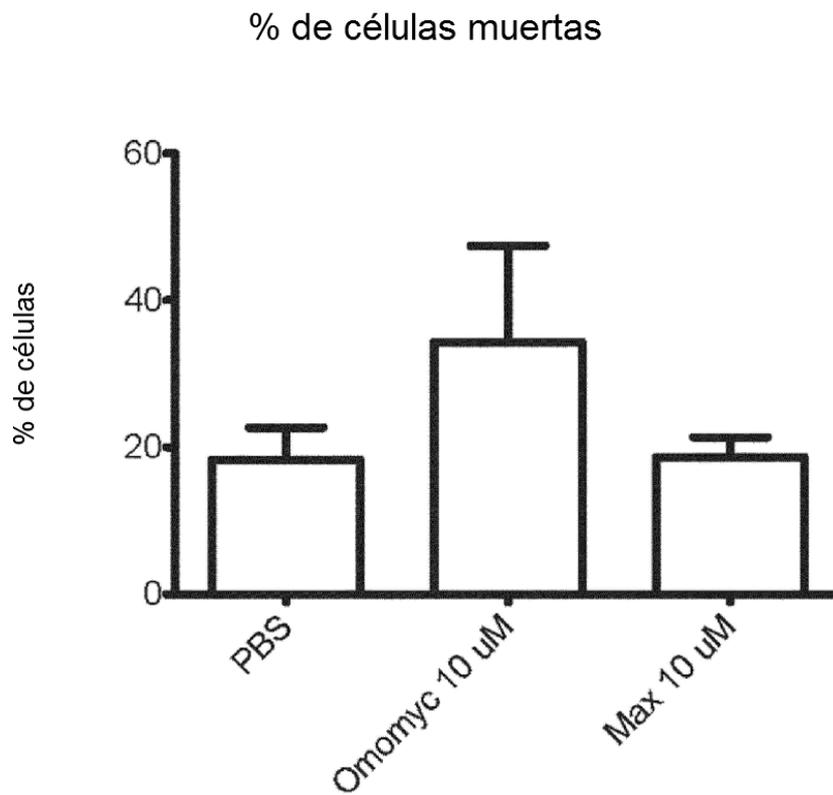
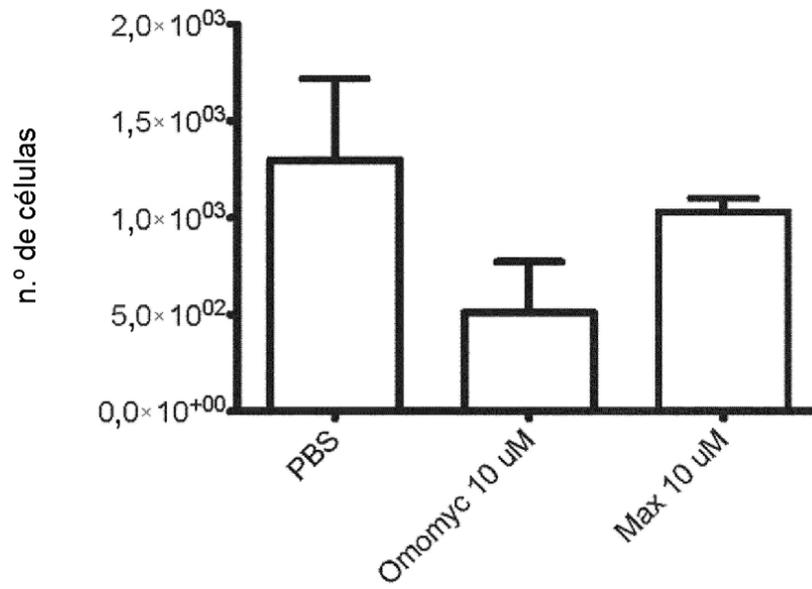


Fig. 2

C

Células vivas



D

% de células positivas para anexina V

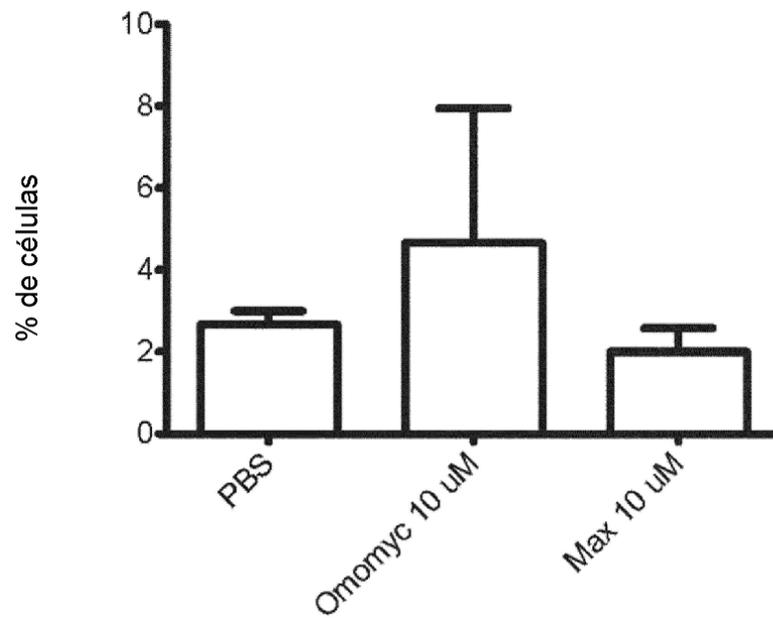
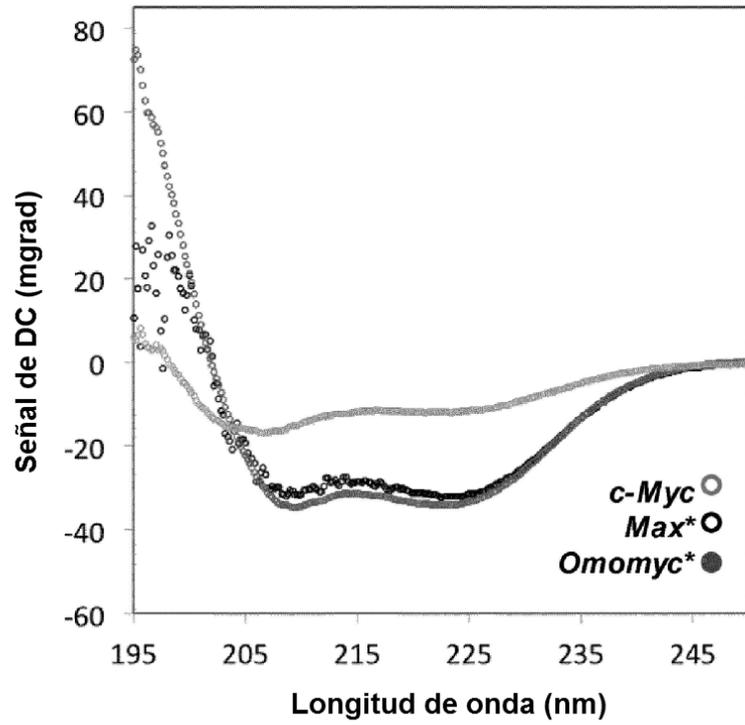


Fig. 2 (cont.)

A



B

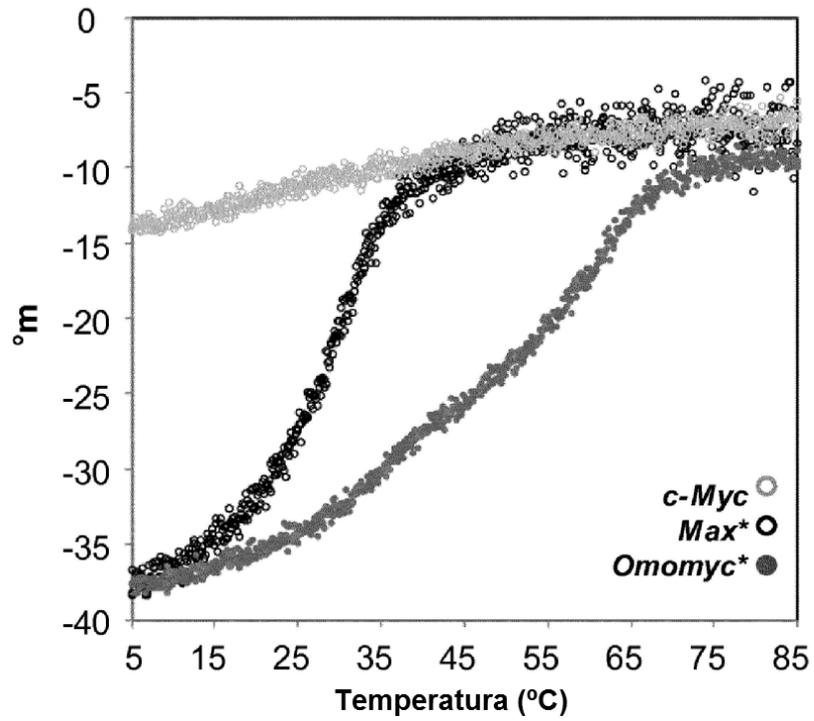


Fig. 3

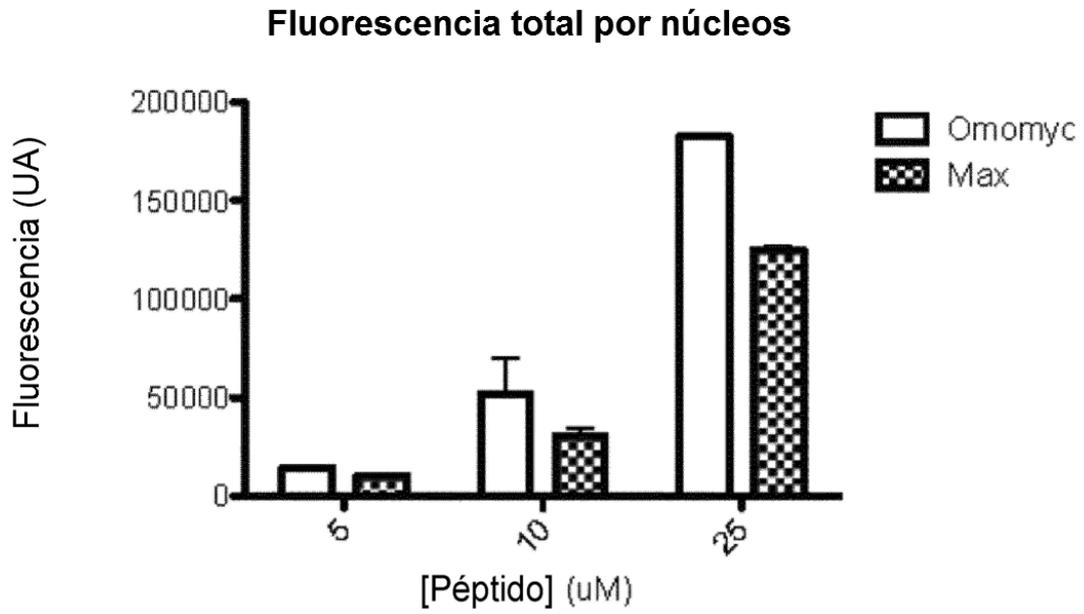


Fig. 4

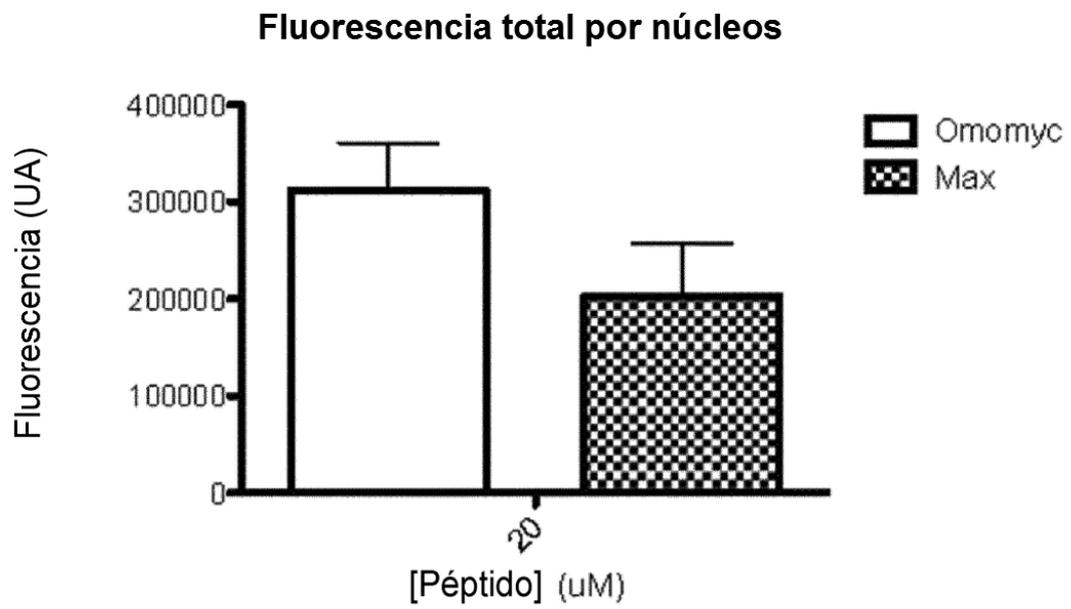


Fig. 5

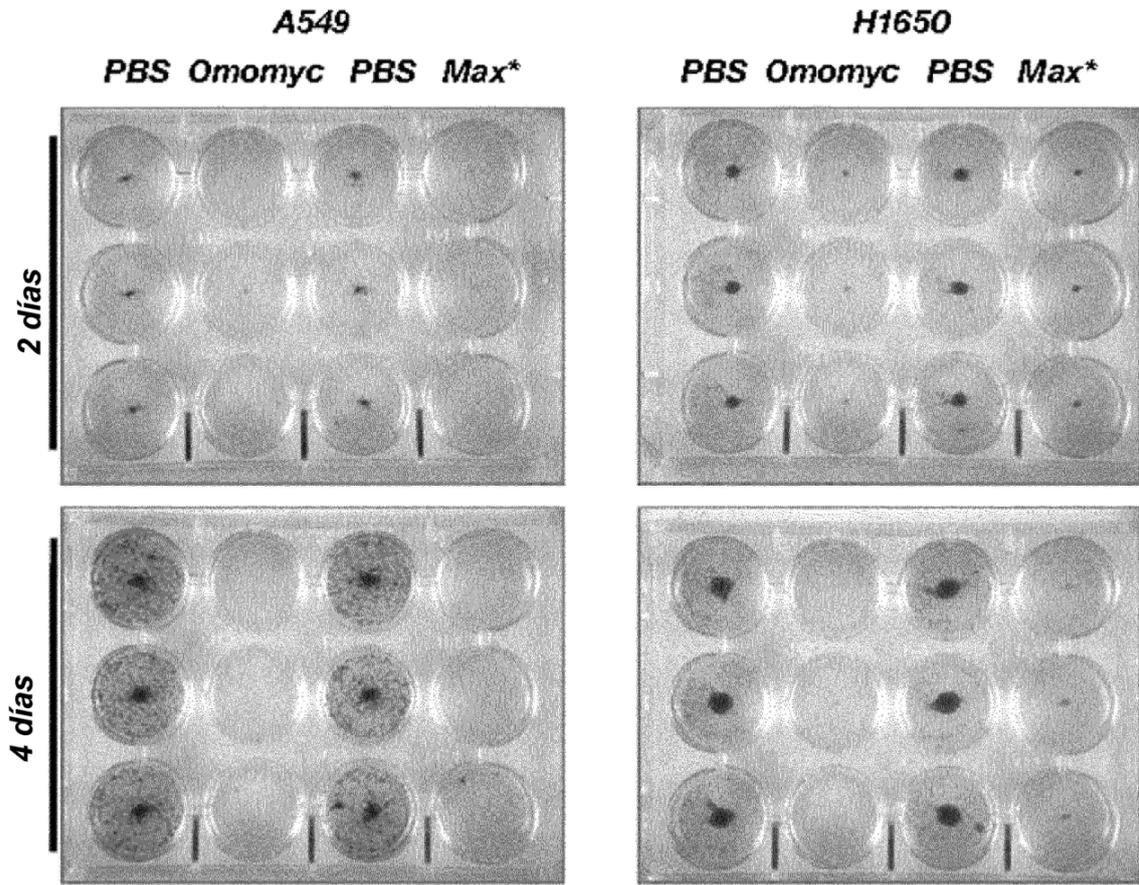


Fig. 6

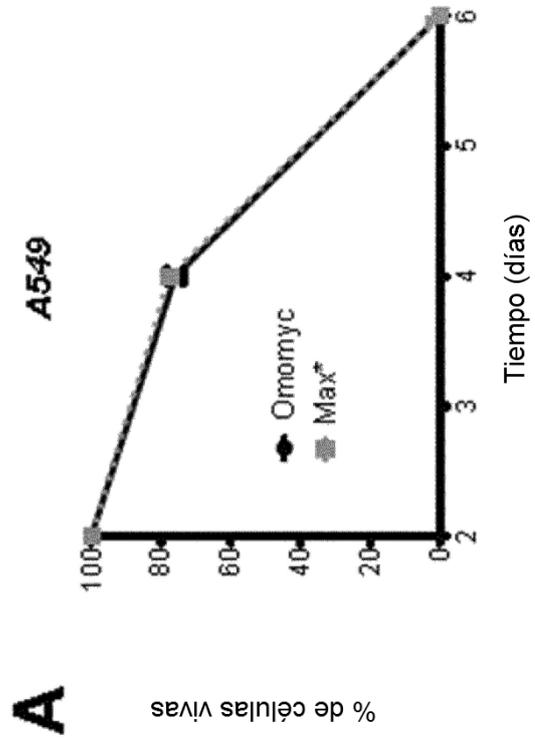
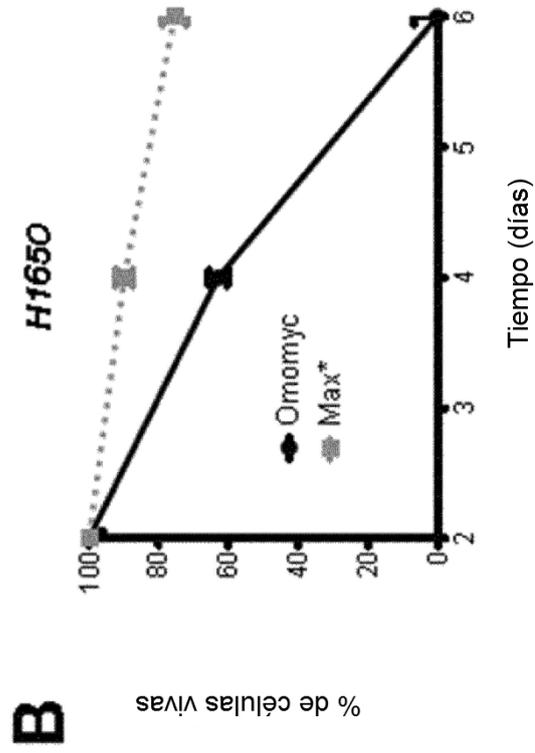


Fig. 7

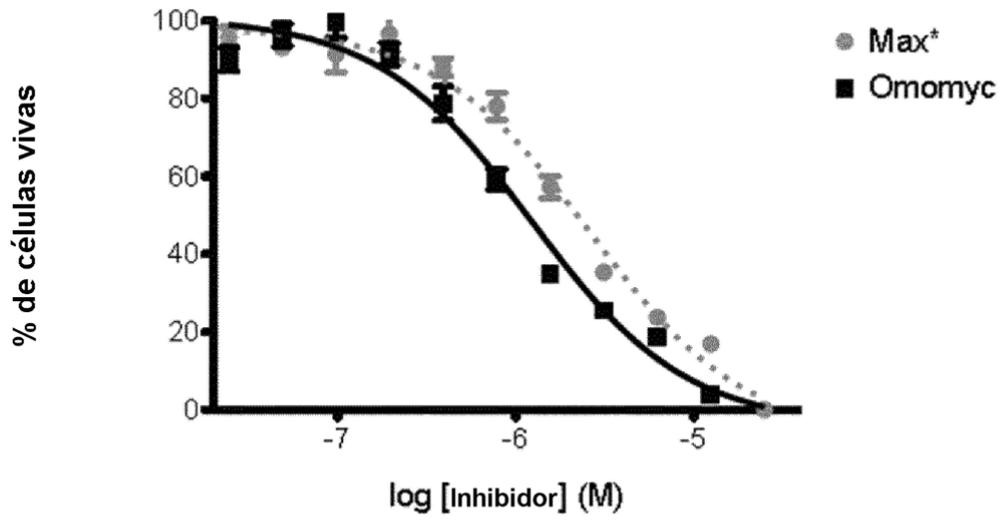


Fig. 8

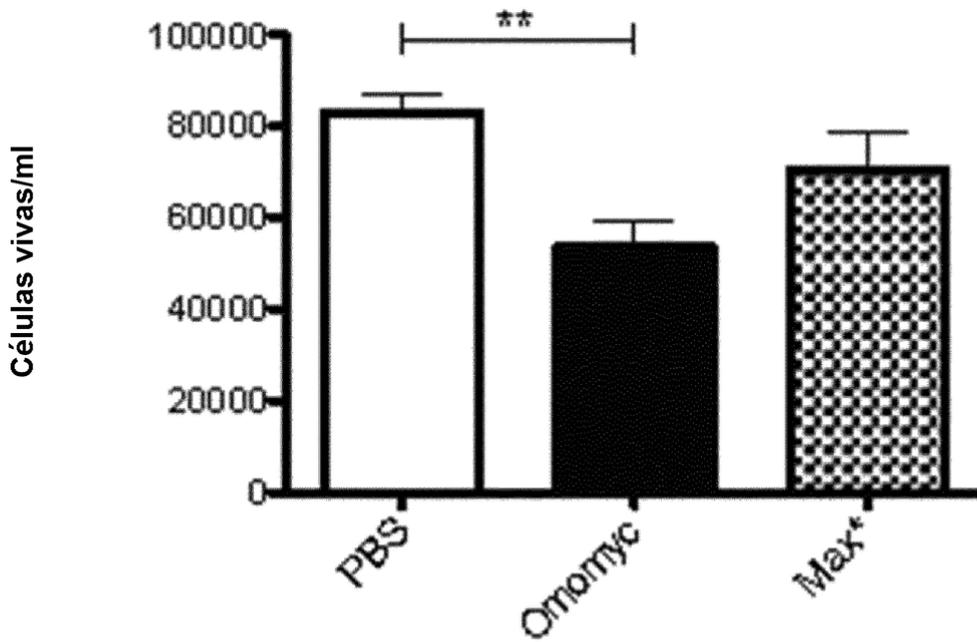


Fig. 9

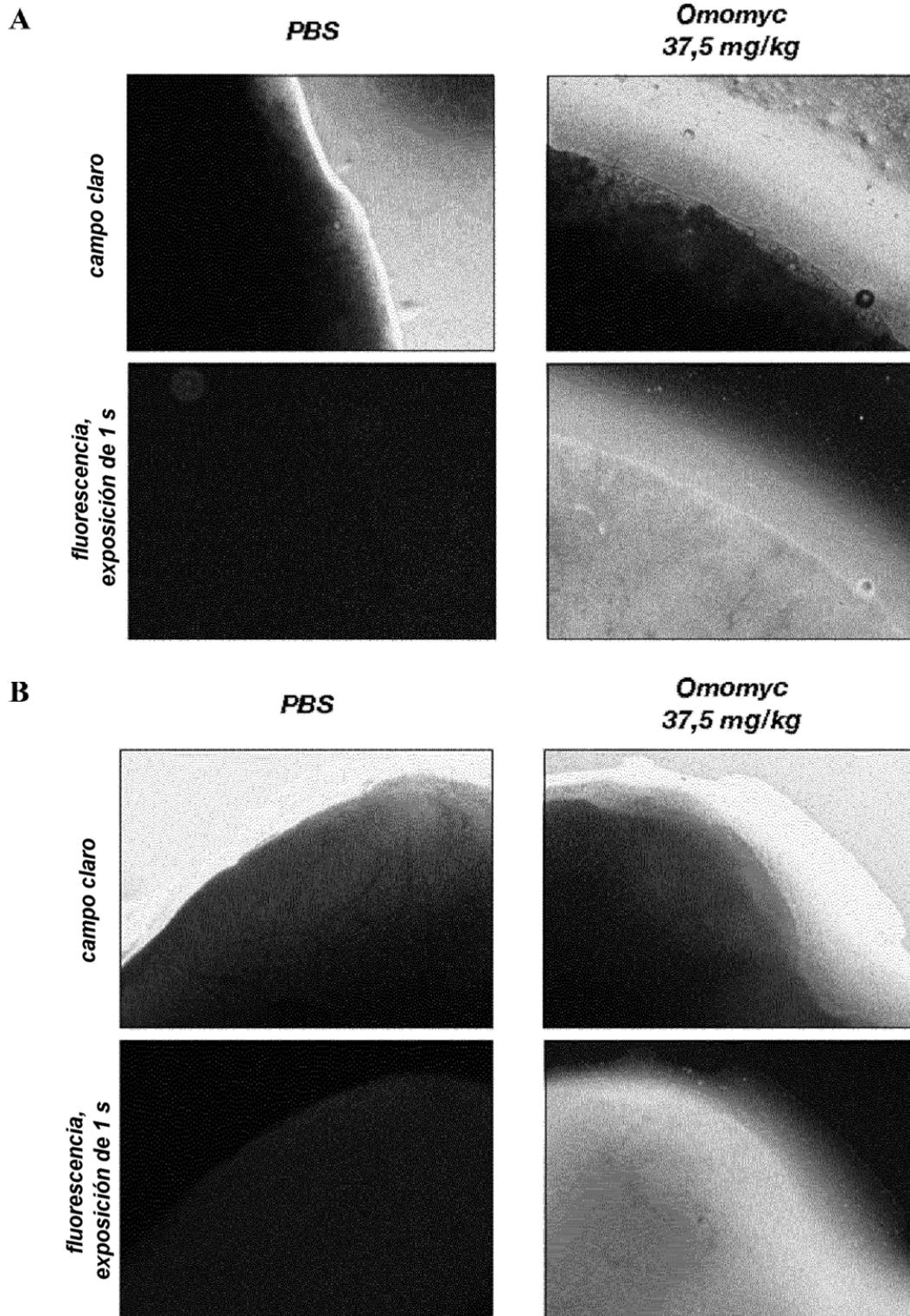


Fig. 10

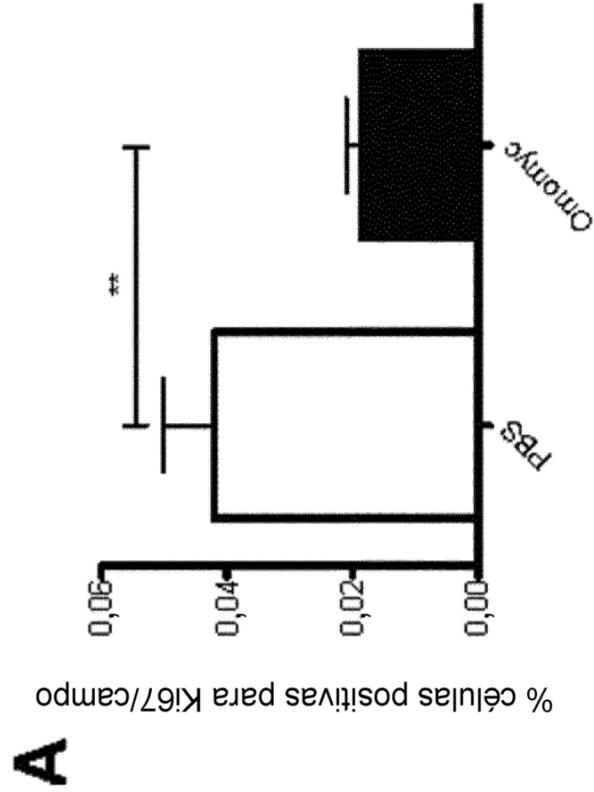
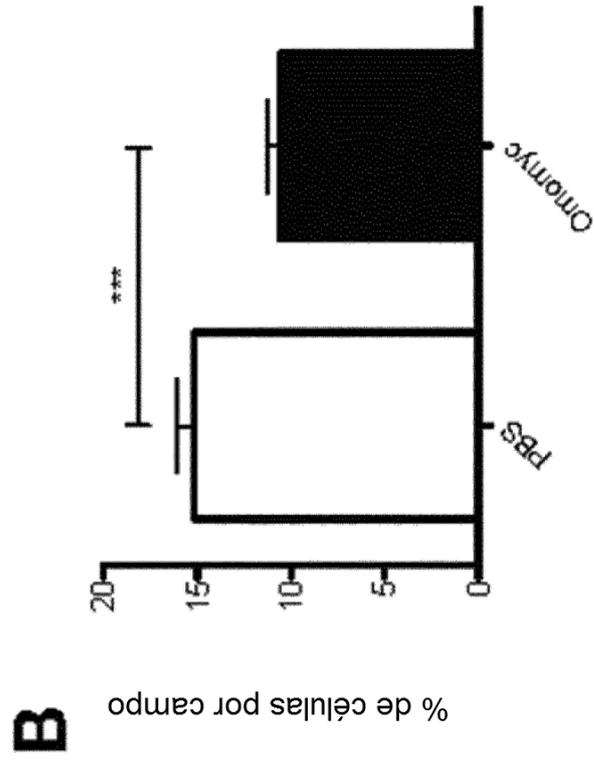


Fig. 11

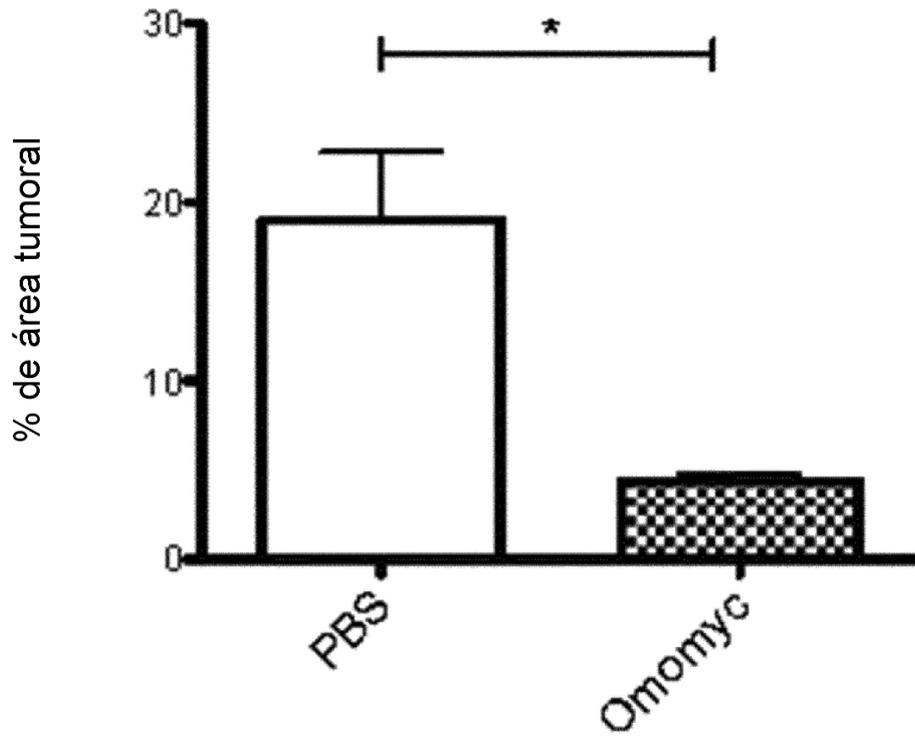


Fig. 12