

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 543**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/GB2015/054068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15816833 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3233110**

54 Título: **Péptido de terminal C de acetilcolinesterasa cíclico en el tratamiento o prevención de cáncer o metástasis**

30 Prioridad:

19.12.2014 GB 201422715

18.05.2015 GB 201508480

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

31.01.2020

73 Titular/es:

**NEURO-BIO LTD (100.0%)
Building F5, Culham Science Centre
Abingdon, Oxfordshire OX14 3DB, GB**

72 Inventor/es:

**GREENFIELD, SUSAN ADELE y
PEPPER, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 739 543 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

Péptido de terminal C de acetilcolinesterasa cíclico en el tratamiento o prevención de cáncer o metástasis

5 La invención se refiere a cánceres, y en particular a composiciones, terapias y métodos novedosos para tratar, prevenir o aliviar el cáncer o la enfermedad metastásica.

10 El cáncer y los tumores malignos forman un grupo de enfermedades que involucran el crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o diseminarse a otras partes del cuerpo, es decir, metástasis. En 2012, se produjeron aproximadamente 14 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo. Por lo tanto, subsiste la necesidad de proporcionar un medicamento mejorado para el tratamiento del cáncer y la metástasis.

15 Los inventores investigaron los efectos de un péptido cíclico derivado del terminal C de la acetilcolinesterasa (conocido como "NBP-14") en varias estirpes celulares cancerosas, así como en células tumorales primarias derivadas de pacientes y linfocitos derivados de individuos sanos emparejados por edad, y encontraron que muestran una modesta actividad apoptótica y antiproliferativa en cada una de las estirpes celulares de cáncer probadas. Además, también han demostrado que el péptido cíclico no es tóxico en las células normales. De acuerdo con lo anterior, los inventores consideran que los péptidos cíclicos tendrán un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer, tumores y enfermedad metastásica.

20 Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido cíclico, de la SEQ ID NO: 3, o un derivado o análogo del mismo que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, para uso en el tratamiento, mejora o prevención del cáncer o enfermedad metastásica.

25 Como se describe en los Ejemplos, los inventores realizaron pruebas de citotoxicidad in vitro de un péptido cíclico derivado del terminal C de la acetilcolinesterasa (conocido como "NBP-14") en: (i) muestras de leucemia linfocítica crónica primaria (CLL) derivadas de pacientes con CLL con un rango de marcadores de pronóstico (células MEC-1); (ii) en KG1a (estirpe celular de leucemia mieloide aguda) y H929 y JLN3 (estirpes celulares de mieloma múltiple); y (iii) en MCF7 y MDA-MB-231 (estirpes celulares de cáncer de mama). Los inventores han demostrado sorprendentemente que el péptido cíclico, NBP-14, mostró efectos apoptóticos en cada una de las estirpes celulares probadas a concentraciones $>0.1 \mu\text{M}$. Más aún, las células MCF7 mostraron una mayor sensibilidad a NBP-14. El péptido cíclico, el NBP-14, mostró evidencia de actividad antiproliferativa en células MDA-MB-231, y también se observaron efectos similares en células JLN3, células KG1a, células MEC-1 y células H929 con concentraciones de péptido $>0.1 \mu\text{M}$. Ventajosamente, también han mostrado que el péptido cíclico no es tóxico en células normales a las mismas concentraciones.

40 El cáncer que se trata puede ser leucemia. Por ejemplo, el cáncer puede ser leucemia linfocítica o leucemia linfocítica crónica (CLL). El cáncer puede ser leucemia mieloide o leucemia mieloide aguda. El cáncer puede ser mieloma múltiple. El cáncer puede ser cáncer de mama.

Más preferiblemente, el polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo, es para uso en el tratamiento, mejora o prevención de enfermedad metastásica.

45 Los polipéptidos cíclicos son cadenas peptídicas cuyos terminales N y C están unidos entre sí con un enlace peptídico que forma una cadena circular de aminoácidos, como se muestra en la Figura 8B.

50 El término "derivado o análogo del mismo" puede significar un polipéptido dentro del cual los residuos de aminoácidos se reemplazan por residuos (ya sean aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o imitadores de aminoácidos) con cadenas laterales similares o propiedades de la estructura principal peptídica. Adicionalmente, los terminales de dichos péptidos pueden estar protegidos por grupos protectores de terminales N y C con propiedades similares a los grupos acetilo o amida.

55 Los derivados y análogos de péptidos de acuerdo con la invención también pueden incluir aquellos que aumentan la vida media del péptido in vivo. Por ejemplo, un derivado o análogo de los péptidos de la invención puede incluir derivados peptoides y retropeptoides de los péptidos, híbridos de péptido-peptoides y derivados de D-aminoácido de los péptidos.

60 Los peptoides, o glicinas sustituidas con poli-N, son una clase de peptidomiméticos cuyas cadenas laterales se unen al átomo de nitrógeno de la estructura principal peptídica, en lugar de a los carbonos alfa, así como en aminoácidos. Los derivados peptoides de los péptidos de la invención pueden diseñarse fácilmente a partir del conocimiento de la estructura del péptido. Los retropeptoides (en los cuales todos los aminoácidos se reemplazan por residuos peptoides en orden inverso) también son derivados adecuados de acuerdo con la invención. Se espera que un retropeptoides se una en la dirección opuesta en la ranura de unión al ligando, en comparación con un péptido o péptido híbrido peptoides que contiene un residuo peptoides. Como resultado, las cadenas laterales de los residuos peptoides pueden apuntar en la misma dirección que las cadenas laterales en el péptido original.

Preferiblemente, el polipéptido, derivado o análogo cíclico del mismo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos derivada del terminal C de la acetilcolinesterasa (AChE), o un truncamiento de la misma.

5 Como se describe en los Ejemplos, los inventores se sorprendieron mucho al observar que los polipéptidos derivados de AChE cíclicos de la invención se dirigen selectivamente a las células tumorales en lugar de al tejido normal.

10 Por lo tanto, el término "derivado de" puede significar una secuencia de aminoácidos, que es un derivado o una modificación de una secuencia de aminoácidos que está presente en, o forma, el terminal C de AChE, y una parte de la misma.

15 El término "truncamiento de los mismos" puede significar que el polipéptido cíclico derivado de AChE se reduce de tamaño mediante la eliminación de aminoácidos. La reducción de los aminoácidos se puede lograr mediante la eliminación de residuos del terminal C o N del péptido antes de la ciclización en el polipéptido cíclico de la invención, o se puede lograr mediante la eliminación de uno o más aminoácidos dentro del núcleo del péptido antes de la ciclización.

20 La acetilcolinesterasa es una serina proteasa que hidroliza la acetilcolina, y será bien conocida por los expertos. La principal forma de acetilcolinesterasa que se encuentra en el cerebro se conoce como acetilcolinesterasa de cola (T-AChE). Se prefiere especialmente que el polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo comprenda una secuencia de aminoácidos derivada del terminal C de la acetilcolinesterasa de cola (T-AChE), o un truncamiento de la misma.

25 La secuencia de proteínas de una realización de acetilcolinesterasa de cola humana (Gen Bank: AAA68151.1) tiene una longitud de 614 aminoácidos, y se proporciona en este documento como la SEQ ID No: 1, como sigue:

```

1 mrppqc1lht pslaspllll llwllgggvq aegredaell vtvrggrlrg irlktpggpv
61 saflgipfae ppmgprf1p pepkqpwsqv vdattfqsvc yqyvdtlypg feqtemwnpn
121 relsedc1yl nvwtpyprpt sptpvlwiy gggfysgass ldvydgrflv qaertvlvsm
181 nyrvgafgfl alpgsreapq nvglldqrla lqwwqenvaa fggdptsvtl fgesagaasv
241 gmhllsppsr glfhrav1qs gapngpwatv gmgearrrat qlahlvgcpp ggtgndtel

```

```

301 vaclrtrpaq vlvnhewhvl pgesvfrfsf vpvvdqdf1s dtpealinag dfhglqv1vg
361 vvkdegsyfl vygapgfskd neslisraef lagvrvgvppq vsdlaaeavv lhytdwlhpe
421 dparlreals dvvqdhnvvc pvaqlaqla aqqarvyayv fehrast1sw plwmqvphqy
481 e1ef1fg1pl dpsrnytaee kifaqrlmry wanfartqdp neprdpkapq wppytagaqq
541 yvsldlrple vrrglraqac afwnrflpkl lsatdtldea erqwkafhr wssymvhwkn
601 qfdhyskqdr csdl

```

[SEQ ID No:1]

30 Se apreciará que los primeros 31 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1 se eliminan mientras se libera la proteína, dejando de esta manera una secuencia de 583 aminoácidos. Por lo tanto, se prefiere que el polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos derivada del terminal C de la acetilcolinesterasa, o un truncamiento de la misma, en la que la acetilcolinesterasa comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se indica en la SEQ ID No: 1, preferiblemente excluyendo los 31 aminoácidos en el terminal N.

35 Preferiblemente, el polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de los últimos 300, 200, 100 o 50 aminoácidos que forman el terminal C de la acetilcolinesterasa, o un truncamiento de la misma, más preferiblemente en la que la acetilcolinesterasa comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en la SEQ ID No: 1. El polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo comprende o consiste preferiblemente en una secuencia de aminoácidos derivada de los últimos 40 aminoácidos que forman el terminal C de la acetilcolinesterasa, o un truncamiento de la misma.

40 Preferiblemente, el polipéptido, derivado o análogo cíclico del mismo comprende o consiste en entre 8 y 40 residuos de aminoácidos, más preferiblemente entre 10 y 30 aminoácidos, y lo más preferiblemente entre 12 y 20 aminoácidos. El inventor ha preparado tres secuencias de péptidos que se derivan del terminal C de AChE, y que se mencionan en este documento como T30, T14 y T15, en el que el número corresponde al número de aminoácidos.

50 La secuencia de aminoácidos de T30 (que corresponde a los últimos 30 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No:1) se proporciona en este documento como la SEQ ID No:2, como sigue:-
KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSDL [SEQ ID No:2]

La secuencia de aminoácidos de T14 (que corresponde a los 14 residuos de aminoácidos ubicados hacia el extremo de la SEQ ID No:1, y carece de los 15 aminoácidos finales encontrados en T30) se proporciona en este documento como la SEQ ID No:3, como sigue:-AEFHRWSSYMHVK [SEQ ID No:3]

5 La secuencia de aminoácidos de T15 (que corresponde a los últimos 15 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No:1) se proporciona en este documento como la SEQ ID No:4, como sigue:-NQFDHYSKQDRCSL [SEQ ID No:4]

10 Se apreciará que cualquiera de las secuencias representadas como SEQ ID No: 2-4 puede ciclarse o ciclarse fácilmente para formar un polipéptido cíclico. Por ejemplo, la ciclización de péptidos puede lograrse mediante las técnicas de ciclización de cadena lateral a cadena lateral, de cadena lateral a estructura principal o de cabeza a cola (terminal C al terminal N). En una realización preferida, la ciclización de cabeza a cola es el método preferido por el cual se producen los polipéptidos cíclicos. Los polipéptidos cíclicos se pueden sintetizar utilizando la ciclización de péptidos lineal en fase de solución clásica o a ciclización basada en resina. Los métodos preferidos para la ciclización se describen en los ejemplos. En otra realización preferida, el polipéptido se produce utilizando un enfoque de división por ciclización, en el que el polipéptido cíclico se sintetiza mediante ciclización después de la síntesis de péptidos lineales por etapas. Una ventaja de este método es que la cadena lateral no necesita estar anclada, lo que hace que el enfoque sea más general. Preferiblemente, antes de uso, las muestras resultantes de los péptidos cíclicos se pueden analizar mediante MALDI-TOF MS.

20 Un polipéptido de acuerdo con la invención consiste en la SEQ ID No: 3 cíclica, o una variante funcional o fragmento de la misma que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de la misma.

25 Los inventores encontraron que la SEQ ID No: 3 (es decir denominada en este documento "T14 ciclada", "CT14" o "NBP-14") mostró sorprendentemente actividad apoptótica y antiproliferativa selectiva en cada una de las estirpes celulares de cáncer probadas en comparación con células sanas, y no fue tóxica en las células normales, no cancerosas.

30 Se apreciará que el polipéptido cíclico de acuerdo con la invención se puede utilizar en un medicamento, que se puede utilizar como una monoterapia (es decir, solo el uso del polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo), para tratar, aliviar o prevenir el cáncer o metástasis. Alternativamente, el polipéptido cíclico de acuerdo con la invención se puede utilizar como un complemento de, o en combinación con, terapias conocidas para tratar, aliviar o prevenir el cáncer.

35 El polipéptido cíclico de acuerdo con la invención se puede combinar en composiciones que tienen una serie de formas diferentes dependiendo, en particular, de la manera en que se va a utilizar la composición. Por lo tanto, por ejemplo, la composición puede estar en forma de polvo, comprimido, cápsula, líquido, pomada, crema, gel, hidrogel, aerosol, rociador, solución micelar, parche transdérmico, suspensión de liposomas o cualquier otra forma adecuada que se pueda administrar a una persona o animal que necesita tratamiento. Se apreciará que el vehículo de los medicamentos de acuerdo con la invención debe ser uno que sea bien tolerado por el sujeto al que se administra, y que preferiblemente permita el suministro del polipéptido cíclico a través de la barrera hematoencefálica cuando se tratan tumores cerebrales.

45 Los polipéptidos cíclicos de acuerdo con la invención también se pueden incorporar dentro de un dispositivo de liberación lenta o retardada. Dichos dispositivos se pueden insertar, por ejemplo, sobre o debajo de la piel, y el medicamento puede ser liberado durante semanas o incluso meses. El dispositivo puede estar ubicado por lo menos adyacente al sitio de tratamiento. Dichos dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiere un tratamiento a largo plazo con polipéptidos cíclicos utilizados de acuerdo con la invención y que normalmente requerirían una administración frecuente (por ejemplo, por lo menos una inyección diaria).

50 En una realización preferida, los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden administrar a un sujeto mediante inyección en el torrente sanguíneo o directamente en un sitio que requiere tratamiento. Por ejemplo, el medicamento puede inyectarse por lo menos adyacente al cerebro. Las inyecciones pueden ser intravenosas (bolos o infusiones) o subcutáneas (bolos o infusiones), o intradérmicas (bolos o infusiones).

55 Se apreciará que la cantidad de polipéptido cíclico que se requiere está determinada por su actividad biológica y biodisponibilidad, que a su vez depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas del polipéptido cíclico y si se está utilizando como monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también se verá influenciada por la vida media del polipéptido cíclico en el sujeto que se está tratando. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar las dosis óptimas que se van a administrar, y variarán con el polipéptido cíclico particular en uso, la concentración de la composición farmacéutica, el modo de administración y el avance del cáncer o la metástasis. Los factores adicionales que dependen del sujeto en particular que se esté tratando darán como resultado la necesidad de ajustar las dosificaciones, que incluyen la edad, peso, sexo, dieta del sujeto y tiempo de administración.

60

En general, se puede utilizar una dosis diaria de entre 0.001 µg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal, o entre 0.01 µg/kg de peso corporal y 1 mg/kg de peso corporal, del polipéptido cíclico de acuerdo con la invención para tratar, aliviar, o prevenir cáncer o metástasis, dependiendo de qué polipéptido cíclico se utiliza.

5 El polipéptido cíclico se puede administrar antes, durante o después del inicio del cáncer. Las dosis diarias se pueden administrar como una administración única (por ejemplo, una inyección diaria única o la inhalación de un aerosol nasal). Alternativamente, el polipéptido cíclico puede requerir la administración dos veces o más durante un día. Como ejemplo, los polipéptidos cíclicos pueden administrarse como dos (o más, dependiendo de la gravedad del cáncer o la metástasis que se está tratando) dosis diarias de entre 0.07 µg y 700 mg (es decir, suponiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis al despertar y luego una segunda dosis por la noche (si está en un régimen de dos dosis) o en intervalos de 3 o 4 horas a partir de entonces. Alternativamente, se puede utilizar un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas de polipéptido cíclico de acuerdo con la invención a un paciente sin la necesidad de administrar dosis repetidas.

15 Se pueden utilizar procedimientos conocidos, tales como los empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación in vivo, ensayos clínicos, etc.) para formar formulaciones específicas del polipéptido cíclico de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (como dosis diarias de los agentes y la frecuencia de administración). Los inventores consideran que son los primeros en sugerir una composición de tratamiento contra el cáncer, basada en el uso de un polipéptido cíclico de la invención. Por lo tanto, en un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica contra el cáncer o antimetastásica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido, derivado o análogo cíclico del mismo de acuerdo con el primer aspecto, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 La invención también proporciona en un cuarto aspecto, un proceso para fabricar la composición farmacéutica contra el cáncer o antimetastásica de acuerdo con el tercer aspecto, comprendiendo el proceso combinar una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo de acuerdo con el primer aspecto, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 El polipéptido, derivado o análogo cíclico del mismo comprende o consiste preferiblemente en T14 cíclico (es decir, NBP-14) como se describe en el presente documento, es decir, la SEQ ID No: 3.

35 Un "sujeto" puede ser un vertebrado, mamífero o animal doméstico. Por lo tanto, los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden utilizar para tratar cualquier mamífero, por ejemplo, ganado (por ejemplo, un caballo), mascotas, o se pueden utilizar en otras aplicaciones veterinarias. Más preferiblemente, sin embargo, el sujeto es un ser humano.

40 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de polipéptido cíclico es cualquier cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es la cantidad de agente activo que se necesita para tratar el cáncer o la metástasis, o que produce el efecto deseado. El polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo se puede utilizar como adyuvante para el tratamiento de tumores sólidos o metastásicos, por ejemplo, con quimioterapia o radioterapia. Esto significa que se requieren dosis y tiempos de exposición más bajos de quimioterapia y/o radioterapia.

45 Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptido cíclico utilizada puede ser de aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 800 mg, y preferiblemente de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 500 mg.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se menciona en el presente documento, es cualquier compuesto conocido o combinación de compuestos conocidos que aquellos expertos en la técnica saben que son útiles para formular composiciones farmacéuticas.

50 En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido, y la composición puede estar en forma de un polvo o comprimido. Sin embargo, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido, y la composición farmacéutica está en forma de una solución. Se pueden utilizar composiciones farmacéuticas líquidas, que son soluciones o suspensiones estériles, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intravenosa y particularmente subcutánea.

55 El polipéptido cíclico y las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral en forma de una solución o suspensión estéril que contiene otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, suficiente solución salina o glucosa para hacer que la solución sea isotónica), sales biliares, acacia, gelatina, monoleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares. El polipéptido cíclico utilizado de acuerdo con la invención también se puede administrar por vía oral en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos, y formas líquidas, tales como soluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas útiles para la administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones y suspensiones estériles.

65

Se apreciará que la invención se extiende a cualquier ácido nucleico o péptido o variante, derivado o análogo de los mismos, que comprende sustancialmente las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:3, que incluyen las variantes funcionales o fragmentos funcionales de las mismas. Los términos "variante funcional" y "fragmento funcional", pueden ser una secuencia que tienen por lo menos 70%, incluso más preferiblemente más de 75%, y aún más preferiblemente más de 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos tiene por lo menos 85% de identidad con la SEQ ID NO: 3, más preferiblemente por lo menos 90% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 92% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 95% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 97% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 98% de identidad y, más preferiblemente por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3.

El técnico experto apreciará cómo calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos. Para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos, primero se debe preparar una alineación de las dos secuencias, seguida de un cálculo del valor de identidad de la secuencia. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar diferentes valores dependiendo de: (i) el método utilizado para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementado en diferentes programas), o alineación estructural desde la comparación 3D; y (ii) los parámetros utilizados por el método de alineación, por ejemplo, alineación local frente a global, la matriz de puntuación de pares utilizada (por ejemplo, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.), y penalización de espacio, por ejemplo, forma funcional y constantes.

Habiendo hecho la alineación, hay muchas formas diferentes de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, uno puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de la alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones sin espacios; o (v) el número de posiciones equivalentes excluyendo las protuberancias. Adicionalmente, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende en gran medida de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto es un par de secuencias, mayor es la identidad de secuencia que uno puede esperar que ocurra por casualidad.

Por lo tanto, se apreciará que la alineación precisa de secuencias de proteínas o ADN es un proceso complejo. El programa de alineación múltiple ClustalW popular (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) es una forma preferida para generar múltiples alineaciones de Proteínas o ADN de acuerdo con la invención. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineaciones de ADN: Penalización de Apertura de Espacios = 15.0, Penalización de Extensión de Espacios = 6.66 y Matriz = Identidad. Para alineaciones de proteínas: Penalización de Apertura de Espacios = 10.0, Penalización de Extensión de Espacios = 0.2 y Matriz = Gonnet. Para alineaciones de ADN y proteínas: ENDGAP = -1, y GAPDIST = 4. Aquellos expertos en la técnica sabrán que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para una alineación óptima de la secuencia.

Preferiblemente, el cálculo de las identidades porcentuales entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos se puede calcular a partir de una alineación tal como $(N/T)*100$, en la que N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas, que incluyen los espacios pero que excluyen las protuberancias. Por lo tanto, un método más preferido para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias comprende (i) preparar una alineación de secuencias utilizando el programa ClustalW utilizando un conjunto adecuado de parámetros, por ejemplo, como se estableció anteriormente; y (ii) insertar los valores de N y T en la siguiente fórmula: - Identidad de secuencia = $(N/T)*100$.

Aquellos expertos en la técnica conocerán métodos alternativos para identificar secuencias similares. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar será codificada por una secuencia, que se hibrida a secuencias de ADN o sus complementos bajo condiciones rigurosas. Por condiciones rigurosas, nos referimos a que el nucleótido se hibrida a un ADN o ARN unido a un filtro en 3x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de por lo menos un lavado en 0.2 x SSC/SDS al 0.1% a aproximadamente 20°C-65°C. Alternativamente, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en por lo menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos de las secuencias mostradas en la SEQ ID No: 1-4.

Debido a la degeneración del código genético, está claro que cualquier secuencia de ácido nucleico descrita en este documento se podría variar o cambiar sin afectar sustancialmente la secuencia de la proteína codificada, para proporcionar una variante funcional de la misma. Las variantes de nucleótidos adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprenden todas, o porciones de, secuencias que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido al que sustituye, para producir un cambio conservador. Por ejemplo, los pequeños aminoácidos no polares e hidrófobos incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos no polares, hidrófobos grandes incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente

(básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por lo tanto, se apreciará qué aminoácidos pueden reemplazarse con un aminoácido que tenga propiedades biofísicas similares, y el técnico experto conocerá las secuencias de nucleótidos que codifican estos aminoácidos.

5 Todas las características descritas en este documento (que incluyen las reivindicaciones acompañantes, resumen y dibujos) y/o todas las etapas de cualquier método o proceso divulgado de esta manera, se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que por lo menos algunas de dichas características y/o etapas son mutuamente excluyentes.

10 Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo las realizaciones de la misma se pueden llevar a cabo, ahora se hará referencia, a modo de ejemplo, a las Figuras acompañantes, en las cuales:

15 La Figura 1 es una comparación de los efectos citotóxicos de T15 (SEQ ID No:4), T30 (SEQ ID No:2), y del polipéptido cíclico de acuerdo con la invención, es decir NBP-14 (SEQ ID No:3), en las estirpes celulares de cáncer de mama (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

20 La Figura 2 muestra una comparación de los efectos citotóxicos de T15, T30, NBP-14 y Ara-C en la estirpe celular KG1a. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

25 La Figura 3 muestra una comparación de los efectos citotóxicos de T15, T30, NBP-14 y fludarabina en las estirpes celulares (A) H929 y (B) MEC-1. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

La Figura 4A muestra una comparación de los efectos citotóxicos de T15, T30, NBP-14 en células de CLL primarias.

30 La Figura 4(B) muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-CD20, Rituximab, se muestra para comparación. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y se presentaron como la media (\pm DE) de cinco experimentos independientes;

35 La Figura 5 muestra una comparación de los efectos de los péptidos T15, T30, y NBP-14 en linfocitos T y B normales. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y los datos se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

40 La Figura 6 muestra una comparación de los efectos antiproliferativos de T15, T30 y NBP-14 en (A) células MDA-MB-231 y (B) células MCF7. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y los datos se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

La Figura 7 muestra una comparación de los efectos antiproliferativos de T15, T30 y NBP-14 en (A) células KG1a y (B) células MEC-1 y (C) células H929. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y los datos se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

45 La Figura 8A muestra la secuencia de NBP-14 con los residuos de Alanina (A) y Lisina (K) terminales que forman los sitios de ciclización.

La Figura 8B muéstrale péptido NBP-14 cíclico en el que los residuos de alanina y lisina terminales se unen juntos;

50 La Figura 9 muestra la comparación de las dosis-respuestas antimigratorias inducidas por el péptido NBP-14 en las estirpes celulares de cáncer MDA-MB-231, MCF7, JJN3 y KG1a. Todos los datos se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes. *, $P < 0.05$;

55 La Figura 10 muestra la comparación de los efectos antimigratorios de T15, T30, NBP-14 en las estirpes celulares de cáncer de mama (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Todos los datos se presentaron como la media (\pm DE) de cinco experimentos independientes;

60 La Figura 11 muestra la comparación de los efectos antimigratorios de T15, T30, NBP-14 en la estirpe celular KG1a. Todos los datos se presentaron como la media (\pm DE) de cinco experimentos independientes;

La Figura 12 muestra la comparación de los efectos antimigratorios de T15, T30, NBP-14 en la estirpe celular JJN3. Todos los datos se presentaron como la media (\pm DE) de cinco experimentos independientes;

65 La Figura 13 muestra la comparación de los efectos citotóxicos de T15, T30, NBP-14 en células de CLL primarias. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y los datos se presentaron como la media (\pm DE) de diez experimentos independientes;

La Figura 14 muestra la comparación de los efectos antimigratorios de T15, T30 y péptidos NBP-14 sobre células B normales. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y los datos se presentaron como la media (\pm DE) de cinco experimentos independientes;

5 La Figura 15 muestra la comparación de los efectos de péptidos NBP-14 en células de CLL primarias y linfocitos B normales. Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado y los datos se presentaron como la media (\pm DE) de tres experimentos independientes;

10 La Figura 16 muestra la correlación entre la migración de referencia y el porcentaje de disminución en la migración inducida por NBP-14;

15 La Figura 17 muestra la cantidad de migración de referencia en una variedad de estirpes celulares en ausencia de NBP-14, que incluyen MDA-MB-231, células de CLL, células B normales, células MEC-1, J2N3, KG1a, MCF7 y H929; y

20 La Figura 18 muestra el porcentaje de disminución en la migración inducida por NBP-14 1 μ M en una variedad de estirpes celulares, que incluyen MDA-MB-231, células de CLL, células B normales, células MEC-1, J2N3, KG1a, MCF7 y H929.

Ejemplos

Razón fundamental

25 Los inventores han generado una serie de péptidos lineales y cíclicos basados en el terminal C de la acetilcolinesterasa conocidos como péptidos T15, T30 y NBP-14 y evaluaron sus efectos una serie de estirpes celulares y células de leucemia primaria derivadas de pacientes. Cabe señalar que la SEQ ID No: 3 se denomina en el presente documento "T14 ciclado", "CT14" o "NBP-14", y es un péptido cíclico con una secuencia de aminoácidos derivada del terminal C de la acetilcolinesterasa de cola.

30 Objetivos

1. Determinar el perfil citotóxico y citostático de NBP-14 en una gama de modelos de cáncer in vitro en humanos; y
2. Evaluar los efectos del NBP-14 en los linfocitos B y T normales.

35 Materiales y métodos

Ciclización de péptidos

40 Se utilizaron tres técnicas para lograr la ciclización de los péptidos lineales descritos en este documento, es decir, la ciclización de cadena lateral a cadena lateral, de cadena lateral a estructura principal y de cabeza a cola (terminal C a terminal N). La ciclización de cabeza a la cola se ha investigado ampliamente y puede implicar la ciclización con disulfuro de Cys-Cys dirigida (hasta dos por molécula). La monitorización cuidadosa de la reacción asegura un 100% de ciclización. Se utilizan dos enfoques generales para la síntesis: (1) ciclización clásica del péptido lineal en fase de solución en condiciones de alta dilución; y (2) ciclización basada en resina. Se emplearon dos protocolos distintos en la síntesis en fase sólida (1):

45 (a) Se llevó a cabo la ciclización en resina de un péptido anclado a través de un grupo funcional de cadena lateral, tal como imidazol, ácido 3, 4 amina' o alcohol. El péptido se protegió ortogonalmente como un éster en el terminal C, y el péptido luego se ensambló a través de la síntesis regular de Boc o Fmoc, seguido de saponificación, ciclización y división.

50 (b) Otro protocolo que se utilizó fue el enfoque de división de la ciclización, en el que el péptido cíclico se sintetizó mediante ciclización después de la síntesis de péptidos lineales en forma de etapas. Una de las ventajas de este método es que la cadena lateral no necesita estar anclada, lo que hace que el enfoque sea más general que (a). (Christopher J. White and Andrei K. Yudin (2011) Nature Chemistry 3; Valero et al (1999) J Peptide Res. 53, 76-67; Lihu Yang and Greg Morriello (1999) Tetrahedron Letters 40, 8197-8200; Parvesh Wadhvani et al (2006) J. Org. Chem. 71, 55-61).

60 Condiciones de cultivo de células KG1a, H929, MCF7, MDA-MB-231, MEC-1 y CLL primaria La estirpe celular KG1a de leucemia mieloide aguda (AML) se mantuvo en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 20% de suero de ternera fetal. La estirpe celular de mieloma múltiple (MM) H929, las dos estirpes celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231), las células MEC-1 y las células de leucemia linfocítica crónica primaria se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 10% de suero de ternera fetal. El medio utilizado contenía acetilcolina, pero después del conjunto inicial de experimentos, se agregaron 100 μ M adicionales de acetilcolina al medio de cultivo.

Posteriormente, las células se dividieron en alícuotas (10^6 células/ml) en placas de 24 pozos y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5% durante 72 h en presencia de los péptidos (T15, T30, NBP-14 y la combinación de T30+NBP-14) en concentraciones entre 0.1 nM y 1 μM . Adicionalmente, se llevaron a cabo cultivos de control a los que no se agregó péptido. Las células se recogieron posteriormente mediante centrifugación y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el ensayo de Anexina V o se contaron utilizando un contador de viabilidad celular Vi-Cell XR (Beckman Coulter).

Medición de la apoptosis in vitro

Las células cultivadas se recogieron mediante centrifugación y luego se resuspendieron en 195 μl de tampón rico en calcio. Posteriormente, se agregaron 5 μl de Anexina V (eBiosciences) a la suspensión celular y las células se incubaron en la oscuridad durante 10 minutos antes del lavado. Las células finalmente se resuspendieron en 190 μl de tampón rico en calcio junto con 10 μl de yoduro de propidio. La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo inmunofluorescente de doble color utilizando un citómetro de flujo Accuri C6 y los datos se analizaron utilizando el software CFlow (BD Biosciences).

Medición de la proliferación in vitro

Las células cultivadas se recogieron por centrifugación y luego se contaron utilizando un contador de viabilidad celular Vi-Cell XR. La cantidad de células viables en cada cultivo se expresó luego como un porcentaje de las células viables en los cultivos de control (sin péptido).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0 (Graphpad Software Inc.).

Ensayo de citotoxicidad in vitro

La sensibilidad del fármaco in vitro se midió utilizando el ensayo de Anexina V/yoduro de propidio. La comparación de los efectos de cada péptido solo o en combinación en las diversas estirpes celulares y células primarias se muestra a continuación.

Ejemplo 1 - T14 cíclico (es decir, "NBP-14")

La acetilcolinesterasa 'con cola' (T-AChE) se expresa en la sinapsis y los inventores han identificado previamente dos péptidos que podrían ser divididos de su terminal C, uno denominado "T14" (14 aminoácidos de longitud), dentro del otro que se conoce como "T30" (30 aminoácidos de longitud), y ambos tienen una fuerte homología de secuencia con la región comparable de β -amiloide.

La secuencia de aminoácidos del péptido lineal, T14, es AEFHRWSSYMHVHWK [SEQ ID No:3].

La secuencia de aminoácidos del péptido lineal, T30, es KAEFHRWSSYMHVHWKNQFDHYSKQDRCSL [SEQ ID No:2].

Otro péptido denominado "T15" corresponde a los últimos 15 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1, es decir, NQFDHYSKQDRCSL [SEQ ID No: 4].

El péptido terminal C "T14" de AChE se ha identificado como la parte saliente de la molécula de AChE responsable de su rango de acciones no hidrolíticas. El análogo de péptido sintético de 14 aminoácidos (es decir, "T14"), y posteriormente la secuencia de aminoácidos más grande, más estable y más potente en el que está incorporado (es decir, "T30") muestra acciones comparables a aquellas informadas para AChE 'no colinérgicas'.

Refiriéndose primero a la Figura 8A, se muestra el péptido T14 cíclico de 14 aminoácidos de longitud (es decir, "NBP-14"). El péptido cíclico, NBP-14, se ha ciclizado a través de los residuos de alanina (A) y Lisina (K) terminales, y se muestra en la Figura 8B. La ciclización se puede lograr por varios medios diferentes. Por ejemplo, Genosphere Biotechnologies (Francia) realizó la ciclización de T14 al transformar el péptido lineal en una lactama de terminal N a terminal C. La ciclización de T14 para crear NBP-14 cíclica une ambos extremos, es decir, HWK-AEF.

Ejemplo 2 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en las estirpes celulares MCF7 y MDA-MB-231

Los inventores examinaron la capacidad de los péptidos derivados de acetilcolinesterasa (NBP-14 y/o T30) para inducir apoptosis en las dos estirpes celulares de cáncer de mama, y los resultados se muestran en las Figuras 1A y 1B. Las células MCF7 mostraron evidencia de apoptosis a concentraciones de péptidos superiores a 0.1 μM . La estirpe celular MDA-MB-231 fue menos sensible a los efectos de los péptidos bajo las mismas condiciones.

Ejemplo 3 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en la estirpe celular KG1a AML

Las células KG1a se cultivaron con los péptidos durante 72 h y se evaluaron sus efectos apoptóticos, y los resultados se muestran en la Figura 2. Para comparación, las células KG1a también se cultivaron con Ara-C, un agente citotóxico comúnmente utilizado para el tratamiento de la AML. Los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa mostraron cierta toxicidad en las células KG1a, y Ara-C mostró una dosis-respuesta a concentraciones por encima de 0.1 μM .

Ejemplo 4 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa sobre las estirpes celulares B H929 y MEC-1

Los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa mostraron un efecto citotóxico pequeño en células H929 y células MEC-1, y los resultados se muestran en las Figuras 3A y 3B. El análogo de nucleósido fludarabina indujo una dosis-respuesta en ambas estirpes celulares.

Ejemplo 5 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en células de CLL primarias

Los inventores examinaron a continuación los efectos de los péptidos derivados de acetilcolinesterasa en células de CLL primarias derivadas de pacientes, y los resultados se muestran en las Figuras 4A y 4B. el NBP-14 mostró evidencia de dosis-respuesta en concentraciones por encima de 0.1 μM . El efecto sobre la viabilidad de las células de CLL primarias fue modesto (~20% de apoptosis a 1 μM). Los inventores a continuación compararon esta respuesta con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 no genotóxico (Rituximab). El rituximab indujo una dosis-respuesta más pronunciada a concentraciones utilizadas clínicamente del agente en comparación con el NBP-14.

Ejemplo 6 - El efecto apoptótico de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en los linfocitos B y T normales

Con el fin de evaluar los efectos de los péptidos derivados de acetilcolinesterasa sobre células normales (no malignas), se aislaron linfocitos B y T de voluntarios sanos normales (n=3). Los resultados se muestran en la Figura 5. Los péptidos probados mostraron una toxicidad moderada en los linfocitos B y T.

Ejemplo 7 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa sobre la proliferación de las estirpes celulares

Los inventores examinaron a continuación la capacidad de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa para inducir citostasia, es decir, para inhibir la proliferación en las diversas estirpes celulares empleadas en este estudio. Los resultados se muestran en las Figuras 6A y 6B. Las dos estirpes celulares de cáncer de mama mostraron respuestas diferenciales después de la incubación con los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa. La estirpe celular más proliferativa MDA-MB-231 mostró una reducción significativa en la proliferación con concentraciones de péptido NBP-14 por encima de 0.1 μM cuando se comparó con el péptido de control T15. Este efecto no fue tan significativo en la estirpe celular MCF7 menos proliferativa. Cabe destacar que la estirpe celular MDA-MB-231 mostró una proliferación incrementada en presencia de concentraciones sub-nanomolares de T30 y NBP-14+T30.

Haciendo referencia a la Figura 7A-C, la estirpe celular KG1a, la estirpe celular MEC-1 y la estirpe celular H929 mostraron una proliferación reducida después de la incubación con concentraciones de NBP-14 por encima de 0.1 μM . El efecto de Ara-C (células KG1a) y fludarabina (células MEC-1 y H929) se muestra para comparación.

Conclusiones

1. El NBP-14 mostró modestos efectos apoptóticos en cada una de las estirpes celulares analizadas a concentraciones >0.1 μM . Aunque las células MCF7 mostraron una sensibilidad relativamente mayor al NBP-14, no fue preferentemente citotóxica en estas células cuando se comparó con el péptido de control (T15) y el péptido tóxico (T30).

2. Ninguno de los péptidos analizados pareció mostrar efectos citotóxicos significativos en los linfocitos B y T normales.

3. El NBP-14 mostró una clara actividad antiproliferativa en la estirpe celular migratoria, células MDA-MB-231. También se observaron efectos similares en células KG1a, células MEC-1 y células H929 con concentraciones de péptido >0.1 μM . Los efectos antiproliferativos sobre células MCF7 fueron menos marcados, pero este es el crecimiento más lento de todas las estirpes celulares utilizadas en este estudio.

4. La falta de toxicidad, en células normales, de NBP-14 es alentadora.

5. Los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa que incluyen NBP-14 exhiben un efecto antimetastásico.

Con base en los hallazgos anteriores, los inventores han demostrado que los péptidos cíclicos derivados del terminal C de la acetilcolinesterasa de cola y, en particular, del NBP-14, es decir la SEQ ID No.3 se pueden utilizar para tratar

el cáncer y prevenir la metástasis. De acuerdo con lo anterior, estos péptidos cíclicos se pueden utilizar como un adyuvante para el tratamiento de tumores sólidos o metastásicos con quimioterapia/radioterapia. Esto significa que se requieren dosis y tiempos de exposición más bajos de quimioterapia y/o radioterapia.

5 Ejemplo 8 - Los efectos del NBP-14 sobre la migración en estirpes celulares de cáncer y muestras de CLL primaria

Los siguientes ensayos se realizaron con el fin de evaluar la potencial actividad antimigratoria (antimetastásica) del NBP-14 que se muestra en la Figura 8B:

10 1. Investigar los efectos del NBP-14 sobre la migración in vitro de KG1a (estirpe celular de leucemia mieloide aguda), JLN3 (estirpe celular de mieloma múltiple) y las estirpes celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7) utilizando ensayos transwell.

15 2. Investigar los efectos del NBP-14 sobre la migración in vitro de muestras de CLL primarias utilizando ensayos transwell.

3. Evaluar los efectos del NBP-14 sobre la migración de las células B normales.

20 Las células MDA-MB-231, KG1a y MEC-1 son estirpes celulares de cáncer altamente migratorias. JLN3, CLL y MCF-7 son estirpes celulares de cáncer menos migratorias. Los linfocitos B son células normales, no cancerosas.

Razón fundamental

25 Los ejemplos anteriores 1-7 indicaron que un péptido derivado de acetilcolinesterasa inhibía la actividad endocítica en una estirpe celular de cáncer de mama metastásico humano. Los siguientes ejemplos fueron diseñados para establecer si el péptido NBP-14 tenía el potencial de inhibir la migración de una serie de estirpes celulares y células de leucemia primaria derivadas de pacientes.

Objetivos

30 1. Determinar si el NBP-14 podría inhibir la migración de células tumorales en una variedad de modelos de cáncer in vitro en humanos.

35 2. Evaluar los efectos del NBP-14 sobre la migración de los linfocitos B normales.

Materiales y métodos

Condiciones de cultivo de KG1a, JLN3, MCF7, MDA-MB-231 y células de CLL primarias y células B normales

40 La estirpe celular de leucemia mieloide aguda (AML) KG1a se mantuvo en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 5% de suero de ternera fetal. La estirpe celular de mieloma múltiple (MM) JLN3, las dos estirpes celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231), las células de leucemia linfocítica crónica primaria y los linfocitos B normales se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 5% de suero de ternera fetal. Adicionalmente, se agregaron 100 µM de acetilcolina a los medios de cultivo para garantizar que la disponibilidad de acetilcolina no fuera un factor limitante en estos experimentos.

Ensayos de migración

50 Los ensayos de migración in vitro se realizaron utilizando 6.0 µm de placas de migración transwell de tamaño de poro (Costar, Corning, N.Y.). Se agregaron un total de 10⁶ células de CLL en 500 µl de medio RPMI a la cámara superior del inserto transwell. Se agregaron 100 ng/ml de CXCL12 a la cámara baso-lateral para todos los tipos de células probadas aparte de las células KG1a. Estas células no expresan CXCR4 y, por lo tanto, no responden a CXCL12. En su lugar, los medios que contenían un 10% de suero de ternera fetal se agregaron a la cámara baso-lateral en estos experimentos. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en CO₂ al 5% en presencia de los péptidos (T15, T30, NBP-14 y la combinación de T30+NBP-14) a concentraciones entre 0.1 nM y 10 µM. Adicionalmente, se llevaron a cabo cultivos de control a los que no se agregó péptido. Las células se recogieron posteriormente mediante centrifugación y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo Accuri C6 (BD). Ninguna de las condiciones probadas indujo una muerte celular significativa en los cultivos. La migración de las células de CLL se determinó al contar las células que migraron a la cámara inferior (baso-lateral) de la placa transwell y luego se expresó como un porcentaje de la cantidad total de células inicialmente agregada a la cámara superior (apical).

Análisis estadístico

65 Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0 (Graphpad Software Inc.).

Resultados

5 Se realizaron experimentos iniciales para determinar si el péptido derivado de la acetilcolinesterasa, NBP-14, alteraba la migración de una serie de estirpes celulares de cáncer de una manera dependiente de la dosis. Haciendo referencia a la Figura 9, las estirpes celulares probadas mostraron diferentes niveles de referencia de migración (sin controles peptídicos) pero tres de las cuatro estirpes celulares mostraron una disminución significativa en la migración cuando se cultivaron con NBP-14 a concentraciones de $\geq 1 \mu\text{M}$. Solo las células MCF7 no lograron mostrar una reducción significativa en la migración, pero estas células mostraron la menor capacidad migratoria bajo condiciones de control (sin péptido) en cualquier caso.

Ejemplo 9 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en las estirpes celulares MCF7 y MDA-MB-231

15 Los inventores examinaron a continuación la capacidad de $1 \mu\text{M}$ de los péptidos para inhibir la migración en las dos estirpes celulares de cáncer de mama en experimentos de transwell de 24 h. Haciendo referencia a la Figura 10, las células MCF7 tienen solo un potencial metastásico débil mientras que las células MDA-MB-231 son altamente metastásicas. De acuerdo con lo anterior, las células MCF7 mostraron menos migración a las 24 h en comparación con las células MDA-MB-231. El NBP-14 tuvo poco efecto sobre la migración de células MCF7 ($P=0.17$). En contraste, la migración de las células MDA-MB-231 se inhibió significativamente por el NBP-14 ($P<0.0001$). Ni el péptido T15 ni el péptido T30 mostraron un efecto significativo sobre la migración de las células MCF7, mientras que el péptido T30 $1 \mu\text{M}$ inhibió significativamente la migración de las células MDA-MB-231 ($P=0.03$). Adicionalmente, el péptido T30 fue significativamente menos efectivo en inhibir la migración que el NBP-14 ($P=0.0013$).

25 Ejemplo 10 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en la estirpe celular de leucemia mieloide aguda KG1a

30 Se cultivaron células KG1a con los péptidos durante 24 h y se evaluaron sus efectos sobre la migración. Haciendo referencia a la Figura 11, el NBP-14 ($1 \mu\text{M}$) inhibió significativamente la migración de las células KG1a cuando se comparó con los controles no tratados (sin péptido) ($P=0.0017$). En contraste, el cultivo de células KG1a con péptidos T15 y T30 no alteró su capacidad migratoria ($P=0.30$ y $P=0.14$ respectivamente).

Ejemplo 11 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa sobre la estirpe celular de mieloma múltiple JLN3

35 Haciendo referencia a la Figura 12, en concordancia con los datos de la estirpe celular MDA-MB-231, el péptido T15 no mostró un efecto significativo sobre la migración ($P=0.43$), mientras que T30 y NBP-14 inhibieron significativamente la migración de las células JLN3 ($P=0.05$ y $P=0.0001$ respectivamente). NBP-14 inhibió la migración en un grado significativamente mayor cuando se comparó con T30 ($P=0.0003$) y la combinación de NBP-14 y péptido T30 (ambos a $1 \mu\text{M}$) no alteró significativamente la migración de las células JLN3 cuando se comparó con NBP-14 solo bajo las condiciones probadas ($P=0.15$).

Ejemplo 12 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en células de CLL primarias

45 Los inventores examinaron a continuación los efectos de los péptidos sobre la actividad migratoria de las células de CLL primarias derivadas de 10 pacientes. Haciendo referencia a la Figura 13, hubo una considerable variación entre pacientes en la capacidad migratoria de las células de CLL probadas (rango 3.5%-12.4%) a las 24 h. El tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de péptidos T15 o T30 no alteró significativamente esto ($P=0.36$ y $P=0.11$ respectivamente), mientras que el NBP-14 indujo una reducción significativa en la migración ($P=0.0046$). La combinación de T30+NBP-14 no fue más efectiva para inhibir la migración de las células de CLL que el NBP-14 solo ($P=0.65$).

Ejemplo 11 - El efecto de los péptidos derivados de la acetilcolinesterasa en los linfocitos B normales

55 Con el fin de evaluar los efectos de los péptidos sobre células normales (no malignas), se aislaron linfocitos B de voluntarios sanos normales ($n=5$). Haciendo referencia a la Figura 14, el NBP-14 indujo una reducción significativa en la migración de células B normales ($P=0.037$) mientras que los péptidos T15 y T30 no tuvieron un efecto significativo ($P=0.43$ y $P=0.086$ respectivamente). La combinación de T30+NBP-14 no alteró significativamente la migración de las células B normales cuando se comparó con el NBP-14 solo ($P=0.57$).

60 Ejemplo 14 - Comparación de los efectos antimigratorios del NBP-14 en las células de CLL y en las células B normales

Haciendo referencia a la Figura 15, el NBP-14 inhibió significativamente la actividad migratoria de las células de CLL primarias y las células B normales. El análisis de la migración de referencia de células B normales y malignas no reveló diferencias significativas en el porcentaje de células migradas a las 24 h ($P=0.4$). A pesar de su potencial

migratorio inherente similar, las células de CLL primaria fueron significativamente más sensibles a los efectos antimigratorios del NBP-14 en comparación con las células B normales (P=0.0002).

Ejemplo 15 - Relación entre la migración de referencia y la respuesta al NBP-14

5 Los inventores graficaron el porcentaje del valor de referencia de migración promedio para cada una de las estirpes celulares y las células primarias probadas frente al porcentaje de reducción en la migración inducida por NBP-14 1 μ M. Haciendo referencia a la Figura 16, hubo una relación clara entre el nivel de migración de referencia y la respuesta antimigratoria a NBP-14; la migración de referencia alta se asoció con un mayor porcentaje de
10 disminución en la migración. La relación fue aún más fuerte cuando las células B normales se eliminaron del análisis.

Ejemplo 16 - Comparación de la migración de referencia entre varios tipos de células y antes de la exposición a NBP-14

15 Los inventores investigaron el porcentaje de migración de referencia (es decir, el control) para las diversas estirpes celulares bajo examen, y los resultados se muestran en la Figura 17.

Luego, estos valores de control se compararon en cada estirpe celular después de la exposición a NBP-14 1 μ M, y los resultados se muestran en la Figura 18. Como puede verse, para todos los tipos de células, hay una reducción significativa en la migración celular. En otras palabras, hay una clara reducción de la metástasis en todas las estirpes
20 celulares.

Conclusiones

25 1. El NBP-14 mostró efectos antimigratorios significativos en todas las estirpes celulares probadas, con la excepción de las células MCF7, que mostraron la migración de referencia más baja bajo condiciones de control (sin péptido); una observación que está de acuerdo con el bajo potencial metastásico conocido de estas células. El análisis de dosis-respuesta reveló que el NBP-14 fue efectivo para inhibir la migración a concentraciones de ≥ 1 μ M. Por lo tanto, todas las comparaciones posteriores con el péptido de control (T15) y el péptido tóxico (T30) se realizaron a 1 μ M.
30

2. Ninguno de los péptidos indujo efectos citotóxicos significativos en las estirpes celulares o en las células B malignas primarias y no malignas bajo las condiciones probadas. Por lo tanto, las reducciones en la migración observadas no fueron causadas por el aumento de la muerte celular en los cultivos.

35 3. La combinación del péptido tóxico (T30) con NBP-14 no tuvo un efecto significativo sobre la migración en comparación con el NBP-14 solo en ninguna de las estirpes celulares y células primarias evaluadas.

4. Las células de CLL primarias mostraron una heterogeneidad inicial en su capacidad migratoria. Sin embargo, el NBP-14 fue capaz de reducir significativamente la migración en estas células tumorales primarias.
40

5. Las células de CLL primaria eran más sensibles que las células B normales a los efectos antimigratorios del NBP-14. Esto sugiere que el NBP-14 tiene utilidad como agente terapéutico contra el cáncer, particularmente en aquellos tumores que son propensos a la metástasis.

45 6. Existe una reducción significativa en la migración celular o metástasis en todas las estirpes celulares que se probaron.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Neuro-Bio Ltd

<120> CANCER

55 <130> AXH/73830PCT1

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

60 <210> 1

<211> 614

<212> PRT

<213> Homo sapiens

65 <400> 1

ES 2 739 543 T3

Met Arg Pro Pro Gln Cys Leu Leu His Thr Pro Ser Leu Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Gly Gly Gly Val Gly Ala Glu
 20 25 30

Gly Arg Glu Asp Ala Glu Leu Leu Val Thr Val Arg Gly Gly Arg Leu
 35 40 45

Arg Gly Ile Arg Leu Lys Thr Pro Gly Gly Pro Val Ser Ala Phe Leu
 50 55 60

Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro Met Gly Pro Arg Arg Phe Leu Pro
 65 70 75 80

Pro Glu Pro Lys Gln Pro Trp Ser Gly Val Val Asp Ala Thr Thr Phe
 85 90 95

Gln Ser Val Cys Tyr Gln Tyr Val Asp Thr Leu Tyr Pro Gly Phe Glu
 100 105 110

Gly Thr Glu Met Trp Asn Pro Asn Arg Glu Leu Ser Glu Asp Cys Leu
 115 120 125

Tyr Leu Asn Val Trp Thr Pro Tyr Pro Arg Pro Thr Ser Pro Thr Pro
 130 135 140

Val Leu Val Trp Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Gly Ala Ser Ser
 145 150 155 160

Leu Asp Val Tyr Asp Gly Arg Phe Leu Val Gln Ala Glu Arg Thr Val
 165 170 175

ES 2 739 543 T3

Leu Val Ser Met Asn Tyr Arg Val Gly Ala Phe Gly Phe Leu Ala Leu
 180 185 190

Pro Gly Ser Arg Glu Ala Pro Gly Asn Val Gly Leu Leu Asp Gln Arg
 195 200 205

Leu Ala Leu Gln Trp Val Gln Glu Asn Val Ala Ala Phe Gly Gly Asp
 210 215 220

Pro Thr Ser Val Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Val
 225 230 235 240

Gly Met His Leu Leu Ser Pro Pro Ser Arg Gly Leu Phe His Arg Ala
 245 250 255

Val Leu Gln Ser Gly Ala Pro Asn Gly Pro Trp Ala Thr Val Gly Met
 260 265 270

Gly Glu Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gln Leu Ala His Leu Val Gly Cys
 275 280 285

Pro Pro Gly Gly Thr Gly Gly Asn Asp Thr Glu Leu Val Ala Cys Leu
 290 295 300

Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val Leu Val Asn His Glu Trp His Val Leu
 305 310 315 320

Pro Gln Glu Ser Val Phe Arg Phe Ser Phe Val Pro Val Val Asp Gly
 325 330 335

Asp Phe Leu Ser Asp Thr Pro Glu Ala Leu Ile Asn Ala Gly Asp Phe
 340 345 350

His Gly Leu Gln Val Leu Val Gly Val Val Lys Asp Glu Gly Ser Tyr
 355 360 365

Phe Leu Val Tyr Gly Ala Pro Gly Phe Ser Lys Asp Asn Glu Ser Leu
 370 375 380

Ile Ser Arg Ala Glu Phe Leu Ala Gly Val Arg Val Gly Val Pro Gln
 385 390 395 400

Val Ser Asp Leu Ala Ala Glu Ala Val Val Leu His Tyr Thr Asp Trp
 405 410 415

Leu His Pro Glu Asp Pro Ala Arg Leu Arg Glu Ala Leu Ser Asp Val
 420 425 430

ES 2 739 543 T3

Val Gly Asp His Asn Val Val Cys Pro Val Ala Gln Leu Ala Gly Arg
 435 440 445

Leu Ala Ala Gln Gly Ala Arg Val Tyr Ala Tyr Val Phe Glu His Arg
 450 455 460

Ala Ser Thr Leu Ser Trp Pro Leu Trp Met Gly Val Pro His Gly Tyr
 465 470 475 480

Glu Ile Glu Phe Ile Phe Gly Ile Pro Leu Asp Pro Ser Arg Asn Tyr
 485 490 495

Thr Ala Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gln Arg Leu Met Arg Tyr Trp Ala
 500 505 510

Asn Phe Ala Arg Thr Gly Asp Pro Asn Glu Pro Arg Asp Pro Lys Ala
 515 520 525

Pro Gln Trp Pro Pro Tyr Thr Ala Gly Ala Gln Gln Tyr Val Ser Leu
 530 535 540

Asp Leu Arg Pro Leu Glu Val Arg Arg Gly Leu Arg Ala Gln Ala Cys
 545 550 555 560

Ala Phe Trp Asn Arg Phe Leu Pro Lys Leu Leu Ser Ala Thr Asp Thr
 565 570 575

Leu Asp Glu Ala Glu Arg Gln Trp Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser
 580 585 590

Ser Tyr Met Val His Trp Lys Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln
 595 600 605

Asp Arg Cys Ser Asp Leu
 610

<210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Asn
 1 5 10 15

Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu
 20 25 30

10

<210> 3
 <211> 14

ES 2 739 543 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> NBP-14, un péptido derivado del terminal C de los residuos de acetilcolinesterasa con Alanina (A) y Lisina (K) terminal requeridos para la ciclización

<400> 3

Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys
1 5 10

10 <210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 4

Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido cíclico de la SEQ ID No: 3, o un derivado o análogo del mismo que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, para uso en el tratamiento, mejora o prevención del cáncer o enfermedad metastásica.
2. Un polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es leucemia.
- 10 3. Un polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el cáncer es leucemia linfocítica, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielóide, o leucemia mielóide aguda.
- 15 4. Un polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es mieloma múltiple o cáncer de mama.
5. Un polipéptido cíclico, derivado o análogo del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento, mejora o prevención de enfermedad metastásica.
- 20 6. Una composición farmacéutica contra el cáncer o antimetastásica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido cíclico de la SEQ ID No: 3, o un derivado o análogo del mismo que tiene por lo menos 70% de identidad con la SEQ ID No: 3, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Un proceso para elaborar la composición farmacéutica contra el cáncer o antimetastásica de acuerdo con la reivindicación 6, el proceso comprende combinar una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido cíclico de la SEQ ID No: 3, o un derivado o análogo del mismo que tiene por lo menos 70% de identidad con la SEQ ID No: 3, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1A

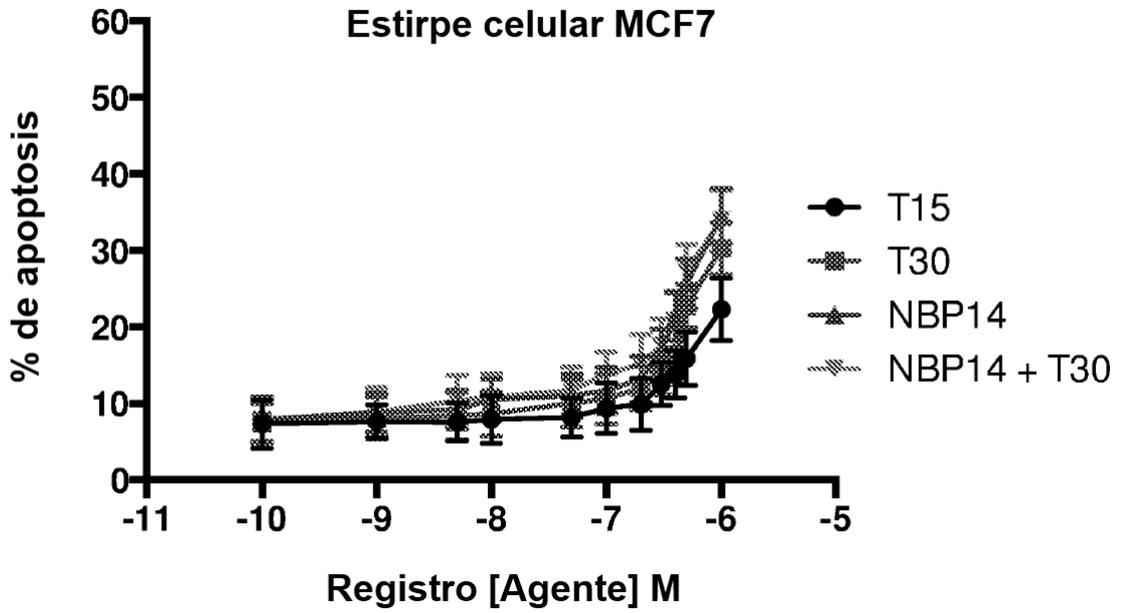


Figura 1B

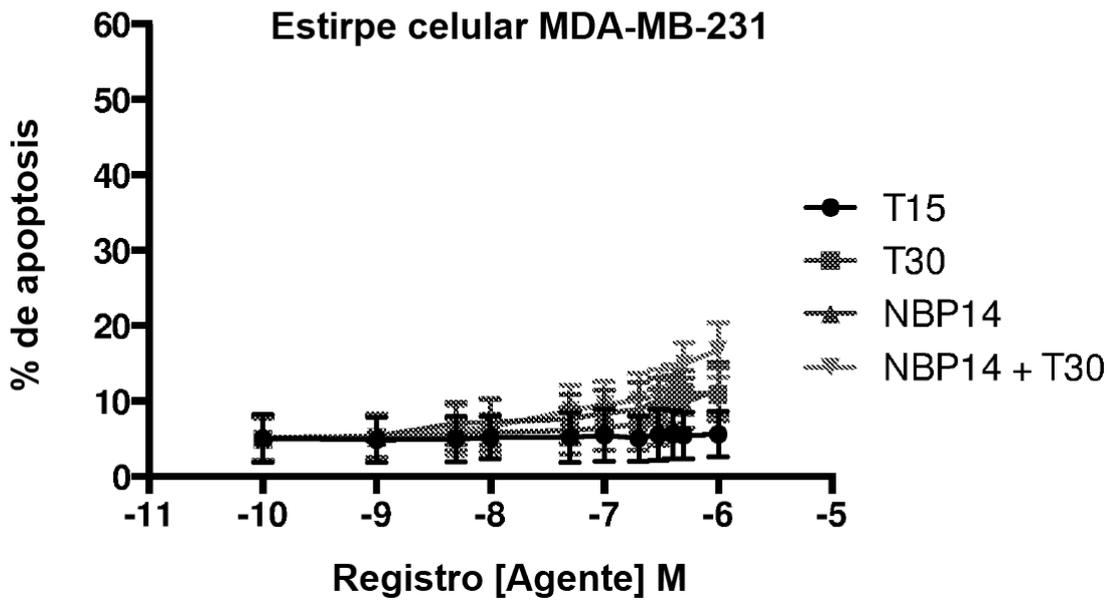


Figura 2

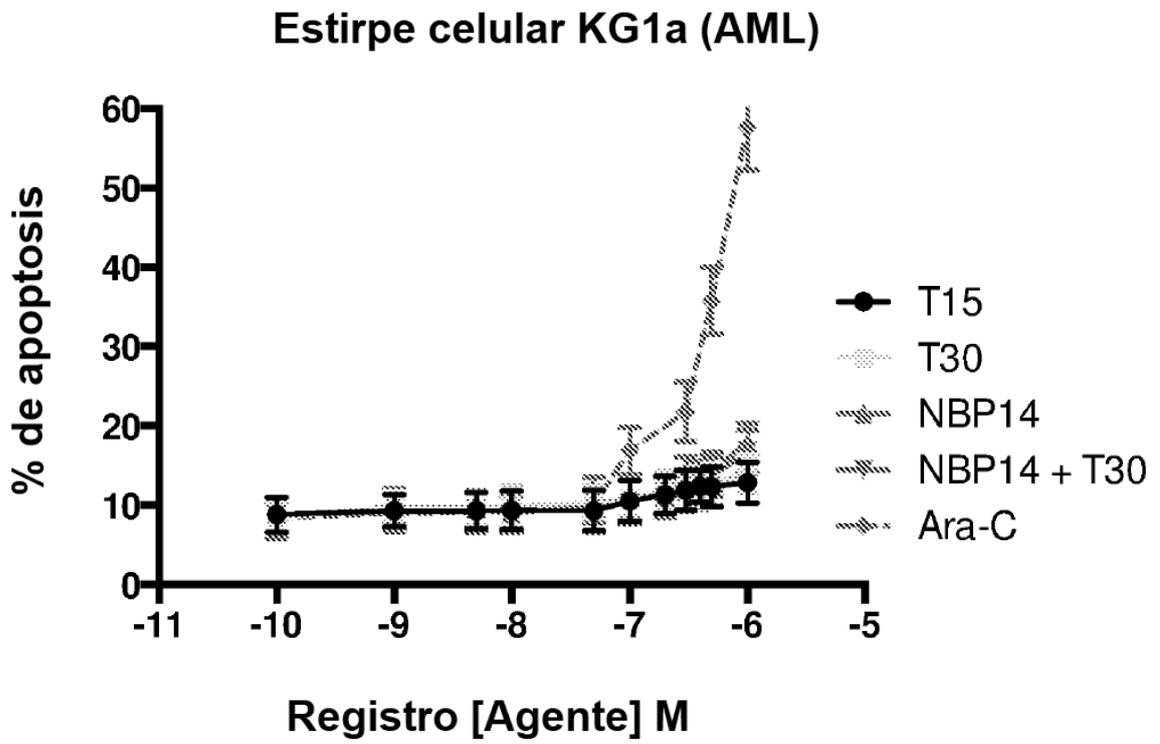


Figura 3A

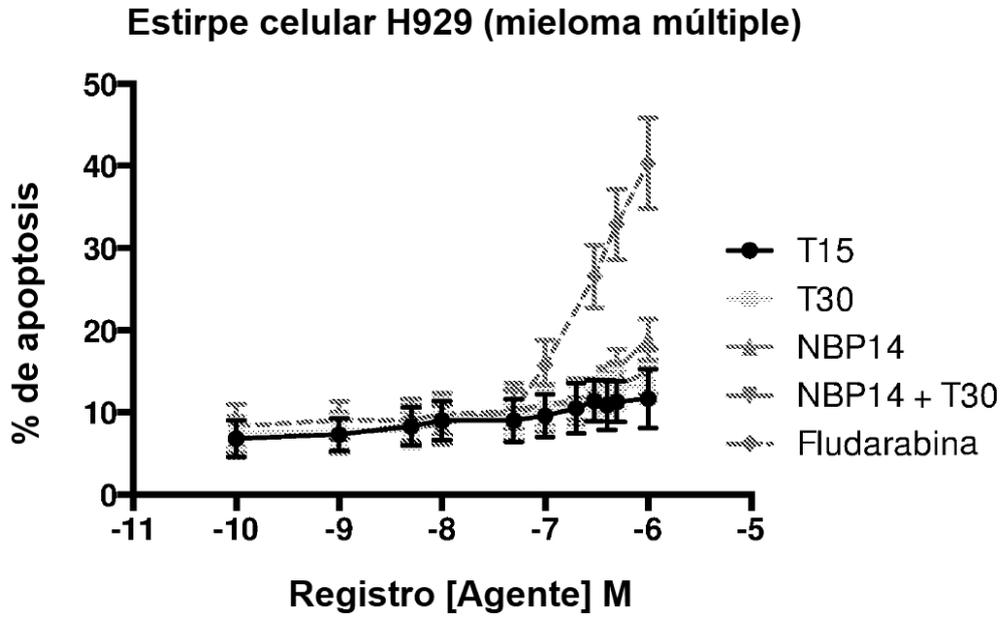


Figura 3B

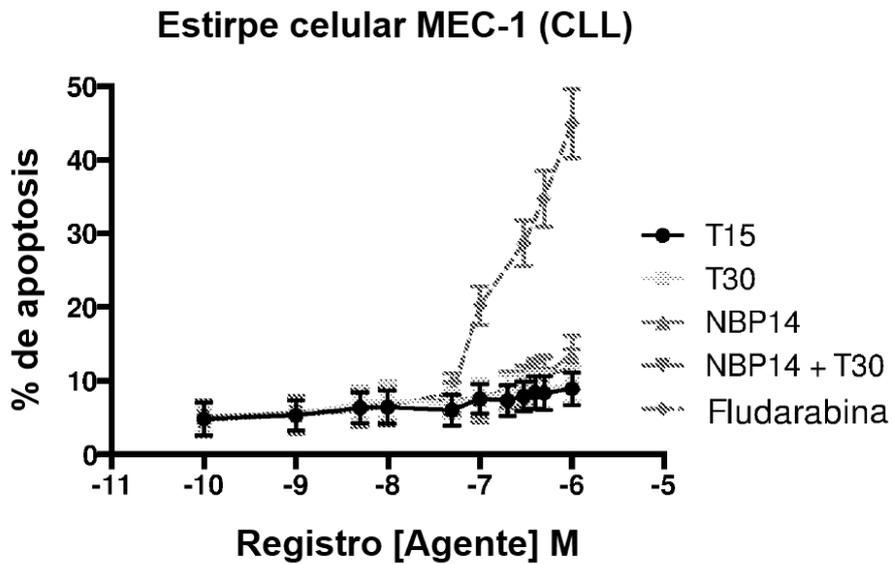


Figura 4A

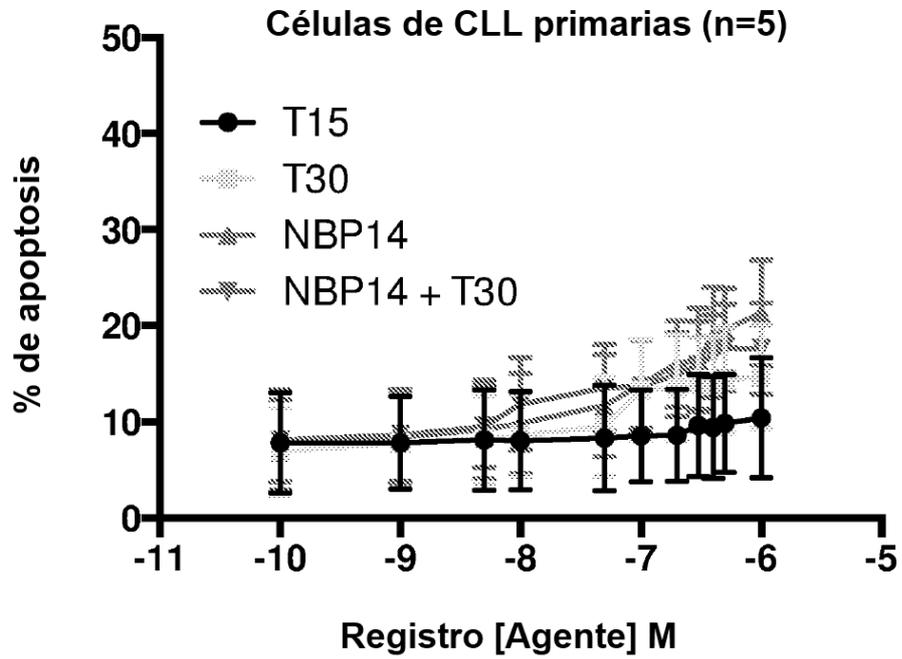


Figura 4B

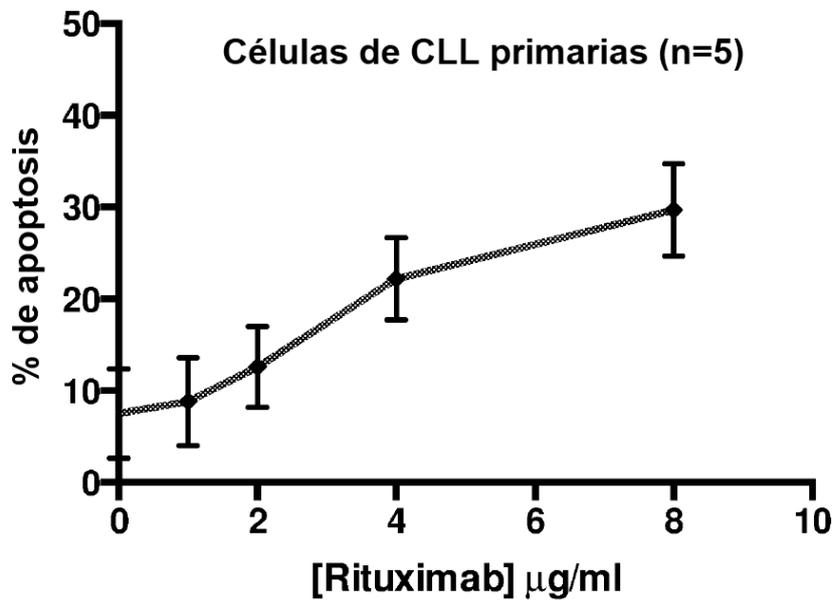


Figura 5

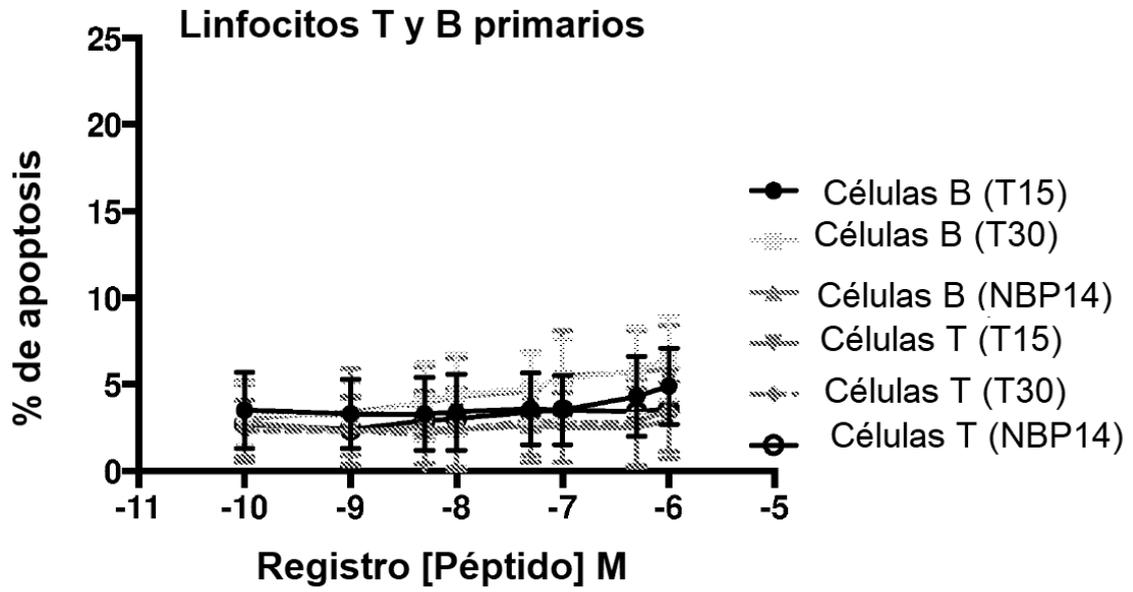


Figura 6A

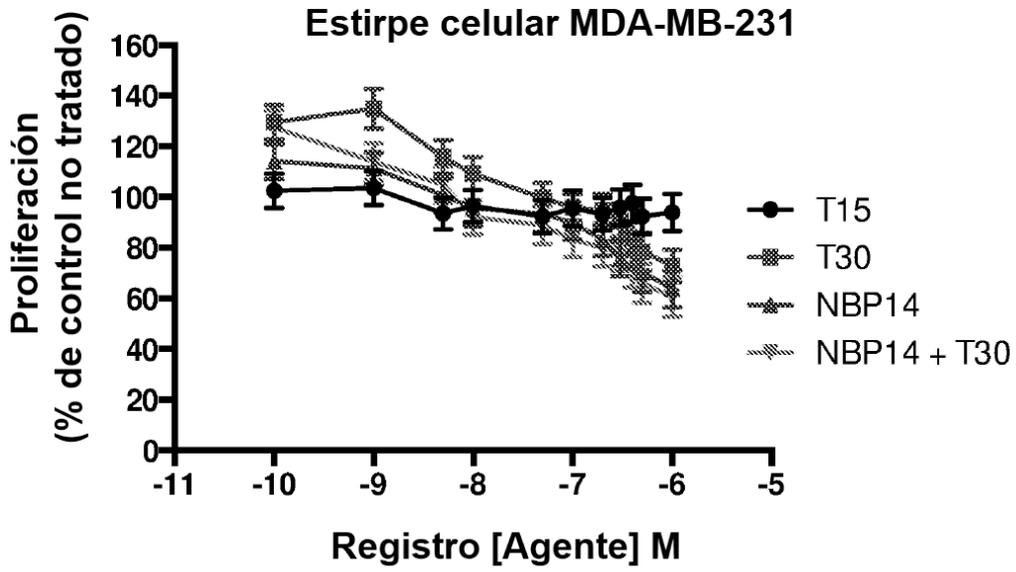


Figura6B

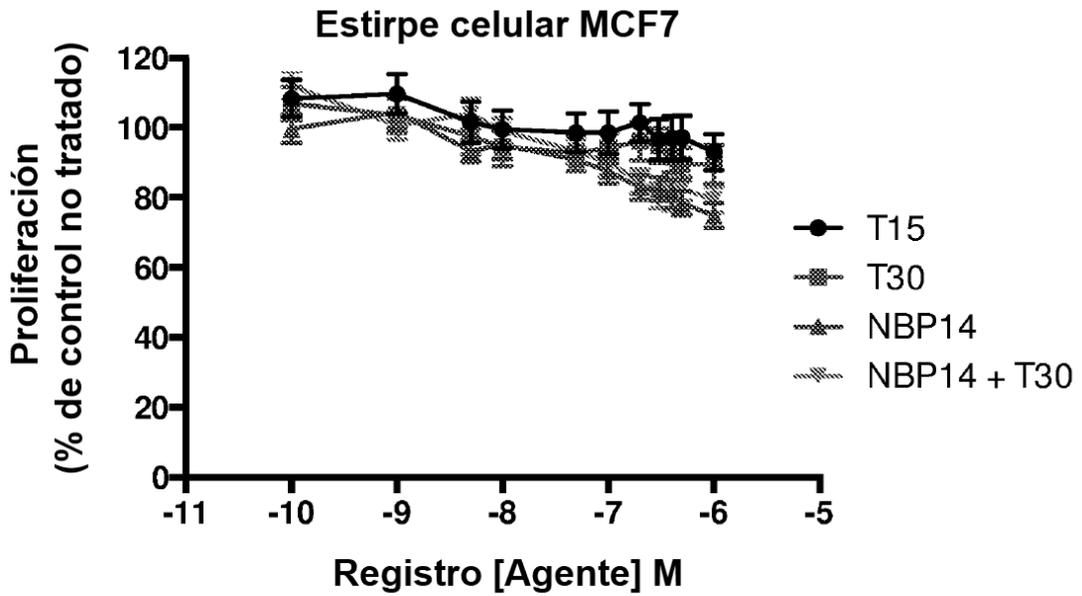


Figura 7A

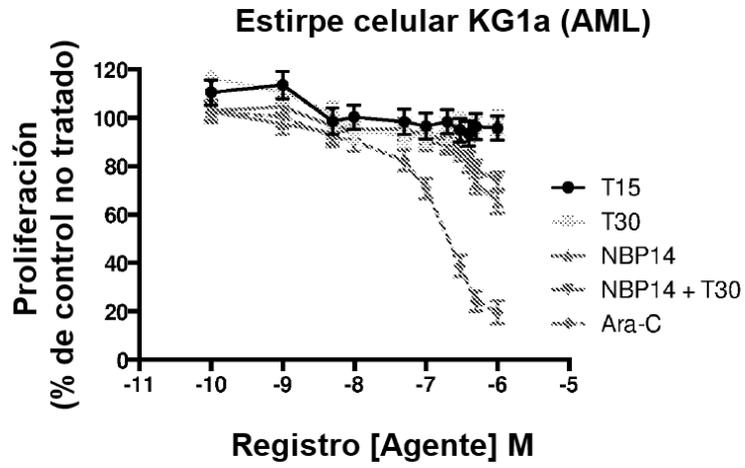


Figura 7B

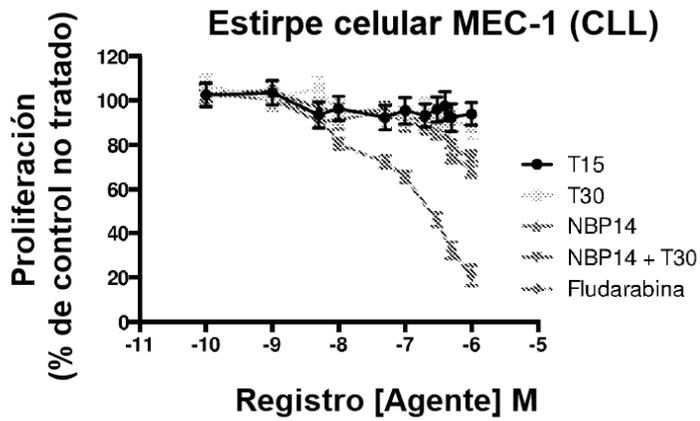


Figura 7C

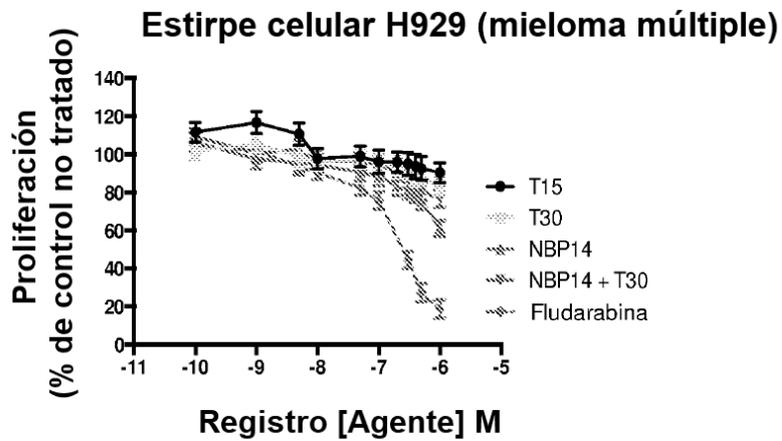


Figura 8A

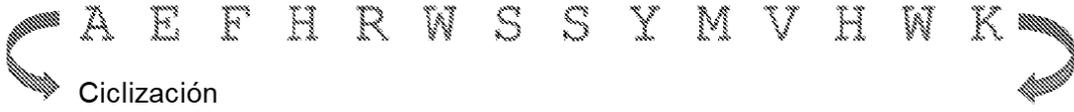


Figura 8B

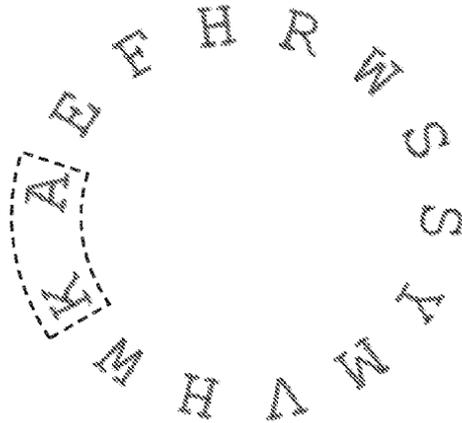


Figura 9

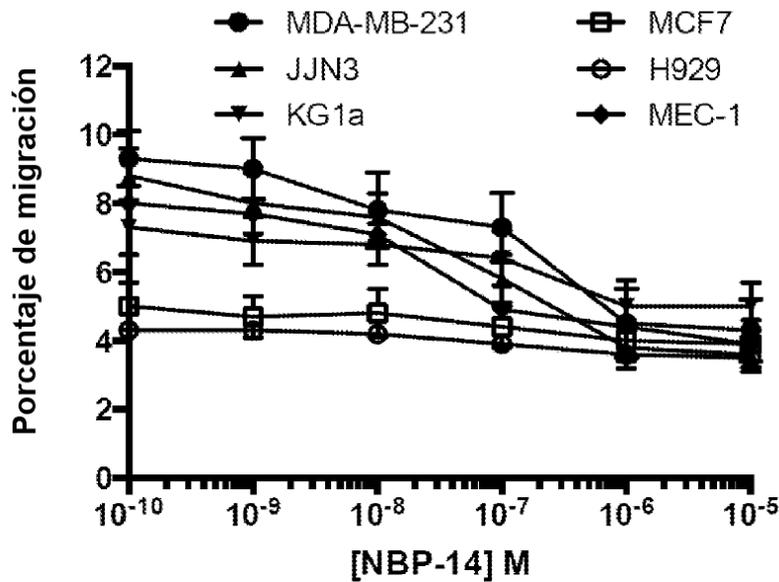


Figura 10A

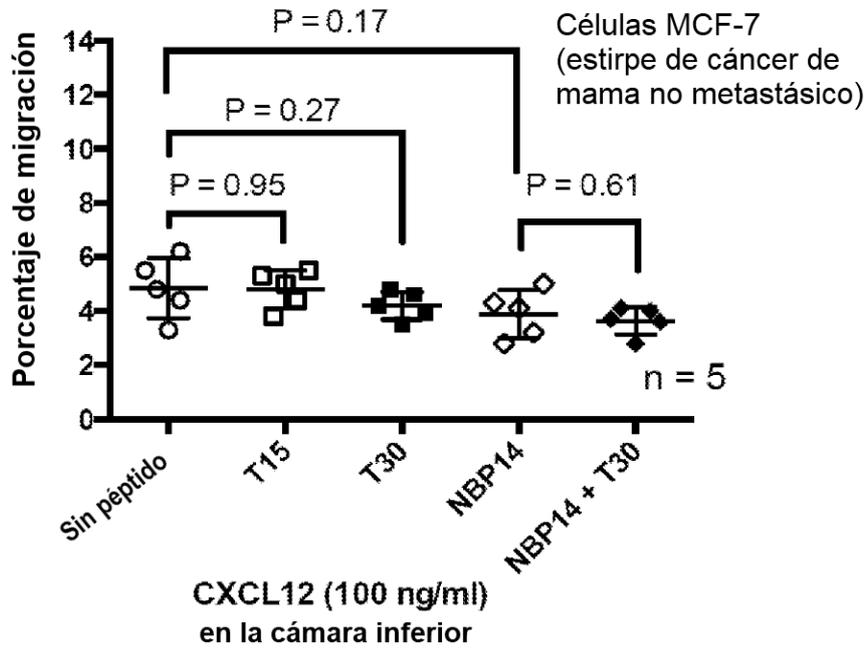


Figura 10B

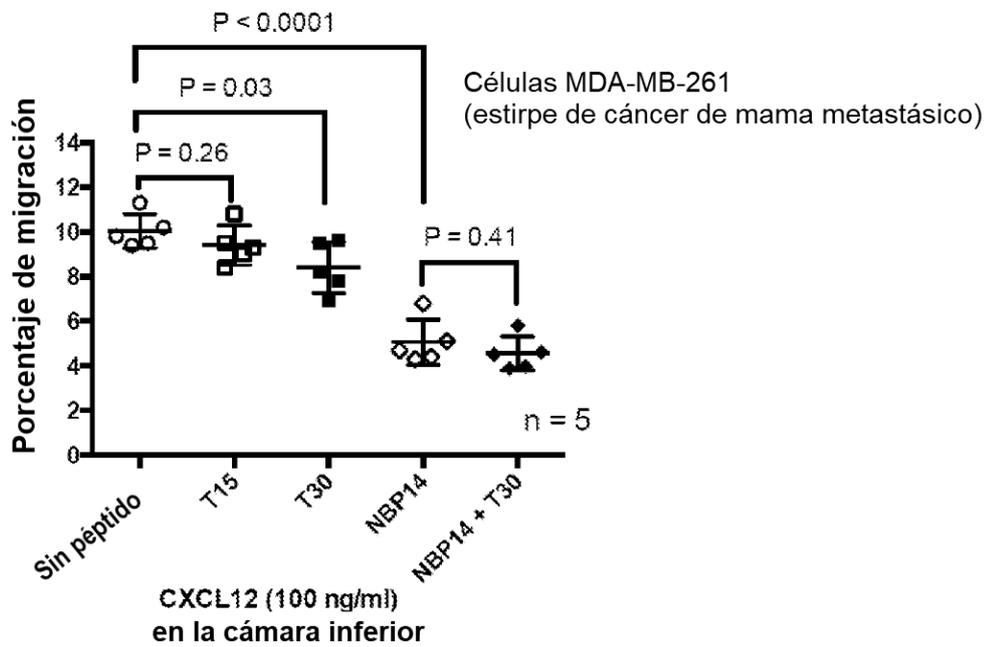


Figura 11

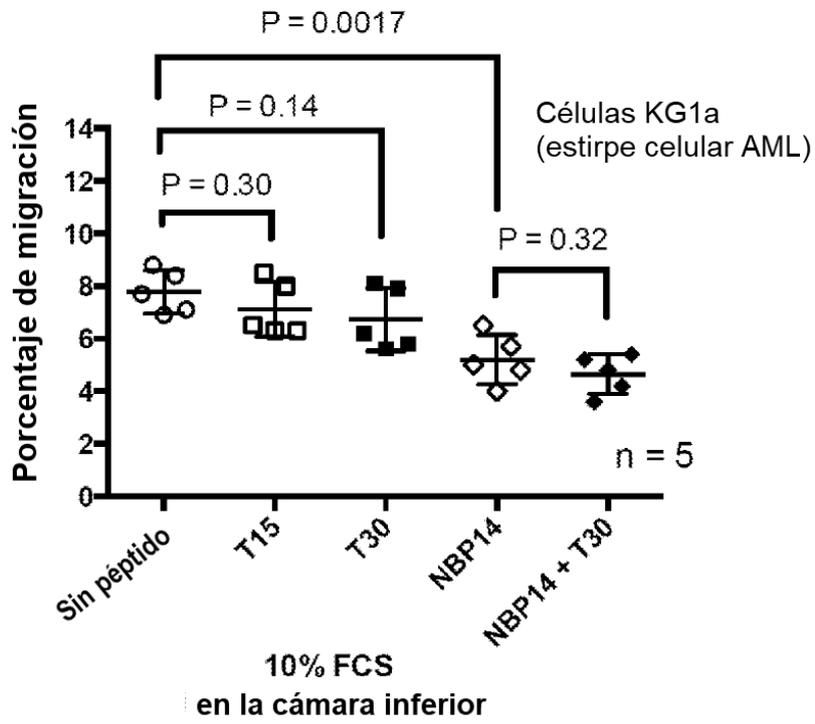


Figura 12

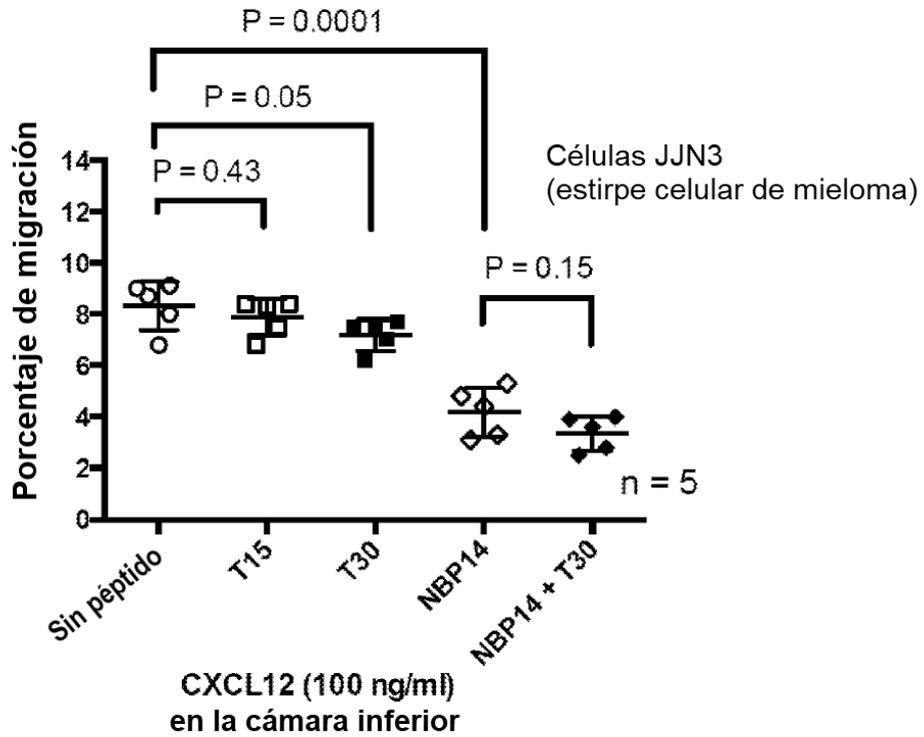


Figura 13

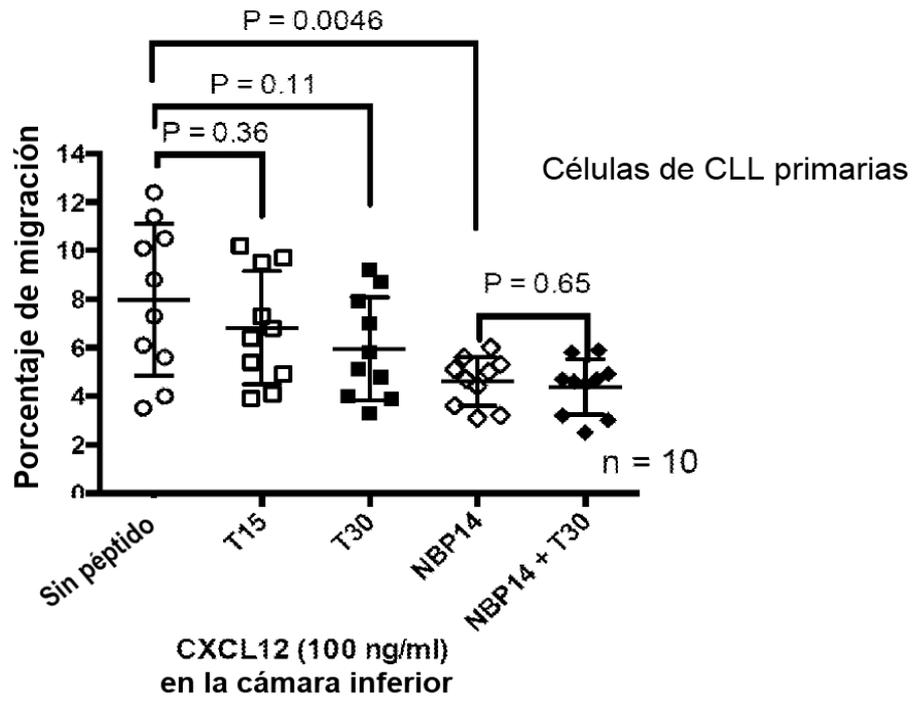


Figura 14

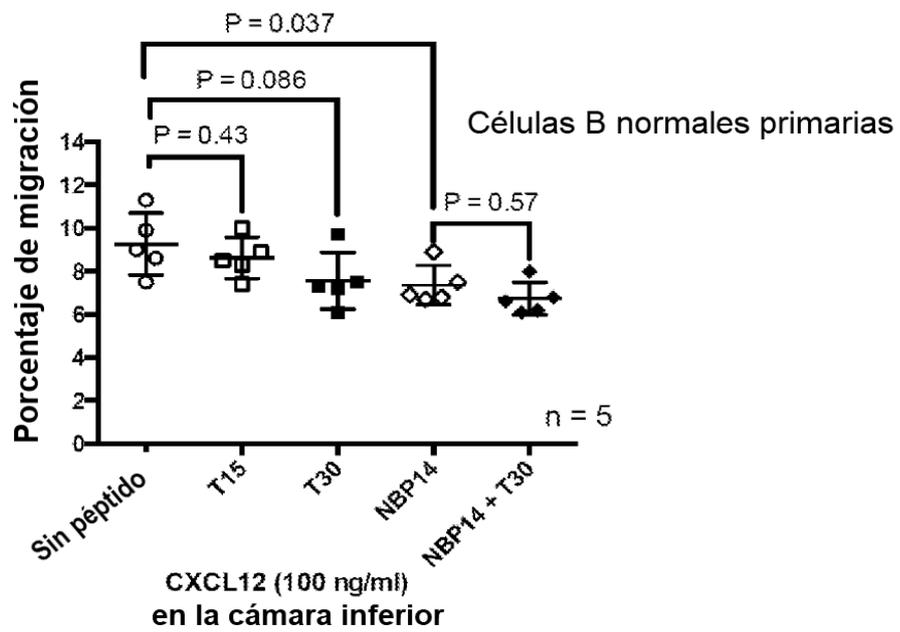


Figura 15

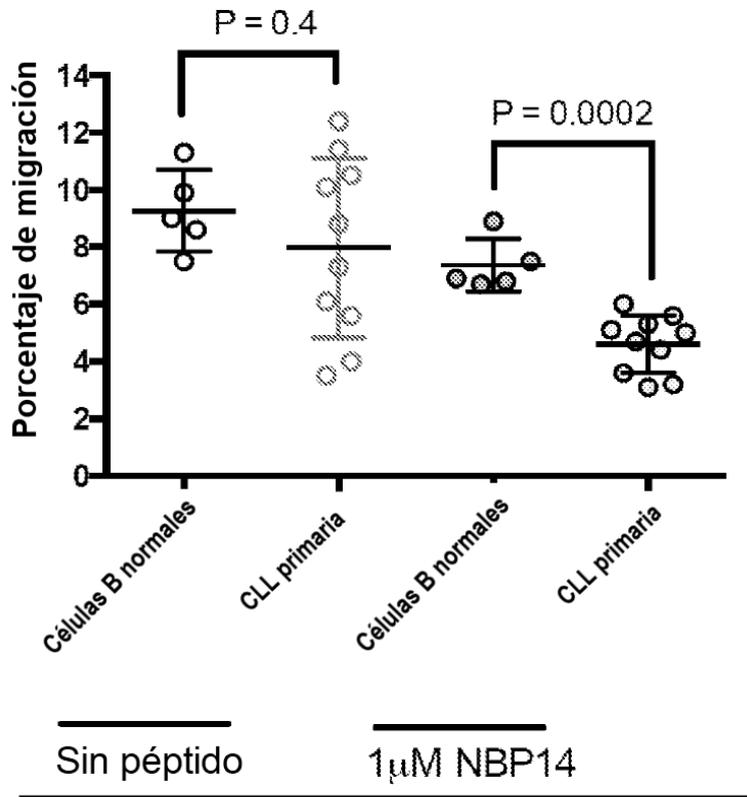


Figura 16

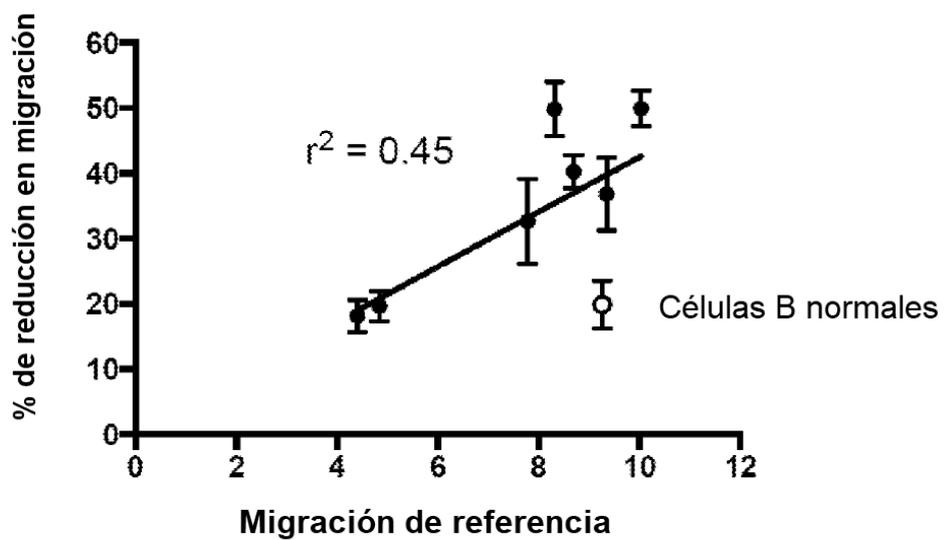


Figura 17

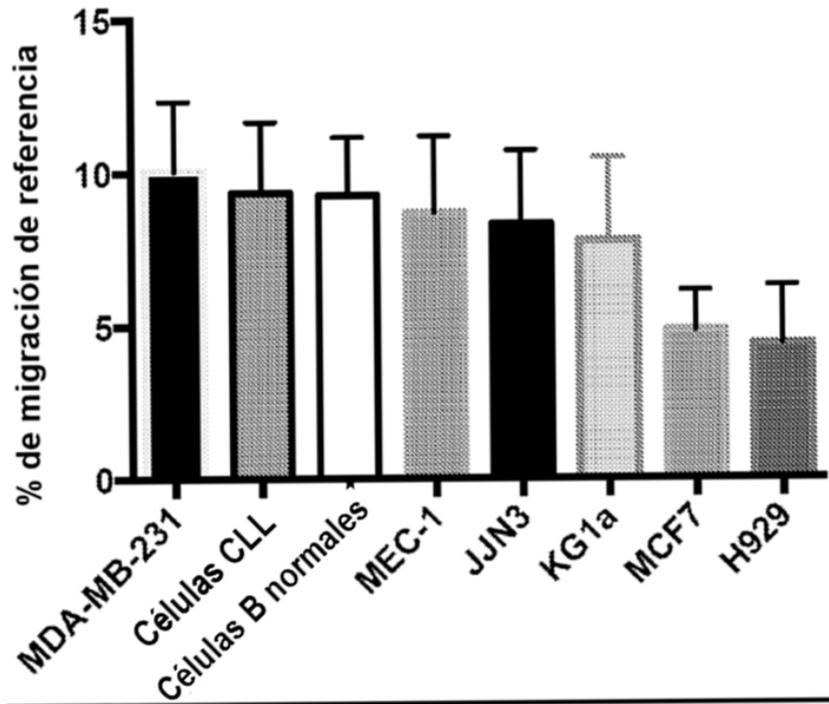


Figura 18

