(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 748 937**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2012 PCT/EP2012/076968**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098337**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2012 E 12813376 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2797616**

(54) Título: **Péptidos penetrantes en las células**

(30) Prioridad:

27.12.2011 EP 11306784

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

(73) Titular/es:

SORBONNE UNIVERSITÉ (50.0%)
21 rue de l'École de Médecine
75006 Paris, FR y
INSTITUT CURIE (50.0%)

(72) Inventor/es:

REBOLLO GARCIA, ANGELITA;
NEMATI, FARIBA;
DECAUDIN, DIDIER;
BRAVO SICILIA, JERONIMO y
FOMINAYA GUTIERREZ, JESUS MARIA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 748 937 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos penetrantes en las células

Campo de la invención

La invención se refiere a péptidos lanzadera que penetran en la membrana celular.

Antecedentes de la invención

La apoptosis es una muerte celular genéticamente programada y su desregulación está asociada, entre otras patologías, al cáncer. Si bien se sabe que la apoptosis depende de los miembros de la familia Bcl-2 y las caspasas, los datos recientes están sugiriendo que las dos familias principales de serina/treonina fosfatasas, PP1 y PP2A son factores clave involucrados en la generación o bien de vida celular o bien de muerte celular. La Ser/Thre fosfatasa PP2A ha sido implicada tanto en la inducción como en la prevención de la apoptosis, lo que sugiere una interacción compleja de las acciones de la fosfatasa. Varias fosfatasas se han convertido recientemente en objetivos atractivos para el tratamiento de diversas enfermedades, incluidos los cánceres. Sin embargo, los únicos fármacos clínicos que reconocen a las fosfatasas son la ciclosporina inmunosupresora A y FK506.

Los péptidos penetrantes de células (CPP) son moléculas que pueden translocarse en las células sin causar daño a la membrana, lo que lleva a su uso propuesto como vectores para administrar carga terapéutica. Se han identificado varios CPP, tales como Tat, antennapedia o SHV1 VP22. Estos péptidos pueden atravesar la membrana celular y alcanzar el citoplasma y/o el núcleo. Se diseñaron péptidos penetrantes que interactúan con proteínas PP1/PP2A. Este enfoque, denominado "Tecnología de la Fosfatasa Farmacéutica" (DPT, por sus siglas en inglés) se ha descrito en Guergnon et al, 2006 y en las solicitudes de patentes internacionales WO2003/011898 y WO2004/011595. Un péptido proapoptótico, llamado DPT-C9h, que desregula específicamente la interacción entre la caspasa-9 y PP2A, utiliza esta secuencia penetrante (solicitud de patente internacional WO2010/112471).

Sin embargo, este péptido muestra una vida media corta; un verdadero inconveniente para sus usos clínicos.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los presentes péptidos mutados superan este problema ya que no son digeridos por las proteasas séricas humanas. Esta nueva propiedad permite reducir la dosis de péptido inyectado, así como el programa de administración.

La invención proporciona un péptido que consiste en los aminoácidos VKKKKIKAEIKI (SEC ID N.º: 2).

La presente descripción proporciona un péptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (I):

X1-KKKIK-**Ψ**-EI-X_2-X_3(I) (SEQ ID NO:1)

donde X_1 no existe, es un residuo de lisina, o valina-lisina;

X_2 no existe, es un residuo de lisina o lisina-isoleucina;

X_3 no existe o es una secuencia de aminoácidos de 1 a 4 aminoácidos;

y Ψ es un residuo de aminoácidos que es diferente de la arginina,

o un péptido resistente a la proteólisis derivado de la secuencia (I) mediante una o más modificaciones químicas, o un péptido sustancialmente homólogo derivado de la secuencia (I) mediante una o más sustituciones conservadoras.

La invención proporciona además un vector que comprende el péptido de la invención como un péptido penetrante de las células, acoplado a una molécula de interés.

La invención proporciona además una construcción de un péptido quimérico, que comprende dicho péptido, tal como un péptido penetrante de las células, fusionado a un péptido proapoptótico, en el que el péptido penetrante se fusiona preferiblemente en el extremo N del péptido proapoptótico.

Otro aspecto de la invención es un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el péptido penetrante de las células o la construcción del péptido quimérico.

Otro aspecto más de la invención es un vector que comprende un ácido nucleico que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido penetrante de las células acoplado a (ii) una secuencia de nucleótidos de interés para su uso en terapia génica o transferencia génica in vivo o ex vivo.

Se contempla además el uso de la construcción del péptido quimérico, o de un ácido nucleico que codifica dicha construcción de péptido quimérico, para la inhibición de la proliferación celular in vitro.

Un objeto más de la invención es una composición farmacéutica que comprende dicho vector o un péptido quimérico como se describe en este documento, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además al uso de los péptidos quiméricos o la composición farmacéutica según la invención para tratar enfermedades hiperproliferativas.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han trabajado para mejorar la estabilidad de los péptidos descritos en el documento WO2010/112471, en particular el péptido DPT-C9h que está sujeto a degradación por las proteasas. Este péptido corresponde a un péptido penetrante asociado a la secuencia del sitio de unión de la caspasa-9 a PP2A. Este péptido induce la apoptosis en las líneas celulares humanas. Además, tiene un efecto apoptótico específico solo en células B tumorales aisladas de pacientes con leucemia linfocítica crónica sin efecto en las células sanas. Además, el péptido induce una reducción importante en el tamaño del tumor cuando se inyecta en ratones con xenoinjertos de cáncer de mama humano.

DPT-C9 consiste en la secuencia VKKKKIK**R**EIKI-YVETLDDIFEQWAHSEDL (SEQ ID NO: 6), donde VKKKKIKREIKI (SEQ ID NO: 7) es el péptido penetrante.

Los inventores han demostrado que una mutación en el péptido penetrante aumenta drásticamente la estabilidad de todo el péptido, al tiempo que mantiene sus propiedades, en particular su capacidad para inducir la apoptosis.

Según la invención, una mutación del residuo de arginina en el péptido penetrante evita la escisión de las proteasas.

Los inventores han diseñado de este modo péptidos que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos (I):

X1-KKKIK-**Ψ**-EI-X_2-X_3(I) (SEQ ID NO:1)

donde X_1 no existe, es un residuo de lisina, o valina-lisina;

X_2 no existe, es un residuo de lisina o lisina-isoleucina;

X_3 no existe o es una secuencia de aminoácidos de 1 a 4 aminoácidos;

y Ψ es un residuo de aminoácidos que es diferente de la arginina,

En una realización preferida, Ψ es A, K o N. Aún más preferiblemente, Ψ es no conservativo con respecto a la arginina. En una realización preferida, Ψ es, por lo tanto, un residuo de aminoácido diferente de lisina, asparagina o glutamina. Preferiblemente Ψ es alanina.

En una realización preferida,

X_1 es valina-lisina;

X_2 es lisina-isoleucina;

y X_3 no existe.

El péptido de la invención es VKKKKIK**A**EIKI (SEQ ID NO: 2).

Otro péptido descrito en este documento es VKKKKIK**K**EIKI (SEQ ID NO: 10).

Todavía otro péptido descrito en este documento es VKKKKIK**N**EIKI (SEQ ID NO: 11).

Definiciones:

El término "paciente" se refiere a un animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero, que incluye hombres, mujeres, adultos y niños que necesitan un tratamiento en el que se desea un efecto pro-apoptótico.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o "terapia" incluye a los tratamientos curativos y/o profilácticos. Más particularmente, el tratamiento curativo se refiere a cualquiera entre el alivio, la mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (por ejemplo, que no progrese a etapas más avanzadas) de un síntoma, así como el retraso en la progresión de un síntoma de un particular trastorno.

El tratamiento profiláctico se refiere a cualquiera de: detener el inicio, reducir el riesgo de desarrollo, reducir la incidencia, retrasar el inicio, reducir el desarrollo, así como aumentar el tiempo de aparición de los síntomas de un trastorno en particular.

La expresión "péptido penetrante" o "péptido penetrante de células" (o "CPP") o "péptido lanzadera", usado indistintamente, significa que el péptido puede translocarse en las células sin causar ningún daño sustancial de la

membrana, y puede usarse como un vector de otras moléculas cuando está unido a ellas. Los términos se refieren a péptidos catiónicos penetrantes de células, también llamados péptidos de transporte, péptidos portadores o dominios de transducción de péptidos. El CPP, como se muestra en este documento, tiene la capacidad de inducir la penetración celular de un péptido fusionado con el CPP en el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de las células de una población dada de un cultivo celular, incluidos todos los número enteros intermedios, y permitir la translocación macromolecular dentro de múltiples tejidos in vivo tras su administración sistémica. Un péptido que penetra en las células también puede referirse a un péptido que, cuando se pone en contacto con una célula en condiciones apropiadas, pasa desde el entorno externo al entorno intracelular, incluido el citoplasma, orgánulos como las mitocondrias o el núcleo de la célula en condiciones significativamente mayores que la difusión pasiva. Esta propiedad puede evaluarse mediante varios métodos conocidos por los expertos.

Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas", "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando uno o más residuos de aminoácidos se reemplazan por un residuo biológicamente similar o cuando más del 80% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente 90%, preferiblemente más de aproximadamente 95% es similar (funcionalmente idéntico). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los programas conocidos en la técnica (BLAST, FASTA, etc.). Preferiblemente, estos péptidos homólogos no incluyen dos residuos de cisteína, por lo que se evita la ciclación.

La expresión "sustitución conservadora", como se usa en el presente documento, denota el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro, sin alterar la conformación y función general del péptido, que incluye, entre otros, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, acidez, basicidad, forma, carácter hidrofóbico, aromático, etc.). Los aminoácidos con propiedades similares son comunes en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos hidrofílicos básicos y pueden ser intercambiables. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede reemplazarse con leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrofílicos neutros, que pueden sustituirse entre sí, incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina.

Por "sustituido" o "modificado", la presente invención incluye aquellos aminoácidos que han sido alterados o modificados a partir de aminoácidos naturales.

En este sentido, debe entenderse que, en el contexto de la presente invención, una sustitución conservadora se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. En la tabla 1 a continuación se exponen ejemplos de sustituciones conservadoras:

Tabla 1. Sustituciones conservadoras I

CARACTERÍSTICAS DE LA CADENA LATERAL	AMINOÁCIDO
No polar	G A P I L V
Polar sin carga	C S T M N Q
Cargado polar	D E K R
Aromático	H F W Y
Otros	N Q D E

Como alternativa, los aminoácidos conservadores se pueden agrupar como se describe en Lehninger, 1975, como se establece en la Tabla 2, inmediatamente a continuación.

Tabla 2. Sustituciones conservadoras II

CARACTERÍSTICAS DE LA CADENA LATERAL	AMINOÁCIDO
No polar (hidrófobo)	
A. Alifático:	A L I V P
B. Aromático:	F W
C. Que contiene azufre:	M
D. Límite:	G

No cargado-polar	
A. Hidroxilo:	S T Y
B. Amidas:	N Q
C. Sulfhidrilo:	C
D. Límite:	G
Cargado positivamente (básica):	K R H
Cargado negativamente (ácido):	D E

Como otra alternativa más, las sustituciones conservadoras ejemplares se exponen en la Tabla 3, inmediatamente debajo.

Tabla 3. Sustituciones conservadoras III

Residuo original	Sustitución ejemplar
Ala (A)	Val (V), Leu (L), Ile (I)
Arg (R)	Lys (K), Gln (Q), Asn (N)
Asn (N)	Gln (Q), His (H), Lys (K), Arg (R)
Asp (D)	Glu (E)
Cys (C)	Ser (S)
Gln (Q)	Asn (N)
Glu (E)	Asp (D)
His (H)	Asn (N), Gln (Q), Lys (K), Arg (R)
Ile (I)	Leu (L), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Leu (L)	Ile (I), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Lys (K)	Arg (R), Gln (Q), Asn (N)
Met (M)	Leu (L), Phe (F), Ile (I)
Phe (F)	Leu (L), Val (V), Ile (I), Ala (A)
Pro (P)	Gly (G)
Ser (S)	Thr (T)
Thr (T)	Ser (S)
Trp (W)	Tyr (T)
Tyr (Y)	Trp (W), Phe (F), Thr (T), Ser (S)
Val (V)	Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Ala (A)

Preparación de péptidos:

Los péptidos descritos en el presente documento pueden sintetizarse usando métodos sintéticos estándar conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo síntesis química o recombinación genética. En una realización preferida, los péptidos se obtienen por condensación gradual de residuos de aminoácidos, ya sea por condensación de un fragmento preformado que ya contiene una secuencia de aminoácidos en el orden apropiado, como por

condensación de varios fragmentos previamente preparados, mientras se protegen los grupos funcionales de aminoácidos, excepto aquellos involucrados en el enlace peptídico durante la condensación. En particular, los péptidos pueden sintetizarse de acuerdo con el método descrito originalmente por Merrifield.

Ejemplos de tecnologías de síntesis química son la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. Como una síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C del péptido a sintetizar está unido a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y por repetición alternativa de reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos amino y los grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno por uno en orden desde el extremo C hasta el extremo N, y uno donde los aminoácidos se unen a la resina o al grupo protector de los grupos amino de los péptidos, cuando se liberan, la cadena peptídica se extiende de esta manera. Los métodos de síntesis en fase sólida se clasifican en gran medida por el método tBoc y el método Fmoc, según el tipo de grupo protector utilizado. Los grupos protectores utilizados habitualmente incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrilo), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (tritilo), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Clz-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO_2 (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino); y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo). Después de la síntesis del péptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido. Dicha reacción de corte de péptidos puede llevarse a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc.

Alternativamente, el péptido puede sintetizarse usando técnicas recombinantes. En este caso, el ácido nucleico y/o la construcción genética comprende o consiste en una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de acuerdo con la invención, polinucleótidos con secuencias nucleotídicas complementarias a una de las secuencias anteriores y secuencias que se hibridan a dichos polinucleótidos en condiciones rigurosas.

La invención se refiere además a una construcción genética que consiste o comprende un polinucleótido como se define en el presente documento, y secuencias reguladoras (tales como un promotor(es) adecuado(s), potenciador es), terminador(es), etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de un péptido de acuerdo con la invención en una célula huésped.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un huésped o célula huésped que expresa (o que bajo circunstancias adecuadas es capaz de expresar) un péptido de la invención; y/o que contiene un polinucleótido de la invención o construcción genética de la invención.

El método para producir el péptido puede comprender opcionalmente los pasos de purificar dicho péptido, modificar químicamente dicho péptido y/o formular dicho péptido en una composición farmacéutica.

Construcciones quiméricas:

El péptido VKKKKIKAEIKI (SEQ ID NO: 2) es útil en la invención como péptido penetrante de las células (CPP).

Por lo tanto, la invención proporciona vectores, que comprenden dicho péptido, como un péptido penetrante de las células, acoplado a una molécula de interés.

La molécula de interés puede estar acoplada a uno o varios de tales CPP.

La molécula de interés puede ser cualquier agente terapéutico, incluido un agente citotóxico (preferiblemente un péptido proapoptótico), un agente antivírico o un agente antibacteriano o antiparasitario.

En una realización preferida, se pueden preparar construcciones de péptidos quiméricos que comprenden dicho péptido, como un péptido penetrante, fusionado a un péptido pro-apoptótico.

Preferiblemente, el péptido proapoptótico se fusiona en el extremo C del péptido penetrante. El péptido proapoptótico puede provenir de cualquier péptido proapoptótico de interés.

La construcción del péptido quimérico puede tener preferiblemente una longitud comprendida entre 23 y 70 aminoácidos, preferiblemente entre 23 y 40 aminoácidos.

En una realización preferida, el péptido pro-apoptótico es un fragmento de la proteína caspasa-9.

Según una realización, las construcciones de péptidos quiméricos útiles en la invención comprenden o consisten en la siguiente secuencia de aminoácidos:

$$Y\text{-}X_{4a}\text{-ETLD-}X_{4b}\text{-I-}X_5\text{-EQWA-}X_6\text{-S-}X_7 \text{ (SEQ ID NO:3)}$$

donde

X_{4a} es valina o isoleucina;

X_{4b} es ácido aspártico o glicina;

X_5 es fenilalanina o leucina;

X_6 es arginina o histidina;

X_7 no existe o es glutamato, o glutamato-aspartato, o glutamato-aspartato-leucina; o

un péptido resistente a la proteólisis derivado de dicho péptido proapoptótico mediante una o más modificaciones químicas, o un péptido sustancialmente homólogo derivado de la SEQ ID NO: 3 por una o más sustituciones conservadoras.

Tales péptidos resistentes a la proteólisis u homólogos inducen la apoptosis celular, in vitro y/o in vivo. Los ensayos para determinar si una molécula, por ejemplo un péptido, induce apoptosis celular son comunes en la técnica e incluyen, por ejemplo, incubar células con el péptido candidato y determinar si dicho péptido candidato induce apoptosis, p. ej. por anexina V y marcaje con PI de las células e identificación como células apoptóticas, que son anexina V^+ y PI^-.

En una realización preferida,

X_{4a} es valina;

X_{4b} es ácido aspártico;

X_5 es fenilalanina;

y X_6 es histidina.

En una realización particular, la construcción del péptido quimérico es:

VKKKKIKAEIKI-YVETLDDIFEQWAHSEDL (SEQ ID NO: 4)

también en este documento designado como Mut3-DPT-C9h.

En otra realización particular, la construcción del péptido quimérico es:

VKKKKIKAEIKI-YIETLDDILEQWARSEDL (SEQ ID NO: 5)

Se describen además en este documento, las construcciones del péptido quimérico:

VKKKKIKKEIKI-YVETLDDIFEQWAHSEDL (SEQ ID NO: 12)

también designado en el presente documento Mut1 -DPT-C9h,

VKKKKIKKEIKI-YIETLDDILEQWARSEDL (SEQ ID NO: 13)

VKKKKIKNEIKI-YVETLDDIFEQWAHSEDL (SEC ID N.º: 14)

también designado en el presente documento Mut2-DPT-C9h, y

VKKKKIKNEIKI-YIETLDDILEQWARSEDL (SEQ ID NO: 15)

En otra realización más, el péptido proapoptótico es un péptido PP2Ah que comprende o consiste en:

la secuencia DTLDHIRALDRLQEVPHEGP (SEQ ID NO: 9).

En una realización particular, la construcción del péptido quimérico es:

VKKKKIK**A**EIKI- DTLDHIRALDRLQEVPHEGP (SEQ ID NO: 16)

Se describen además en este documento, las construcciones del péptido quimérico:

VKKKKIK**K**EIKI- DTLDHIRALDRLQEVPHEGP (SEQ ID NO: 17), y

VKKKKIK**N**EIKI- DTLDHIRALDRLQEVPHEGP (SEQ ID NO: 18)

Protección adicional contra la proteólisis:

Los extremos N y C de los péptidos descritos en el presente documento pueden protegerse opcionalmente contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo N puede estar en forma de un grupo acetilo, y/o el extremo C puede estar en forma de un grupo amida. También se prevén modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis, p. ej. en donde al menos un enlace peptídico -CONH- se modifica y reemplaza por un enlace reducido

(CH2NH), un enlace retro-inverso (NHCO), un enlace metileno-oxi (CH2-O), un enlace tiometileno (CH2-S), un enlace carba (CH2CH2), un enlace cetometileno (CO-CH2), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH2)), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o también un enlace -CH=CH-.

Por ejemplo, el péptido puede modificarse por acetilación, acilación, amidación, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, formación de enlaces reticulados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, fosforilación y similares.

Los péptidos de la presente descripción pueden estar compuestos de aminoácido(s) en la configuración D, que hacen que los péptidos sean resistentes a la proteólisis. También pueden estabilizarse mediante reticulación intramolecular, p. ej. modificando al menos dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales olefínicas, preferiblemente cadenas alquenilo C3-C8, preferiblemente cadenas penten-2-ilo, seguido de reticulación química de las cadenas, de acuerdo con la denominada tecnología "básica" descrita en Walensky et al. al, 2004. Por ejemplo, los aminoácidos en la posición i y de i+4 a i+7 pueden sustituirse por aminoácidos no naturales que muestran residuos olefínicos reactivos. Todos estos péptidos modificados químicamente resistentes a la proteólisis están incluidos en la presente invención.

En otro aspecto de la descripción, los péptidos se unen covalentemente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo C-terminal o un residuo de lisina, especialmente un PEG de 1500 ó 4000 MW, para una disminución en el aclaramiento urinario y en las dosis terapéuticas utilizadas y para un aumento de la vida media en el plasma sanguíneo. En otra realización más, la vida media del péptido aumenta al incluir el péptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para el sistema de suministro de fármacos que forma microesferas. Los polímeros y copolímeros son, por ejemplo, poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA) (como se ilustra en el documento US2007/0184015, SoonKap Hahn et al).

Ácidos nucleicos

La invención también se refiere a un polinucleótido que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de acuerdo con la invención.

La invención se refiere además a una construcción genética que consiste o comprende un polinucleótido como se define en el presente documento, y secuencias reguladoras (tales como un promotor(es) adecuado(s), potenciador(es), terminador(es), etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de un péptido de acuerdo con la invención en una célula huésped.

Las construcciones genéticas de la invención pueden ser ADN o ARN, y son preferiblemente ADN bicatenario. Las construcciones genéticas de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped u organismo huésped previsto en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula huésped prevista o en una forma adecuada para la replicación independiente, el mantenimiento y/o herencia en el organismo huésped previsto. Por ejemplo, las construcciones genéticas de la invención pueden estar en forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que pueda proporcionar la expresión in vitro y/o in vivo (por ejemplo, en una célula huésped, organismo huésped y/o sistema de expresión adecuados).

En un aspecto preferido pero no limitante, una construcción genética de la invención comprende i) al menos un ácido nucleico de la invención; conectado operativamente a ii) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y, opcionalmente, un terminador adecuado; y, opcionalmente, también iii) uno o más elementos adicionales de construcciones genéticas tales como las secuencias 3'- o 5'-UTR, secuencias líderes, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes informadores, y/o elementos que puedan facilitar o aumentar (la eficiencia de) la transformación o integración.

En una realización particular, el ácido nucleico que codifica el péptido penetrante de células de la invención está acoplado o fusionado a un ácido nucleico que codifica un péptido o proteína de interés. El péptido de interés puede ser un péptido pro-apoptótico como se describe en este documento. Más generalmente, el péptido o la proteína de interés puede ser cualquier péptido o proteína para expresar, tal como el péptido o polipéptido terapéutico, así como cualquier péptido antigénico o inmunogénico, si se desea.

El ácido nucleico puede ser transportado especialmente por un vector viral, tal como un adenovirus o un lentivirus, para la infección y expresión ex vivo o in vivo del péptido o proteína de interés acoplado al péptido penetrante de las células.

Actividad proapoptótica:

Los péptidos quiméricos, como se definen en este documento, o los ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos, son útiles para la inhibición de la proliferación celular in vitro o in vivo.

Son agentes terapéuticos útiles, en particular, para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.

Por lo tanto, se describe un método de tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa en un paciente que lo necesite, cuyo método comprende administrar a dicho paciente la construcción del péptido quimérico, o un ácido nucleico que codifique dicha construcción.

Los péptidos (o ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos) son útiles para el tratamiento de un tumor, en particular un tumor canceroso, preferiblemente, en un paciente humano.

El trastorno hiperproliferativo puede ser un cáncer, tal como un cáncer hematológico, en particular leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos B, cutáneo de células T o un cáncer no hematológico, por ejemplo, cáncer de cerebro, epidermoide (en particular, de pulmón, mama, ovario), cabeza y cuello (células escamosas), vejiga, gástrico, pancreático, cabeza, cuello, renal, de próstata, colorrectal, esofágico o tiroideo, y melanoma.

Los diferentes tipos de cánceres pueden incluir, entre otros, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendotelio-sarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, linfoma, leucemia, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de la vía biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogloma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma, melanoma uveal y cáncer de mama.

Más particularmente, los péptidos descritos en este documento (o los ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos) son útiles en el tratamiento de cánceres que exhiben una desregulación de PP1 y/o PP2A o que exhiben una sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, un regulador apoptótico que interactúa y está controlado por PP1 y PP2A.

Se han encontrado altos niveles de expresión del gen bcl-2 humano en todos los linfomas con translocaciones cromosómicas t (14; 18), incluida la mayoría de los linfomas de células B foliculares y muchos linfomas no Hodgkin de células grandes. También se han encontrado altos niveles de expresión del gen bcl-2 en las leucemias que no tienen una translocación cromosómica en (14; 18), incluidas las leucemias linfocíticas del tipo de células pre-B, neuroblastomas, carcinomas nasofaríngeos y muchos adenocarcinomas de próstata, mama y colon. Se encontró especialmente sobreexpresión de bcl-2 en la leucemia linfocítica crónica (CLL) (Deng et al, 2009; Prickett et al, 2004).

En una realización preferida, el tumor canceroso es, por lo tanto, un linfoma, especialmente una leucemia, tal como la leucemia linfocítica crónica (CLL).

Además, los péptidos quiméricos (o ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos) pueden usarse para el tratamiento de la metástasis.

Según otra realización, el trastorno hiperproliferativo puede ser un trastorno hiperproliferativo no canceroso tal como una hiperplasia benigna de la piel (p. ej., la psoriasis) o próstata (p. ej., hipertrofia prostática benigna (HPB)), artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, reestenosis, aterosclerosis o leucoplasia pilosa oral.

Composiciones farmacéuticas:

Los vectores de la invención, en particular los péptidos quiméricos (o el ácido nucleico que codifica dicho péptido) pueden administrarse por cualquier vía conveniente que incluya la intravenosa, oral, transdérmica, subcutánea, mucosa, intramuscular, intrapulmonar, intranasal, parenteral, rectal, vaginal y tópica. La ruta intranasal es de particular interés.

Ventajosamente, también se contempla la administración intratumoral.

El agente terapéutico se formula en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica también puede incluir o combinarse con cualquier otro principio activo, tal como, en particular, un agente anticancerígeno, p. ej., quimioterapias citotóxicas convencionales con inhibidores de la replicación del ADN, como agentes de unión al ADN, en particular fármacos alquilantes o intercalantes, agentes antimetabolitos como los inhibidores de la ADN polimerasa o inhibidores de la topoisomerasa I o II, o con agentes antimitogénicos como los alcaloides. En una realización más, los vectores de la invención, en particular, los péptidos quiméricos (o ácido nucleico que codifica dicho péptido) pueden combinarse con inhibidores de proteasa (quinasa, aromatasa, ATPasa), anticuerpos monoclonales u hormonas o análogos hormonales.

En una realización preferida, el agente terapéutico puede administrarse por electroporación. La electroporación, también conocida como electropermeabilización o electroinyección, es la permeabilización de las membranas celulares como consecuencia de la aplicación de ciertos campos eléctricos cortos e intensos a través de la membrana celular, las células o los tejidos. Típicamente, la electroporación consiste en inyectar compuestos, preferiblemente por vía intramuscular o intradérmica, seguido de la aplicación de una serie de pulsos eléctricos por medio de electrodos conectados a un generador. Las condiciones para aplicar un campo eléctrico en la zona de inyección son bastante conocidas en la actualidad por los expertos en la materia, y se describen, en particular, en la patente de EE. UU. 5468223. Los expertos en la materia podrán adaptar estas condiciones según cada caso. El campo eléctrico puede ser 50-200 microsegundos de pulsos de campos eléctricos de alta resistencia en el intervalo de 1-5000 V/cm y con una frecuencia entre 0,1 y 1.000 hertz. Típicamente, se aplica una secuencia de ocho pulsos de 100 microsegundos de 1000-1500 V/cm con una frecuencia de 1 hertz.

El agente terapéutico, tal como el péptido quimérico, se formula junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma se conoce bastante en la técnica y no necesita limitarse, en base a la formulación. Típicamente, tales composiciones se preparan ya sea como soluciones líquidas o suspensiones inyectables; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en líquidos antes del uso. La preparación también se puede emulsionar. En particular, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de una dosificación sólida, por ejemplo cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, grageas o gránulos.

La elección del vehículo y el contenido de sustancia activa en el vehículo se determinan generalmente de acuerdo con la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto activo, el modo particular de administración y las disposiciones que deben observarse en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden usar excipientes como lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dicálcico y agentes desintegrantes como almidón, ácidos algínicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes como el estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco para preparar las tabletas. Para preparar una cápsula, es ventajoso usar lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se usan suspensiones acuosas, estas pueden contener agentes emulsionantes o agentes que faciliten la suspensión. También pueden usarse diluyentes tales como sacarosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y cloroformo o mezclas de los mismos.

La preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (como el ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto.

La persona experta selecciona la dosificación para que se logre un efecto pro-apoptótico, y depende de la vía de administración y la forma de dosificación que se use. La dosis diaria total del péptido quimérico administrado a un sujeto en dosis únicas o divididas puede ser en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día y preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg/día. Las composiciones de unidades de dosificación pueden contener cantidades de tales submúltiplos de las mismas que se pueden usar para completar la dosis diaria. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para un paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyan el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo y la vía de administración, las tasas de absorción y excreción, la combinación con otros medicamentos y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en la siguiente sección experimental, que debe considerarse como ilustrativa y no limitativa del alcance de la presente solicitud.

Leyendas de las figuras:

La Figura 1 es un gráfico que muestra la estabilidad de los péptidos mutados analizados por fraccionamiento de Proteominer y Maldi-Tof. La relación de intensidad de cada selección está representada, en relación con su propio control. El residuo R fue mutado a K (Mut1-DPT-C9h), N (Mut2-DPT-C9h) o A (Mut3-DPT-C9h). Círculo: péptido control DPT-C9h (SEQ ID NO: 6), Cuadrado: Mut1 -DPT-C9h, Triángulo: Mut2-DPT-C9h, Diamante: Mut3-DPT-C9h.

La Figura 2 muestra un análisis de la apoptosis por tinción de anexina-V-FITC de la línea celular de cáncer de mama. HBCx-12A se trató durante 24 h con 100 μM del control y péptidos mutados.

La Figura 3 muestra la biodistribución de Cy5DPT-C9h y Cy5Mut3DPT-C9h. Los ratones fueron injertados en interescapular por xenoinjerto de cáncer de mama luminal HBCx-3. Recibieron una inyección intraperitoneal de DPT-C9h o Mut3DPT-C9h marcada con Cy5 a 5 mg/kg. El ratón de control recibió el excipiente de control (glucosa 5%). Los ratones fueron fotografiados entre 0 (antes de la inyección) y 168 h después de la inyección. La fluorescencia de los tumores se calculó y normalizó utilizando el software Living Image.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Diseño y caracterización de péptidos penetrantes DPT-C9h no degradables mutados

1.1. Materiales y métodos

Síntesis y secuencia de péptidos

Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador automático de péptidos múltiples con un procedimiento en fase sólida y química estándar de Fmoc. La pureza y la composición de los péptidos se confirmaron por HPLC de fase inversa y por análisis de aminoácidos.

Análisis de estabilidad peptídica en suero humano

El análisis de la degradación de los péptidos fue realizado por Proteominer y Maldi-Tof como se describió previamente.

1 .2. Resultados

DPT-C9h es VKKKKIK**R**EIKI-YVETLDDIFEQWAHSEDL (SEQ ID NO: 6),

El residuo R fue mutado a K (Mut1-DPT-C9h), N (Mut2-DPT-C9h) o A (Mut3-DPT-C9h).

La Figura 1 muestra que el péptido Mut3-DPC-C9h no se degrada tras 24 h de contacto con el suero humano. Además, los otros mutantes mostraron una mayor estabilidad en comparación con el péptido de control (DPT-C9h).

Ejemplo 2: Efecto de DPT-C9h mutado sobre la apoptosis

2.1. Materiales y métodos

Células

Se aisló la línea celular de cáncer de mama humano HBCx-12A a partir de xenoinjertos de cáncer humano primario y se cultivó en medio RPMI suplementado con 10% de FCS.

Detección de apoptosis por tinción de anexina-V-FITC

Las células apoptóticas se detectaron usando anexina-V (-FITC de BD Biosciences) según lo descrito por el fabricante. En resumen, las células se lavaron en 1 x tampón de unión, se centrifugaron y luego se resuspendieron en 200 µl de 1 x tampón de unión que contenía anexina V-FITC (0,1 g/ml) y PI (0,5 g/ml). Después de la incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 10 minutos, las células se analizaron por citometría de flujo. Los datos adquiridos por FACSCalibur (BD Biociences) se analizaron con el software Cellquest Pro.

2.2. Resultados

Luego, los inventores analizaron si los péptidos mutados retenían la capacidad de inducir la apoptosis. La línea celular de cáncer de mama HBCx-12A se trató durante 24 h con 100 µM del control y péptidos mutados. La apoptosis se analizó mediante tinción con anexina-V-FITC. Como se muestra en la Figura 2, los péptidos analizados inducen niveles similares de apoptosis. Se observó el mismo resultado al usar las líneas celulares HBC-x3 y HBCx-17.

Ejemplo 3: Biodistribución de Mut3DPT-C9h en tumores

3.1. Materiales y métodos

Síntesis y secuencia de péptidos

Los péptidos (DPT-C9h y Mut3DPT-C9h) se sintetizaron como se describió anteriormente. El fluorocromo Cy5 se añadió durante la síntesis del péptido.

Ensayos de fluorescencia

A los ratones se les inyectó IP (intraperitonalmente) con el péptido Cy5DPT-C9h o Mut3DPT-C9h (5 mg/kg) y luego se analizaron en diferentes momentos después de la inyección.

Las imágenes de fluorescencia se realizaron con el sistema de imágenes MS (IVIS100, Caliper Life Sciences, EE. UU.). Los ratones fueron anestesiados tras el análisis. El tiempo de adquisición de imágenes fue de 1 s a 10 s, dependiendo de la señal de fluorescencia. El análisis se realizó utilizando el software Living Image V. 2.50 (Caliper Life Sciences).

3.2. Resultados

Biodistribución de Mut3DPT-C9h y DPT-C9h en los modelos de xenoinjerto de cáncer de mama.

Los inventores estaban interesados en analizar y comparar la biodistribución de ambos péptidos. La Figura 3 muestra la biodistribución de Cy5DPT-C9h y Cy5Mut3DPT-C9h en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama. Los ratones se inyectaron intraperitonalmente (IP) y se analizó la biodistribución en diferentes momentos tras la inyección.

La Figura 3 muestra que 6 h después de la inyección IP, los inventores pudieron detectar ambos péptidos en el tumor. El pico máximo de detección de Cy5 Mut3DPT-C9h se detecta 23 h después de la inyección, disminuyendo ligeramente la intensidad de la fluorescencia después de este tiempo. Finalmente, se detectó un nivel considerable de Cy5Mut3DPT-C9h 168 h después de la inyección. El nivel máximo de fluorescencia de Cy5DPT-C9h se detectó 6 h después de la inyección, disminuyendo ligeramente después de este período de tiempo. Se detectó un bajo nivel de Cy5DPT-C9h tras 168 h de tratamiento.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que DPT-C9h marcado con Cy5 y Mut3DPT-C9h marcado con Cy5 alcanzan el tumor. Más importante aún, Mut3DPT-C9h marcado con Cy5 mostró ser más estable que el péptido original, DPT-C9h.

El péptido mutado Mut3DPT-C9h muestra una biodistribución en el tumor más sostenida que el péptido original (DPT-C9h) ya que se puede detectar la fluorescencia del fluorocromo Cy5 por más tiempo que la fluorescencia de DPT-C9h.

Esta nueva propiedad permite reducir la dosis de péptido inyectado, así como el calendario de administración. En resumen, los nuevos mutantes tienen una clara ventaja en comparación con el péptido control y tienen una nueva característica, ya que no son degradables por las proteasas séricas.

Referencias

Deng X, Gao F, and W. Stratford May. Dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding Protein phosphatase 2A inactivates Bcl-2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. Blood. 2009 Jan 8;113(2):422-8.

Guergnon, F. Dessauge, V. Dominguez, J. Viallet, X. Cayla, A. Rebollo, V.Yuste, S.Susin, PE. Bost and A. Garcia Use of penetrating peptides interacting with PP1/PP2A proteins as a basis for a new Drug Phosphatase Technology. Mol. Pharmacol. (2006) 69 :1115-1124.

Lehninger, (1975) Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers, Inc. New-York: NY., pp. 71-77.

Pitton, C., Rebollo, A., Van Snick, J., Theze, J. and Garcia, A. (1993) High affinity and intermediate affinity forms of the human IL-2 receptor expressed in an IL-9-dependent murine T cell line deliver proliferative signals via differences in their transduction pathways. Cytokine, 5, 362-371.

Prickett TD, and Brautigan D (2004). Ovelapping binding sites in Protein Phosphatase 2A for association with regulatory 1 and a4 (mTap42) subunits. J.Biol.Chem. 279,38912-38920.

Walensky et al, Science, 2004, 305:1466-1470.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) et al

<120> PÉPTIDOS PENETRANTES EN LAS CÉLULAS

<130> B1290PC

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptidos penetrantes en las células

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa no existe, es un residuo lisina, o valina-lisina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es un residuo de aminoácido que es diferente de arginina y es no conservador con respect a arginina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Xaa no existe, es un residuo lisina, o lisina-isoleucina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (11)..(11)
<223> Xaa no existe o es una secuencia de amionoácidos de uno a 4 amioácidos

<400> 1
Xaa Lys Lys Lys Ile Lys Xaa Glu Ile Xaa Xaa
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 2
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Ala Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (2)..(2)
<223> Xaa es valina o isoleucina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es ácido aspártico o glicina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es fenilalanina o leucina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (14)..(14)
<223> Xaa es arginina o histidina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> Xaa no existe o es glutamato, o glutamato-aspartato, o glutamato-aspartato-leucina

<400> 3
Tyr Xaa Glu Thr Leu Asp Xaa Ile Xaa Glu Gln Trp Ala Xaa Ser Xaa
1 5 10 15

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 4
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Ala Glu Ile Lys Ile Tyr Val Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 5
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Ala Glu Ile Lys Ile Tyr Ile Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Leu Glu Gln Trp Ala Arg Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 6
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Tyr Val Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 7
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 8
Asp Thr Leu Asp His Ile Arg Ala Leu Asp Arg Leu Gln Glu Val Pro
1 5 10 15

His Glu Gly Pro
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 9
Asp Thr Leu Asp His Ile Arg Ala Leu Asp Arg Leu Gln Glu Val Pro
1 5 10 15

His Glu Gly Pro
20

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 10
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Lys Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 11
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Asn Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 12
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 12
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Lys Glu Ile Lys Ile Tyr Val Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 13
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 13
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Lys Glu Ile Lys Ile Tyr Ile Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Leu Glu Gln Trp Ala Arg Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 14
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Asn Glu Ile Lys Ile Tyr Val Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrante en las células

<400> 15

Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Asn Glu Ile Lys Ile Tyr Ile Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Leu Glu Gln Trp Ala Arg Ser Glu Asp Leu
20 25 30

<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido quimérico

<400> 16
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Ala Glu Ile Lys Ile Asp Thr Leu Asp
1 5 10 15

His Ile Arg Ala Leu Asp Arg Leu Gln Glu Val Pro His Glu Gly Pro
20 25 30

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido quimérico

<400> 17
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Lys Glu Ile Lys Ile Asp Thr Leu Asp
1 5 10 15

His Ile Arg Ala Leu Asp Arg Leu Gln Glu Val Pro His Glu Gly Pro
20 25 30

<210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido quimérico

<400> 18
Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Asn Glu Ile Lys Ile Asp Thr Leu Asp
1 5 10 15

His Ile Arg Ala Leu Asp Arg Leu Gln Glu Val Pro His Glu Gly Pro
20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en el aminoácido:

VKKKKIK**A**EIKI (SEQ ID NO: 2).

2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el extremo N del péptido está en la forma de un grupo acetilo, y/o el extremo C está en la forma de un grupo amida, y/o el péptido comprende una o más modificaciones internas en las que al menos un enlace peptídico -CONH- se modifica y reemplaza por un enlace reducido (CH_2NH), un enlace retro-inverso (NHCO), un enlace metileno-oxi (CH_2-O), un enlace tiometileno (CH_2-S), un enlace carba (CH_2CH_2), un enlace cetometileno (CO-CH_2), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH_2), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace -CH=CH-.

3. Un vector que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 como un péptido penetrante de las células, acoplado a un agente terapéutico.

4. El vector de la reivindicación 3, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente antivírico, un agente antibacteriano y un agente antiparasitario.

5. Una construcción del péptido quimérico que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, como un péptido penetrante de células, fusionado al extremo N de un péptido pro-apoptótico.

6. La construcción del péptido quimérico de la reivindicación 5, que tiene una longitud de 23 a 40 aminoácidos.

7. Una construcción de péptido quimérico de la reivindicación 6, en donde dicho péptido pro-apoptótico consiste en una secuencia:

Y-X_{4a}-ETLD-X_{4b}-I-X_5-EQWA-X_6-S-X_7 (SEQ ID NO: 3)

donde

X_{4a} es valina o isoleucina;

X_{4b} es ácido aspártico o glicina;

X_5 es fenilalanina o leucina;

X_6 es arginina o histidina;

X_7 no existe o es glutamato, o glutamato-aspartato, o glutamato-aspartato-leucina; preferiblemente en donde

X_{4a} es valina;

X_{4b} es ácido aspártico;

X_5 es fenilalanina;

y X_6 es histidina.

8. La construcción del péptido quimérico de la reivindicación 7, que es:

VKKKKIKAEIKI-YVETLDDIFEQWAHSEDL (SEQ ID NO: 4) o

VKKKKIKAEIKI-YIETLDDILEQWARSEDL (SEQ ID NO: 5)

9. La construcción del péptido quimérico de la reivindicación 7, en donde el péptido pro-apoptótico consiste en la secuencia DTLDHIRALDRLQEVPHEGP (SEQ ID NO: 9).

10. La construcción de péptido quimérico de la reivindicación 9 que es

VKKKKIKAEIKI-DTLDHIRALDRLQEVPHEGP (SEQ ID NO: 16).

11. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.

12. El uso del péptido quimérico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, o de un ácido nucleico que codifica dicha construcción de péptido quimérico para la inhibición de la proliferación celular in vitro.

13. Una composición farmacéutica que comprende el vector como se define en la reivindicación 3 ó 4, o el péptido quimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que comprende i) el vector que comprende un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 como un péptido penetrante de las células, acoplado a un agente citotóxico, o ii) el péptido quimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 para usar en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, preferiblemente un cáncer, aún más preferiblemente, un cáncer de mama.

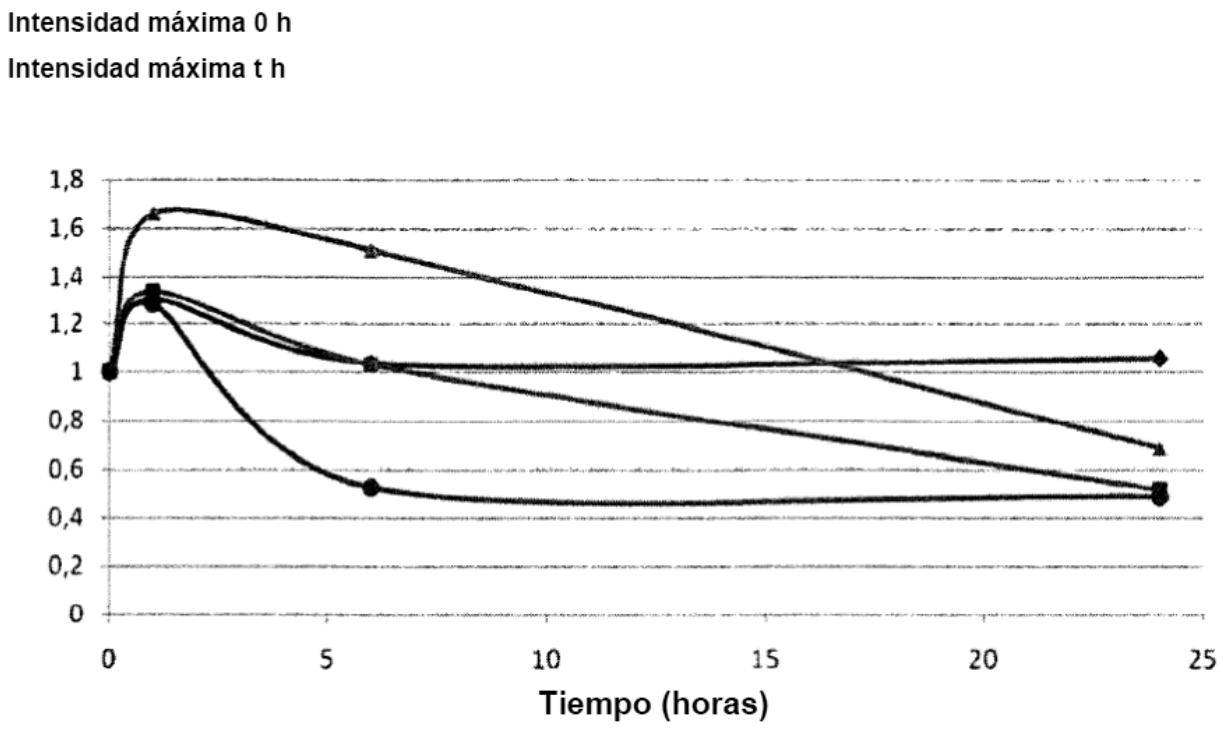
Intensidad máxima 0 h
Intensidad máxima t h
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
25
Tiempo (horas)

FIGURA 1

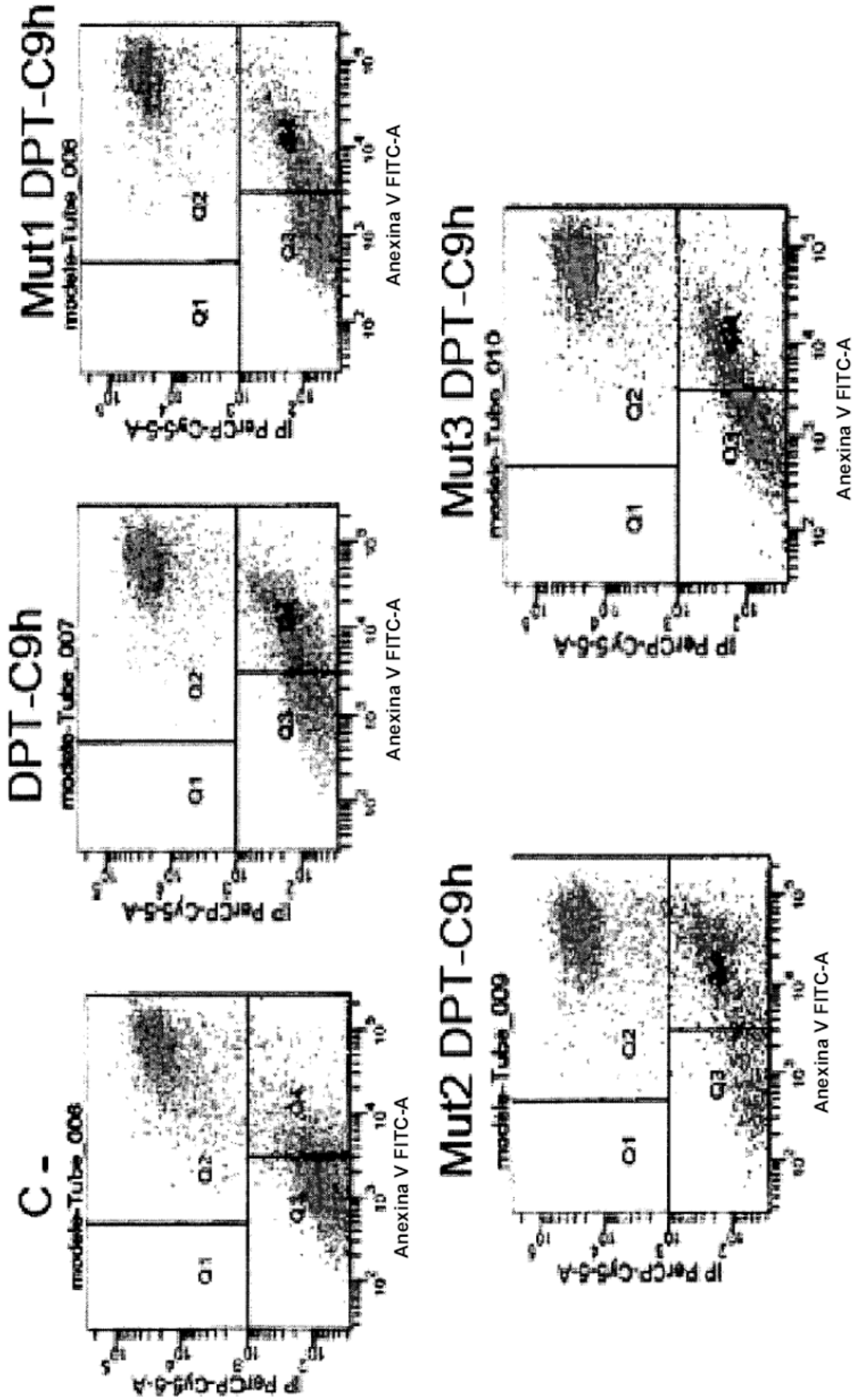
C -
modelo-Tube_006
Q1
Q2
Q3
Q4
IP PerCP-Cy5-5-A
Anexina V FITC-A
DPT-C9h
modelo-Tube_007
Q1
Q2
Q3
IP PerCP-Cy5-5-A
Anexina V FITC-A
Mut1 DPT-C9h
modelo-Tube_008
Q1
Q2
Q3
IP PerCP-Cy5-5-A
Anexina V FITC-A
Mut2 DPT-C9h
modelo-Tube_009
Q1
Q2
Q3
IP PerCP-Cy5-5-A
Anexina V FITC-A
Mut3 DPT-C9h
modelo-Tube_010
Q1
Q2
Q3
IP PerCP-Cy5-5-A
Anexina V FITC-A

FIGURA 2

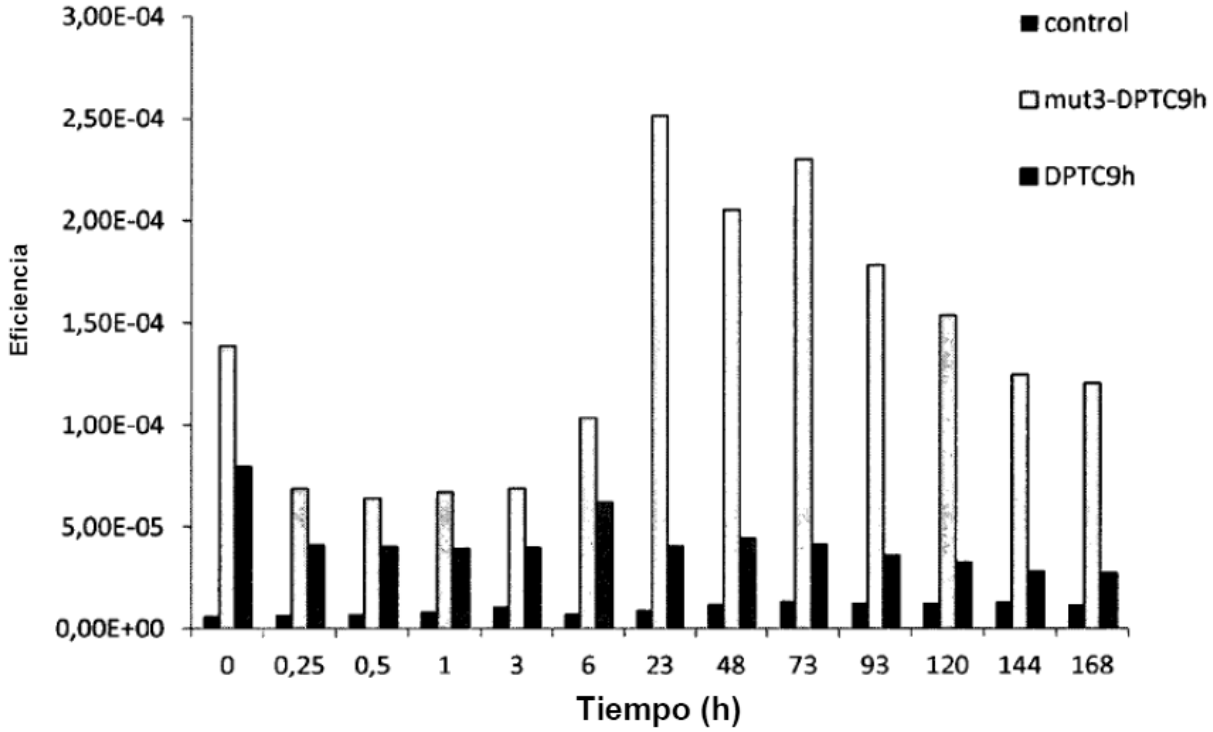
3,00E-04
2,50E-04
2,00E-04
1,50E-04
1,00E-04
5,00E-05
0,00E+00
Eficiencia
control
mut3-DPTC9h
DPTC9h
0
0,25
0,5
1
3
6
23
48
73
93
120
144
168
Tiempo (h)

FIGURA 3