

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 156**

51 Int. Cl.:

A61K 31/495 (2006.01)

C07D 295/15 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2006 PCT/US2006/020910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06128173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006 E 06771588 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 1893210**

54 Título: **Inducción apoptótica selectiva en células cancerosas incluyendo la activación de procaspasa-3**

30 Prioridad:

26.05.2005 US 684807 P

28.03.2006 US 743878 P

25.05.2006 US 420425

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

27.05.2020

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (100.0%)
352 HENRY ADMINISTRATION BUILDING, 506
SOUTH WRIGHT STREET
URBANA, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

**HERGENROTHER, PAUL J.;
PUTT, KARSON S.;
CHEN, GRACE W. y
PEARSON, JENNIFER M.**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 763 156 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

Inducción apoptótica selectiva en células cancerosas incluyendo la activación de procaspasa-3

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reclama el beneficio con 35 USC 119(e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Serie 60/684.807 presentada el 26 de mayo de 2005; y de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Serie 60743878 presentada el 28 de marzo de 2006.

10

Declaración sobre la investigación o desarrollo con fondos federales

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno con la subvención NSF/ contrato CHE-0134779 otorgado por la National Science Foundation. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

15

Antecedentes de la invención

La apoptosis, o muerte celular programada, desempeña un papel en el desarrollo y homeostasia de todos los organismos pluricelulares (Shi Y, 2002, Molecular Cell 9:459-470). Un sello distintivo frecuente del cáncer es la resistencia a las señales apoptóticas naturales. En función del tipo de cáncer, esta resistencia se debe generalmente a la regulación positiva o negativa de proteínas clave en la cascada apoptótica o a mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Tales cambios se producen tanto en la vía apoptótica intrínseca, que se canaliza a través de las mitocondrias y de la caspasa-9, como en la vía apoptótica extrínseca, que implica la acción de los receptores de muerte y de la caspasa-8. Por ejemplo, se han observado en los cánceres, alteraciones en los niveles adecuados de proteínas tales como p53, Bim, Bax, Apaf-1, FLIP y muchas otras. Las alteraciones pueden conducir a una cascada apoptótica defectuosa, una en la que la señal proapoptótica cadena arriba no se transmite adecuadamente para activar las caspasas ejecutoras, caspasa-3 y caspasa-7.

20

25

Como la mayoría de las vías apoptóticas implican en última instancia la activación de la procaspasa-3, las anomalías genéticas cadena arriba son efectivamente "rupturas" en los circuitos apoptóticos, y como resultado, estas células proliferan de manera atípica. Dado el papel central de la apoptosis en el cáncer, se han realizado esfuerzos para desarrollar agentes terapéuticos que se dirijan a proteínas específicas en la cascada apoptótica. Por ejemplo, aglutinantes peptídicos o de molécula pequeña a miembros en cascada como p53 y proteínas en la familia Bcl o a la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP, por sus siglas en inglés) que tienen actividad pro-apoptótica, al igual que los compuestos que promueven la oligomerización de Apaf-1. Sin embargo, debido a que tales compuestos se dirigen a posiciones tempranas (o intermedias a altas) en la cascada apoptótica, los cánceres con mutaciones en las proteínas cadena abajo de esos miembros aún pueden ser resistentes a los posibles efectos beneficiosos de esos compuestos.

30

35

Para fines terapéuticos, sería ventajoso identificar una molécula pequeña que active directamente una proteína proapoptótica cadena abajo en la cascada apoptótica. El enfoque de la invención de los presentes inventores implica una posición relativamente baja en la cascada, lo que permite destruir incluso aquellas células que tienen mutaciones en su maquinaria apoptótica cadena arriba. Además, las estrategias terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden tener una mayor probabilidad de éxito si esa proteína proapoptótica se regula positivamente en las células cancerosas. En la presente invención, los esfuerzos de los presentes inventores para identificar moléculas pequeñas comenzaron con el direccionamiento de la importante proteína efectora cadena abajo de la apoptosis, procaspasa-3.

40

45

La conversión o activación de procaspasa-3 en caspasa-3 da como resultado la generación de la forma de caspasa "ejecutora" activa que posteriormente cataliza la hidrólisis de una multitud de sustratos proteicos. La caspasa-3 activa es un homodímero de heterodímeros y se produce por proteólisis de procaspasa-3. *In vivo*, esta activación proteolítica ocurre generalmente a través de la acción de caspasa-8 o caspasa-9. Para garantizar que la proenzima o el zimógeno no se active prematuramente, la procaspasa-3 tiene un "cierre de seguridad" de 12 aminoácidos que bloquea el acceso al sitio de proteólisis IETD (secuencia de aminoácidos, ile-glu-thr-asp). Véase Roy, S. et al.; Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide, Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 6132-6137 (2001).

50

55

Este cierre de seguridad permite que la procaspasa-3 resista la activación autocatalítica y la proteólisis por la caspasa-9. Los estudios mutagénicos indican que tres restos consecutivos de ácido aspártico parecen ser los componentes críticos del cierre de seguridad. La posición del cierre de seguridad es sensible al pH; por lo tanto, tras la acidificación celular (como se produce durante la apoptosis), se cree que el cierre de seguridad permite el acceso al sitio de proteólisis, y la caspasa-3 activa puede producirse por la acción de la caspasa-9 o mediante un mecanismo de autoactivación.

60

En cánceres particulares, la expresión de procaspasa-3 está regulada positivamente. Un estudio de aislados primarios de 20 pacientes con cáncer de colon reveló que, en promedio, la procaspasa-3 se regulaba positivamente seis veces en dichos aislados en relación con el tejido no canceroso adyacente (Roy et al., 2001). Además, la procaspasa-3 está regulada positivamente en determinados neuroblastomas, linfomas y cánceres de hígado (Nakagawara, A. et al., 1997,

65

Cancer Res. 57:4578-4584; Izban, K. F. et al., Am. J. Pathol. 154:1439-1447; Persad, R. et al., Modern Patholo. 17:861-867). Además, se realizó una evaluación sistemática de los niveles de procaspasa-3 en el grupo de 60 líneas celulares utilizado para la exploración del cáncer por el National Cancer Institute (NCI) Developmental Therapeutics Program. La evaluación reveló que determinados cánceres de pulmón, melanoma, renal y de mama muestran niveles muy potenciados de expresión de procaspasa-3 (Svingen, P.A. et al., Clin. Cancer Res. 10:6807-6820).

Debido al papel de la caspasa-3 activa en el logro de la apoptosis, los niveles de expresión relativamente altos de la procaspasa-3 en determinados tipos de células cancerosas y la intrigante supresión de su autoactivación mediada por el cierre de seguridad, los presentes inventores razonan que podrían identificarse las pequeñas moléculas que modifican directamente la procaspasa-3 y que tales moléculas podrían tener una gran aplicabilidad en la terapia dirigida contra el cáncer.

En el presente documento, los presentes inventores divulgamos modificadores de moléculas pequeñas de procaspasas, que incluyen, en particular, activadores capaces de convertir procaspasa-3 a su forma efectora. Además, los presentes inventores demuestran que determinadas pequeñas moléculas de fármacos pueden activar directa e inmediatamente la procaspasa-3 para lograr un efecto proapoptótico en las células cancerosas *in vivo*. Los presentes inventores creen que estas son las primeras moléculas pequeñas que se sabe que activan directamente la procaspasa-3. La activación directa de las caspasas ejecutoras representa una nueva y valiosa estrategia contra el cáncer.

Sumario de la invención

En general, los términos y frases utilizados en el presente documento, tienen su significado reconocido en la técnica, que se puede encontrar por referencia a textos de referencia, referencias de revistas y contextos conocidos por los expertos en la materia.

Se aplican las siguientes abreviaturas. IAP, inhibidor de apoptosis; PAC-1, compuesto 1 activador de procaspasa; PARP, Poli(ADP-ribosa) polimerasa.

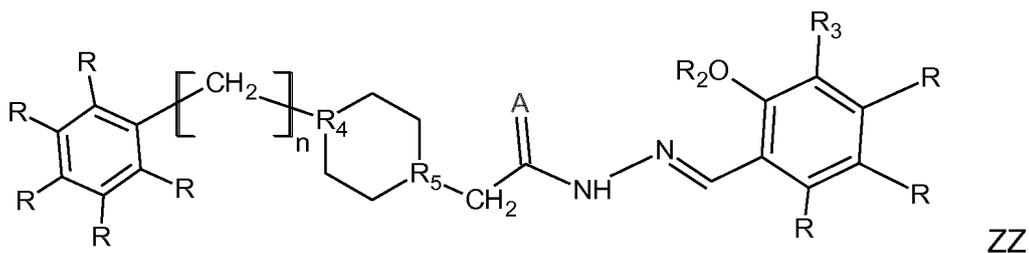
La presente invención en general proporciona compuestos, compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer, composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento del cáncer, métodos de exploración de compuestos y métodos de exploración de idoneidad celular y del paciente para el tratamiento en relación con modificadores de procaspasas. En una realización, los modificadores son activadores. En una realización, la invención proporciona dichos compuestos y métodos en conexión con activadores de procaspasa-3 y procaspasa-7. En realizaciones, las invenciones son aplicables en el contexto de una variedad de enfermedades cancerosas y tipos de células cancerosas como de mama, linfoma, suprarrenal, renal, melanoma, leucemia, neuroblastoma, de pulmón, cerebral y otros conocidos en la técnica.

Como introducción adicional, los presentes inventores han descubierto compuestos capaces de activar una enzima que a menudo se sobreexpresa en su forma inactiva en las células cancerosas. El compuesto induce la muerte celular programada (apoptosis) en células cancerosas, incluidas las que han regulado positivamente la procaspasa-3. El cáncer es un problema grande y creciente, y ahora es causa de muerte número uno en los Estados Unidos. Muchos cánceres resisten la quimioterapia convencional. Los compuestos de la invención pueden aprovechar una diana biológica que puede estar regulada positivamente en las células cancerosas y, por lo tanto, pueden resultar eficaces incluso en células con defectos en su maquinaria apoptótica. Estos compuestos también pueden tener éxito en la terapia dirigida contra el cáncer, donde puede haber ventajas de selectividad en la destrucción de las células cancerosas con una toxicidad comparablemente reducida para las células no cancerosas que tienen niveles más bajos de procaspasa-3.

Sin desear quedar ligado a teoría concreta alguna, se cree que los compuestos de la invención pueden actuar a través del mecanismo de modulación de la apoptosis o muerte celular programada para ser eficaces en el tratamiento de las células cancerosas. En una realización preferida, la modulación de la apoptosis es por inducción de la apoptosis. La modulación de la apoptosis puede ser por inhibición de la apoptosis.

En el presente documento se describe un método para inducir selectivamente la apoptosis en una célula cancerosa, que comprende: (a) administrar a dicha célula cancerosa un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3 de dicha célula cancerosa; y (b) modificar dicha molécula de procaspasa-3 para inducir apoptosis. En una realización, dichas células cancerosas están en un paciente que necesita tratamiento.

En una realización, la invención proporciona compuestos de Fórmula ZZ;



en donde $n = 1$ o 2 ; R, independientemente de otra R, es hidrógeno, halógeno, alquilo o alquilo corto; R_2 = hidrógeno, alquilo corto, éster; R_3 = hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alilo, alquenilo, o haloalquenilo; R_4 y R_5 son N; o $R_4=N$ y $R_5=C$; o R_4 y $R_5 = C$; y A = oxígeno o azufre, para su uso en el tratamiento de cáncer, administrando a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de dicho compuesto. En una realización, dicho compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en fórmula ZZ, PAC-1 y Estructura 5. En una realización, dicho compuesto es PAC-1.

En una realización, el compuesto se selecciona de los que tienen fórmula ZZ en donde R_4 y R_5 son ambos N, A es oxígeno y otros grupos variables son como se definen anteriormente. En una realización, el compuesto se selecciona de los que tienen fórmula ZZ en donde R_4 y R_5 son ambos N, A es oxígeno, R_2 es hidrógeno y otros grupos variables son como se definen anteriormente. En una realización, el compuesto se selecciona de los que tienen fórmula ZZ en donde R_4 y R_5 son ambos N, A es oxígeno, R_2 es hidrógeno, R_3 es alilo y otros grupos variables son como se definen anteriormente.

En una realización, el método comprende además la etapa de evaluar un parámetro de procaspasa-3 o caspasa-3 en una célula cancerosa; en donde dicho parámetro es uno o más de una cantidad semicuantitativa o cuantitativa, una cantidad funcional y un nivel de actividad de dicha procaspasa-3 o caspasa-3.

En una realización, la invención proporciona un método de selección directa *in vitro* para un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3, que comprende: (a) proporcionar un compuesto de prueba; (b) proporcionar una procaspasa-3 purificada; (c) exponer el compuesto de prueba a la procaspasa-3 purificada; (d) medir una actividad de procaspasa-3 después de la exposición al compuesto de prueba; (e) identificar un compuesto modificador comparando una actividad de prueba tras la exposición al compuesto de prueba con una actividad no modificada en ausencia de exposición al compuesto de prueba; seleccionando de este modo un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3. En una realización, el método comprende además comparar dicha actividad modificada o dicha actividad no modificada con una actividad de referencia; en donde dicha actividad de referencia se debe a la exposición de procaspasa-3 a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la fórmula estructural ZZ o subconjuntos de compuestos de dicha fórmula, PAC-1 y Estructura 5.

En el presente documento se describe un método de selección de un compuesto capaz de activar procaspasa-3 que comprende: a) proporcionar procaspasa-3; proporcionar un compuesto de prueba, preferentemente una molécula pequeña; b) hacer reaccionar la procaspasa-3 con el compuesto de prueba, generando así caspasa-3; y c) medir la actividad de caspasa-3. En una realización particular, la medición de la actividad de caspasa-3 emplea un sustrato, Ac-DEVD-pNA. En una realización particular, la medición utiliza un parámetro de lectura de longitud de onda de aproximadamente 410 nm. En una realización particular, la selección se lleva a cabo en paralelo utilizando múltiples compuestos de prueba.

En el presente documento se divulga un método de selección que utiliza la detección de una subunidad de procaspasa-3 como un indicador de que la procaspasa-3 de longitud completa (inactiva) se procesa en caspasa-3. En una realización particular, la subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kD medido por una técnica de migración en gel de proteínas, por ejemplo, en una transferencia Western.

En una realización, la invención proporciona un método de detección celular para un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3, que comprende: (a) proporcionar un compuesto de prueba; (b) proporcionar una célula, en donde la célula supuestamente expresa procaspasa-3; (c) exponer la célula al compuesto de prueba; (d) medir un parámetro celular después de la exposición al compuesto de prueba; en donde dicho parámetro comprende uno o más de viabilidad celular, indicador apoptótico y otros parámetros; (e) identificar un compuesto modificador comparando un parámetro celular probado tras la exposición al compuesto de prueba con un parámetro celular no modificado en ausencia de exposición al compuesto de prueba; seleccionando de este modo un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3. En una realización, el método comprende además comparar dicha actividad modificada o dicha actividad no modificada con una actividad de referencia; en donde dicha actividad de referencia se debe a la exposición de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la fórmula ZZ o subconjuntos de compuestos de dicha fórmula, PAC-1 y Estructura 5.

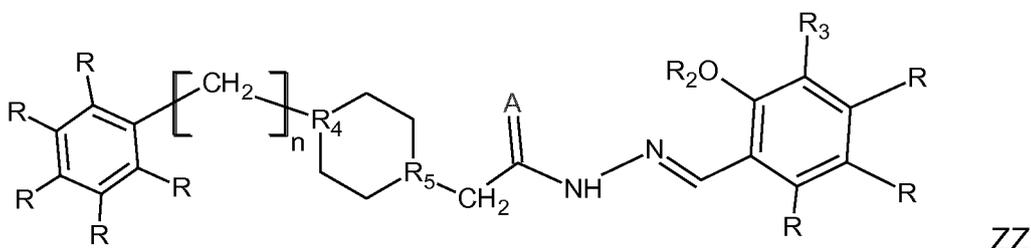
En el presente documento se divulga un método para identificar o diagnosticar una posible susceptibilidad al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa, que comprende (a) evaluar un parámetro de procaspasa en dicha célula cancerosa; y (b) determinar si dicho parámetro permite una mayor

susceptibilidad a activación de una procaspasa. Dicho parámetro de procaspasa puede ser un nivel de procaspasa-3 y dicha procaspasa puede ser procaspasa-3. Dicho parámetro de procaspasa puede ser un nivel de procaspasa-7 y dicha procaspasa puede ser procaspasa-7. Un nivel puede ser una cantidad semicuantitativa o cuantitativa, o una cantidad funcional (por ejemplo, una cantidad basada en la actividad, por ejemplo, una unidad de referencia o una unidad internacional).

En una realización, la invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de una célula cancerosa, comprendiendo, el uso (a) identificar una posible susceptibilidad al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) exponer dicha célula cancerosa a una cantidad eficaz del compuesto activador de procaspasa. En una realización, el compuesto activador de procaspasa se selecciona del grupo que consiste en la fórmula ZZ o subconjuntos de compuestos de dicha fórmula, PAC-1 y Estructura 5. En una realización, dicho compuesto activador de procaspasa es capaz de activar procaspasa-3, procaspasa-7, o tanto procaspasa-3 como procaspasa-7.

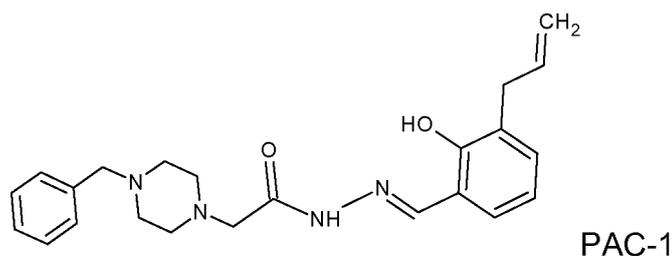
En el presente documento se divulga un método para sintetizar PAC-1, que comprende las etapas del Esquema 1. En el presente documento se divulga un método para sintetizar el Compuesto 5, que comprende las etapas del Esquema 1 con una modificación apropiada. También se divulga un método para sintetizar compuestos de la fórmula ZZ como se divulga en el presente documento y como se entendería en la técnica.

En el presente documento se divulgan compuestos de la fórmula ZZ:

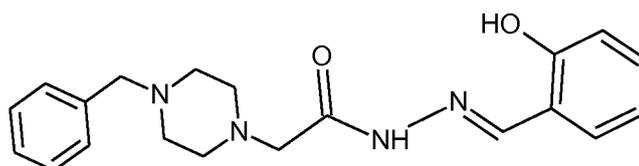


en donde n= 1 o 2; R, independientemente de otra R, es hidrógeno, halógeno, alquilo o alquilo corto; R2 = hidrógeno, alquilo corto, éster u otro resto que se puede eliminar en condiciones fisiológicas; R3 = hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alilo, alquenilo, o haloalquenilo; R4 y R5 son N; o R4=N y R5=C; o R4 y R5 = C; y A = oxígeno o azufre.

En el presente documento se divulgan compuestos de la fórmula ZZ excluyendo PAC-1, en donde la estructura de PAC-1 es:



En una realización, la invención proporciona un compuesto de Estructura 5 para su uso en el método de tratamiento del cáncer, en donde la estructura es:



En una realización, una composición para su uso de acuerdo con la invención es un agente quimioterapéutico.

En algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos y métodos que implican concentraciones eficaces, preferentemente de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM de las fórmulas estructurales divulgadas. Las concentraciones eficaces pueden ser de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 5 μM. La concentración eficaz se puede considerar como un valor tal como una concentración de actividad del 50 % en un ensayo de activación directa de procaspasa, en un ensayo de inducción de apoptosis celular o en una evaluación terapéutica clínica en animales. Dicho valor puede ser inferior a aproximadamente 200 μM. El valor puede ser inferior a aproximadamente

10 μM .

Los compuestos de la divulgación incluyen los de las fórmulas y sales y ésteres de esos compuestos divulgados, incluyendo preferentemente sales y ésteres farmacéuticamente aceptables.

5 En el presente documento se divulgan formas de composiciones de profármacos. Los profármacos de los compuestos divulgados son útiles en los métodos de la presente divulgación. Cualquier compuesto que se convertirá *in vivo* para proporcionar una forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa de un compuesto de la invención es un profármaco. Varios ejemplos y formas de profármacos son bien conocidos en la técnica. Una biomolécula tal como
10 una proteína precursora o ácido nucleico precursor puede ser un profármaco. Se encuentran ejemplos de profármacos, entre otros, en Design of Prodrugs, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985), Methods in Enzymology, Vol. 42, en las páginas 309-396, editado por K. Widder, et. al. (Academic Press, 1985); A Textbook of Drug Design and Development, editado por Krosgaard-Larsen and H. Bundgaard, Capítulo 5, "Design and Application of Prodrugs," por H. Bundgaard, en las páginas 113-191, 1991); H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 8, páginas 1-38
15 (1992); H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 77, página 285(1988); y Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

20 Cuando se divulga un grupo de sustituyentes en el presente documento, se entiende que todos los miembros individuales de ese grupo y todos los subgrupos, incluidos los isómeros y enantiómeros de los miembros del grupo, se divulgan por separado. Cuando se use un grupo de Markush u otro agrupamiento en el presente documento, todos los miembros individuales del grupo y todas las combinaciones y subcombinaciones posibles del grupo pretenden estar incluidas de forma individual en la divulgación. Cuando se describe un compuesto en el presente documento de manera que no se especifica un isómero o enantiómero particular del compuesto, por ejemplo, en una fórmula o en un nombre químico, esa descripción pretende incluir cada isómero y enantiómero del compuesto descrito
25 individualmente o en cualquier combinación. Además, a menos que se especifique otra cosa, se pretende que todas las variantes isotópicas de los compuestos divulgados en el presente documento estén abarcadas por la divulgación. Por ejemplo, se entenderá que uno cualquiera o más hidrógenos en una molécula divulgada se pueden reemplazar con deuterio o tritio. Las variantes isotópicas de una molécula son generalmente útiles como referencia en los ensayos de
30 la molécula y en la investigación química y biológica relacionada con la molécula o su uso. Se pretende que los nombres específicos de los compuestos sean ejemplares, ya que se sabe que un experto en la materia puede nombrar los mismos compuestos de manera diferente.

35 Las moléculas divulgadas en el presente documento pueden contener uno o más grupos ionizables [grupos de los que se puede eliminar (por ejemplo, -OH, -COOH, etc.) o añadir (por ejemplo, aminas) un protón o que se pueden cuaternizar (por ejemplo, aminas)]. Se pretende que todas las formas iónicas posibles de tales moléculas y sales de las mismas se incluyan individualmente en la divulgación del presente documento. Con respecto a las sales de los compuestos del presente documento, un experto habitual en la materia puede seleccionar entre una amplia variedad de contraiones disponibles, aquellos que son apropiados para la preparación de sales para una aplicación dada. Por ejemplo, en general, puede emplearse cualquier anión en la formación de sales de compuestos en el presente
40 documento; por ejemplo, haluro, sulfato, carboxilato, acetato, fosfato, nitrato, trifluoroacetato, glicolato, piruvato, oxalato, malato, succinato, fumarato, tartarato, citrato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, p-toluenosulfonato, salicilato y otros.

45 Los compuestos de la presente divulgación, y las sales o ésteres de los mismos, pueden existir en su forma tautomérica, en las que los átomos de hidrógeno se transponen a otras partes de las moléculas y los enlaces químicos entre los átomos de las moléculas se reordenan en consecuencia. Debe entenderse que todas las formas tautoméricas, en la medida en que puedan existir, se desvelan en el presente documento. Además, los compuestos pueden tener isómeros en trans y en cis y pueden contener uno o más centros quirales, por lo tanto, existen en formas enantioméricas y diastereoméricas. En el presente documento se divulgan todos estos isómeros, enantiómeros
50 individuales, así como mezclas de isómeros en cis y en trans, mezclas de diastereómeros; mezclas no racémicas y racémicas de enantiómeros (isómeros ópticos); y las mezclas anteriores enriquecidas para una o más formas; excepto que se indique lo contrario en el presente documento. Cuando no se hace mención específica de la configuración (cis, trans o R o S) de un compuesto (o de un carbono asimétrico), entonces, se pretende cualquiera de los isómeros o una mezcla de más de un isómero. Los procesos para la preparación pueden usar racematos, enantiómeros o diastereómeros como materiales de partida. Cuando se preparan productos enantioméricos o diastereoméricos, pueden separarse por métodos convencionales, por ejemplo, por cromatografía o cristalización fraccionada. Los compuestos de la invención pueden estar en forma libre o hidratada.

60 Se puede usar cada formulación o combinación de componentes descrita o ejemplificada en el presente documento, a menos que se indique otra cosa.

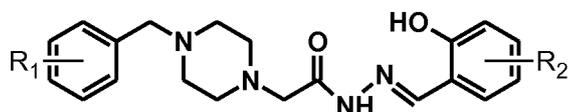
Cada vez que se describe un intervalo en la presente solicitud, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o un intervalo de composición o concentración, todos los intervalos intermedios y subintervalos, así como los valores individuales incluidos en los intervalos dados pretenden estar incluidos en la divulgación.

65 Algunas referencias proporcionadas en el presente documento proporcionan detalles sobre fuentes de materiales de

partida, materiales de partida adicionales, reactivos adicionales, métodos de síntesis adicionales, métodos de análisis adicionales y usos adicionales de la invención. Un experto en la materia apreciará que los materiales de partida, reactivos, sustratos sólidos, métodos sintéticos, métodos de purificación y métodos analíticos distintos de los ejemplificados específicamente pueden emplearse en la práctica de la invención basándose en el conocimiento en la técnica y sin recurrir a una experimentación indebida.

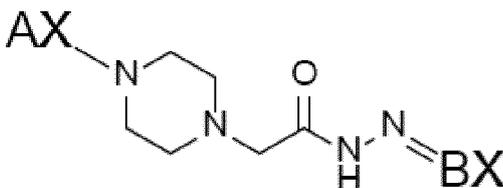
En una realización, la invención proporciona una composición terapéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende un compuesto de fórmula ZZ y un transportador farmacéuticamente aceptable. En el presente documento se divulgan composiciones terapéuticas que comprenden uno o más compuestos y para cada compuesto una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde los compuestos están presentes en la composición en una cantidad o en una cantidad combinada eficaz para obtener el beneficio terapéutico deseado. Las composiciones terapéuticas opcionalmente comprenden además uno o más componentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, transportadores y excipientes como se conocen en la técnica.

En una realización, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula ZZ2:



en donde R1 y R2 son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, alilo, haloalquilo, alquenoilo o haloalquenoilo. En una realización, R1 y R2 son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alilo o alquilo corto, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



en donde AX y BX son grupos como se define en la reivindicación 17.

En una realización, la invención proporciona un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: L01R06, L02R03, L02R06, L08R06, L09R03, L09R06 y L09R08.

En el presente documento se divulga un método de selección de un paciente con cáncer candidato para un posible tratamiento con un activador de procaspasa mediante la identificación de un nivel elevado de una procaspasa en el candidato, que comprende obtener una muestra de prueba de células o tejidos del candidato, evaluar el nivel de procaspasa en la muestra de prueba y determinar si el nivel de procaspasa es elevado en la muestra de prueba en relación con un nivel de referencia, seleccionando, de esta manera, a un paciente con cáncer candidato para un posible tratamiento con un activador de procaspasa. La procaspasa puede seleccionarse del grupo que consiste en procaspasa-2, -3, -6-, -7, -8 y -9. En un método particular, la procaspasa es procaspasa-3.

En algunos métodos, un nivel elevado de la muestra de prueba es al menos aproximadamente 2 veces mayor que el nivel de referencia. En algunos métodos, un nivel elevado de la muestra de prueba es al menos aproximadamente 4 veces mayor que el nivel de referencia. En algunos métodos, el nivel de referencia es de una segunda muestra de prueba del mismo paciente. En algunos métodos, el nivel de referencia es de una muestra normal de células o tejidos. El nivel de referencia puede ser de una línea celular, tal como una línea celular de cáncer o una línea celular normal. En algunos métodos, el nivel de referencia es un umbral absoluto. Véase Svingen, P.A. et al., Clin. Cancer Res. 10:6807-6820 que describe varias cantidades de niveles de procaspasas, incluido el número de moléculas por célula.

En una realización, la invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer induciendo la muerte en una célula cancerosa, que comprende administrar a dicha célula cancerosa un compuesto capaz de activar una molécula de procaspasa de dicha célula cancerosa. En una realización, la procaspasa es una o más de procaspasa-3 y procaspasa-7. En una realización preferida la procaspasa es procaspasa 3. En una realización, el compuesto tiene una fórmula estructural ZZ. En una realización, el compuesto tiene una fórmula estructural ZZ2.

Se reconoce que, independientemente de la corrección final de cualquier explicación mecanicista o hipótesis creída o divulgada en el presente documento, una realización de la invención puede, no obstante, ser operativa y útil.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. A) Activación *in vitro* de procaspasa-3 y caspasa-3 activa por PAC-1. PAC-1 activa la procaspasa-3 con una $CE_{50} = 0,22 \mu\text{M}$. Las barras de error representan desviaciones estándar de la media. B) Escisión de procaspasa-3 a caspasa-3 activa inducida por PAC-1. La procaspasa-3 se expresó de forma recombinante en *E. coli* con una etiqueta His-6 N-terminal y se purificó. La inmunotransferencia se realizó con un anticuerpo anti-His-6. En ausencia de PAC-1, no se observó maduración de procaspasa-3. En presencia de PAC-1 $100 \mu\text{M}$, la escisión para generar el fragmento p19 se observa dentro de 1 hora y $> 50 \%$ de escisión se observa después de 4 horas.

Figura 2. A) Activación de mutantes en la región de "cierre de seguridad" de procaspasa-3 por PAC-1. PAC-1 tiene una CE_{50} para la activación de $0,22 \mu\text{M}$ en procaspasa-3 de tipo silvestre (DDD), y los valores correspondientes de CE_{50} de $2,77 \mu\text{M}$ (DAD), $113 \mu\text{M}$ (DDA) y $131 \mu\text{M}$ (ADD) para determinados mutantes. B) PAC-1 activa la procaspasa-7 con una CE_{50} de $4,5 \mu\text{M}$. C) Dependencia del pH de la activación por PAC-1 de procaspasa-3. A pH bajo, el cierre de seguridad está "desactivado" y la procaspasa-3 se activa esencialmente al máximo. Las barras de error representan desviaciones estándar de la media.

Figura 3. PAC-1 induce apoptosis en células HL-60. A) Exposición a fosfatidilserina (medida por tinción con Anexina-V) después de un tratamiento de 20 horas con PAC-1 $100 \mu\text{M}$. B) Condensación de cromatina como se visualiza mediante tinción con Hoechst después de un tratamiento de 20 horas con PAC-1 $100 \mu\text{M}$.

Figura 4. A) Despolarización de la membrana mitocondrial (MMP, por sus siglas en inglés) y actividad similar a caspasa-3 en células HL-60 tratadas con etopósido $10 \mu\text{M}$. B) Despolarización de la membrana mitocondrial (MMP) y actividad similar a caspasa-3 en células HL-60 tratadas con PAC-1 $100 \mu\text{M}$. C) El tratamiento con PAC-1 ($100 \mu\text{M}$) induce una disminución rápida de la actividad PARP celular en células HL-60, consistente con una activación inmediata de la caspasa-3/-7 celular. Por el contrario, las células tratadas con etopósido ($10 \mu\text{M}$) muestran una disminución en la actividad PARP en puntos de tiempo mucho más tardíos. D) PAC-1 induce la muerte celular de una manera dependiente de procaspasa-3. Para varias líneas celulares de cáncer diversas, se determinaron los niveles de procaspasa-3 (por citometría de flujo) y se midió la CI_{50} de PAC-1 ($R^2 = 0,9822$). PAC-1 es bastante potente ($CI_{50} = 0,35 \mu\text{M}$) en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H226 que se sabe que tiene altos niveles de procaspasa-3, pero notablemente menos potente en los glóbulos blancos normales derivados de la médula ósea de un donante humano sano.

La Fig. 5A ilustra los niveles relativos de procaspasa-3 en células normales y cancerosas de varios pacientes.

La Fig. 5B ilustra los niveles de CI_{50} para PAC-1 en una variedad de tipos celulares que tienen una gama de niveles relativos de procaspasa-3.

La Fig. 5C ilustra el efecto del tratamiento de animales con PAC-1 sobre los resultados del crecimiento tumoral.

La Fig. 5D ilustra el efecto del tratamiento oral de animales con PAC-1 sobre los resultados del crecimiento tumoral.

La FIG. 5E ilustra los resultados de la progresión del cáncer en un modelo de cáncer de pulmón para grupos de tratamiento de control, PAC-1 y gefitinib (Iressa™; AstraZeneca). Se inyectaron células tumorales en ratones por administración i.v.; Iressa y PAC-1 se administraron por vía oral a 100 mg/kg .

La Fig. 6A ilustra los niveles relativos de procaspasa-3 en células normales y cancerosas de tres pacientes.

La Fig. 6B ilustra la sensibilidad de las células normales y cancerosas del Paciente 3 al tratamiento con PAC-1.

La Fig. 7 ilustra los resultados de la administración de PAC-1 por vía intraperitoneal en el contexto de un modelo de cáncer de pulmón en ratones.

Las Fig. 8A y 8B ilustran estructuras para compuestos de derivados de PAC-1 y una biblioteca combinatoria.

La Fig. 9 ilustra una secuencia de nucleótidos para caspasa 3 de *Homo sapiens*, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (CASP3), variante de transcripción alfa, ARNm (número de acceso NM_004346; ARNm lineal de 2689 pb; obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

La Fig. 10 ilustra una secuencia de nucleótidos para caspasa 7 de *Homo sapiens*, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (CASP7), variante de transcripción alfa, ARNm (número de acceso NM_001227; 2605 pb; ARNm lineal; obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se proporcionan para aclarar su uso específico en el contexto de la invención.

Cuando se usan en el presente documento, la expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a cualquier sustancia capaz de reducir o prevenir el crecimiento, la proliferación o la propagación de una célula cancerosa, una población de células cancerosas, tumores u otro tejido maligno. El término también pretende abarcar cualquier agente antitumoral o anticanceroso.

5 Cuando se usan en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" pretende abarcar contextos tales como una cantidad farmacéuticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en realizaciones, la cantidad es capaz de lograr un estado beneficioso, resultado beneficioso, actividad funcional en un ensayo de selección o mejora de una afección clínica.

10 Cuando se usan en el presente documento, la expresión "célula cancerosa" pretende abarcar definiciones como se entiende ampliamente en la técnica. En una realización, la expresión se refiere a una célula anormalmente regulada que puede contribuir a una afección clínica de cáncer en un ser humano o animal. En una realización, la expresión puede referirse a una línea celular o una célula cultivada dentro o derivada de un cuerpo humano o animal. Una célula cancerosa puede ser de una amplia variedad de tipos de células, tejidos u órganos diferenciados como se entiende en la técnica.

20 El término "alquilo" se refiere a un monorradical de hidrocarburo de cadena ramificada o no ramificada que preferentemente tiene de 1 a 22 átomos de carbono y a grupos cicloalquilo que tienen uno o más anillos que tienen de 3 a 22 átomos de carbono. Los grupos alquilo cortos son los que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, incluyendo grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo, incluyendo todos los isómeros de los mismos. Los grupos alquilo largos son los que tienen 8-22 átomos de carbono y preferentemente los que tienen 12-22 átomos de carbono, así como los que tienen 12-20 y los que tienen 16-18 átomos de carbono.

25 El término "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos de 3 a 22 átomos de carbono que tienen un único anillo cíclico o múltiples anillos condensados. Los grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo único, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclooctilo y similares, o estructuras de anillos múltiples tales como adamantanilo y similares.

30 El término "alquenilo" se refiere a un monorradical de un grupo hidrocarburo insaturado ramificado o no ramificado que preferentemente tiene de 2 a 22 átomos de carbono y a grupos cicloalquenilo que tienen uno o más anillos que tienen de 3 a 22 átomos de carbono en donde, al menos, un anillo contiene un doble enlace. Los grupos alquenilo pueden contener uno o más dobles enlaces (C=C) que pueden estar conjugados. Los grupos alquenilo preferidos son los que tienen 1 o 2 dobles enlaces. Los grupos alquenilo cortos son los que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, incluyendo grupos etileno, (vinil)propileno, butileno, pentileno y hexileno, incluyendo todos los isómeros de los mismos. Los grupos alquenilo largos son los que tienen 8-22 átomos de carbono y preferentemente los que tienen 12-22 átomos de carbono, así como los que tienen 12-20 átomos de carbono y los que tienen 16-18 átomos de carbono. El término "cicloalquenilo" se refiere a grupos alquenilo cíclicos de 3 a 22 átomos de carbono que tienen un único anillo cíclico o múltiples anillos condensados en los que, al menos un anillo contiene un doble enlace (C=C). Los grupos cicloalquenilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo único, tales como ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclooctenilo, ciclooctadienilo y ciclooctatrienilo.

45 El término "alquinilo" se refiere a un monorradical de un hidrocarburo insaturado que tiene preferentemente de 2 a 22 átomos de carbono y que tiene uno o más enlaces triples (C≡C). Los grupos alquinilo incluyen etinilo, propargilo y similares. Los grupos alquinilo cortos son los que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, incluyendo todos los isómeros de los mismos. Los grupos alquinilo largos son los que tienen 8-22 átomos de carbono y preferentemente los que tienen 12-22 átomos de carbono, así como los que tienen 12-20 y los que tienen 16-18 átomos de carbono.

50 El término "arilo" se refiere a un grupo que contiene un grupo carbocíclico aromático insaturado de 6 a 22 átomos de carbono que tiene un anillo único (por ejemplo, fenilo), uno o más anillos (por ejemplo, bifenilo) o múltiples anillos condensados (fusionados), en donde al menos un anillo es aromático (p. ej., naftilo, dihidrofenantrenilo, fluorenilo o antrilo). Los arilos incluyen fenilo, naftilo y similares. Los grupos arilo pueden contener porciones que son alquilo, alquenilo o alquinilo además de los anillos aromáticos insaturados. El término "alcarilo" se refiere a los grupos arilo que contienen porciones de alquilo, es decir, alquilen-arilo y alquilenarilo sustituido. Dichos grupos aralquilo se ejemplifican por bencilo, fenetilo y similares.

Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo están opcionalmente sustituidos como se describe en el presente documento (los términos pueden incluir variaciones sustituidas) y pueden contener 1-8 sustituyentes no de hidrógeno que dependen del número de átomos de carbono en el grupo y el grado de insaturación del grupo.

60 El término "alquilenilo" se refiere a un dirradical de una cadena de hidrocarburo saturada ramificada o no ramificada, que preferentemente tiene de 1 a 10 átomos de carbono, más preferentemente tiene 1-6 átomos de carbono y más preferentemente 2-4 átomos de carbono; el término puede incluir variaciones sustituidas. Este término se ejemplifica por grupos tales como metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-), más generalmente -(CH₂)_n-, donde n es 1-10 o más preferentemente 1-6 o n es 2, 3 o 4. Los grupos alquilenilo pueden estar ramificados. Los grupos alquilenilo pueden estar opcionalmente sustituidos. Los grupos alquilenilo pueden tener hasta dos sustituyentes no de hidrógeno por

átomos de carbono. Los grupos alquilenos sustituidos preferidos tienen 1, 2, 3 o 4 sustituyentes no de hidrógeno.

El término "arileno" se refiere al dirradical derivado de arilo (incluyendo arilo sustituido) como se define anteriormente y se ejemplifica por 1,2-fenileno, 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, 1,2-naftileno y similares.

El término "amino" se refiere al grupo -NH₂ o al grupo -NRR donde cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, heteroarilo y heterocíclico siempre que ambos R sean de no hidrógeno.

Los grupos alquilo están opcionalmente sustituidos como se analiza en el presente documento y pueden, dependiendo del tamaño del grupo alquilo, tener preferentemente 1-10 grupos sustituyentes. Los grupos alquilo sustituidos incluyen aquellos que portan de 1 a 8 sustituyentes, de 1 a 5 sustituyentes, de 1 a 3 sustituyentes y 1 o 2 sustituyentes.

Haloalquilo "se refiere a alquilo como se define en el presente documento sustituido por uno o más grupos halo como se define en el presente documento, que pueden ser iguales o diferentes. Los grupos haloalquilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, trifluorometilo, 3-fluorododecilo, 12,12,12-trifluorododecilo, 2-bromooctilo, 3-bromo-6-cloroheptilo y similares.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático de 2 a 22 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre dentro de al menos un anillo (si existe más de un anillo). Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos.

El término "heterociclo" y "heterocíclico" se refieren a monorradical de un grupo saturado o insaturado que tiene un único anillo o múltiples anillos condensados, de 2-22 átomos de carbono o de 1 a 6 heteroátomos, preferentemente de 1 a 4 heteroátomos, seleccionados de nitrógeno, azufre, fósforo, y/u oxígeno dentro de al menos un anillo. Los grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos.

El término "éster" se refiere a entidades químicas como se entiende en la técnica y en particular puede incluir grupos de la forma (RCO-).

En cuanto a cualquiera de los grupos anteriores que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, que dichos grupos no contienen ninguna sustitución o patrón de sustitución que sea poco práctica estéricamente y/o no factible sintéticamente. Los compuestos de la presente divulgación incluyen todos los isómeros estereoquímicos nuevos que surgen de la sustitución de estos compuestos divulgados.

La invención puede entenderse adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1. Compuestos activadores de procaspasa.

La mutación o la expresión aberrante de proteínas en la cascada apoptótica es un sello distintivo frecuente del cáncer. Estos cambios pueden evitar que se transmitan señales proapoptóticas a las caspasas ejecutoras, evitando así la muerte celular apoptótica y permitiendo la proliferación celular. La caspasa-3 y caspasa-7 son caspasas ejecutoras clave, que existen como zimógenos inactivos que se activan por señales cadena arriba. De manera importante, los niveles de expresión de procaspasa-3 son significativamente más altos en determinadas células cancerosas en relación con los controles no cancerosos. En este caso se indica la identificación de pequeñas moléculas que activan directamente la procaspasa-3 a caspasa-3 activa. Un compuesto particular, PAC-1, efectúa la activación *in vitro* con una CE₅₀ del orden de 220 nanomolar e induce apoptosis en una multitud de líneas celulares cancerosas.

A diferencia de muchos fármacos contra el cáncer conocidos, las células tratadas con PAC-1 muestran una activación inmediata de procaspasa-3, y se muestra que la toxicidad de PAC-1 es directamente proporcional a la cantidad de procaspasa-3 contenida en una célula. Por lo tanto, PAC-1 activa directamente la procaspasa-3 a caspasa-3 *in vivo*, permitiendo que este compuesto induzca la apoptosis incluso en células que tienen maquinaria apoptótica defectuosa. PAC-1 es la primera molécula pequeña que se sabe que activa directamente la procaspasa-3; la activación directa de caspasas ejecutoras es una nueva estrategia contra el cáncer que puede resultar beneficiosa en una variedad de cánceres, incluidos los muchos cánceres en los que la procaspasa-3 está regulada positivamente.

Se seleccionó una colección de aproximadamente 20.000 moléculas pequeñas estructuralmente diversas para determinar la capacidad de activar procaspasa-3 *in vitro*. La procaspasa-3 se expresó y purificó en *E. coli* (Roy et al., 2001). Se añadió procaspasa-3 (a una concentración de 50 ng/ml) a los pocillos de una placa de 384 pocillos, y los compuestos se añadieron a una concentración final de aproximadamente 40 μ M. Después, cada placa se incubó durante dos horas a 37 °C, después de lo cual se añadió el sustrato peptídico de caspasa-3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNa) a una concentración de 200 μ M. La formación del cromóforo de p-nitroanilina se siguió a 405 nm en el transcurso de dos horas.

De los compuestos evaluados, cuatro indujeron un aumento significativo sobre el fondo en la hidrólisis del sustrato

peptídico de caspasa-3. De esos cuatro, uno mostró un fuerte efecto dependiente de la dosis en la activación *in vitro* de procaspasa-3. Tal como se muestra en la Figura 1A, este primer compuesto activador de procaspasa (PAC-1) proporciona la activación semimáxima de procaspasa-3 a una concentración de 0,22 μM . Este compuesto no está simplemente aumentando la actividad de la caspasa-3 por sí mismo, ya que no tiene ningún efecto sobre la actividad catalítica de la enzima caspasa-3 completamente procesada (Figura 1A).

La procaspasa-3 tiene un prodominio N-terminal (restos 1-28), seguido de una subunidad grande (17 kDa) y una subunidad pequeña (12 kDa) que están separadas por un enlazador entre subunidades (Pop et al., 2003). *In vivo*, dos monómeros de procaspasa-3 se ensamblan para formar un homodímero catalíticamente inactivo que puede activarse mediante escisión en D175 en el enlazador entre subunidades. El papel preciso del prodominio no está claro, y se ha demostrado que la escisión en la región entre subunidades por sí sola es suficiente para la actividad catalítica completa (Stennicke, H. R. et al., 1998). Aunque la procaspasa-3 es catalíticamente competente, es altamente resistente a la autoactivación debido a la presencia del cierre de seguridad de 12 aminoácidos; sin embargo, cuando el cierre de seguridad está mutado se observa una autoactivación significativa de la procaspasa-3 (Roy et al., 2001). Los compuestos que interactúan con esta importante región reguladora o en otras posiciones pueden permitir la autoactivación de la procaspasa-3.

Para evaluar directamente la capacidad de PAC-1 para catalizar la autoactivación de la procaspasa-3, la proteína procaspasa-3 se incubó con PAC-1 100 μM para puntos de tiempo que varían de una a cinco horas. Como se muestra por la transferencia Western en la Figura 1B, PAC-1 induce la escisión de procaspasa-3 de una manera dependiente del tiempo, con un procesamiento > 50 % observado después de 4 horas. Por el contrario, la procaspasa-3 incubada en tampón no muestra prácticamente ninguna autoactivación durante el mismo lapso de tiempo. En un intento por determinar la región de procaspasa-3 con la que interacciona PAC-1, se realizaron sustituciones de alanina en la tríada clave de ácido aspártico en la región de cierre de seguridad, restos Asp179, Asp180 y Asp181. Todas las mutaciones en estas posiciones disminuyeron drásticamente la capacidad de PAC-1 para activar la procaspasa-3, con determinadas mutaciones más perjudiciales para la activación de la procaspasa-3 por PAC-1 (Figura 2A).

Al igual que la caspasa-3, la caspasa-7 también existe como un zimógeno inactivo que se activa por proteólisis. La caspasa-3 y caspasa-7 son ambas caspasas ejecutoras y tienen una homología de secuencia y estructural considerables (Denault, J.-B. et al., 2003). La procaspasa-7 también puede tener una región de cierre de seguridad similar, aunque solo tiene dos ácidos aspárticos en la tríada clave (Asp-Thr-Asp), en lugar de tres. Como lo indican los datos en la Figura 2B, PAC-1 también puede activar la procaspasa-7, aunque de una manera menos eficiente que su activación de procaspasa-3 (CE_{50} de 4,5 μM frente a 0,22 μM para la activación de procaspasa-3). La potencia de la activación de procaspasa-7 por PAC-1 es similar a su efecto sobre el mutante Asp-Ala-Asp de procaspasa-3 (CE_{50} = 2,77 μM). El efecto de PAC-1 se suprime a valores bajos de pH donde la procaspasa-3 sufre una autoactivación rápida (Figura 2C).

Se probó la capacidad de una molécula pequeña que activa la procaspasa-3 para inducir apoptosis en líneas celulares humanas, y se encontró que PAC-1 induce apoptosis en una variedad de líneas celulares cancerosas. En las células HL-60, la adición de PAC-1 conduce a una exposición considerable a fosfatidilserina en la membrana celular acompañada de una condensación de cromatina significativa (Figuras 3A y B). Además, el compuesto induce la escisión de PARP-1 (según lo evaluado por un ensayo de actividad PARP *in vivo*; Putt KS et al., 2005) y provoca la despolarización de la membrana mitocondrial (véase a continuación). También se observó una ampolla celular significativa por microscopía. Además, la toxicidad de PAC-1 podría suprimirse en presencia del inhibidor de caspasa z-VAD-fmk (datos no mostrados; véase Slee et al., 1996).

Si PAC-1 induce, de hecho, la apoptosis a través de la activación directa de procaspasa-3, el curso temporal de los eventos apoptóticos debe alterarse en relación con el observado con los agentes proapoptóticos de referencia. Se conoce bien que el etopósido induce apoptosis a través de la vía intrínseca; por lo tanto, la despolarización de la membrana mitocondrial va seguida por la activación de la procaspasa-3 en las células tratadas con etopósido. De hecho, en las células HL-60 tratadas con etopósido 10 μM , se observa la despolarización de la membrana mitocondrial, seguida de la detección de actividad similar a caspasa-3 (Figura 4A). Por el contrario, el tratamiento de las células con PAC-1 da un resultado muy diferente. Con PAC-1, el primer sello distintivo bioquímico observado de apoptosis es la actividad enzimática similar a caspasa-3. Esta actividad se observa a los pocos minutos de la adición del compuesto, y la activación del 50 % tiene lugar en poco más de 2 horas y mucho antes de cualquier despolarización significativa de la membrana mitocondrial (Figura 4B). Además, la actividad PARP se reduce rápidamente en células tratadas con PAC-1, mientras que esta reducción se observa en puntos de tiempo posteriores en células tratadas con etopósido (Figura 4C). Los experimentos de control muestran que PAC-1 no inhibe directamente la actividad enzimática de PARP-1. En la secuencia típica de eventos apoptóticos, la membrana mitocondrial se despolariza, se activan las caspasas y se escinden los sustratos de la caspasa (como PARP-1). La observación de que las células tratadas con PAC-1 muestran una rápida activación de caspasa-3/-7 (antes de la despolarización de la membrana mitocondrial) y una rápida escisión de un sustrato de caspasa es indicativo de que este compuesto ejerce su toxicidad celular a través de la activación directa de procaspasa-3.

Para definir adicionalmente la potencia de PAC-1, se evaluó la capacidad de este compuesto para inducir la muerte celular en líneas celulares de cáncer con niveles variables de procaspasa-3. Se determinó la cantidad de procaspasa-

3 presente en múltiples líneas celulares de cáncer (leucemia, linfoma, melanoma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer renal) y en los glóbulos blancos aislados de la médula ósea de un donante sano. Los valores de CI_{50} para la inducción de muerte celular se obtuvieron para PAC-1 en estas líneas celulares. Los datos combinados muestran una fuerte correlación entre la concentración celular de procaspasa-3 y la sensibilidad a PAC-1 (Figura 4D). De forma destacable, los glóbulos blancos procedentes de la médula ósea de un donante humano sano se encuentran entre aquellos con la menor cantidad de procaspasa-3, y PAC-1 es comparativamente menos tóxico para estas células. PAC-1 es más potente frente a la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H226, con una CI_{50} de 0,35 μ M. De acuerdo con los datos en la bibliografía (Svingen et al., 2004), los presentes inventores encontraron que esta línea celular tiene una concentración de procaspasa-3 que es mayor que cinco veces la del control no canceroso.

A diferencia de estos experimentos con PAC-1, el etopósido no mostró tal correlación entre la potencia en el cultivo celular y los niveles celulares de procaspasa-3. Por ejemplo, el etopósido fue ineficaz ($CI_{50} > 50 \mu$ M) en la inducción de la muerte en tres de las líneas celulares de melanoma (UACC-62, CRL-1872 y B16-F10), la línea celular de cáncer de mama (Hs 578t) y la línea celular de cáncer de pulmón (NCI-H226); teniendo estas líneas celulares niveles de procaspasa-3 de 1,0, 2,4, 1,9, 3,7 y 5,3, respectivamente. El etopósido fue eficaz ($CI_{50} < 1 \mu$ M) frente a HL-60, U-937, SK-N-SH y PC-12, que tienen niveles de procaspasa-3 de 4,3, 4,0, 4,7 y 4,4, respectivamente. Por consiguiente, en general no hay correlación entre los niveles de procaspasa-3 y la CI_{50} para el etopósido.

Las células cancerosas generalmente tienen una sensibilidad reducida a las señales proapoptóticas debido a la mutación o la expresión aberrante de una variedad de proteínas en la cascada apoptótica. Por tanto, muchos tipos de cáncer son notablemente resistentes no solo a las señales endógenas de muerte celular apoptótica, sino también a los agentes quimioterapéuticos que actúan a través de mecanismos similares. La regulación positiva paradójica de los niveles de expresión de procaspasa-3 en determinados tipos de cáncer proporciona una oportunidad de usar este conjunto intracelular de proteínas existente para inducir directamente la apoptosis, evitando así la porción cadena arriba de la cascada, a menudo no funcional o comprometida. Aunque la procaspasa-3 es conocida por su relativa incapacidad para sufrir autoactivación, depende de un cierre de seguridad de 12 aminoácidos para mantenerse en el estado inactivo. PAC-1 induce la autoactivación de la procaspasa-3 *in vitro*, y esta activación se ve muy disminuida por la mutación de la región clave de tri-aspartato del cierre de seguridad. Estos datos son consistentes con la noción de que PAC-1 está interfiriendo directamente con la capacidad del cierre de seguridad para mantener la latencia de procaspasa-3.

En el cultivo celular, el tratamiento con PAC-1 induce una actividad rápida similar a caspasa-3. Es probable que la escisión mediada por caspasa-3 de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, etc.) induzca después la despolarización de la membrana mitocondrial y amplifique la apoptosis. Además, la potencia de PAC-1 hacia una variedad de líneas celulares de cáncer es directamente proporcional a la concentración de procaspasa-3 en la célula. Vale la pena señalar que varias de las líneas celulares contra las que PAC-1 es eficaz tienen vías apoptóticas defectuosas que las hacen resistentes a la apoptosis; por ejemplo, la expresión de Apaf-1 disminuye drásticamente en las células SK-MEL-5 y Bcl-2 se sobreexpresa en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H226.

Los datos presentados en el presente documento respaldan completamente la idea de que los compuestos activadores de procaspasa-3 pueden ser extremadamente eficaces contra los cánceres comunes. La eficacia se puede potenciar para situaciones en las que los niveles de procaspasa-3 son aberrantemente altos.

La evaluación de los niveles de procaspasa-3 en biopsias de cáncer puede ser simple y rápida; por tanto, la posible eficacia de un compuesto tal como PAC-1 se puede evaluar a priori con un alto grado de precisión. Los activadores de procaspasa-3 y los métodos en el presente documento proporcionan estrategias de medicina personalizadas que pueden ser preferentes a las terapias que dependen de las citotoxinas generales en el ámbito de los tratamientos contra el cáncer.

50 MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: La resina Ni-NTA y el anticuerpo anti-Penta His Alexa Fluor 647 se adquirieron de Qiagen (Valencia, CA). El tinte Bradford se adquirió de Bio-Rad (Hercules, CA). Los dispositivos de transferencia de pin se adquirieron de V & P Scientific (San Diego, CA). El reactivo z-vad-fmk se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA). E. coli Rosetta se adquirió de Novagen (Madison, WI). El anticuerpo anti-caspasa-3 se adquirió de Sigma (St. Louis, MO). El conjugado de anexina V Alexa Fluor 488, JC-9 y yoduro de propidio se adquirieron de Molecular Probes (Eugene, OR). IPTG y el reactivo de ensayo de proliferación celular CellTiter 96 MTS/PMS se adquirieron de Promega (Madison, WI). El Suero Fetal Bovino se adquirió de Biomed (Foster City, CA). Las placas de microtitulación de 96 y 384 pocillos, portaobjetos de microscopio, cubreobjetos de microscopio, suero de caballo y todos los demás reactivos se adquirieron de Fisher (Chicago, IL).

Métodos: Condiciones de Cultivo Celular. Las células U-937, HL-60, CRL-1872, ACHN, NCI-H226, SK-MEL-5 y UACC-62 se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %. Las células SK-N-SH, B16-F10 y Hs 578t se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle con BSS de Earle, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio y se complementaron con FBS al 10 %. Las células PC-12 se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 5 % y suero de caballo al 10 %. La médula ósea humana se cultivó en IDMEM complementado con FBS al 40 %. Todas las líneas

celulares cultivadas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂, 95 % de aire. Las células U-937 y HL-60 se dividieron cada dos o tres días según fuera necesario. La médula ósea humana se descongeló del material congelado y se diluyó inmediatamente y se usó para los experimentos. Todas las demás células se dividieron cuando alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia.

5 Expresión y Purificación de Proteínas. Se sembró 1 ml de un cultivo nocturno de E. coli Rosetta que contenía el plásmido de expresión de procaspasa-3 o procaspasa-7 en 1 l de medio LB que contenía el antibiótico apropiado. Las células se indujeron con IPTG 1 mM durante 30 minutos. Las células se centrifugaron después y se volvieron a suspender en tampón de unión con NTA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Imidazol 10 mM, pH 7,9). Las células se lisaron pasando dos veces por una prensa francesa. El lisado celular se centrifugó después a 14.000 x g durante 30 min. El sobrenadante se decantó y se añadió 1 ml de resina de níquel-NTA. El lisado celular se incubó durante 1 hora a 4 °C. La resina se cargó en una columna, se lavó con 10 ml de tampón de unión con NTA seguido de 10 ml de tampón de lavado con NTA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Imidazol 20 mM, pH 7,9). Las proteínas se eluyeron en fracciones de 1 ml con 10 ml de tampón de elución con NTA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Imidazol 250 mM, pH 7,9). Se agruparon las fracciones que contenían proteína y se determinó la cantidad de proteína usando el ensayo Bradford.

20 Selección de bibliotecas. La procaspasa-3 aislada se diluyó a 50 ng/ml en tampón de ensayo de caspasa (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 0,1 mM, CHAPS al 0,1 % y glicerol al 10 %, pH 7,4). Se añadieron 45 µl de la solución de procaspasa-3 a cada pocillo de una placa de microtitulación de fondo plano Nunc de 384 pocillos. Se seleccionaron aproximadamente 20.000 compuestos. Alrededor de 6.000 de los compuestos se recogieron de varias fuentes dentro del departamento de química de la Universidad de Illinois; sus estructuras están disponibles en: <http://www.scs.uiuc.edu/~phgroup/comcollections.html>. Los otros aproximadamente 14.000 compuestos se adquirieron de Chembridge Corporation (San Diego, California). PAC-1 era un miembro de los compuestos adquiridos de Chembridge Corporation.

25 Los compuestos, constituidos como soluciones madre 10 mM en DMSO, se transfirieron a los pocillos utilizando un aparato de transferencia de 384 pines que transfiere 0,2 µl de compuesto. Esto produjo una concentración final de compuesto de aproximadamente 40 µM. Se realizaron controles en los que solo DMSO (que no contenía ningún compuesto) se transfirió con pines. Las placas se incubaron después durante 2 horas a 37 °C. Se añadieron a cada pocillo 5 µl de una solución 2 mM de Ac-DEVD-pNA (N-acetil-ASP-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida) en tampón de ensayo de caspasa. Después se leyó la placa cada 2 minutos a 405 nm durante 2 horas en un lector de placas Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale CA). La pendiente de la porción lineal para cada pocillo se usó para determinar la actividad de caspasa-3.

35 Curvas de activación. La dependencia de la dosis de los activadores de procaspasa-3 se determinó añadiendo varias concentraciones de compuesto a 90 µl de una procaspasa-3 de 50 mg/ml, caspasa-3 activa, procaspasa-7 o caspasa-7 activa en tampón de ensayo de caspasa en una placa de 96 pocillos. Las placas se incubaron después durante 12 horas a 37 °C. Se añadieron a cada pocillo 10 µl de una solución 2 mM de Ac-DEVD-pNA en tampón de ensayo de caspasa. Se leyó la placa cada 2 minutos a 405 nm durante 2 horas en un lector de placas Spectra Max Plus 384. Se determinó la pendiente de la porción lineal para cada pocillo y se calculó el factor de aumento en la activación de los pocillos de control no tratados.

45 Gel de activación de PAC-1. La procaspasa-3 se expresó y aisló exactamente como se describe anteriormente. La procaspasa-3 se diluyó a aproximadamente 50 µg/ml en tampón de ensayo de caspasa. La procaspasa-3 se incubó después en presencia o ausencia de PAC-1 100 µM durante tiempos variables a 37 °C. Después de esta incubación, se añadió un volumen igual de tampón de carga (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, SDS al 2 %, glicerol al 20 %, pH 8,0) a cada muestra de procaspasa-3. Todas las muestras se almacenaron después a -80 °C hasta que se completó el curso temporal. Todas las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 minutos y se ejecutaron en un gel SDS-PAGE al 12 %. Las proteínas se transfirieron después a papel de nitrocelulosa durante la noche. Las transferencias se lavaron en TTBS (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Tween -20 al 0,1 %, pH 7,4) y se bloquearon con una solución de leche al 10 % durante 2 horas. Después las transferencias se incubaron en una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-Penta His Alexa Fluor 647 durante 2 horas. Después se lavó la transferencia con TTBS y se exploró en un explorador de fluorescencia Typhoon (Amersham Biosciences, SunnyVale CA).

55 Mutaciones del cierre de seguridad. EL cierre de seguridad DDD de procaspasa-3 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO: 9) se mutó a ADD (SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:10), DAD (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 11 y DDA (SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12) usando la estrategia de cambio rápido con los siguientes cebadores,
gacagacagtggtgttgCGgatgacatggcgtgtcataaaatacc (SEQ ID NO:13),
gacagacagtggtgttgatgCtgacatggcgtgtcataaaatacc (SEQ ID NO:14) y
60 **gacagacagtggtgttgatgCcatggcgtgtcataaaatacc** (SEQ ID NO:15) respectivamente. Véanse también la Figura 9 y la Figura 10. Las bases mutadas están subrayadas y en mayúscula. Todos los plásmidos mutantes se secuenciaron para garantizar una secuencia adecuada en todo el gen. Todos los plásmidos mutantes se expresaron exactamente como procaspasa-3 de tipo silvestre como se describe anteriormente. La capacidad de PAC-1 para activar cada mutante de procaspasa-3 se determinó añadiendo varias concentraciones de PAC-1 a 90 µl de una procaspasa-3 de tipo silvestre y procaspasa-3 mutante de 50 ng/ml en tampón de ensayo de caspasa en una placa de 96 pocillos. Las placas se incubaron después durante 12 horas a 37 °C. Se añadieron a cada pocillo 10 µl de una solución 2 mM de

Ac-DEVD-pNA en tampón de ensayo de caspasa. Se leyó la placa cada 2 minutos a 405 nm durante 2 horas en un lector de placas Spectra Max Plus 384. Se determinó la pendiente de la porción lineal para cada pocillo y se calculó el factor de aumento en la actividad de cada mutante.

5 Efecto del pH sobre la activación por PAC-1 de procaspasa-3. El efecto del pH sobre la activación de procaspasa-3 por PAC-1 se determinó diluyendo procaspasa-3 en tampón de ensayo de caspasa de pH (MES 25 mM, Tris 25 mM, HEPES 25 mM, PIPES 25 mM, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 0,1 mM, CHAPS al 0,1 % y glicerol al 10 %) a una concentración de 50 ng/ml. Después se cambió el tampón a varios valores de pH y se añadieron 90 μ l a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadió PAC-1 a una concentración de 100 μ M o se añadió DMSO como control para cada valor de pH. Las placas se incubaron después durante 12 horas a 37 °C. Se añadieron a cada pocillo 10 μ l de una solución 2 mM de Ac-DEVD-pNA en tampón de ensayo de caspasa. La placa se leyó cada 2 minutos a 405 nm durante 2 horas en un lector de placas Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale CA). Se determinó la pendiente de la porción lineal para cada pocillo y se calculó el factor de aumento en la activación para cada valor de pH.

15 Tinción con Anexina V. Se añadieron 500 μ l de medio que contenía PAC-1 200 μ M o solo DMSO como control a los pocillos de una placa de 24 pocillos. Después se añadieron 500 μ l de células HL-60 a una concentración de 2×10^6 células/ml a la placa de 24 pocillos. La placa se incubó durante 20 horas a 37 °C. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces en PBS. Las células se lavaron después en tampón de unión a Anexina V (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4) y se resuspendieron en 100 μ l de tampón de unión a Anexina V. Se añadieron 5 μ l de conjugado anexina V, Alexa Fluor 488 y los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos protegidos de la luz. Después se añadieron 400 μ l de tampón de unión a Anexina V, seguido de la adición de 1 μ l de una solución de yoduro de propidio de 1 mg/ml. La intensidad fluorescente de cada célula se determinó por citometría de flujo a 525 nm (canal verde) y 675 nm (canal rojo). Se analizaron al menos 50.000 células en cada experimento.

30 Tinción de cromatina condensada. Se añadieron 500 μ l de medio que contenía PAC-1 200 μ M o solo DMSO como control a los pocillos de una placa de 24 pocillos. Después se añadieron 500 μ l de células HL-60 a una concentración de 2×10^6 células/ml a la placa de 24 pocillos. Las células se incubaron durante 20 horas y se cosecharon por centrifugación. Las células se lavaron después en tampón PBS seguido de la adición de etanol al 100 % enfriado en hielo. Las células se fijaron durante la noche a 4 °C. Las células fijas se incubaron con 2 μ g/ml de Hoechst-33258 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió una gota de células a un portaobjetos de microscopio y se cubrió con un cubreobjetos de grosor N.º 1. Se observó cromatina condensada con un aumento de 400x en un microscopio Zeiss Axiovert 100.

35 Inhibición de la muerte celular por z-vad-fmk. Se añadieron 100 μ l de células HL-60 a una concentración de 5×10^5 células/ml a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron durante 1 hora en presencia o ausencia de z-vad-fmk 100 μ M, un inhibidor de la caspasa pan permeable a las células. Después se añadió PAC-1 a diversas concentraciones, y las células se incubaron durante 24 horas adicionales. La muerte celular se cuantificó mediante la adición de 20 μ l del reactivo de ensayo de proliferación celular CellTiter 96 MTS/PMS a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 45 minutos hasta que se formó el producto coloreado. La absorbancia se midió después a 490 nm en un lector de placas Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

45 Determinación *in vivo* del potencial de la membrana mitocondrial. Se añadieron 1 ml de células HL-60 a una concentración de 1×10^6 células/ml a los pocillos de una placa de 24 pocillos. Después, se añadió PAC-1 a una concentración de 100 μ M o se añadió DMSO como control. Las células se incubaron varias veces y las células se cosecharon después por centrifugación. Las células se lavaron en PBS y después se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se añadieron 10 μ g de tinte JC-9 y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos protegidas de la luz. Las células se lavaron dos veces con PBS y se criaron en 500 μ l de PBS. La intensidad fluorescente de cada célula se determinó por citometría de flujo a 525 nm (canal verde) y 675 nm (canal rojo). Se analizaron 50.000 células en cada experimento. El cambio en el canal rojo se usó después para determinar la cantidad de despolarización de la membrana mitocondrial.

55 Determinación *in vivo* de actividad similar a caspasa-3. La cantidad de actividad proteasa similar a caspasa-3 se determinó por la cantidad de Ac-DEVD-pNA (N-acetil-ASP-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida) escindida por minuto mediante lisados celulares. Para conseguir esto, se añadieron 50 μ l de medio que contenía concentraciones variables de PAC-1 a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ l de células HL-60 a una concentración de 5×10^6 células/ml a la placa y se incubaron por varias veces. Después del período de incubación, la placa se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos para sedimentar las células. Las células se lavaron después con 100 μ l de PBS y se resuspendieron en 150 μ l de Tampón de Ensayo de Caspasa enfriado en hielo. Cada pocillo se sonicó después para lisar las células. Se transfirieron 90 μ l de lisado celular de cada pocillo a una nueva placa. Se añadió Ac-DEVD-pNA a cada pocillo para alcanzar una concentración final de 200 μ M. Después se leyó la placa cada 2 minutos a 405 nm durante 2 horas en un lector de placas Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale CA). Se determinó la pendiente de la porción lineal para cada pocillo y se calculó la cantidad de Ac-DEVD-pNA escindida por minuto.

65 Determinación *in vivo* de la escisión por PARP. La cantidad de escisión por PARP se determinó usando un ensayo de

actividad PARP in vivo. Para conseguir esto, se añadieron 50 µl de medio que contenía NAD⁺ 200 µM a los pocillos de control de una placa de 96 pocillos. Después se añadieron 50 µl de medio que contenía PAC-1 200 µM y NAD⁺ 200 µM a los pocillos experimentales. Después se añadieron 25 µl de células HL-60 a una concentración de 5 x 10⁶ células/ml a cada pocillo. Las células se incubaron varias veces y después se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos. El medio celular se eliminó y se reemplazó con 50 µl de tampón de lisis PARP (Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8,0, Tritón X-100 al 1 %) que contenía H₂O₂ 25 mM. La placa se incubó después durante 60 minutos a 37 °C. Para determinar la cantidad de NAD⁺ todavía presente, se añadieron 20 µl de KOH 2 M y 20 µl de una solución de acetofenona (en etanol) al 20 % (v/v) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. La placa se incubó después durante 10 minutos a 4 °C. Se añadieron 90 µl de una solución de ácido fórmico al 88 % (v/v) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. La placa se incubó después durante 5 min. en un horno a 110 °C. Se dejó enfriar la placa y después se leyó en un Criterion Analyst AD (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con una excitación de 360 nm, una emisión de 445 nm y un espejo dicróico de corte de 400 nm. El fluoróforo se excitó usando una lámpara continua de 1000 W para 1,6 x 10⁵ µs con 5 lecturas realizadas por pocillo. Después se calculó el número de moles de NAD⁺ escindidos por minuto y se determinó la actividad PARP restante en comparación con los pocillos de control.

Concentración relativa de procaspasa-3 en varias líneas celulares. Las células U-937, HL-60 y de médula ósea humana se cosecharon por centrifugación, mientras que todas las demás líneas celulares se tripsinizaron primero para liberar las células y después se cosecharon por centrifugación. Todas las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en 1 ml de etanol al 100 % enfriado en hielo. Las células se fijaron durante la noche a 4 °C. Las células se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos, se lavaron con PBS y después se añadieron 100 µl de una dilución 1:100 de anticuerpo anti-caspasa-3 en PBS. Las células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de cinco lavados con PBS. Las células se resuspendieron después en 1 ml de una dilución 1:10.000 de anticuerpo anti-Ab Cy3 de ratón marcado durante 2 horas a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las células se lavaron cinco veces con PBS y se resuspendieron en 500 µl de PBS. La intensidad fluorescente de cada célula se determinó por citometría de flujo a 675 nm (canal rojo). Se analizaron al menos 20.000 células en cada experimento. La mediana de la población se utilizó para determinar la concentración relativa de procaspasa-3 en cada línea celular.

Determinación de los valores de CI₅₀ en varias líneas celulares. se añadieron 50 µl de medio que contenía varias concentraciones de PAC-1 o etopósido a cada pocillo de una placa de 96 pocillos excepto a los pocillos de control, que contenían solamente DMSO. Las células U-937, HL-60 y de médula ósea humana se cosecharon por centrifugación, mientras que todas las demás líneas celulares se tripsinizaron primero antes de la centrifugación. Las células se resuspendieron después en medio y se diluyeron bien a 1 x 10⁶ células/ml para células U-937, HL-60 y de médula ósea humana o 50.000 células/ml para todas las demás líneas celulares. Después se añadieron 50 µl de las soluciones celulares a cada pocillo y las placas se incubaron durante 24 o 72 horas para etopósido y PAC-1 respectivamente. La muerte celular se cuantificó mediante la adición de 20 µl del reactivo de ensayo de proliferación celular CellTiter 96 MTS/PMS a cada pocillo. Las placas se incubaron después a 37 °C durante aproximadamente una hora hasta que se formó el producto coloreado. La absorbancia se midió a 490 nm en un lector de placas Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

Análisis de datos: Los datos de todos los experimentos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software Summit (Cytomation, Fort Collins CO). Todos los gráficos se analizaron usando la Tabla de Curva 2D.

El profesor Ronald Hoffman (Universidad de Illinois-Chicago Cancer Center) proporcionó médula ósea humana. El profesor Guy Salvesen (Instituto Burnham) proporcionó los vectores de expresión de procaspasa-3 y procaspasa-7.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS - Apéndice A. La información del listado de secuencias que se acompaña por separado, designada Apéndice A, debe considerarse e incorporarse como parte de la memoria descriptiva adjunta.

Tabla 1. Descripción General de la Información del Listado de Secuencias.

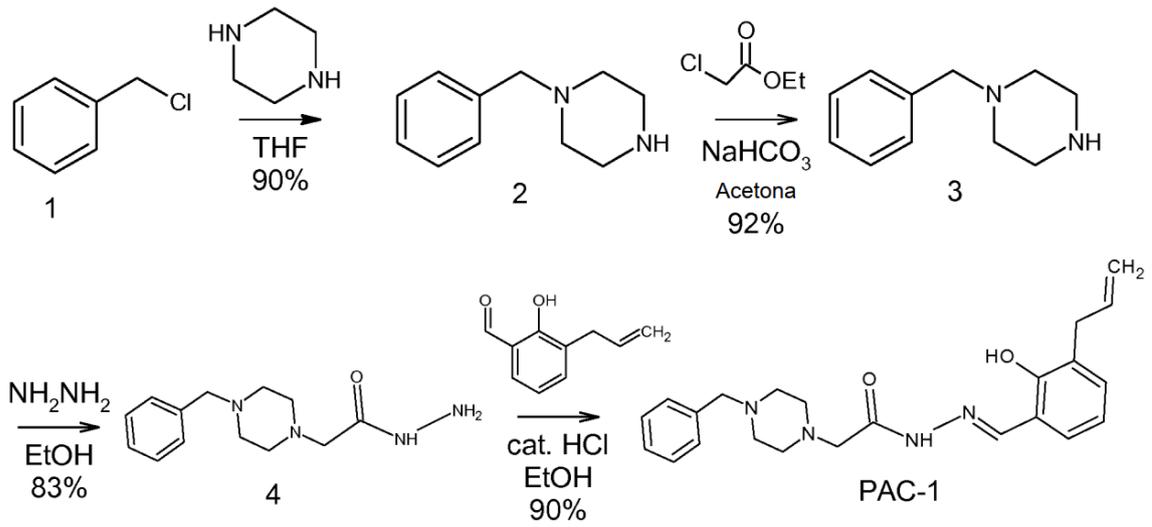
SEQ ID NO:	Breve Descripción	Tipo
1	Procaspsa-3; con secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre de aminoácidos DDD (Número de ACCESO NM_004346)	ADN/ARN
2	traducción automática	PRT
3	mutante ADD de procaspasa-3	ADN/ARN
4	traducción automática	PRT
5	mutante DAD de procaspasa-3	ADN/ARN
6	traducción automática	PRT
7	mutante DDA de procaspasa-3	ADN/ARN

(continuación)

SEQ ID NO:	Breve Descripción	Tipo
8	traducción automática	PRT
9	DDD de tipo silvestre de procaspasa-3	PRT
10	mutante ADD de procaspasa-3	PRT
11	mutante DAD de procaspasa-3	PRT
12	mutante DDA de procaspasa-3	PRT
13	cebador1 de PCR	ADN
14	cebador2 de PCR	ADN
15	cebador3 de PCR	ADN
16	Procaspasa-7 con secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre de aminoácidos DTD (Número de Acceso NM_001227)	ADN/ARN
17	traducción automática	PRT
18	Secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7	ADN/ARN
19	traducción automática	PRT
20	Cierre de seguridad de tipo silvestre DTD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A	ADN/ARN
21	traducción automática	PRT
22	Cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A	ADN/ARN
23	traducción automática	PRT
24	Procaspasa-7 con aminoácidos DTD	PRT
25	Secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7	PRT
26	Cierre de seguridad de tipo silvestre DTD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A	PRT
27	Cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A	PRT

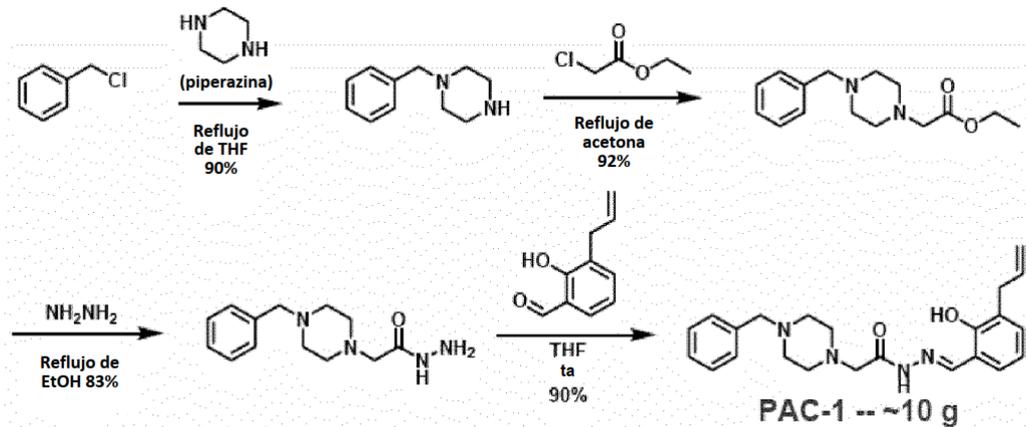
EJEMPLO 2. Síntesis de compuestos activadores de procaspasa.

- 5 PAC-1 y otros compuestos se preparan de acuerdo con los siguientes esquemas, por ejemplo, Esquema 1 y/o Esquema 2. Se preparan variaciones adicionales de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.



Esquema 1

En un ejemplo particular, PAC-1 se prepara de acuerdo con el Esquema 2:



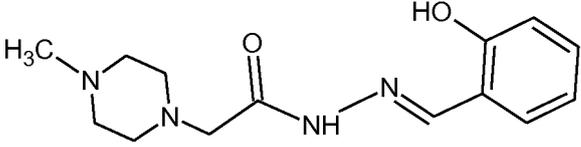
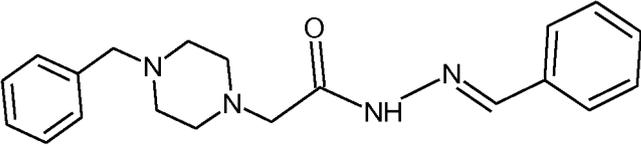
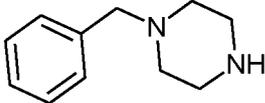
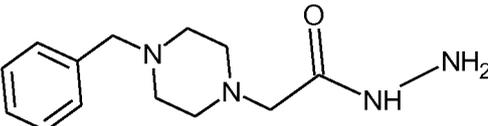
EJEMPLO 3. Análogos de PAC-1.

10 Se prepararon compuestos análogos de PAC-1 y se evaluó su capacidad para activar directamente la procaspasa-3 purificada *in vitro*.

Tabla 2. Actividad de PAC-1 y compuestos análogos.

Designación de Compuesto/Estructura	Estructura	Actividad
PAC-1		Activo
5		Activo

(continuación)

Designación de Compuesto/Estructura	Estructura	Actividad
6		Inactivo
7		Inactivo
2		Inactivo
4		Inactivo

EJEMPLO 4. Realizaciones farmacéuticas.

- 5 Lo siguiente describe información relevante para realizaciones farmacéuticas y farmacológicas y se complementa además con información en la técnica disponible para un experto en la materia. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et. al., en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Capítulo 1 p. 1).
- 10 Cabe señalar que el médico tratante sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad o disfunciones orgánicas, etc. Por el contrario, el médico tratante también sabría ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera adecuada (a la luz de o evitando aspectos de toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de interés puede variar según la gravedad de la afección que se va a tratar y la vía de administración. La gravedad de la afección puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, por medio
- 15 de métodos de evaluación de pronóstico convencionales. Además, la dosis y quizá la frecuencia de dosificación, también pueden variar de acuerdo con las circunstancias, por ejemplo, la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. Un programa comparable al analizado anteriormente se puede usar en medicina veterinaria.

20 Dependiendo de las condiciones específicas que se están tratando y del método de direccionamiento seleccionado, dichos agentes pueden formularse y administrarse sistémicamente o localmente. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en Alfonso y Gennaro (1995) y en otras partes de la técnica. Las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa o intestinal; suministro parenteral, que incluye inyecciones intramuscular, subcutánea o intramedular, así como administración intraocular, intratecal, intravenosa o intraperitoneal.

25 Para inyección u otras vías, los agentes de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, solución de Ringer, agua para inyección, tampón de solución salina fisiológica y otra solución. Para la administración transmucosa, se pueden usar en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Tales penetrantes se conocen

30 generalmente en la técnica.

También se divulga el uso de transportadores farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos divulgados en el presente documento en dosis adecuadas para administración sistémica u otra. Con la elección adecuada del transportador y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente divulgación, en particular las

35 formuladas como soluciones, pueden administrarse por vía parenteral, tal como por inyección intravenosa u otras vías. Los compuestos apropiados pueden formularse fácilmente usando transportadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración oral. Tales transportadores posibilitan que los compuestos se formulen como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, elixires, soluciones, suspensiones y similares, por ejemplo para su ingestión por un paciente que se va a tratar. Para otras vías, las

formulaciones se pueden preparar para cremas, pomadas, lociones y similares.

5 Los agentes destinados a administrarse intracelularmente pueden administrarse utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichos agentes pueden encapsularse en liposomas, en otros restos que facilitan la translocación de la membrana o en otros restos de direccionamiento; y después se administran como se describe anteriormente. Los liposomas pueden incluir bicapas lipídicas esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación de liposomas se pueden incorporar al interior acuoso. Los contenidos liposómicos están protegidos del microambiente externo y, debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, se suministran de manera eficiente al citoplasma celular. Además, debido a los atributos de hidrofobicidad, pueden administrarse pequeñas moléculas orgánicas directamente intracelularmente.

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en donde los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr la finalidad prevista. La determinación de las cantidades eficaces se encuentra claramente dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación proporcionada en el presente documento y otra información en la técnica.

20 Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, grageas, cápsulas o soluciones, incluidos los formulados para la liberación retardada o solamente para ser liberados cuando el producto farmacéutico llega al intestino delgado o grueso.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar de una manera que se conoce en sí misma, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolviendo, suspensión, granulación, preparación de grageas, levitación, emulsificación, encapsulación, inmovilización, liofilización y otros procesos.

30 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

40 Las preparaciones farmacéuticas para su uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

45 Los núcleos de grageas se proporcionan opcionalmente con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

50 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos mezclados con carga, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes.

60 **EJEMPLO 5. Inducción Directa de Apoptosis en Células Cancerosas con un Activador de Molécula Pequeña de Procaspa-3.**

65 **RESUMEN:** La mutación o la expresión aberrante de proteínas en la cascada apoptótica es un sello distintivo del cáncer. Estos cambios evitan que se transmitan señales proapoptóticas a las caspasas ejecutoras, evitando así la muerte celular apoptótica y permitiendo la proliferación celular. La caspasa-3 y caspasa-7 son las caspasas ejecutoras clave, que existen como zimógenos inactivos que se activan por señales cadena arriba. De manera importante, los

niveles de procaspasa-3 son significativamente más altos en determinadas células cancerosas en relación con los controles no cancerosos. En el presente documento se informa de la identificación de una molécula pequeña (PAC-1) que activa directamente la procaspasa-3 a caspasa-3 activa *in vitro* con una CE_{50} de 220 nanomolar e induce apoptosis en una variedad de líneas celulares de cáncer. A diferencia de muchos fármacos contra el cáncer conocidos, las células tratadas con PAC-1 muestran una activación inmediata de procaspasa-3, y se muestra que la eficacia de PAC-1 es proporcional a la cantidad de procaspasa-3 contenida en una célula. Los derivados de PAC-1 que no activan la procaspasa-3 *in vitro* tampoco tienen actividad proapoptótica. Las células cancerosas aisladas de tumores primarios de colon son considerablemente más sensibles a la inducción apoptótica por PAC-1 que las células del tejido adyacente no canceroso del mismo paciente; estas células cancerosas contienen en promedio aproximadamente 7 veces más procaspasa-3 que las células del tejido primario no canceroso adyacente. Además, la sensibilidad a PAC-1 de las células primarias de los tumores de cáncer de colon se correlaciona fuertemente con el nivel de la diana de procaspasa-3. Finalmente, PAC-1 como entidad única se mostró como activo para retardar el crecimiento de tumores en tres modelos diferentes en ratones, incluidos dos modelos en los que se administró PAC-1 por vía oral. Por lo tanto, PAC-1 activa directamente la procaspasa-3 a caspasa-3 *in vivo*, permitiendo así, que este compuesto induzca la apoptosis incluso en células que tienen maquinaria apoptótica defectuosa. PAC-1 es la primera molécula pequeña que se sabe que activa directamente la procaspasa-3; la activación directa de las caspasas ejecutoras es una estrategia contra el cáncer que puede resultar beneficiosa en los muchos tipos de cáncer en los que los niveles de procaspasa-3 son elevados.

INTRODUCCIÓN. Un sello distintivo del cáncer es la resistencia a las señales apoptóticas naturales. En función del tipo de cáncer, esta resistencia se debe generalmente bien a la regulación positiva o a la negativa de proteínas clave en la cascada apoptótica o a mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Tales cambios se producen tanto en la vía apoptótica intrínseca, que se canaliza a través de las mitocondrias y de la caspasa-9, como en la vía apoptótica extrínseca, que implica la acción de los receptores de muerte y de la caspasa-8. Por ejemplo, se han observado alteraciones en los niveles adecuados de p53, Bim, Bax, Apaf-1, FLIP y muchos otros en cánceres y conducen a una cascada apoptótica defectuosa, una en la que la señal proapoptótica cadena arriba no se transmite correctamente para activar las caspasas ejecutoras, caspasa-3 y caspasa-7. Como la mayoría de las vías apoptóticas implican en última instancia la activación de la procaspasa-3, estas anomalías genéticas son efectivamente "rupturas" en los circuitos apoptóticos, y como resultado, estas células proliferan sin control.

Dado el papel central de la apoptosis en el cáncer, se han realizado esfuerzos para desarrollar agentes terapéuticos que se dirijan a proteínas específicas en la cascada apoptótica. Por ejemplo, los aglutinantes peptídicos o de moléculas pequeñas a p53, a las proteínas de la familia Bcl o a los IAP tienen actividad proapoptótica, al igual que los compuestos que promueven la oligomerización de Apaf-1. Sin embargo, debido a que muchos de estos compuestos se dirigen a posiciones tempranas o intermedias en la cascada apoptótica, los cánceres con mutaciones en las proteínas cadena abajo probablemente sean resistentes a sus efectos. Para fines terapéuticos, sería ideal identificar una molécula pequeña que active directamente una proteína proapoptótica cadena abajo en la cascada apoptótica. Además, dicha una estrategia terapéutica podría tener una mayor probabilidad de éxito si los niveles de esta proteína fueran elevados en las células cancerosas.

La conversión de procaspasa-3 en caspasa-3 da como resultado la generación de la caspasa "ejecutora" activa que posteriormente cataliza la hidrólisis de una multitud de sustratos proteicos. La caspasa-3 activa es un homodímero de heterodímeros y se produce por proteólisis de procaspasa-3. *In vivo*, esta activación proteolítica ocurre generalmente a través de la acción de caspasa-8 o caspasa-9. Para garantizar que este zimógeno no se active prematuramente, la procaspasa-3 tiene un "cierre de seguridad" de triácido aspártico que bloquea el acceso al sitio de proteólisis IETD. Este cierre de seguridad permite que la procaspasa-3 resista la activación autocatalítica y la proteólisis por la caspasa-9. La posición del cierre de seguridad es sensible al pH; por lo tanto, tras la acidificación celular (como se produce durante la apoptosis), se cree que el cierre de seguridad permite el acceso al sitio de proteólisis, y la caspasa-3 activa puede producirse por la acción de la caspasa-9 o mediante un mecanismo de autoactivación.

Las células de determinados tipos de tejido canceroso tienen niveles elevados de procaspasa-3. Un estudio de aislados primarios de 20 pacientes con cáncer de colon reveló que, en promedio, la procaspasa-3 se elevó seis veces en dichos aislados en relación con el tejido adyacente no canceroso. Además, los niveles de procaspasa-3 están elevados en determinados neuroblastomas, linfomas y cánceres de hígado. De hecho, una evaluación sistemática de los niveles de procaspasa-3 en el grupo de 60 líneas celulares utilizado por el NCI reveló que los cánceres particulares de pulmón, melanoma, renal y de mama muestran niveles muy potenciados de procaspasa-3. Dada la importancia central de la caspasa-3 activa para la apoptosis exitosa, los altos niveles de procaspasa-3 en determinados tipos de células cancerosas, y la intrigante supresión de su autoactivación mediada por el cierre de seguridad, los presentes inventores razonan que podrían identificarse las pequeñas moléculas que activan directamente la procaspasa-3 y que tales moléculas podrían tener un gran potencial en la terapia dirigida contra el cáncer. En el presente texto original, los presentes inventores indican la identificación *in vitro* de un activador de molécula pequeña de procaspasa-3, **PAC-1**. PAC-1 es poderosamente proapoptótico en líneas celulares de cáncer de manera proporcional a los niveles de procaspasa-3, su efecto proapoptótico se debe a su activación directa e inmediata de procaspasa-3, y es eficaz contra aislados de cáncer de colon primario y en tres modelos diferentes de cáncer en ratones.

Se seleccionaron aproximadamente 20.500 moléculas pequeñas estructuralmente diversas por la capacidad de activar

procaspasa-3 *in vitro*. La procaspasa-3 se expresó y purificó en *E. coli* de acuerdo con procedimientos convencionales. Se añadió procaspasa-3 a los pocillos de una placa de 384 pocillos, y los compuestos se añadieron a una concentración final de aproximadamente 40 μM (la concentración final de procaspasa-3 fue 50 ng/ml). Después, cada placa se incubó durante dos horas a 37 °C, después de lo cual se añadió el sustrato peptídico de caspasa-3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNa) a una concentración de 200 μM . La formación del cromóforo de p-nitroanilina se siguió a 405 nm en el transcurso de dos horas. De los -20.500 compuestos evaluados, cuatro indujeron un aumento significativo sobre el fondo en la hidrólisis del sustrato peptídico de caspasa-3. De esos cuatro, uno mostró un fuerte efecto dependiente de la dosis en la activación *in vitro* de procaspasa-3. Tal como se muestra en la **Figura 1A**, este primer compuesto activador de procaspasa (**PAC-1**) proporciona la activación semimáxima de procaspasa-3 a una concentración de 0,22 μM . Este compuesto no está simplemente aumentando la actividad de la caspasa-3 por sí mismo, ya que no tiene ningún efecto sobre la actividad catalítica de la enzima caspasa-3 completamente procesada (**Figura 1A**).

La procaspasa-3 consiste en un prodominio N-terminal (restos 1-28), seguido de una subunidad grande (17 kDa) y una subunidad pequeña (12 kDa) que están separadas por un enlazador entre subunidades.²² *In vivo*, dos monómeros de procaspasa-3 se ensamblan para formar un homodímero que puede activarse mediante escisión en D175 en el enlazador entre subunidades. El papel preciso del prodominio no está claro, y se ha demostrado que la escisión en la región entre subunidades por sí sola es suficiente para la actividad catalítica completa. Aunque la procaspasa-3 tiene suficiente actividad catalítica para impulsar su propia maduración proteolítica, es altamente resistente a esta autoactivación debido a la presencia del cierre de seguridad de tres aminoácidos. Sin embargo, cuando el cierre de seguridad está mutado se observa una autoactivación significativa de la procaspasa-3. Para evaluar directamente la capacidad de **PAC-1** para catalizar la maduración de la procaspasa-3 a caspasa-3 activa, la proteína procaspasa-3 se incubó con **PAC-1** 100 μM para puntos de tiempo que varían de una a cinco horas. Como se muestra por la transferencia Western en la **Figura 1B**, **PAC-1** induce la escisión de procaspasa-3 de una manera dependiente del tiempo, con un procesamiento > 50 % observado después de 4 horas. Por el contrario, la procaspasa-3 incubada en tampón no muestra prácticamente ninguna autoactivación durante el mismo lapso de tiempo. **PAC-1** también fue eficaz en este ensayo a una concentración de 5 μM .

Se realizaron después sustituciones de alanina en la tríada clave de ácido aspártico en la región de cierre de seguridad de procaspasa-3, restos Asp179, Asp180 y Asp181. Todas las mutaciones en estas posiciones disminuyeron drásticamente la capacidad de **PAC-1** para activar la procaspasa-3, con determinadas mutaciones más perjudiciales para la activación de la procaspasa-3 por **PAC-1** (**Figura 2A**). Al igual que la caspasa-3, la caspasa-7 también existe como un zimógeno inactivo que se activa por proteólisis. La caspasa-3 y caspasa-7 son ambas caspasas ejecutoras y tienen una homología de secuencia y estructural considerables. La procaspasa-7 también se prevé que tenga una región de cierre de seguridad similar, aunque solo tiene dos ácidos aspárticos en la tríada clave (Asp-Thr-Asp), en lugar de tres. Como lo indican los datos en la **Figura 2B**, **PAC-1** también puede activar la procaspasa-7, aunque de una manera menos eficiente que su activación de procaspasa-3 (CE_{50} de 4,5 μM frente a 0,22 μM para la activación de procaspasa-3). La potencia de la activación de procaspasa-7 por **PAC-1** es similar a su efecto sobre el mutante Asp-Ala-Asp de procaspasa-3 (CE_{50} = 2,77 μM). Como cabía esperar, el efecto de **PAC-1** se suprime a valores bajos de pH donde la procaspasa-3 sufre una autoactivación rápida (**Figura 2C**).

Se encontró que **PAC-1** induce apoptosis en una variedad de líneas celulares de cáncer. En las células HL-60, la adición de **PAC-1** conduce a una exposición considerable a fosfatidilserina en la membrana celular acompañada de una condensación de cromatina significativa (**Figuras 3A, 3B**). Además, el compuesto induce la escisión del sustrato de caspasa **PARP-1** (según lo evaluado por un ensayo de actividad PARP *in vivo*) y provoca la despolarización de la membrana mitocondrial (véase a continuación). También se observó una ampolla celular significativa de células tratadas con **PAC-1** por microscopía. Además, la toxicidad de **PAC-1** podría suprimirse en la presencia del inhibidor de caspasa z-VAD-fmk.

Si **PAC-1** induce, de hecho, la apoptosis a través de la activación directa de procaspasa-3, entonces el curso temporal de los eventos apoptóticos debe alterarse en relación con el observado con los agentes proapoptóticos de referencia. Se conoce bien que el etopósido induce apoptosis a través de la vía intrínseca; por lo tanto, la despolarización de la membrana mitocondrial va seguida por la activación de la procaspasa-3 en las células tratadas con etopósido. De hecho, en las células HL-60 tratadas con etopósido 10 μM , se observa la despolarización de la membrana mitocondrial, seguida de la detección de actividad similar a caspasa-3 (**Figura 4A**). Por el contrario, el tratamiento de las células con **PAC-1** da un resultado muy diferente. Con este compuesto, el primer sello distintivo bioquímico observado de la apoptosis es la actividad enzimática similar a caspasa-3, con actividad observada a los pocos minutos de la adición de **PAC-1** y la activación del 50% tiene lugar en poco más de 2 horas y mucho antes de cualquier despolarización significativa de la membrana mitocondrial (**Figura 4B**). Además, la actividad **PARP-1** se reduce rápidamente en células tratadas con **PAC-1**, mientras que esta reducción se observa en puntos de tiempo posteriores en células tratadas con etopósido (**Figura 4C**); los experimentos de control muestran que **PAC-1** no inhibe directamente la actividad enzimática de **PARP-1**. En la secuencia típica de eventos apoptóticos, se despolariza la membrana mitocondrial, se activan las caspasas y se escinden los sustratos de la caspasa (como **PARP-1**). La observación de que las células tratadas con **PAC-1** muestran una rápida activación de caspasa-3/-7 (antes de la despolarización de la membrana mitocondrial) y una rápida escisión de un sustrato de caspasa (**PARP-1**) es indicativo de que **PAC-1** ejerce su toxicidad celular a través de la activación directa de procaspasa-3.

Para definir adicionalmente la potencia de **PAC-1**, se evaluó la capacidad de este compuesto para inducir la muerte celular en líneas celulares de cáncer con niveles variables de procaspasa-3. Primero se determinó los niveles de procaspasa-3 presentes en múltiples líneas celulares de cáncer (leucemia, linfoma, melanoma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer suprarrenal y cáncer renal). Los valores de CI_{50} para la inducción de muerte celular se obtuvieron para **PAC-1** frente a estas líneas celulares. Los datos combinados muestran una fuerte correlación entre la concentración celular de procaspasa-3 y la sensibilidad a **PAC-1** (**Figura 4D**, **Figura 4E**). **PAC-1** es más potente frente a la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H226, con una CI_{50} de 0,35 μ M. Los presentes inventores encontraron que esta línea celular tiene una concentración de procaspasa-3 que es mayor que cinco veces la de los niveles de referencia. De manera importante, hay una línea celular de cáncer (MCF-7, células de cáncer de mama) que se sabe que no tiene expresión de procaspasa-3. **PAC-1** prácticamente no tiene efecto sobre las células MCF-7, induciendo la muerte con una CI_{50} > 75 μ M.

Por el contrario, el etopósido no mostró tal correlación entre la potencia en el cultivo celular y los niveles celulares de procaspasa-3. Por ejemplo, el etopósido fue ineficaz (CI_{50} > 50 μ M) en la inducción de la muerte en tres de las líneas celulares de melanoma (UACC-62, CRL-1872 y B16-F10), la línea celular de cáncer de mama (Hs 578t) y la línea celular de cáncer de pulmón (NCI-H226); teniendo estas líneas celulares niveles de procaspasa-3 de 1,0, 2,4, 1,9, 3,7 y 5,3, respectivamente. El etopósido fue ineficaz (CI_{50} < 1 μ M) frente a HL-60, U-937, SK-N-SH y PC-12, que tienen niveles de procaspasa-3 de 4,3, 4,0, 4,7 y 4,4, respectivamente. Por consiguiente, en general no hay correlación entre los niveles de procaspasa-3 y la CI_{50} para el etopósido.

Se sintetizaron y evaluaron varios derivados de **PAC-1** tanto para determinar sus propiedades de activación de procaspasa-3 como sus efectos sobre las células cancerosas en cultivo celular (Tabla 3). El derivado de **PAC-1** que carece del grupo alilo (desalil PAC-1) es capaz de inducir la activación de procaspasa-3 y la muerte celular a niveles similares de **PAC-1**. Sin embargo, todos los demás derivados no mostraron actividad en ninguno de los ensayos. Por consiguiente, si bien parece que el grupo alilo es prescindible para la actividad biológica, el hidroxilo fenólico y los anillos aromáticos son todos críticos para la actividad de **PAC-1**. Estos datos también son consistentes con el mecanismo de acción propuesto de **PAC-1**; los compuestos que no activan la procaspasa-3 *in vitro* no tienen efecto proapoptótico sobre las células cancerosas en cultivo.

Para probar esta estrategia directa de activación de procaspasa-3 mediada por moléculas pequeñas en aislados clínicos de cáncer, los presentes inventores obtuvieron tumores de colon recién resecados (junto con tejido adyacente no canceroso) de 18 pacientes del Carle Foundation Hospital (Urbana, IL). El tejido canceroso y no canceroso se separó, y las células procedentes de estos se evaluaron para determinar sus niveles de procaspasa-3 y su sensibilidad a **PAC-1**. Tal como se muestra en la **Figura 5A**, en todos los casos, las células cancerosas tenían niveles elevados (1,7 a 17,2 veces, con una elevación promedio de 7,6 veces) de procaspasa-3 en relación con las células del tejido adyacente no canceroso del mismo paciente. Además, estas células cancerosas fueron bastante susceptibles a la inducción de muerte por **PAC-1**. **PAC-1** indujo la muerte celular en las células cancerosas primarias con valores de CI_{50} de 0,007-1,41 μ M, mientras que **PAC-1** indujo la muerte celular en el tejido adyacente no canceroso con valores de CI_{50} de 5,02-9,98 μ M (**Figura 5B** y Tabla 4). El tejido canceroso que tenía niveles elevados de procaspasa-3 fue extremadamente sensible a **PAC-1**. Por ejemplo, **PAC-1** indujo la muerte en las células cancerosas del paciente 17 con una CI_{50} de 7 nM, y estas células fueron más de 700 veces más sensibles a **PAC-1** que las células del tejido normal adyacente. Véase también la **Figura 6A** que muestra las concentraciones relativas de procaspasa-3 en muestras normales y cancerosas de los Pacientes 1, 2 y 3 durante un período de tiempo de aproximadamente 54 días; La **Figura 6B** ilustra que las células en el tejido canceroso pueden ser más de aproximadamente 80 veces más sensibles a **PAC-1** en comparación con el tejido normal.

Además de las células del tejido no canceroso de los 18 pacientes, **PAC-1** también se evaluó frente a otros cuatro tipos de células no cancerosas: glóbulos blancos aislados de la médula ósea de un donante sano, Hs888Lu (fibroblastos de pulmón), MCF-10A (fibroblastos de mama) y Hs578Bst (células epiteliales de mama). De forma destacable, los tipos de células no cancerosas se encuentran entre los que tienen la menor cantidad de procaspasa-3, y **PAC-1** es comparativamente menos capaz de inducir la muerte en estas células, con valores de CI_{50} de 3,2 - 8,5 μ M (**Figura 5B**, diamantes verdes). Como resulta evidente a partir de la **Figura 5B**, **PAC-1** induce la muerte en una amplia variedad de tipos celulares (líneas celulares no cancerosas, células primarias no cancerosas, líneas celulares cancerosas, células cancerosas primarias) de una manera directamente relacionada con el nivel de procaspasa-3. La elevación de la procaspasa-3 en las células cancerosas permite que **PAC-1** induzca selectivamente la muerte en estos tipos celulares.

PAC-1 se evaluó en un modelo de xenoinjerto de ratón usando un modo de liberación lenta de suministro de fármacos. En este modelo, se formaron tumores subcutáneos en ratones BALB/c (lampiños) atímicos hembra ovariectomizados utilizando la línea celular ACHN (cáncer renal). Una vez que se midió que los tumores eran mayores de aproximadamente 30 mm², se administró el fármaco mediante la implantación de un microgránulo de **PAC-1** y colesterol, proporcionando niveles lentos y constantes de liberación del compuesto. Se usaron tres grupos de ratones, con microgránulos que contenían 0 mg, 1 mg y 5 mg de **PAC-1**, seis ratones por grupo, con cuatro tumores por ratón. Se monitorizaron los tamaños de los tumores durante aproximadamente 8 semanas. Tal como se muestra en la **Figura 5C**, el crecimiento tumoral se retarda significativamente en los ratones que se implantaron con el microgránulo que

5 contenía 5 mg de **PAC-1**. La evaluación de la ingesta de alimentos en la última semana del experimento no mostró diferencias en el consumo de alimentos entre los tres grupos de ratones. Después de sacrificar a los ratones, se tomaron muestras de plasma de cada ratón y se analizó el contenido de **PAC-1** de cada uno. Para los ratones que recibieron un microgránulo de 5 mg de **PAC-1**, este análisis reveló que **PAC-1** estaba presente a una concentración de 5 nM en el plasma después del experimento de 54 días.

10 **PAC-1** se evaluó en un segundo modelo de xenoinjerto de ratón, utilizando este la administración oral como el modo de suministro del fármaco. En este modelo, se formaron tumores de xenoinjerto subcutáneo en ratones BALB/c-nu/nu atímicos macho (5 semanas de edad, SLC, Hamamaysu, Japón) utilizando la línea celular NCI-H226 (cáncer de pulmón), ocho ratones por grupo, tres tumores por ratón. Después de la formación de los tumores en los ratones, los ratones se trataron con **PAC-1** mediante sonda oral una vez al día durante 21 días a una concentración de 0, 50 o 100 mg/kg y se sacrificaron 1 semana después. Tal como se indica claramente en el gráfico de la **Figura 5D**, la administración oral de **PAC-1** retrasa significativamente el crecimiento del tumor de una manera dependiente de la dosis.

15 Finalmente, **PAC-1** se evaluó en un modelo de ratón donde las células NCI-H226 se inyectaron en ratones BALB/c-nu/nu atímicos macho mediante inyección en la vena de la cola. El experimento total duró 28 días; los ratones se trataron una vez al día con **PAC-1** (100 mg/kg) mediante sonda oral en los días 1-4 y 7-11. En los otros días, los ratones no recibieron **PAC-1**. Un segundo grupo de ratones recibió solamente vehículo. Después de 28 días, se sacrificaron los ratones y se examinaron sus pulmones. Tal como se muestra en la **Figura 5E**, existe una clara diferencia entre el pulmón del ratón de control (con una evidente masa tumoral gris) y el pulmón del ratón tratado con **PAC-1**. Los resultados también se muestran en un grupo de un animal tratado con gefitinib (Iressa™; AstraZeneca).

25 Las células cancerosas generalmente tienen una sensibilidad reducida a las señales proapoptóticas debido a la mutación o la expresión aberrante de una variedad de proteínas en la cascada apoptótica. Por tanto, muchos tipos de cáncer son notablemente resistentes no solo a las señales endógenas de muerte celular apoptótica, sino también a los agentes quimioterapéuticos que actúan a través de mecanismos similares. La elevación paradójica de los niveles de procaspasa-3 en determinados tipos de cáncer proporciona la oportunidad de utilizar este conjunto intracelular de proteínas existente para inducir directamente la apoptosis, evitando así la porción de la cascada cadena arriba, con frecuencia no funcional. **PAC-1** induce la autoactivación de procaspasa-3 *in vitro*. En el cultivo celular, el tratamiento con **PAC-1** induce una actividad rápida similar a caspasa-3. Es probable que la escisión mediada por caspasa-3 de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, etc.) induzca después la despolarización de la membrana mitocondrial y amplifique la apoptosis. Además, la potencia de **PAC-1** hacia una variedad de tipos de células cancerosas y no cancerosas es proporcional a la concentración de procaspasa-3 en la célula. Como las células cancerosas primarias aisladas de los tumores de colon resecaados tienen niveles elevados de procaspasa-3, estas células son considerablemente más sensibles a **PAC-1** que las células del tejido adyacente no canceroso. Vale la pena señalar que varias de las líneas celulares contra las que **PAC-1** es eficaz tienen vías apoptóticas defectuosas que las hacen resistentes a la apoptosis; por ejemplo, la expresión de Apaf-1 disminuye drásticamente en las células SK-MEL-5 y Bcl-2 se sobreexpresa en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H226. Finalmente, **PAC-1** es eficaz en tres modelos diferentes de cáncer en ratones, incluidos dos en los que **PAC-1** se administra por vía oral.

45 Los datos presentados en el presente documento apoyan la noción de que los compuestos activadores de procaspasa-3 pueden ser extremadamente eficaces contra una variedad de cánceres comunes en los que los niveles de procaspasa-3 son aberrantemente altos. La evaluación de los niveles de procaspasa-3 en biopsias de cáncer es simple y rápida; por tanto, la posible eficacia de un compuesto tal como **PAC-1** se puede evaluar *a priori* con un alto grado de precisión. Dichas estrategias de medicina personalizada pueden ser preferentes a las terapias que dependen de las citotoxinas generales y pueden ser valiosas en la terapia contra el cáncer.

50 El profesor Guy Salvesen (Instituto Burnham) proporcionó los vectores de expresión de procaspasa-3 y procaspasa-7.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

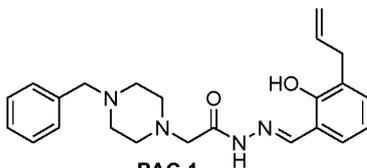
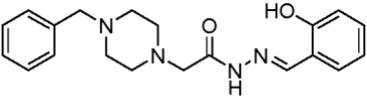
55 **Figuras 1 y 2.** La estructura de **PAC-1** se muestra en otra parte de la memoria descriptiva. **Fig. 1A)** Activación *in vitro* de procaspasa-3 y caspasa-3 activa por **PAC-1**. **PAC-1** activa la procaspasa-3 con una $CE_{50} = 0,22 \mu M$. **Fig. 1B)** Escisión de procaspasa-3 a caspasa-3 activa inducida por **PAC-1**. La procaspasa-3 se expresó de forma recombinante en *E. coli* con una etiqueta His-6 N-terminal y se purificó. La inmunotransferencia se realizó con un anticuerpo anti-His-6. En ausencia de **PAC-1** no se observa maduración de procaspasa-3. En presencia de **PAC-1** 100 μM , la escisión para generar el fragmento p19 se observa dentro de 1 hora y > 50 % de escisión se observa después de 4 horas. **PAC-1** también es eficaz a 5 μM en este ensayo. **Fig. 2A)** Activación de mutantes en la región de "cierre de seguridad" de procaspasa-3 por **PAC-1**. **PAC-1** tiene una CE_{50} para la activación de 0,22 μM en procaspasa-3 de tipo silvestre (DDD), y los valores correspondientes de CE_{50} de 2,77 μM (DAD), 113 μM (DDA) y 131 μM (ADD) para los mutantes. **Fig. 2B)** **PAC-1** activa la procaspasa-7 con una CE_{50} de 4,5 μM . **Fig. 2C)** Dependencia del pH de la activación por **PAC-1** de procaspasa-3. A pH bajo, el cierre de seguridad está desactivado y la procaspasa-3 se activa esencialmente al máximo. Las barras de error representan desviaciones estándar de la media.

Figuras 3 y 4. PAC-1 induce apoptosis en células HL-60. Fig. 3A) Exposición a fosfatidilserina (medida por tinción con Anexina-V) después de un tratamiento de 20 h con **PAC-1** 100 μM . **PAC-1** también es eficaz a 5 μM en este ensayo (véase **Figura 2** de apoyo). **Fig. 3B)** Condensación de cromatina como se visualiza mediante tinción con Hoechst después de un tratamiento de 20 h con **PAC-1** 100 μM . **Fig. 4A)** Despolarización de la membrana mitocondrial (MMP) y actividad similar a caspasa-3 en células HL-60 tratadas con etopósido 10 μM . **Fig. 4B)** Despolarización de la membrana mitocondrial (MMP) y actividad similar a caspasa-3 en células HL-60 tratadas con **PAC-1** 100 μM . **Fig. 4C)** El tratamiento con **PAC-1** (100 μM) induce una disminución rápida de la actividad PARP celular en células HL-60, consistente con una activación inmediata de la caspasa-3/-7 celular. Por el contrario, las células tratadas con etopósido (10 μM) muestran una disminución en la actividad PARP en puntos de tiempo mucho más tardíos. **Fig. 4D y Fig. 4E)** **PAC-1** induce la muerte celular de una manera dependiente de procaspasa-3. Para varias líneas celulares de cánceres diversas, se determinaron los niveles de procaspasa-3 (por citometría de flujo con un anticuerpo para procaspasa-3) y se midió la CI_{50} de **PAC-1** (a través de un tratamiento de 72 h con un intervalo de concentraciones de **PAC-1** y cuantificación usando el ensayo MTS). **PAC-1** es bastante potente ($\text{CI}_{50} = 0,35 \mu\text{M}$) en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H226 que se sabe que tiene altos niveles de procaspasa-3. Las barras de error representan desviaciones estándar de la media.

Tabla 3. PAC-1 y desalil PAC-1 activan la procaspasa-3 in vitro e inducen la muerte en células cancerosas en cultivo celular, pero otros análogos estructurales no tienen efecto activador de procaspasa-3 in vitro y no dan inducción de muerte en cultivo celular.

Figura 5. Fig. 5A) Los niveles de procaspasa-3 son elevados en células derivadas de tejido de cáncer de colon recién resecado. Se obtuvieron tumores primarios de colon recién resecados (junto con tejido adyacente no canceroso) de 18 pacientes diferentes, se separaron el tejido canceroso y no canceroso y se midieron los niveles de procaspasa-3 para cada uno usando un anticuerpo contra procaspasa-3 y citometría de flujo. En promedio, las células del tejido canceroso tienen una elevación de 7,6 veces en procaspasa-3 en comparación con las células derivadas de tejido adyacente no canceroso del mismo paciente. **Fig. 5B)** **PAC-1** induce la muerte celular de manera proporcional al nivel celular de procaspasa-3. Los círculos rojos representan las células cancerosas primarias de los 18 tumores de colon. Los triángulos negros representan las mismas líneas celulares de cáncer representadas en la **Figura 4D**. Los diamantes verdes son cuatro tipos de células no cancerosas: Hs888Lu (fibroblastos de pulmón), MCF-10A (fibroblastos de mama), Hs578Bst (células epiteliales de mama) y glóbulos blancos aislados de la médula ósea de un donante sano. Los cuadrados azules son las células no cancerosas primarias aisladas de los márgenes tumorales de los 18 pacientes. **Tabla 4)** Las células derivadas de tejido primario de cáncer de colon son considerablemente más sensibles a la inducción de muerte por **PAC-1** que las células derivadas de tejido adyacente no canceroso del mismo paciente. **Fig. 5C)** **PAC-1** reduce el crecimiento de tumores en un modelo de xenoinjerto de cáncer. Los tumores se formaron con la línea celular ACHN (cáncer renal) mediante inyección subcutánea, con seis ratones en cada grupo y cuatro tumores por ratón. Una vez que los tumores crecieron aproximadamente 30 mm^2 , se implantó **PAC-1** como un microgránulo de colesterol. Las barras de error representan error estándar de la media. **Fig. 5D)** La administración oral de **PAC-1** retrasa significativamente el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto en ratones. Los tumores se formaron usando la línea celular NCI-H226 (cáncer de pulmón) mediante inyección subcutánea, ocho ratones en cada grupo y tres tumores por ratón. Se administró **PAC-1** o vehículo una vez al día por sonda oral en los días 1-21. Las barras de error representan error estándar de la media. **Fig. 5E)** La administración oral de **PAC-1** retrasa significativamente el crecimiento del tumor en un modelo de inyección i.v. Los ratones se inyectaron i.v. con la línea celular NCI-H226 (cáncer de pulmón). Los ratones se trataron con **PAC-1** (100 mg/kg) por sonda oral siguiendo el protocolo como se describe en el presente texto. Las imágenes muestran los pulmones de los ratones que no recibieron **PAC-1** y tienen una gran cantidad de masa tumoral gris en el pulmón. Por el contrario, los ratones que recibieron **PAC-1** casi no tienen materia gris visible.

Tabla 3. Compuestos seleccionados que indican niveles de actividad.

Compuesto	CE_{50} (μM) para activación de procaspasa-3	CI_{50} (μM) para inducción de muerte en células HL-60
 <p>PAC-1</p>	0,22	0,92
 <p>desalil PAC-1</p>	0,43	1,74

(continuación)

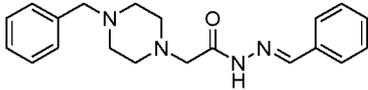
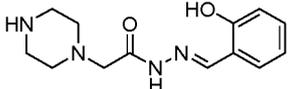
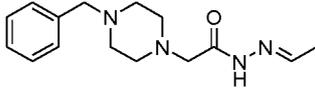
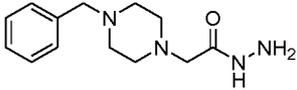
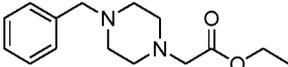
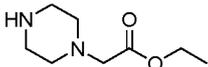
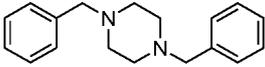
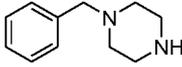
Compuesto	CE ₅₀ (μM) para activación de procaspasa-3	CI ₅₀ (μM) para inducción de muerte en células HL-60
	> 50	> 100
	> 50	> 100
	> 50	> 100
	> 50	> 100
	> 50	> 100
	> 50	> 100
	> 50	> 100
	> 50	> 100

Tabla 4. Niveles de concentración de actividad de PAC-1 en pacientes.

Paciente	PAC-1, CI ₅₀ μM	
	Normal	Cancerosa
1	6,78	0,212
2	9,79	0,154
3	6,61	0,080
4	9,50	0,340
5	6,88	0,216
6	6,28	0,020
7	7,34	0,422
8	5,67	0,045
9	6,54	0,844
10	9,98	0,017
11	5,94	1,030
12	5,63	0,052
13	5,50	0,499

(continuación)

Paciente	PAC-1, CI_{50} μ M	
	Normal	Cancerosa
14	7,58	0,366
15	5,96	0,106
16	5,02	0,527
17	5,17	0,007
18	6,39	1,410

EJEMPLO 6. Prueba de PAC-1 en modelo de cáncer de pulmón en ratones.

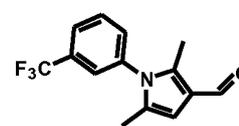
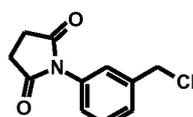
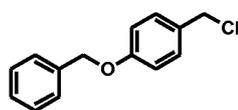
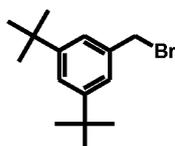
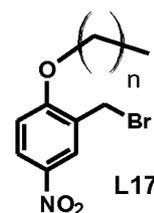
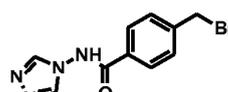
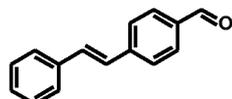
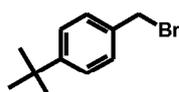
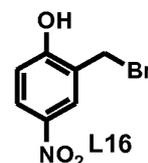
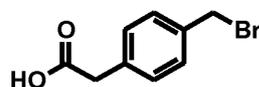
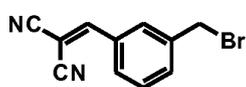
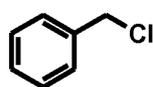
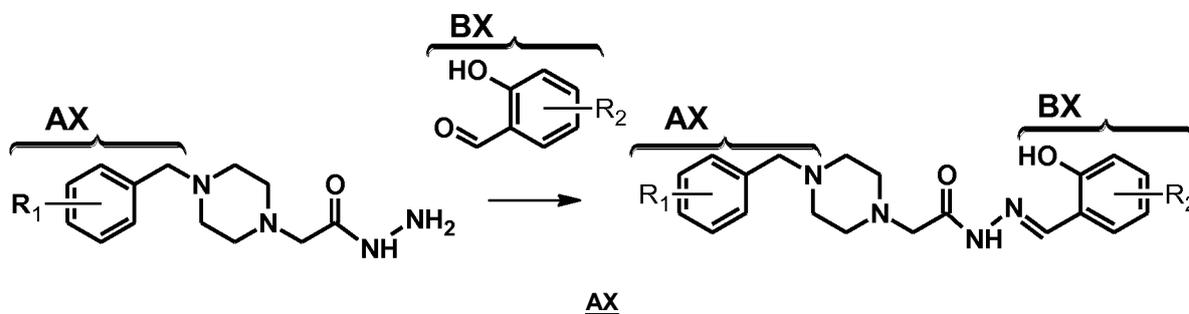
5 Se empleó un modelo de xenoinjerto usando células NCI-H226 (cáncer de pulmón). PAC-1 se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a 10 mg/kg. Se realizó una comparación de eficacia con gefitinib (Iressa™; AstraZeneca, Wilmington, Delaware) a 40 mg/kg utilizando 5 ratones por grupo. Los resultados se muestran en la **Figura 7**, indicando que PAC-1 estaba asociado con la reducción del crecimiento en el volumen tumoral.

10 EJEMPLO 7. Derivados combinatorios, síntesis y uso terapéutico.

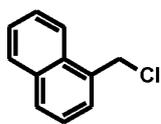
Se preparan varios compuestos como derivados de la estructura de PAC-1. Se hace reaccionar un grupo hidrazida con un grupo aldehído para producir una biblioteca combinatoria de compuestos derivados.

15 Se usa uno cualquiera de los grupos precursores de hidrazida (AX) designado L1-L20 para generar hidrazidas que se hacen reaccionar con uno cualquiera de los grupos aldehído (BX) designado 1-28, dando así 560 compuestos derivados de PAC-1. Un compuesto derivado se sintetiza usando métodos como se describe en el presente documento y de acuerdo con el conocimiento disponible en la técnica. Véase el esquema y las estructuras de componentes a continuación, además de las **Figuras 8A y 8B**.

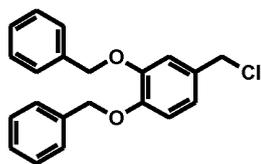
20



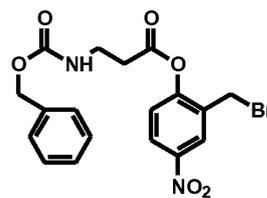
25



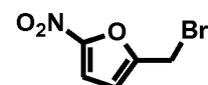
L4



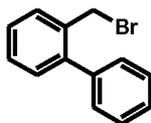
L9



L14



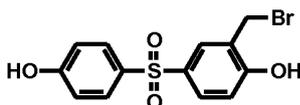
L19



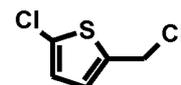
L5



L10

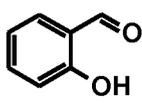


L15

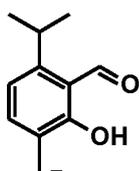


L20

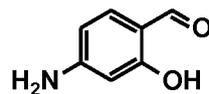
BX



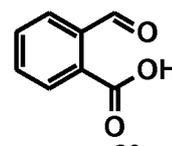
1



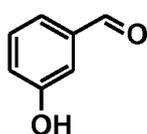
7



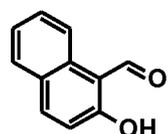
13



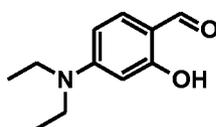
20



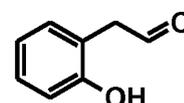
2



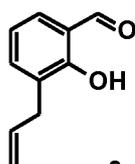
8



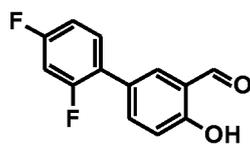
14



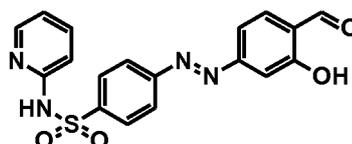
21



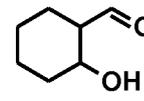
3



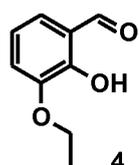
9



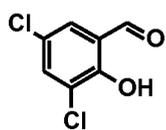
15



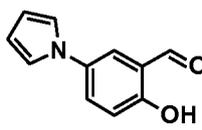
22



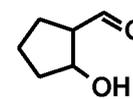
4



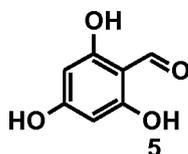
10



16



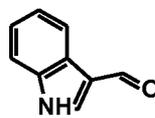
23



5



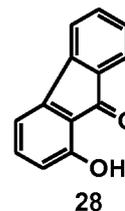
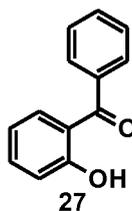
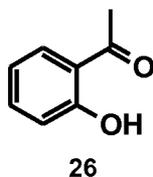
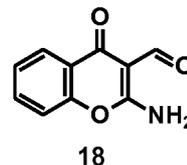
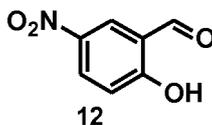
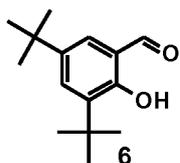
11



17



24



5 En una realización, dichos compuestos derivados se modifican adicionalmente, por ejemplo, alterar una propiedad como actividad, solubilidad, toxicidad, estabilidad y/u otras propiedades en relación con aplicaciones farmacéuticas.

10 Los compuestos derivados se usan como agentes anticancerosos. Los compuestos se validan como capaces de tener actividad antineoplásica, regulación de apoptosis y/o activación de procaspasa-3. Por ejemplo, se usan aislados primarios del cáncer de colon recién extirpado para evaluar los niveles de procaspasa-3 y la sensibilidad de las células a los niveles de compuestos de prueba, donde un compuesto de prueba es PAC-1 o un compuesto derivado. Los compuestos se clasifican en función de la propensión a inducir la muerte celular en células cancerosas frente a células normales.

15 En la evaluación adicional de un compuesto derivado, se realizan pruebas *in vitro* e *in vivo*. Se evalúa la estabilidad en relación con la exposición a los microsomas hepáticos.

20 **EJEMPLO 8. Actividad de determinados derivados relativos a PAC-1.**

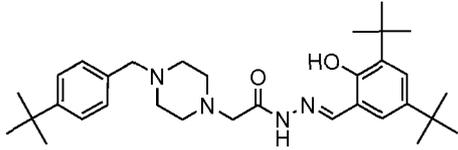
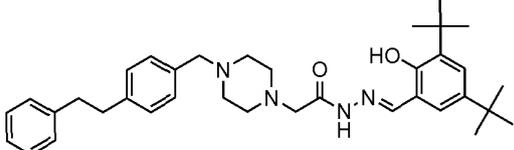
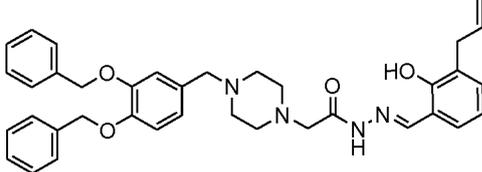
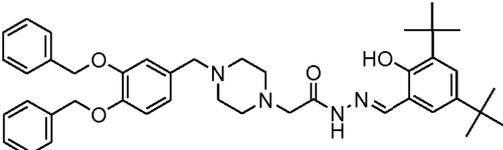
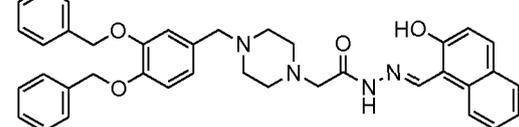
PAC-1 y determinados derivados se probaron en la línea celular HL-60 y se determinaron los valores de CI_{50} . Los resultados se indican en la Tabla 5 (donde las designaciones L y R se refieren a las estructuras que se muestran en las series AX y BX anteriores, respectivamente). Varios de los derivados de PAC-1 mostraron un nivel de actividad que generalmente era aproximadamente un orden de magnitud mayor que el del compuesto PAC-1.

25

Tabla 5.

NOMBRE	ESTRUCTURA	CI_{50} frente a HL-60	Factor mejor que PAC-1
PAC-1 L01R03		54,6 uM	1,0
L01R06		5,63 uM	9,7 veces
L02R03		4,34 uM	12,6 veces

(continuación)

NOMBRE	ESTRUCTURA	Cl ₅₀ frente a HL-60	Factor mejor que PAC-1
L02R06		6,53 uM	8,4 veces
L08R06		5,31 uM	10,3 veces
L09R03		4,82 uM	11,3 veces
L09R06		4,17 uM	13,1 veces
L09R08		2,42 uM	22,6 veces

5 Cuando los términos "que comprenden", "comprende", "comprendido/a" o "que comprende" se usan en el presente documento, deben interpretarse como que especifican la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados mencionados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes o grupos de los mismos adicionales. Las realizaciones separadas de la invención también pretenden abarcar en donde los términos "que comprende" o "comprende(n)" o "comprendido" se reemplazan opcionalmente con los términos, análogos en gramática, por ejemplo; "que consiste/consiste(n)" o "que consiste esencialmente en/consiste(n) esencialmente en" para describir de ese modo realizaciones adicionales que no son necesariamente coextensivas. Para aclarar, como se usa en el presente documento "que comprende" es sinónimo de "que tiene" "que incluye", "que contiene", o "caracterizado por", y es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas del método adicionales no enumerados. Como se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, componente o ingrediente no especificado en el elemento de las reivindicaciones. Como se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación (por ejemplo, que no afecten a un principio activo). En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede reemplazarse por cualquiera de los otros dos términos. La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento puede ponerse en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se divulguen de forma específica en el presente documento.

15 La invención se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Un experto en la materia apreciará que las composiciones, métodos, dispositivos, elementos de los dispositivos, materiales, características opcionales, procedimientos y técnicas distintas de las descritas específicamente en el presente documento pueden aplicarse a la práctica de la invención como se divulga ampliamente en el presente documento sin recurrir a experimentación indebida. Todos los equivalentes funcionales de composiciones, métodos, dispositivos, elementos de los dispositivos, materiales, procedimientos y técnicas descritos en el presente documento conocidos en la técnica; y porciones de los mismos; pretenden estar abarcados por la presente invención. Cada vez que se divulga un intervalo, se pretende abarcar todos los subintervalos y valores individuales. La presente invención no se

limita a las realizaciones divulgadas, incluyendo cualquiera mostrada en los dibujos o ejemplificada en la memoria descriptiva, que se dan a modo de ejemplo o ilustración y no de limitación. El alcance de la invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones.

5 REFERENCIAS

Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 60/516556 de Hergenrother et al., presentada el jueves, 30 de octubre de 2003; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 60/603246 de Hergenrother et al., presentada el 20 de agosto de 2004; documento U.S. 10/976.186 de Hergenrother et al., presentado el 27 de octubre de 2004.

Documentos US 6.762.045 Membrane derived caspase-3, compositions comprising the same and methods of use therefore; US 6.534.267 Polynucleotides encoding activators of caspases; US 6.403.765 Truncated Apaf-1 and methods of use thereof; US 6.303.329; 6.878.743 de Choong, et al. expedidos el 12 de abril, 2005; el documento US 20040077542 de Wang, Xiaodong; et al., publicado el 22 de abril, 2004; el documento US 20040180828 de Shi, Yigong, publicado el 16 de septiembre, 2004.

Véase EA et al., Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32, *Biochem J.* 1 de abril de 1996;315 (Pt 1):21-4.

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).

2. Okada, H. & Mak, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Rev. Cancer* 4, 592-603 (2004).

3. Roy, S. et al. Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6132-6137 (2001).

4. Svingen, P. A. et al. Components of the cell death machine and drug sensitivity of the National Cancer Institute Cell Line Panel. *Clin. Cancer Res.* 10, 6807-6820 (2004).

5. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumor suppression. *Nature* 432, 307-315 (2004).

6. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Achilles' heel of cancer. *Nature* 412, 865-866 (2001).

7. Traven, A., Huang, D. C. & Lithgow, T. Protein hijacking: key proteins held captive against their will. *Cancer Cell* 5, 107-108 (2004).

8. Soengas, M. S. et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211 (2001).

9. Wajant, H. Targeting the FLICE inhibitory protein (FLIP) in cancer therapy. *Mol. Interv.* 3, 124-127 (2003).

10. Denicourt, C. & Dowdy, S. F. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. *Science* 305, 1411-1413 (2004).

11. Vassilev, L. T. et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848 (2004).

12. Degterev, A. et al. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-XL. *Nature Cell Biol.* 3, 173-182 (2001).

13. Becattini, B. et al. Rational design and real time, in-cell detection of the proapoptotic activity of a novel compound targeting Bcl-XL. *Chem. Biol.* 11,389-395 (2004).

14. Wang, J.-L. et al. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 7124-7129 (2000).

15. Li, L. et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF α -mediated cell death. *Science* 305, 1471-1474 (2004).

16. Nguyen, J. T. & Wells, J. A. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7533-7538 (2003).

17. Jiang, X. et al. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- α in a death regulatory pathway. *Science* 299, 223-226 (2003).

18. Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15, 725-731

(2003).

19. Nakagawara, A. et al. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 β converting enzyme (ICE) and CPP32 in favorable human neuroblastomas. *Cancer Res.* 57, 4578-4584 (1997).

20. Izban, K. F. et al. Characterization of the interleukin-1 β -converting enzyme/Ced-3-family protease, caspase-3/ CPP32, in Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 154, 1439-1447 (1999).

21. Persad, R. et al. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Modern Pathol.* 17, 861-867 (2004).

22. Pop, C., Feeney, B., Tripathy, A. & Clark, A. C. Mutations in the procaspase-3 dimer interface affect the activity of the zymogen. *Biochemistry* 42, 12311-12320 (2003).

23. Stennicke, H. R. et al. *J. Biol. Chem.* 273, 27084-27090 (1998).

24. Denault, J.-B. & Salvesen, G. S. Human caspase-7 activity and regulation by its N-terminal peptide. *J. Biol. Chem.* 278, 34042-24050 (2003).

25. Putt, K. S., Beilman, G. J. & Hergenrother, P. J. Direct quantitation of Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity as a means to distinguish necrotic and apoptotic death in cell and tissue samples. *ChemBioChem* 6, 53-55 (2005).

26. Liang, Y., Nylander, K. D., Yan, C. & Schor, N. F. Role of caspase 3-dependent Bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* 61, 142-149 (2002).

27. Fujita, N., Nagahshi, A., Nagashima, K., Rokudai, S. & Tsuruo, T. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 17, 1295-1304 (1998).

28. Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424 (1999).

29. Koty, P. P., Zhang, H. & Levitt, M. L. Antisense bcl-2 treatment increases programmed cell death in nonsmall cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 23, 115-127 (1999).

Base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la página web de la National Library of Medicine/National Institutes of Health (NIH): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> usando la base de datos Gene para buscar CASP3 (caspasa 3, cisteína proteasa relacionada con la apoptosis [Homo sapiens] ID de gen: 836 Etiqueta de locus: HGNC:1504; MIM: 600636 actualizado el 15 de mayo de 2005. Otros apodos: HGNC:1504, APOPAIN, CPP32, CPP32B, SCA-1; Otras designaciones: secuencia codificante de procaspasa3 humana; proteasa de escisión PARP; actividad de escisión de SREBP 1; Yama; caspasa 3; cisteína proteasa CPP32).

Hergenrother PJ. Obtaining and screening compound collections: a user's guide and a call to chemists. *Curr Opin Chem Biol.* 2006

Silverman SK, Hergenrother PJ. Combinatorial chemistry and molecular diversity Tools for molecular diversification and their applications in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol.* 2006.

Goode DR, Sharma AK, Hergenrother PJ. Using peptidic inhibitors to systematically probe the S1' site of caspase-3 and caspase-7. *Org Lett.* 4 de agosto de 2005;7(16):3529-32. PMID: 16048334

Dothager RS, Putt KS, Allen BJ, Leslie BJ, Nesterenko V, Hergenrother PJ. Synthesis and identification of small molecules that potently induce apoptosis in melanoma cells through G1 cell cycle arrest. *J Am Chem Soc.* 22 de junio de 2005;127(24):8686-96. PMID: 15954774

Putt KS, Hergenrother PJ. A nonradiometric, high-throughput assay for poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG): application to inhibitor identification and evaluation. *Anal Biochem.* 15 de oct de 2004;333(2):256-64. PMID: 15450800

Putt KS, Hergenrother PJ. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD(+): application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Anal Biochem.* 1 de marzo de 2004;326(1):78-86. PMID: 14769338

Nesterenko V, Putt KS, Hergenrother PJ. Identification from a combinatorial library of a small molecule that selectively induces apoptosis in cancer cells. *J Am Chem Soc.* 3 de diciembre de 2003;125(48):14672-3. PMID: 14640619

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The Board of Trustees of the University of Illinois
 <120> Inducción Apoptótica Selectiva en Células Cancerosas Incluyendo la Activación de Procaspasa-3
 <130> EPP98656
 10 <140> PCT/US2006/020910 (EP 06771588.8)
 <141> 26/05/2006
 <150> US 60/684.807
 <151> 26/05/2005
 15 <150> US 60/743.878
 <151> 28/03/2006
 20 <150> US 11/420.425
 <151> 25/05/2006
 <160> 27
 25 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 834
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(834)
 35 <223> Procaspasa-3; con secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre de aminoácidos DDD (Número de ACCESO NM_004346)
 <400> 1
 atg gag aac act gaa aac tca gtg gat tca aaa tcc att aaa aat ttg 48
 Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
 1 5 10 15
 gaa cca aag atc ata cat gga agc gaa tca atg gac tct gga ata tcc 96
 Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
 20 25 30
 ctg gac aac agt tat aaa atg gat tat cct gag atg ggt tta tgt ata 144
 Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
 35 40 45
 ata att aat aat aag aat ttt cat aaa agc act gga atg aca tct cgg 192
 Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
 50 55 60
 tct ggt aca gat gtc gat gca gca aac ctc agg gaa aca ttc aga aac 240
 Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
 65 70 75 80
 ttg aaa tat gaa gtc agg aat aaa aat gat ctt aca cgt gaa gaa att 288
 Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
 85 90 95
 40

ES 2 763 156 T3

```

gtg gaa ttg atg cgt gat gtt tct aaa gaa gat cac agc aaa agg agc      336
Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
      100                      105                      110

agt ttt gtt tgt gtg ctt ctg agc cat ggt gaa gaa gga ata att ttt      384
Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
      115                      120                      125

gga aca aat gga cct gtt gac ctg aaa aaa ata aca aac ttt ttc aga      432
Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
      130                      135                      140

ggg gat cgt tgt aga agt cta act gga aaa ccc aaa ctt ttc att att      480
Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
      145                      150                      155                      160

cag gcc tgc cgt ggt aca gaa ctg gac tgt ggc att gag aca gac agt      528
Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
      165                      170                      175

ggt gtt gat gat gac atg gcg tgt cat aaa ata cca gtg gag gcc gac      576
Gly Val Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
      180                      185                      190

ttc ttg tat gca tac tcc aca gca cct ggt tat tat tct tgg cga aat      624
Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
      195                      200                      205

tca aag gat ggc tcc tgg ttc atc cag tcg ctt tgt gcc atg ctg aaa      672
Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
      210                      215                      220

cag tat gcc gac aag ctt gaa ttt atg cac att ctt acc cgg gtt aac      720
Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
      225                      230                      235                      240

cga aag gtg gca aca gaa ttt gag tcc ttt tcc ttt gac gct act ttt      768
Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
      245                      250                      255

cat gca aag aaa cag att cca tgt att gtt tcc atg ctc aca aaa gaa      816
His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
      260                      265                      270

ctc tat ttt tat cac taa      834
Leu Tyr Phe Tyr His
      275

```

<210> 2
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

```

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
1                      5                      10                      15

Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
20                      25                      30

```

10

ES 2 763 156 T3

Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
 35 40 45

Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
 50 55 60

Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
 65 70 75 80

Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
 85 90 95

Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
 100 105 110

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
 115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
 130 135 140

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
 145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
 165 170 175

Gly Val Asp Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
 180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
 195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
 210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
 225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
 245 250 255

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
 260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
 275

<210> 3
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 763 156 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (50)..(880)
 5 <223> Procaspasa-3; con secuencia mutante de cierre de seguridad de aminoácidos DDD a ADD

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (934)..(934)
 10 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (939)..(939)
 15 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (954)..(954)
 20 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (982)..(982)
 25 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (988)..(988)
 30 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1000)..(1000)
 35 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1024)..(1024)
 40 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1036)..(1036)
 45 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1045)..(1045)
 50 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1051)..(1051)
 55 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1053)..(1053)
 60 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1063)..(1063)
 65 <223> n es a, c, g, t o u

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (1071)..(1071)
<223> n es a, c, g, t o u

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1075)..(1075)
<223> n es a, c, g, t o u

15
<220>
<221> misc_feature
<222> (1079)..(1079)
<223> n es a, c, g, t o u

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (1086)..(1086)
<223> n es a, c, g, t o u

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (1093)..(1093)
<223> n es a, c, g, t o u

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (1095)..(1095)
<223> n es a, c, g, t o u

35
<220>
<221> misc_feature
<222> (1100)..(1100)
<223> n es a, c, g, t o u

40
<220>
<221> misc_feature
<222> (1104)..(1104)
<223> n es a, c, g, t o u

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (1106)..(1106)
<223> n es a, c, g, t o u

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (1125)..(1125)
<223> n es a, c, g, t o u

55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1140)..(1140)
<223> n es a, c, g, t o u

60
<220>
<221> misc_feature
<222> (1146)..(1146)
<223> n es a, c, g, t o u

65
<220>
<221> misc_feature
<222> (1149)..(1150)
<223> n es a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1155)..(1155)
 <223> n es a, c, g, t o u

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1157)..(1157)
 <223> n es a, c, g, t o u

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1159)..(1159)
 <223> n es a, c, g, t o u

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1190)..(1190)
 <223> n es a, c, g, t o u

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1199)..(1200)
 <223> n es a, c, g, t o u

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1209)..(1209)
 <223> n es a, c, g, t o u

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1212)..(1212)
 <223> n es a, c, g, t o u

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1223)..(1224)
 <223> n es a, c, g, t o u

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1233)..(1233)
 <223> n es a, c, g, t o u

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1235)..(1235)
 <223> n es a, c, g, t o u

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1238)..(1238)
 <223> n es a, c, g, t o u

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1241)..(1241)
 <223> n es a, c, g, t o u

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1246)..(1246)
 <223> n es a, c, g, t o u

65

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1256)..(1256)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1259)..(1259)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1262)..(1262)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1273)..(1273)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1276)..(1276)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1282)..(1282)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1285)..(1285)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1288)..(1288)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1294)..(1294)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1299)..(1299)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1302)..(1302)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (1306)..(1306)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <400> 3
 60

ES 2 763 156 T3

gtacattccc tctgaataat tttgtttact ttaagaagga gatatacat atg gag aac 58
Met Glu Asn
1

act gaa aac tca gtg gat tca aaa tcc att aaa aat ttg gaa cca aag 106
Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu Glu Pro Lys
5 10 15

atc ata cat gga agc gaa tca atg gac tct gga ata tcc ctg gac aac 154
Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser Leu Asp Asn
20 25 30 35

agt tat aaa atg gat tat cct gag atg ggt tta tgt ata ata att aat 202
Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile Ile Ile Asn
40 45 50

aat aag aat ttt cat aaa agc act gga atg aca tct cgg tct ggt aca 250
Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg Ser Gly Thr
55 60 65

gat gtc gat gca gca aac ctc agg gaa aca ttc aga aac ttg aaa tat 298
Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn Leu Lys Tyr
70 75 80

gaa gtc agg aat aaa aat gat ctt aca cgt gaa gaa att gtg gaa ttg 346
Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile Val Glu Leu
85 90 95

atg cgt gat gtt tct aaa gaa gat cac agc aaa agg agc agt ttt gtt 394
Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser Ser Phe Val
100 105 110 115

tgt gtg ctt ctg agc cat ggt gaa gaa gga ata att ttt gga aca aat 442
Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe Gly Thr Asn
120 125 130

gga cct gtt gac ctg aaa aaa ata aca aac ttt ttc aga ggg gat cgt 490
Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg Gly Asp Arg
135 140 145

tgt aga agt cta act gga aaa ccc aaa ctt ttc att att cag gcc tgc 538
Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile Gln Ala Cys
150 155 160

cgt ggt aca gaa ctg gac tgt ggc att gag aca gac agt ggt gtt gcg 586
Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser Gly Val Ala
165 170 175

gat gac atg gcg tgt cat aaa ata cca gtg gag gcc gac ttc ttg tat 634
Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Tyr

ES 2 763 156 T3

180	185	190	195	
gca tac tcc aca gca cct ggt tat tat tct tgg cga aat tca aag gat				682
Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn Ser Lys Asp	200	205	210	
ggc tcc tgg ttc atc cag tcg ctt tgt gcc atg ctg aaa cag tat gcc				730
Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys Gln Tyr Ala	215	220	225	
gac aag ctt gaa ttt atg cac att ctt acc cgg gtt aac cga aag gtg				778
Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn Arg Lys Val	230	235	240	
gca aca gaa ttt gag tcc ttt tcc ttt gac gct act ttt cat gca aag				826
Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe His Ala Lys	245	250	255	
aaa cag att cca tgt att gtt tcc atg ctc aca aaa gaa ctc tat ttt				874
Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe	260	265	270	275
tat cac ctgagcacc accaccacca ccaactgagat cgggctgcta caagccgaaa				930
Tyr His				
gganctgant tggtgctgc cccnctgacc atactacata cccctgggg cnctaacngg				990
tctggggggn tttttgctga aggagacttt tccngatggc aatggnacc cctgnccgcc				1050
ntnaccggc gnggggggtt ncccnacng acctancttg ccngncctan cccncncttc				1110
cttttcttc ttcnccggtt ccggttccn cagctnaann ggggncntng gtccattggc				1170
ttcgcccccc caaactgtn gggggtccnn ggccccccna angtttccct tanngacccc				1230
ttnangnct ntcccngacc ccccnccnt tnttttaag tcnccncccg gnaangnta				1290
aatncctna ancccntggg ttgggggccc tttttt				1326

5 <210> 4
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu															
1				5					10					15	
Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser															
			20						25					30	
Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile															
		35					40					45			
Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg															
	50					55					60				

ES 2 763 156 T3

Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
65 70 75 80

Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
85 90 95

Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
100 105 110

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
130 135 140

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
165 170 175

Gly Val Ala Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
245 250 255

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
275

- <210> 5
- <211> 1398
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- <222> (51)..(881)
- <223> Procaspasa-3; con secuencia mutante de cierre de seguridad de aminoácidos DDD a DAD

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (923)..(923)

<223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (933)..(933)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (942)..(942)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (963)..(963)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (978)..(978)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (991)..(991)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (994)..(994)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1022)..(1022)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1031)..(1031)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1033)..(1033)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1045)..(1045)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1047)..(1047)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (1061)..(1061)
 <223> n es a, c, g, t o u
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (1067)..(1067)
 <223> n es a, c, g, t o u

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1069)..(1069)
 <223> n es a, c, g, t o u

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1076)..(1076)
 <223> n es a, c, g, t o u

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1091)..(1091)
 <223> n es a, c, g, t o u

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1095)..(1095)
 <223> n es a, c, g, t o u

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1098)..(1098)
 <223> n es a, c, g, t o u

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1102)..(1102)
 <223> n es a, c, g, t o u

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1105)..(1105)
 <223> n es a, c, g, t o u

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1112)..(1112)
 <223> n es a, c, g, t o u

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1116)..(1116)
 <223> n es a, c, g, t o u

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1122)..(1123)
 <223> n es a, c, g, t o u

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1126)..(1126)
 <223> n es a, c, g, t o u

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1129)..(1129)
 <223> n es a, c, g, t o u

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1134)..(1134)
 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1139)..(1139)
 <223> n es a, c, g, t o u
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1144)..(1144)
 <223> n es a, c, g, t o u
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1148)..(1148)
 <223> n es a, c, g, t o u
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1150)..(1150)
 <223> n es a, c, g, t o u
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1158)..(1158)
 <223> n es a, c, g, t o u
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1175)..(1175)
 <223> n es a, c, g, t o u
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1180)..(1180)
 <223> n es a, c, g, t o u
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1190)..(1190)
 <223> n es a, c, g, t o u
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1196)..(1196)
 <223> n es a, c, g, t o u
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1200)..(1200)
 <223> n es a, c, g, t o u
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1202)..(1202)
 <223> n es a, c, g, t o u
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1206)..(1207)
 <223> n es a, c, g, t o u
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1215)..(1215)
 <223> n es a, c, g, t o u
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1224)..(1224)
 <223> n es a, c, g, t o u

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1231)..(1231)
 <223> n es a, c, g, t o u

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1238)..(1238)
 <223> n es a, c, g, t o u

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1245)..(1245)
 <223> n es a, c, g, t o u

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1249)..(1249)
 <223> n es a, c, g, t o u

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1273)..(1273)
 <223> n es a, c, g, t o u

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1276)..(1276)
 <223> n es a, c, g, t o u

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1284)..(1284)
 <223> n es a, c, g, t o u

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1299)..(1299)
 <223> n es a, c, g, t o u

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1309)..(1309)
 <223> n es a, c, g, t o u

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1312)..(1312)
 <223> n es a, c, g, t o u

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1319)..(1319)
 <223> n es a, c, g, t o u

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1321)..(1321)
 <223> n es a, c, g, t o u

65

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1325)..(1325)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1328)..(1328)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1335)..(1335)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1337)..(1337)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1345)..(1345)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1348)..(1348)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1355)..(1355)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1358)..(1358)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1364)..(1364)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1369)..(1369)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1376)..(1376)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (1379)..(1379)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1387)..(1387)
 <223> n e s a, c, g, t o u

 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (1390)..(1390)

ES 2 763 156 T3

<223> n e s a, c, g, t o u

<400> 5

cgtacattcc ctctgaataa ttttgtttac ttttaagaagg agatatacat atg gag	56
Met Glu	
1	
aac act gaa aac tca gtg gat tca aaa tcc att aaa aat ttg gaa cca	104
Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu Glu Pro	
5 10 15	
aag atc ata cat gga agc gaa tca atg gac tct gga ata tcc ctg gac	152
Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser Leu Asp	
20 25 30	
aac agt tat aaa atg gat tat cct gag atg ggt tta tgt ata ata att	200
Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile Ile Ile	
35 40 45 50	
aat aat aag aat ttt cat aaa agc act gga atg aca tct cgg tct ggt	248
Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg Ser Gly	
55 60 65	
aca gat gtc gat gca gca aac ctc agg gaa aca ttc aga aac ttg aaa	296
Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn Leu Lys	
70 75 80	
tat gaa gtc agg aat aaa aat gat ctt aca cgt gaa gaa att gtg gaa	344
Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile Val Glu	
85 90 95	
ttg atg cgt gat gtt tct aaa gaa gat cac agc aaa agg agc agt ttt	392
Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser Ser Phe	
100 105 110	
gtt tgt gtg ctt ctg agc cat ggt gaa gaa gga ata att ttt gga aca	440
Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe Gly Thr	
115 120 125 130	

ES 2 763 156 T3

aat gga cct gtt gac ctg aaa aaa ata aca aac ttt ttc aga ggg gat 488
 Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg Gly Asp
 135 140 145

cgt tgt aga agt cta act gga aaa ccc aaa ctt ttc att att cag gcc 536
 Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile Gln Ala
 150 155 160

tgc cgt ggt aca gaa ctg gac tgt ggc att gag aca gac agt ggt gtt 584
 Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser Gly Val
 165 170 175

gat gct gac atg gcg tgt cat aaa ata cca gtg gag gcc gac ttc ttg 632
 Asp Ala Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu
 180 185 190

tat gca tac tcc aca gca cct ggt tat tat tct tgg cga aat tca aag 680
 Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn Ser Lys
 195 200 205 210

gat ggc tcc tgg ttc atc cag tcg ctt tgt gcc atg ctg aaa cag tat 728
 Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys Gln Tyr
 215 220 225

gcc gac aag ctt gaa ttt atg cac att ctt acc cgg gtt aac cga aag 776
 Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn Arg Lys
 230 235 240

gtg gca aca gaa ttt gag tcc ttt tcc ttt gac gct act ttt cat gca 824
 Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe His Ala
 245 250 255

aag aaa cag att cca tgt att gtt tcc atg ctc aca aaa gaa ctc tat 872
 Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr
 260 265 270

ttt tat cac ctgagcacc accaccacca ccaactgagat ccggctgcta 921
 Phe Tyr His
 275

cnaagcccga angaagctga nttggctgct gcccccgctg ancaataact agcatanccc 981

cttggggccn ctnaacgggt ctggaggggt ttttgctgaa nggggacctn tntccggatt 1041

ggcnaangga cccccctgn accgcncntt aaccncgcgg ggggggggtn cccncanggg 1101

nccnctacct ngccngcccc nnaacncncc cnttccntt ctncctnct tccccngtt 1161

cccgggtttc ccgnagccna aacgggggnc ccttnggtnc nattnngctt tccncccc 1221

ccnaaacttn tagggnggt ccnnggncc cccgaaagg tttccccttg cnggncccc 1281

ttnaaggact tcccagnaa cccccncg ncccttntn aggntcnccc cccngnaag 1341

ggtnaantcc gttnaanccc ttnggctngg gggncntt tttttntnc ccccc 1398

<210> 6
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 763 156 T3

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
1 5 10 15

Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
20 25 30

Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
35 40 45

Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
50 55 60

Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
65 70 75 80

Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
85 90 95

Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
100 105 110

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
130 135 140

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
165 170 175

Gly Val Asp Ala Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
245 250 255

ES 2 763 156 T3

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
275

- 5 <210> 7
<211> 1316
<212> ADN
<213> Homo sapiens

- 10 <220>
<221> CDS
<222> (51)..(881)
<223> Procaspasa-3; con secuencia mutante de cierre de seguridad de aminoácidos DDD a DAD

- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (914)..(914)
<223> n es a, c, g, t o u

- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (942)..(942)
<223> n es a, c, g, t o u

- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (958)..(958)
<223> n es a, c, g, t o u

- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (982)..(982)
<223> n es a, c, g, t o u

- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (986)..(986)
<223> n es a, c, g, t o u

- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (988)..(988)
<223> n es a, c, g, t o u

- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1006)..(1006)
<223> n es a, c, g, t o u

- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (1026)..(1026)
<223> n es a, c, g, t o u

- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (1032)..(1032)
<223> n es a, c, g, t o u

- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (1038)..(1038)
<223> n es a, c, g, t o u

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1040)..(1041)
 <223> n es a, c, g, t o u

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1051)..(1051)
 <223> n es a, c, g, t o u

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1062)..(1062)
 <223> n es a, c, g, t o u

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1067)..(1067)
 <223> n es a, c, g, t o u

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1073)..(1073)
 <223> n es a, c, g, t o u

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1097)..(1097)
 <223> n es a, c, g, t o u

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1101)..(1101)
 <223> n es a, c, g, t o u

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1106)..(1106)
 <223> n es a, c, g, t o u

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1108)..(1108)
 <223> n es a, c, g, t o u

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1114)..(1114)
 <223> n es a, c, g, t o u

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1118)..(1118)
 <223> n es a, c, g, t o u

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1123)..(1123)
 <223> n es a, c, g, t o u

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1129)..(1129)
 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1134)..(1134)
 <223> n es a, c, g, t o u
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1148)..(1149)
 <223> n es a, c, g, t o u
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1151)..(1151)
 <223> n es a, c, g, t o u
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1154)..(1154)
 <223> n es a, c, g, t o u
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1156)..(1157)
 <223> n es a, c, g, t o u
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1173)..(1173)
 <223> n es a, c, g, t o u
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1193)..(1193)
 <223> n es a, c, g, t o u
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1200)..(1200)
 <223> n es a, c, g, t o u
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1206)..(1206)
 <223> n es a, c, g, t o u
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1215)..(1215)
 <223> n es a, c, g, t o u
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1228)..(1230)
 <223> n es a, c, g, t o u
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1232)..(1232)
 <223> n es a, c, g, t o u
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1247)..(1247)
 <223> n es a, c, g, t o u
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1250)..(1250)
 <223> n es a, c, g, t o u

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1261)..(1261)
 <223> n es a, c, g, t o u

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1263)..(1264)
 <223> n es a, c, g, t o u

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1272)..(1272)
 <223> n es a, c, g, t o u

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1275)..(1275)
 <223> n es a, c, g, t o u

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1277)..(1277)
 <223> n es a, c, g, t o u

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1286)..(1286)
 <223> n es a, c, g, t o u

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1289)..(1289)
 <223> n es a, c, g, t o u

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1291)..(1292)
 <223> n es a, c, g, t o u

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1294)..(1294)
 <223> n es a, c, g, t o u

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1299)..(1299)
 <223> n es a, c, g, t o u

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1301)..(1301)
 <223> n es a, c, g, t o u

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1304)..(1304)
 <223> n es a, c, g, t o u

65

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 763 156 T3

<222> (1307)..(1307)
 <223> n e s a, c, g, t o u

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1316)..(1316)
 <223> n e s a, c, g, t o u

10 <400> 7

cgtacattcc ctctgaataa ttttgtttac tttaagaagg agatatacat atg gag	56
Met Glu	
1	
aac act gaa aac tca gtg gat tca aaa tcc att aaa aat ttg gaa cca	104
Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu Glu Pro	
5 10 15	
aag atc ata cat gga agc gaa tca atg gac tct gga ata tcc ctg gac	152
Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser Leu Asp	
20 25 30	
aac agt tat aaa atg gat tat cct gag atg ggt tta tgt ata ata att	200
Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile Ile Ile	
35 40 45 50	
aat aat aag aat ttt cat aaa agc act gga atg aca tct cgg tct ggt	248
Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg Ser Gly	
55 60 65	
aca gat gtc gat gca gca aac ctc agg gaa aca ttc aga aac ttg aaa	296
Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn Leu Lys	
70 75 80	
tat gaa gtc agg aat aaa aat gat ctt aca cgt gaa gaa att gtg gaa	344
Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile Val Glu	
85 90 95	
ttg atg cgt gat gtt tct aaa gaa gat cac agc aaa agg agc agt ttt	392
Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser Ser Phe	
100 105 110	
gtt tgt gtg ctt ctg agc cat ggt gaa gaa gga ata att ttt gga aca	440
Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe Gly Thr	
115 120 125 130	
aat gga cct gtt gac ctg aaa aaa ata aca aac ttt ttc aga ggg gat	488

ES 2 763 156 T3

Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg Gly Asp	
135 140 145	
cg t tg t aga ag t cta act gga aaa ccc aaa ctt ttc att att cag gcc	536
Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile Gln Ala	
150 155 160	
tgc cgt ggt aca gaa ctg gac tgt ggc att gag aca gac agt ggt gtt	584
Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser Gly Val	
165 170 175	
gat gat gcc atg gcg tgt cat aaa ata cca gtg gag gcc gac ttc ttg	632
Asp Asp Ala Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu	
180 185 190	
tat gca tac tcc aca gca cct ggt tat tat tct tgg cga aat tca aag	680
Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn Ser Lys	
195 200 205 210	
gat ggc tcc tgg ttc atc cag tgc ctt tgt gcc atg ctg aaa cag tat	728
Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys Gln Tyr	
215 220 225	
gcc gac aag ctt gaa ttt atg cac att ctt acc cgg gtt aac cga aag	776
Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn Arg Lys	
230 235 240	
gtg gca aca gaa ttt gag tcc ttt tcc ttt gac gct act ttt cat gca	824
Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe His Ala	
245 250 255	
aag aaa cag att cca tgt att gtt tcc atg ctc aca aaa gaa ctc tat	872
Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr	
260 265 270	
ttt tat cac ctgagcacc cccccaccac cactgagatc cgnctgctac	921
Phe Tyr His	
275	
aaagcccgaa aggaagctga nttggctgct gccccnctg accataccta gcataccct	981
ngggncncta acgggtctgg ggggnntttg ctgaagggg acctnttccg natggcnann	1041
ggacccccn gtaccgccct naaccngcgg gngggggttc cccacggac cctacntgcn	1101
gcccnanccc cncttncct tntcctcntt ccnccgtccg gttcccnan ctnanngggc	1161
ccttggtcca tnggcttcgc ccccccaaa cnttagggng gtcnngggcc cccnaaggt	1221
tcccttnng nccccttaa ggactntcnc ggacccccn cnccttttt nagntnctc	1281
cctgnaangn ntnaaatncn ttnaanccct gggcn	1316

<210> 8
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
1 5 10 15

ES 2 763 156 T3

Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
 20 25 30
 Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
 35 40 45
 Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
 50 55 60
 Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
 65 70 75 80
 Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
 85 90 95
 Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
 100 105 110
 Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
 115 120 125
 Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
 130 135 140
 Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
 145 150 155 160
 Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
 165 170 175
 Gly Val Asp Asp Ala Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
 195 200 205
 Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
 210 215 220
 Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
 225 230 235 240
 Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
 245 250 255
 His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
 260 265 270
 Leu Tyr Phe Tyr His
 275

ES 2 763 156 T3

<210> 9
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(277)
 <223> Procaspa-3; con secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre de aminoácidos DDD (Número de
 10 ACCESO NM_004346)

<400> 9

Met	Glu	Asn	Thr	Glu	Asn	Ser	Val	Asp	Ser	Lys	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu
1				5					10					15	
Glu	Pro	Lys	Ile	Ile	His	Gly	Ser	Glu	Ser	Met	Asp	Ser	Gly	Ile	Ser
			20					25					30		
Leu	Asp	Asn	Ser	Tyr	Lys	Met	Asp	Tyr	Pro	Glu	Met	Gly	Leu	Cys	Ile
		35					40					45			
Ile	Ile	Asn	Asn	Lys	Asn	Phe	His	Lys	Ser	Thr	Gly	Met	Thr	Ser	Arg
	50					55					60				
Ser	Gly	Thr	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Arg	Glu	Thr	Phe	Arg	Asn
65					70					75					80
Leu	Lys	Tyr	Glu	Val	Arg	Asn	Lys	Asn	Asp	Leu	Thr	Arg	Glu	Glu	Ile
				85					90					95	
Val	Glu	Leu	Met	Arg	Asp	Val	Ser	Lys	Glu	Asp	His	Ser	Lys	Arg	Ser
			100					105					110		
Ser	Phe	Val	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	His	Gly	Glu	Glu	Gly	Ile	Ile	Phe
		115					120					125			
Gly	Thr	Asn	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Asn	Phe	Phe	Arg
	130					135					140				
Gly	Asp	Arg	Cys	Arg	Ser	Leu	Thr	Gly	Lys	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Ile
145					150					155					160
Gln	Ala	Cys	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Asp	Cys	Gly	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser
				165					170					175	

ES 2 763 156 T3

Gly Val Asp Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
 180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
 195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
 210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
 225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
 245 250 255

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
 260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
 275

<210> 10
 <211> 277
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (1)..(277)
 <223> Procaspa-3; con secuencia mutante de cierre de seguridad de aminoácidos DDD a ADD

<400> 10

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
 35 40 45

Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
 50 55 60

Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
 65 70 75 80

ES 2 763 156 T3

Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
85 90 95

Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
100 105 110

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
130 135 140

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
165 170 175

Gly Val Ala Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
245 250 255

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
275

- <210> 11
- <211> 277
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10 <222> (1)..(277)
- <223> Procaspasa-3; con secuencia mutante de cierre de seguridad de aminoácidos DDD a DAD
- <400> 11

ES 2 763 156 T3

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
 35 40 45

Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
 50 55 60

Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
 65 70 75 80

Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
 85 90 95

Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
 100 105 110

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
 115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
 130 135 140

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
 145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
 165 170 175

Gly Val Asp Ala Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
 180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
 195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
 210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
 225 230 235 240

ES 2 763 156 T3

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
 245 250 255

His Xaa Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
 260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
 275

<210> 12
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(277)
 <223> Procaspasa-3; con secuencia mutante de cierre de seguridad de aminoácidos DDD a DAD

<400> 12

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
 35 40 45

Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
 50 55 60

Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
 65 70 75 80

Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
 85 90 95

Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
 100 105 110

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
 115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
 130 135 140

ES 2 763 156 T3

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
165 170 175

Gly Val Asp Asp Ala Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
245 250 255

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
275

- 5 <210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Oligo sintético
- <400> 13
gacagacagt ggtgtgagg atgacatggc gtgtcataaa atacc 45
- 15 <210> 14
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Oligo sintético
- <400> 14
gacagacagt ggtgtgatg ctgacatggc gtgtcataaa atacc 45
- 25 <210> 15
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> Oligo sintético
- <400> 15
gacagacagt ggtgtgatg atgcatggc gtgtcataaa atacc 45

ES 2 763 156 T3

<210> 16
 <211> 912
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(912)
 10 <223> Procaspasa-7 con secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre de aminoácidos DTD (Número de Acceso NM_001227)

<400> 16

atg gca gat gat cag ggc tgt att gaa gag cag ggg gtt gag gat tca	48
Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser	
1 5 10 15	
gca aat gaa gat tca gtg gat gct aag cca gac cgg tcc tcg ttt gta	96
Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val	
20 25 30	
ccg tcc ctc ttc agt aag aag aag aaa aat gtc acc atg cga tcc atc	144
Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile	
35 40 45	
aag acc acc cgg gac cga gtg cct aca tat cag tac aac atg aat ttt	192
Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe	
50 55 60	
gaa aag ctg ggc aaa tgc atc ata ata aac aac aag aac ttt gat aaa	240
Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys	
65 70 75 80	
gtg aca ggt atg ggc gtt cga aac gga aca gac aaa gat gcc gag gcg	288
Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala	
85 90 95	
ctc ttc aag tgc ttc cga agc ctg ggt ttt gac gtg att gtc tat aat	336
Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn	
100 105 110	
gac tgc tct tgt gcc aag atg caa gat ctg ctt aaa aaa gct tct gaa	384
Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu	
115 120 125	
gag gac cat aca aat gcc gcc tgc ttc gcc tgc atc ctc tta agc cat	432
Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His	
130 135 140	
gga gaa gaa aat gta att tat ggg aaa gat ggt gtc aca cca ata aag	480
Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys	
145 150 155 160	
gat ttg aca gcc cac ttt agg ggg gat aga tgc aaa acc ctt tta gag	528

ES 2 763 156 T3

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
 165 170 175

aaa ccc aaa ctc ttc ttc att cag gct tgc cga ggg acc gag ctt gat 576
 Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp
 180 185 190

gat ggc atc cag gcc gac tcg ggg ccc atc aat gac aca gat gct aat 624
 Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Thr Asp Ala Asn
 195 200 205

cct cga tac aag atc cca gtg gaa gct gac ttc ctc ttc gcc tat tcc 672
 Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
 210 215 220

acg gtt cca ggc tat tac tcg tgg agg agc cca gga aga ggc tcc tgg 720
 Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
 225 230 235 240

ttt gtg caa gcc ctc tgc tcc atc ctg gag gag cac gga aaa gac ctg 768
 Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
 245 250 255

gaa atc atg cag atc ctc acc agg gtg aat gac aga gtt gcc agg cac 816
 Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
 260 265 270

ttt gag tct cag tct gat gac cca cac ttc cat gag aag aag cag atc 864
 Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
 275 280 285

ccc tgt gtg gtc tcc atg ctc acc aag gaa ctc tac ttc agt caa tag 912
 Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
 290 295 300

<210> 17
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
 1 5 10 15

Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
 20 25 30

Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile
 35 40 45

Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe
 50 55 60

Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys
 65 70 75 80

ES 2 763 156 T3

Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala
85 90 95

Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn
100 105 110

Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
115 120 125

Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
130 135 140

Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys
145 150 155 160

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
165 170 175

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp
180 185 190

Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Thr Asp Ala Asn
195 200 205

Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
210 215 220

Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
225 230 235 240

Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
245 250 255

Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
260 265 270

Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
275 280 285

Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
290 295 300

<210> 18
<211> 912
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(912)
<223> Secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7

<400> 18

ES 2 763 156 T3

atg gca gat gat cag ggc tgt att gaa gag cag ggg gtt gag gat tca	48
Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser	
1 5 10 15	
gca aat gaa gat tca gtg gat gct aag cca gac cgg tcc tcg ttt gta	96
Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val	
20 25 30	
ccg tcc ctc ttc agt aag aag aag aaa aat gtc acc atg cga tcc atc	144
Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile	
35 40 45	
aag acc acc cgg gac cga gtg cct aca tat cag tac aac atg aat ttt	192
Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe	
50 55 60	
gaa aag ctg ggc aaa tgc atc ata ata aac aac aag aac ttt gat aaa	240
Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys	
65 70 75 80	
gtg aca ggt atg ggc gtt cga aac gga aca gac aaa gat gcc gag gcg	288
Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala	
85 90 95	
ctc ttc aag tgc ttc cga agc ctg ggt ttt gac gtg att gtc tat aat	336
Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn	
100 105 110	
gac tgc tct tgt gcc aag atg caa gat ctg ctt aaa aaa gct tct gaa	384
Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu	
115 120 125	
gag gac cat aca aat gcc gcc tgc ttc gcc tgc atc ctc tta agc cat	432
Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His	
130 135 140	
gga gaa gaa aat gta att tat ggg aaa gat ggt gtc aca cca ata aag	480
Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys	
145 150 155 160	
gat ttg aca gcc cac ttt agg ggg gat aga tgc aaa acc ctt tta gag	528
Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu	
165 170 175	
aaa ccc aaa ctc ttc ttc att cag gct tgc cga ggg acc gag ctt gat	576
Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp	
180 185 190	
gat ggc atc cag gcc gac tcg ggg ccc atc aat gac gca gat gct aat	624
Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Ala Asp Ala Asn	
195 200 205	
cct cga tac aag atc cca gtg gaa gct gac ttc ctc ttc gcc tat tcc	672
Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser	
210 215 220	
acg gtt cca ggc tat tac tcg tgg agg agc cca gga aga ggc tcc tgg	720
Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp	

ES 2 763 156 T3

```

225                230                235                240
ttt gtg caa gcc ctc tgc tcc atc ctg gag gag cac gga aaa gac ctg      768
Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
                245                250                255

gaa atc atg cag atc ctc acc agg gtg aat gac aga gtt gcc agg cac      816
Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
                260                265                270

ttt gag tct cag tct gat gac cca cac ttc cat gag aag aag cag atc      864
Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
                275                280                285

ccc tgt gtg gtc tcc atg ctc acc aag gaa ctc tac ttc agt caa tag      912
Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
                290                295                300

```

<210> 19
 <211> 303
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 19

```

Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
 1                5                10                15

Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
                20                25                30

Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile
 35                40                45

Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe
 50                55                60

Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys
 65                70                75

Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala
 85                90                95

Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn
 100               105               110

Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
 115               120               125

Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
 130               135               140

Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys

```

ES 2 763 156 T3

```

145                150                155                160

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
                165                170                175

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp
                180                185                190

Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Ala Asp Ala Asn
                195                200                205

Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
                210                215                220

Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
225                230                235                240

Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
                245                250                255

Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
                260                265                270

Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
                275                280                285

Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
                290                295                300

```

<210> 20
 <211> 936
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(936)

10

<223> Cierre de seguridad de tipo silvestre DTD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A

<400> 20

```

atg gca gat gat cag ggc tgt att gaa gag cag ggg gtt gag gat tca      48
Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
1                5                10                15

gca aat gaa gat tca gtg gat gct aag cca gac cgg tcc tcg ttt gta      96
Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
                20                25                30

ccg tcc ctc ttc agt aag aag aag aaa aat gtc acc atg cga tcc atc      144
Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile
                35                40                45

```

ES 2 763 156 T3

aag acc acc cgg gac cga gtg cct aca tat cag tac aac atg aat ttt	192
Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe	
50 55 60	
gaa aag ctg ggc aaa tgc atc ata ata aac aac aag aac ttt gat aaa	240
Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys	
65 70 75 80	
gtg aca ggt atg ggc gtt cga aac gga aca gac aaa gat gcc gag gcg	288
Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala	
85 90 95	
ctc ttc aag tgc ttc cga agc ctg ggt ttt gac gtg att gtc tat aat	336
Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn	
100 105 110	
gac tgc tct tgt gcc aag atg caa gat ctg ctt aaa aaa gct tct gaa	384
Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu	
115 120 125	
gag gac cat aca aat gcc gcc tgc ttc gcc tgc atc ctc tta agc cat	432
Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His	
130 135 140	
gga gaa gaa aat gta att tat ggg aaa gat ggt gtc aca cca ata aag	480
Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys	
145 150 155 160	
gat ttg aca gcc cac ttt agg ggg gat aga tgc aaa acc ctt tta gag	528
Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu	
165 170 175	
aaa ccc aaa ctc ttc ttc att cag gct gcc cga ggg acc gag ctt gat	576
Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Ala Arg Gly Thr Glu Leu Asp	
180 185 190	
gat ggc atc cag gcc gac tcg ggg ccc atc aat gac aca gat gct aat	624
Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Thr Asp Ala Asn	
195 200 205	
cct cga tac aag atc cca gtg gaa gct gac ttc ctc ttc gcc tat tcc	672
Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser	
210 215 220	
acg gtt cca ggc tat tac tcg tgg agg agc cca gga aga ggc tcc tgg	720
Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp	
225 230 235 240	
ttt gtg caa gcc ctc tgc tcc atc ctg gag gag cac gga aaa gac ctg	768
Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu	
245 250 255	
gaa atc atg cag atc ctc acc agg gtg aat gac aga gtt gcc agg cac	816
Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His	
260 265 270	
ttt gag tct cag tct gat gac cca cac ttc cat gag aag aag cag atc	864
Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile	
275 280 285	
ccc tgt gtg gtc tcc atg ctc acc aag gaa ctc tac ttc agt caa ctc	912
Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln Leu	

ES 2 763 156 T3

195	200	205
Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser		
210	215	220
Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp		
225	230	235
Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu		
245	250	255
Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His		
260	265	270
Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile		
275	280	285
Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln Leu		
290	295	300
Glu His His His His His His		
305	310	

<210> 22
 <211> 936
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(936)
 <223> Cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A

<400> 22

atg gca gat gat cag ggc tgt att gaa gag cag ggg gtt gag gat tca	48
Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser	
1 5 10 15	
gca aat gaa gat tca gtg gat gct aag cca gac cgg tcc tcg ttt gta	96
Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val	
20 25 30	
ccg tcc ctc ttc agt aag aag aag aaa aat gtc acc atg cga tcc atc	144
Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile	
35 40 45	
aag acc acc cgg gac cga gtg cct aca tat cag tac aac atg aat ttt	192
Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe	
50 55 60	
gaa aag ctg ggc aaa tgc atc ata ata aac aac aag aac ttt gat aaa	240
Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys	
65 70 75 80	

ES 2 763 156 T3

gtg aca ggt atg ggc gtt cga aac gga aca gac aaa gat gcc gag gcg 288
Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala
85 90 95

ctc ttc aag tgc ttc cga agc ctg ggt ttt gac gtg att gtc tat aat 336
Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn
100 105 110

gac tgc tct tgt gcc aag atg caa gat ctg ctt aaa aaa gct tct gaa 384
Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
115 120 125

gag gac cat aca aat gcc gcc tgc ttc gcc tgc atc ctc tta agc cat 432
Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
130 135 140

gga gaa gaa aat gta att tat ggg aaa gat ggt gtc aca cca ata aag 480
Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys
145 150 155 160

gat ttg aca gcc cac ttt agg ggg gat aga tgc aaa acc ctt tta gag 528
Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
165 170 175

aaa ccc aaa ctc ttc ttc att cag gct gcc cga ggg acc gag ctt gat 576
Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Ala Arg Gly Thr Glu Leu Asp
180 185 190

gat ggc atc cag gcc gac tcg ggg ccc atc aat gac gca gat gct aat 624
Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Ala Asp Ala Asn
195 200 205

cct cga tac aag atc cca gtg gaa gct gac ttc ctc ttc gcc tat tcc 672
Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
210 215 220

acg gtt cca ggc tat tac tcg tgg agg agc cca gga aga ggc tcc tgg 720
Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
225 230 235 240

ttt gtg caa gcc ctc tgc tcc atc ctg gag gag cac gga aaa gac ctg 768
Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
245 250 255

gaa atc atg cag atc ctc acc agg gtg aat gac aga gtt gcc agg cac 816
Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
260 265 270

ttt gag tct cag tct gat gac cca cac ttc cat gag aag aag cag atc 864
Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
275 280 285

ccc tgt gtg gtc tcc atg ctc acc aag gaa ctc tac ttc agt caa ctc 912
Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln Leu
290 295 300

gag cac cac cac cac cac cac tga 936
Glu His His His His His His
305 310

<210> 23
<211> 311
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 763 156 T3

Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
 1 5 10 15

Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
 20 25 30

Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile
 35 40 45

Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe
 50 55 60

Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys
 65 70 75 80

Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala
 85 90 95

Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn
 100 105 110

Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
 115 120 125

Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
 130 135 140

Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
 165 170 175

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Ala Arg Gly Thr Glu Leu Asp
 180 185 190

Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Ala Asp Ala Asn
 195 200 205

Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
 210 215 220

Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp

ES 2 763 156 T3

Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
 115 120 125

Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
 130 135 140

Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
 165 170 175

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp
 180 185 190

Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Thr Asp Ala Asn
 195 200 205

Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
 210 215 220

Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
 225 230 235 240

Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
 245 250 255

Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
 260 265 270

Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
 275 280 285

Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
 290 295 300

<210> 25
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(303)
 <223> Secuencia de cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7

10

<400> 25

ES 2 763 156 T3

Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
 1 5 10 15

Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
 20 25 30

Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile
 35 40 45

Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe
 50 55 60

Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys
 65 70 75 80

Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala
 85 90 95

Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn
 100 105 110

Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
 115 120 125

Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
 130 135 140

Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
 165 170 175

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp
 180 185 190

Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Asp Asp Ala Asn
 195 200 205

Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
 210 215 220

Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
 225 230 235 240

Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
 245 250 255

ES 2 763 156 T3

Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
 260 265 270

Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
 275 280 285

Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
 290 295 300

<210> 26
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(303)
 <223> Cierre de seguridad de tipo silvestre DTD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A

10

<400> 26

Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
 1 5 10 15

Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
 20 25 30

Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile
 35 40 45

Lys Thr Thr Arg Asp Arg Val Pro Thr Tyr Gln Tyr Asn Met Asn Phe
 50 55 60

Glu Lys Leu Gly Lys Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys
 65 70 75 80

Val Thr Gly Met Gly Val Arg Asn Gly Thr Asp Lys Asp Ala Glu Ala
 85 90 95

Leu Phe Lys Cys Phe Arg Ser Leu Gly Phe Asp Val Ile Val Tyr Asn
 100 105 110

Asp Cys Ser Cys Ala Lys Met Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu
 115 120 125

Glu Asp His Thr Asn Ala Ala Cys Phe Ala Cys Ile Leu Leu Ser His
 130 135 140

ES 2 763 156 T3

Gly Glu Glu Asn Val Ile Tyr Gly Lys Asp Gly Val Thr Pro Ile Lys
145 150 155 160

Asp Leu Thr Ala His Phe Arg Gly Asp Arg Cys Lys Thr Leu Leu Glu
165 170 175

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Ala Arg Gly Thr Glu Leu Asp
180 185 190

Asp Gly Ile Gln Ala Asp Ser Gly Pro Ile Asn Asp Thr Asp Ala Asn
195 200 205

Pro Arg Tyr Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Phe Ala Tyr Ser
210 215 220

Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Ser Pro Gly Arg Gly Ser Trp
225 230 235 240

Phe Val Gln Ala Leu Cys Ser Ile Leu Glu Glu His Gly Lys Asp Leu
245 250 255

Glu Ile Met Gln Ile Leu Thr Arg Val Asn Asp Arg Val Ala Arg His
260 265 270

Phe Glu Ser Gln Ser Asp Asp Pro His Phe His Glu Lys Lys Gln Ile
275 280 285

Pro Cys Val Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Gln
290 295 300

<210> 27

<211> 303

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(303)

<223> Cierre de seguridad de tipo silvestre DDD de procaspasa-7, secuencia mutante del sitio activo de C a A

<400> 27

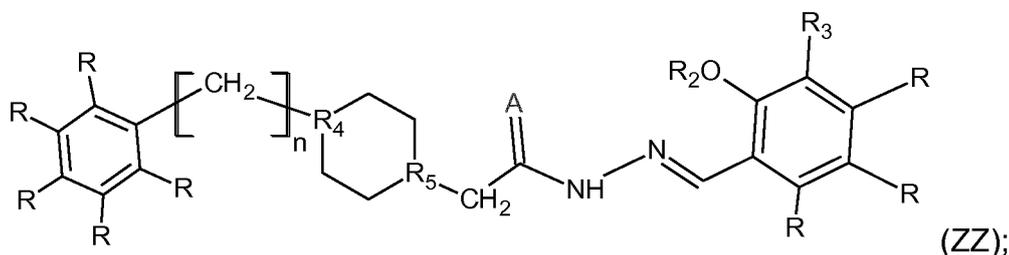
Met Ala Asp Asp Gln Gly Cys Ile Glu Glu Gln Gly Val Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Asn Glu Asp Ser Val Asp Ala Lys Pro Asp Arg Ser Ser Phe Val
20 25 30

Pro Ser Leu Phe Ser Lys Lys Lys Lys Asn Val Thr Met Arg Ser Ile

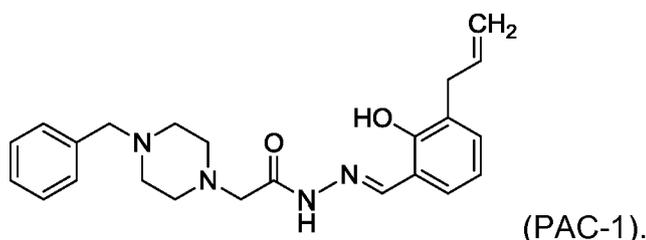
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula ZZ:



5 en donde n= 1 o 2; R, independientemente de otra R, es hidrógeno, halógeno, alilo o grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; R₂ = hidrógeno, grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, éster; R₃ = hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alilo, alqueniilo, o haloalqueniilo; R₄ y R₅ son N; o R₄=N y R₅=C; o R₄ y R₅ = C; y A =
 10 oxígeno o azufre; para su uso en el tratamiento de cáncer, administrando a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de dicho compuesto.

2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es PAC-1:

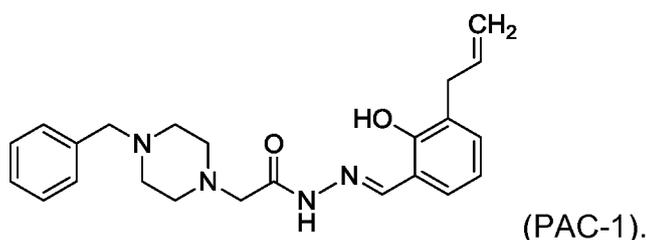


15 3. Una composición farmacéutica para su uso en tratamiento del cáncer, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

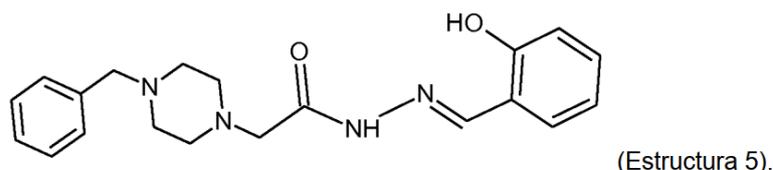
20 4. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha composición farmacéutica es para administración oral.

5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, capaz de modificar una molécula de procaspasa-3 en una célula cancerosa para inducir selectivamente la apoptosis en dicha célula cancerosa.

25 6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho compuesto es PAC-1,



30 7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el compuesto es la Estructura 5,



35 8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además la etapa de evaluar un parámetro de procaspasa-3 o caspasa-3 en una célula cancerosa; en donde dicho parámetro es uno o más de una cantidad semicuantitativa o cuantitativa, una cantidad funcional y un nivel de actividad de dicha procaspasa-3 o caspasa-3.

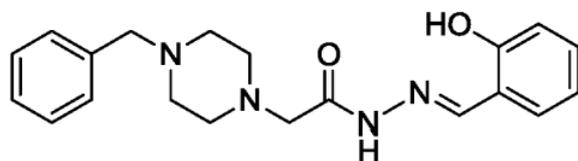
9. Un método de selección directa *in vitro* para un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3, que comprende: (a) proporcionar un compuesto de prueba; (b) proporcionar una procaspasa-3 purificada; (c) exponer el compuesto de prueba a la procaspasa-3 purificada; (d) medir una actividad de procaspasa-3 después de la exposición al compuesto de prueba; (e) identificar un compuesto modificador comparando una actividad de prueba tras la exposición al compuesto de prueba con una actividad no modificada en ausencia de exposición al compuesto de prueba; seleccionando de este modo un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3, comprendiendo el método adicionalmente comparar dicha actividad modificada o dicha actividad no modificada con una actividad de referencia; en donde dicha actividad de referencia se debe a la exposición a un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Un método de selección celular para un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3, que comprende: (a) proporcionar un compuesto de prueba; (b) proporcionar una célula, en donde la célula supuestamente expresa procaspasa-3; (c) exponer la célula al compuesto de prueba; (d) medir un parámetro celular después de la exposición al compuesto de prueba; en donde dicho parámetro celular comprende uno o más de viabilidad celular e indicador apoptótico; (e) identificar un compuesto modificador comparando un parámetro celular probado tras la exposición al compuesto de prueba con un parámetro celular no modificado en ausencia de exposición al compuesto de prueba; seleccionando de este modo un compuesto capaz de modificar una molécula de procaspasa-3, comprendiendo adicionalmente comparar dicha actividad modificada o dicha actividad no modificada con una actividad de referencia; en donde dicha actividad de referencia se debe a la exposición a un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

11. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es un compuesto activador de procaspasa y el uso comprende (a) identificar una posible susceptibilidad al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) exponer dicha célula cancerosa a una cantidad eficaz del compuesto activador de procaspasa.

12. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho compuesto activador de procaspasa es capaz de activar procaspasa-3, procaspasa-7, o tanto procaspasa-3 como procaspasa-7.

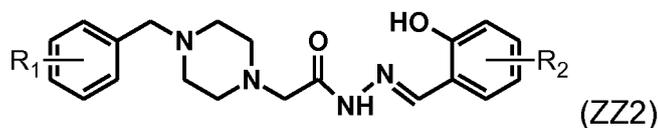
13. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es la Estructura 5:



(Estructura 5).

14. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 13, en donde dicha administración se realiza por vía oral.

15. Un compuesto que tiene la fórmula ZZ2:

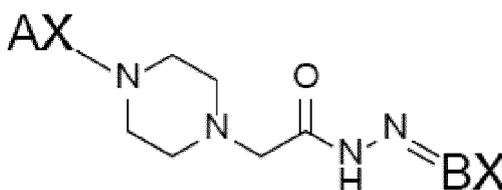


(ZZ2)

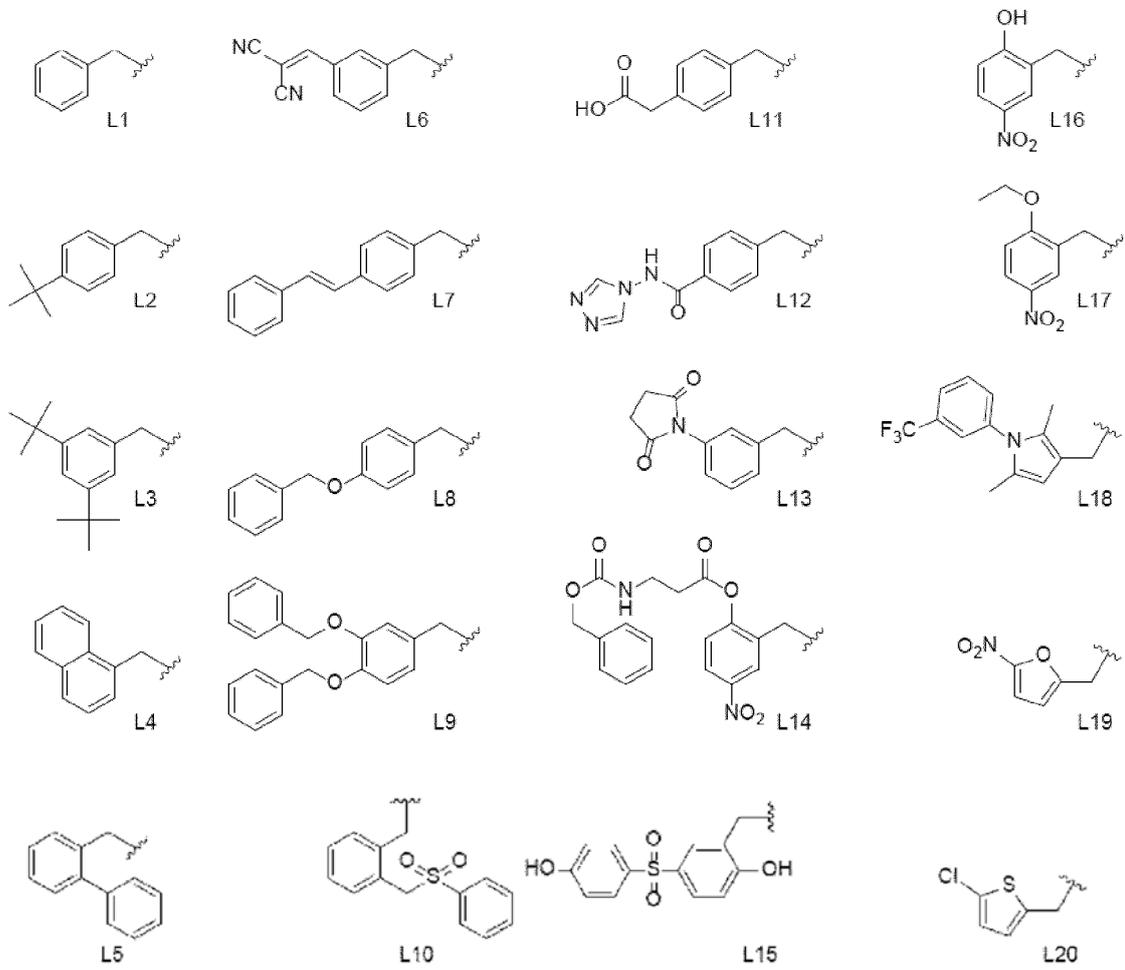
en donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, alilo, haloalquilo, alquenilo o haloalquenilo, para su uso en el tratamiento del cáncer.

16. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alilo o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

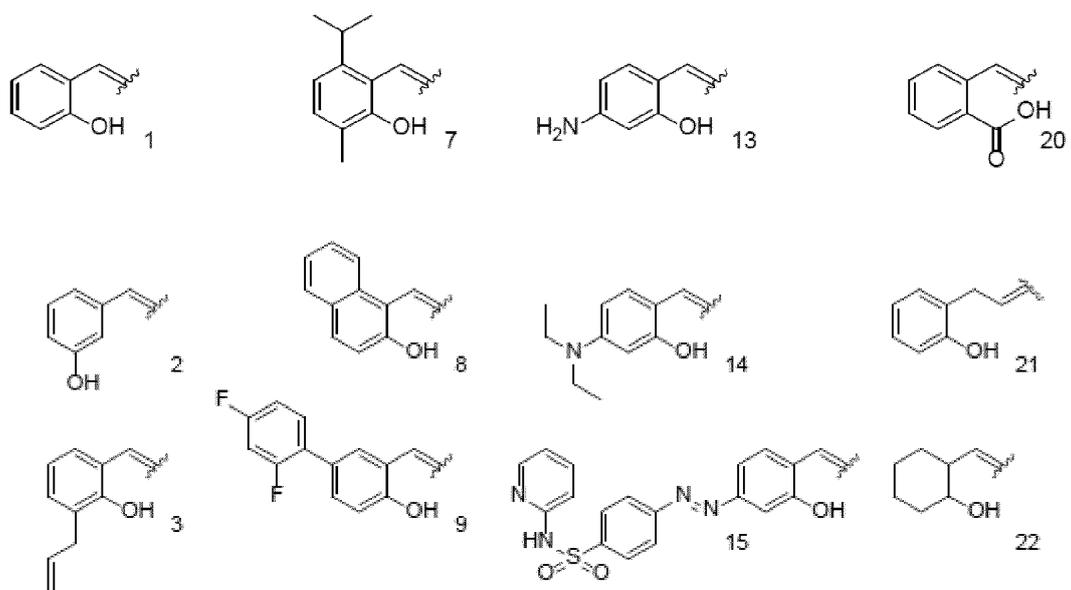
17. Un compuesto que tiene la fórmula:

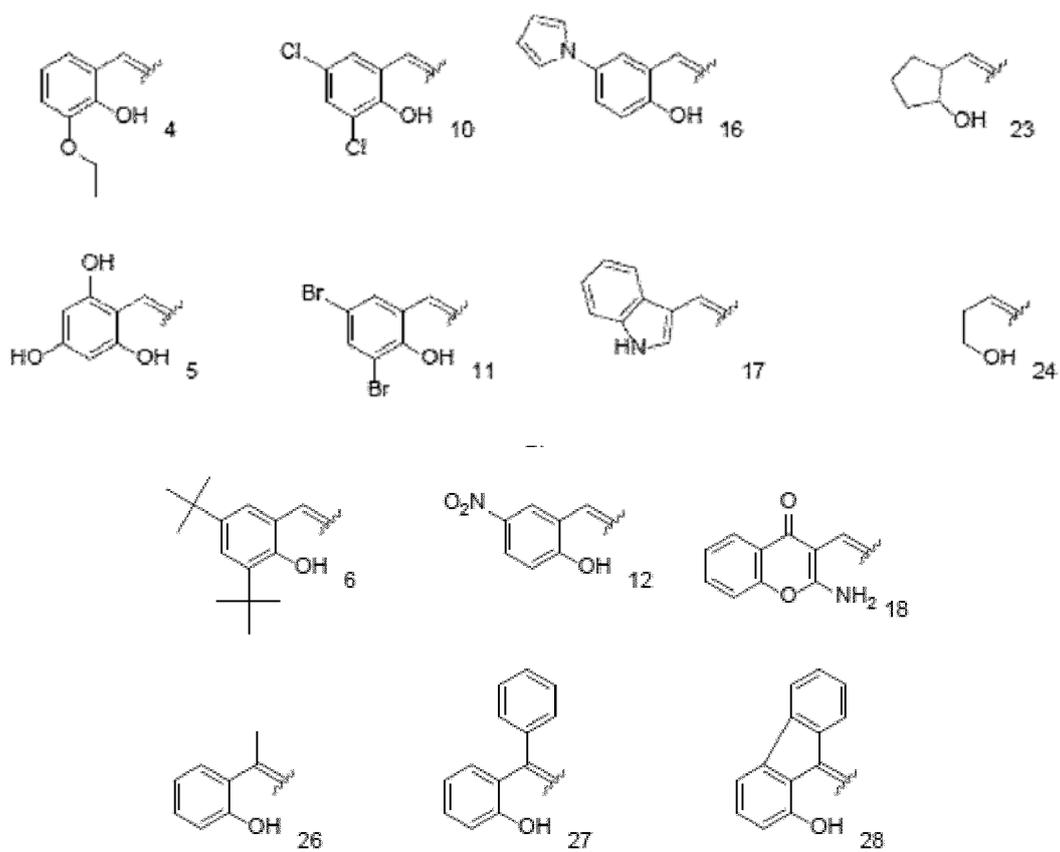


en donde AX se selecciona entre el grupo que consiste en:

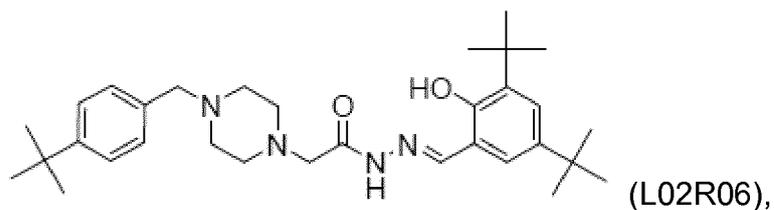
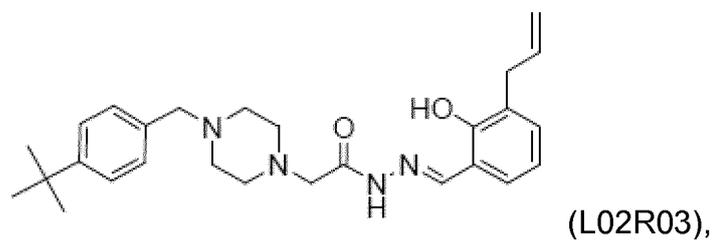
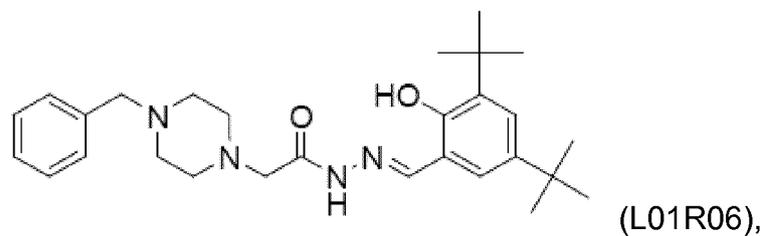


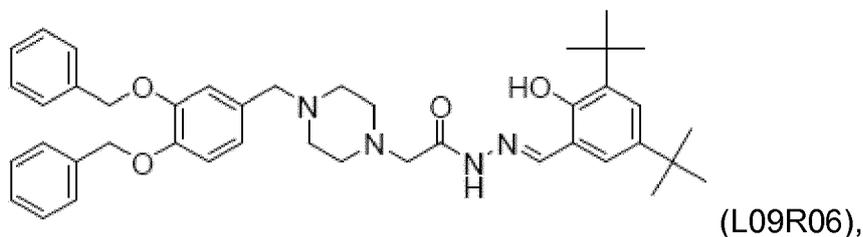
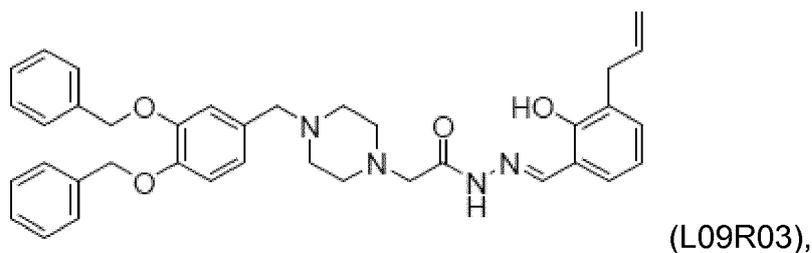
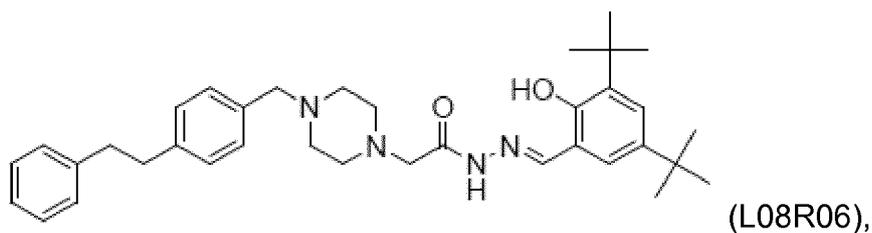
y BX se selecciona entre el grupo que consiste en:



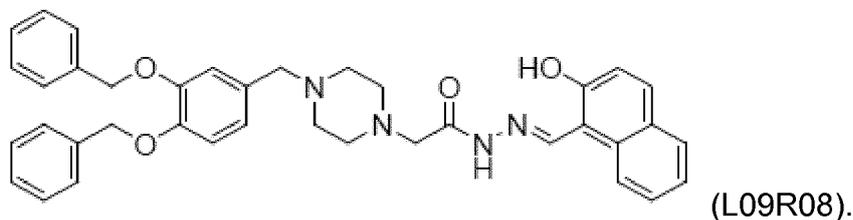


18. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: las fórmulas L01R06, L02R03, L02R06, L08R06, L09R03, L09R06 y L09R08, en donde las fórmulas son las siguientes:





y

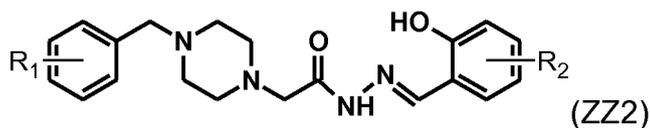


19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 18, para su uso en el tratamiento de cáncer.

20. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 5 o 19, en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal, melanoma, linfoma, neuroblastoma o leucemia.

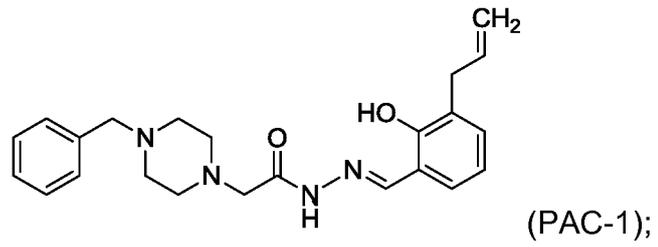
5 21. Un compuesto capaz de activar una molécula de procaspasa-3 para su uso en el tratamiento del cáncer, administrando el compuesto a una célula cancerosa para inducir así la muerte en dicha célula cancerosa en donde el compuesto es un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

22. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el compuesto tiene la fórmula estructural ZZ2,

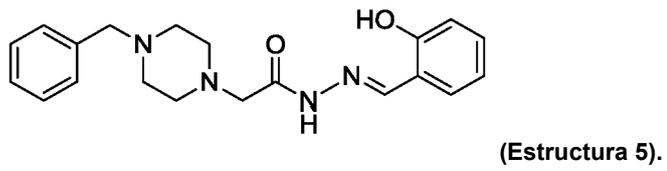


10 en donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, alilo, haloalquilo, alquenilo o haloalquenilo.

15 23. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 21 en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en PAC-1 y Estructura 5,



y



24. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

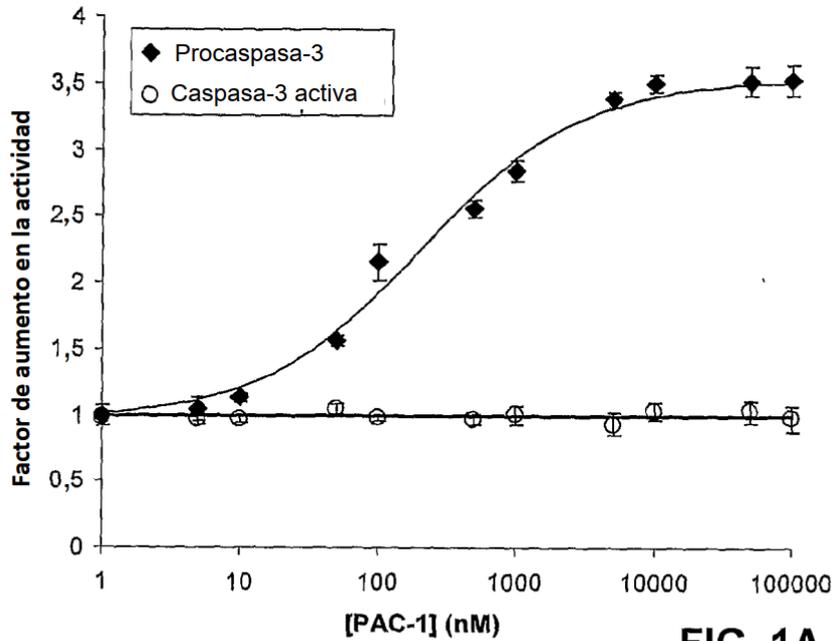


FIG. 1A

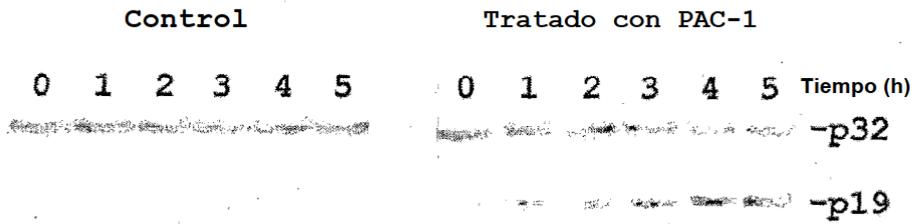


FIG. 1B

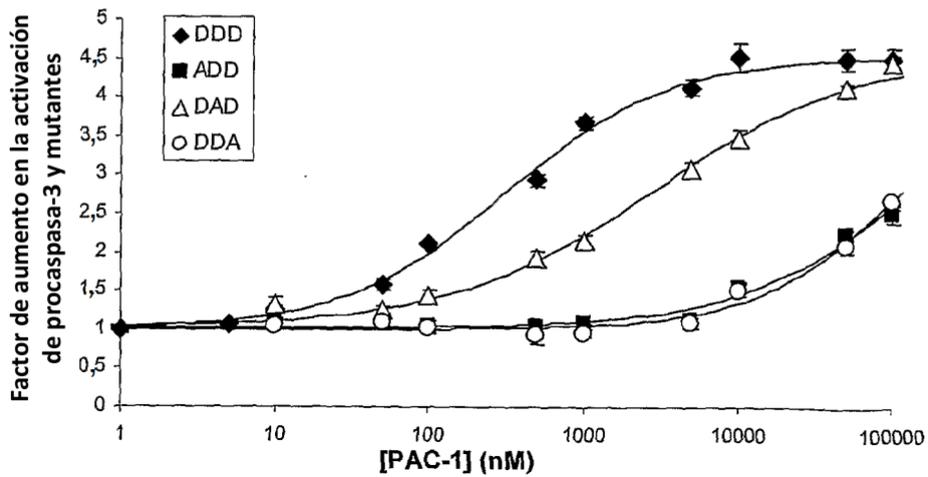


FIG. 2A

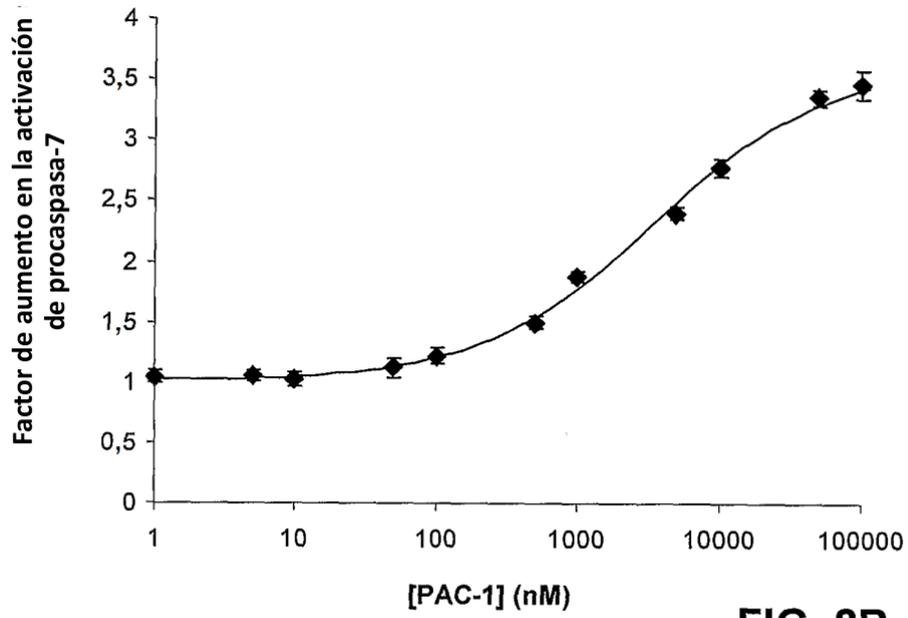


FIG. 2B

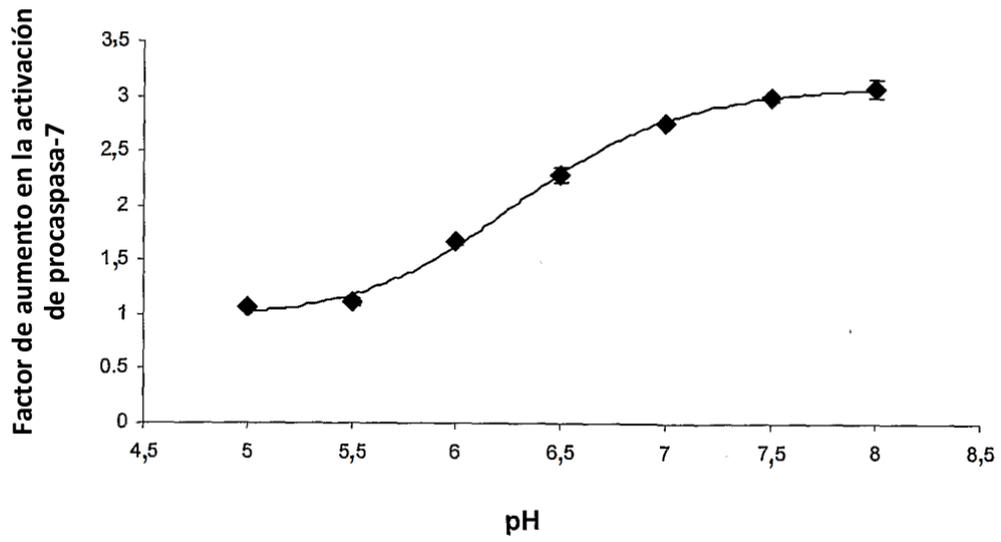


FIG. 2C

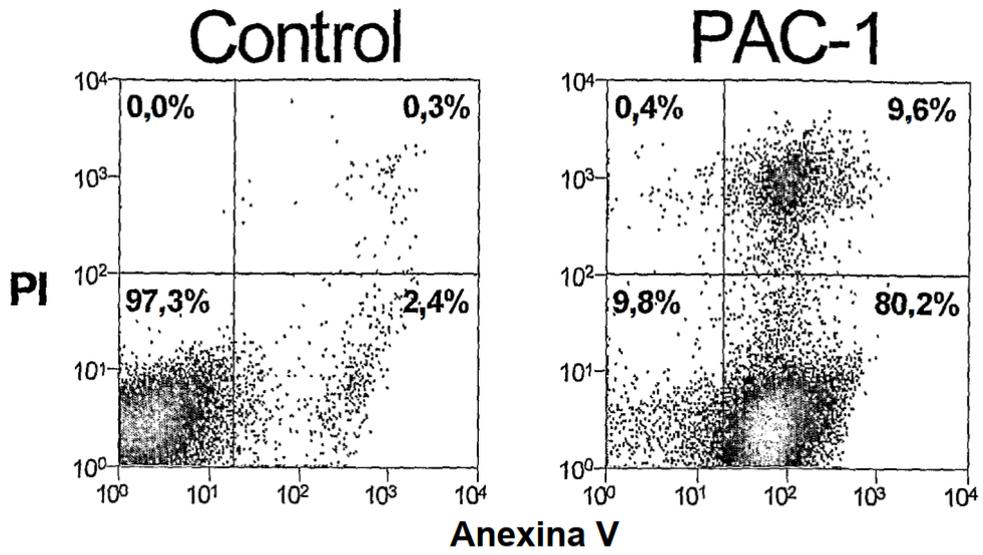


FIG. 3A (color)

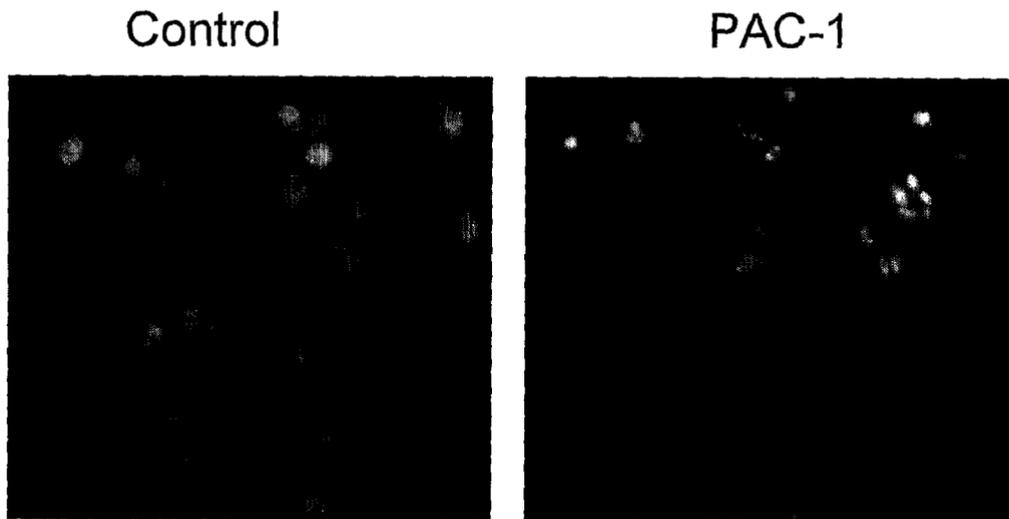


FIG. 3B (color)

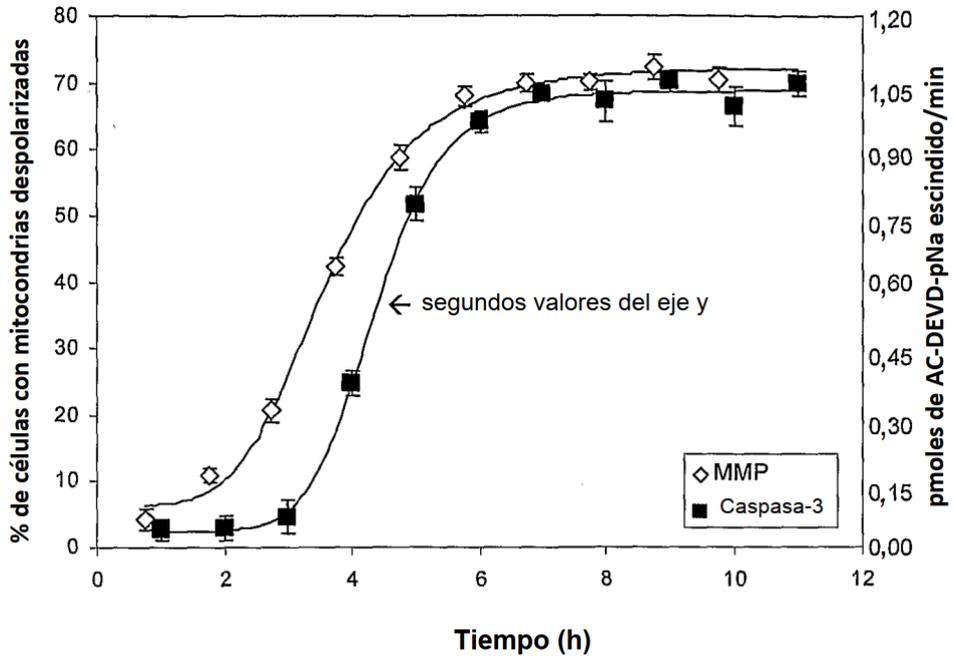


FIG. 4A

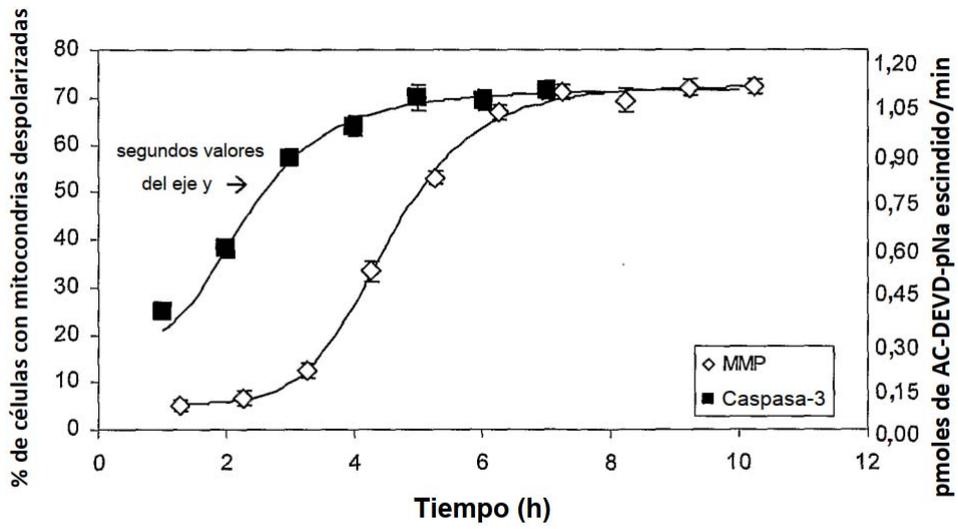


FIG. 4B

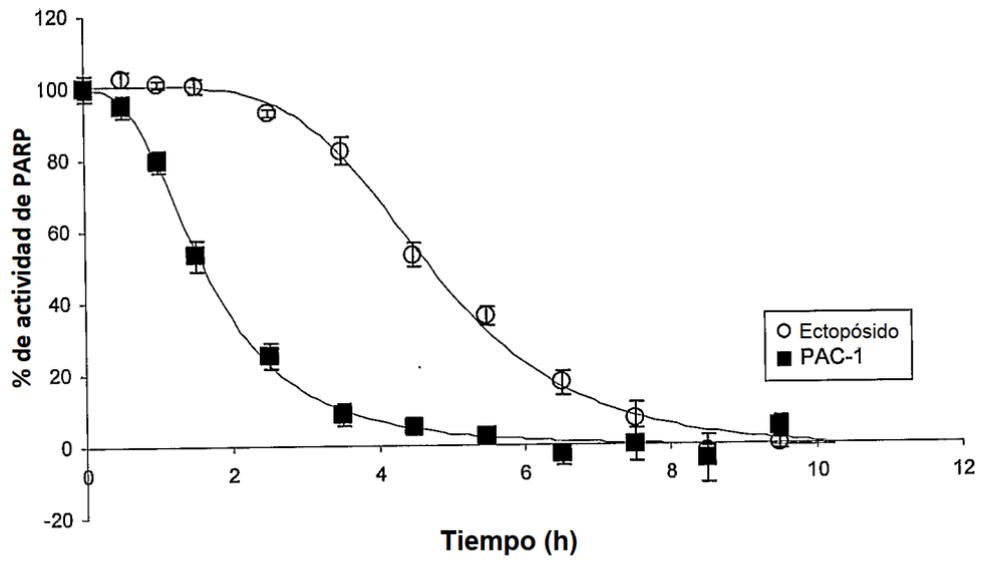


FIG. 4C

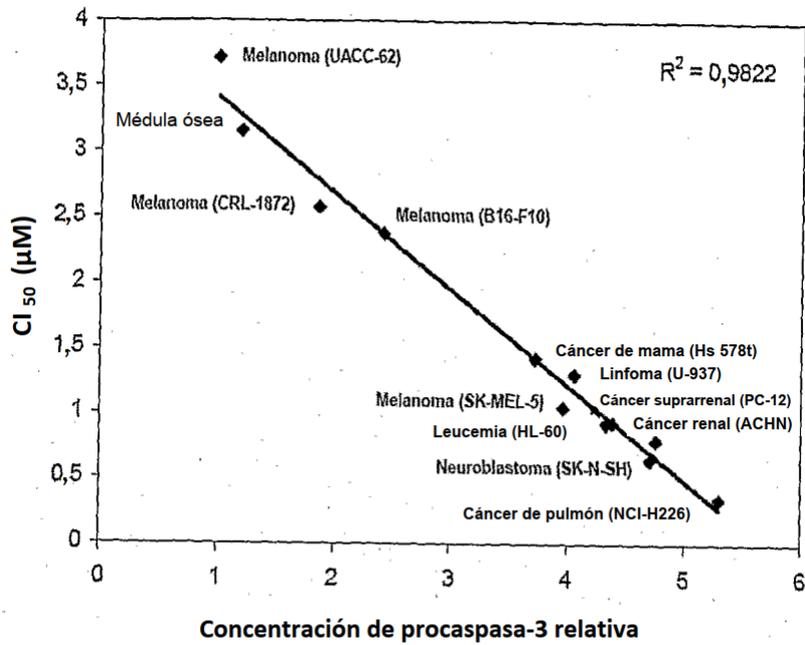


FIG. 4D

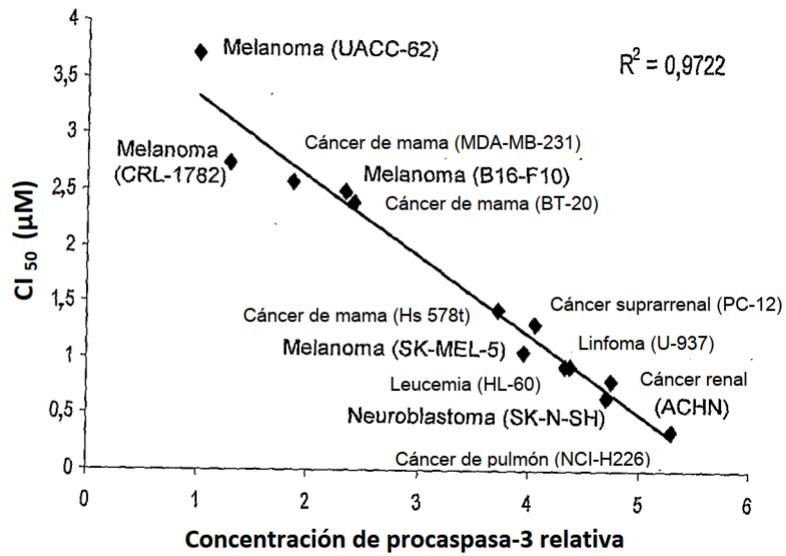


FIG. 4E

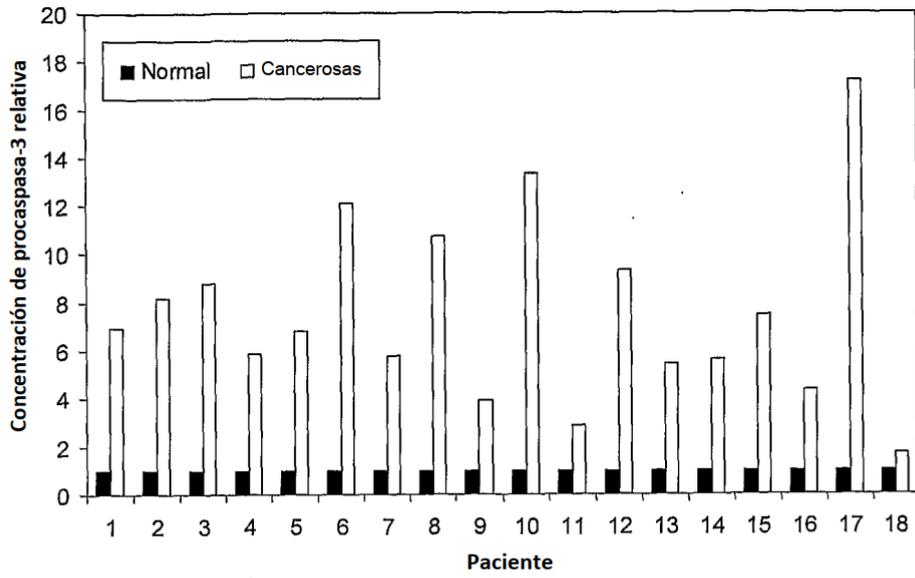


FIG. 5A

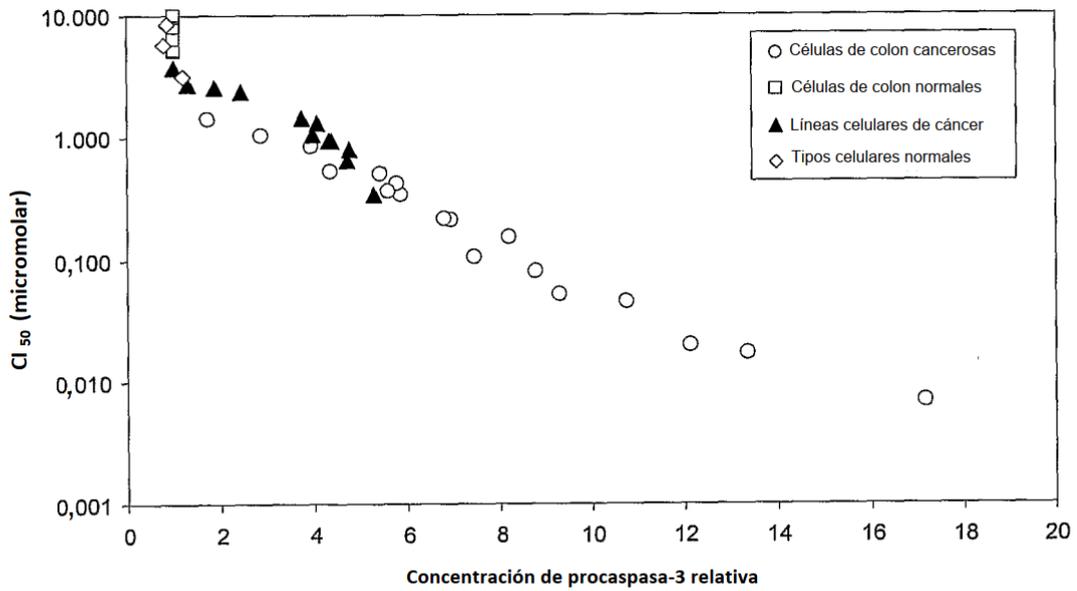


FIG. 5B

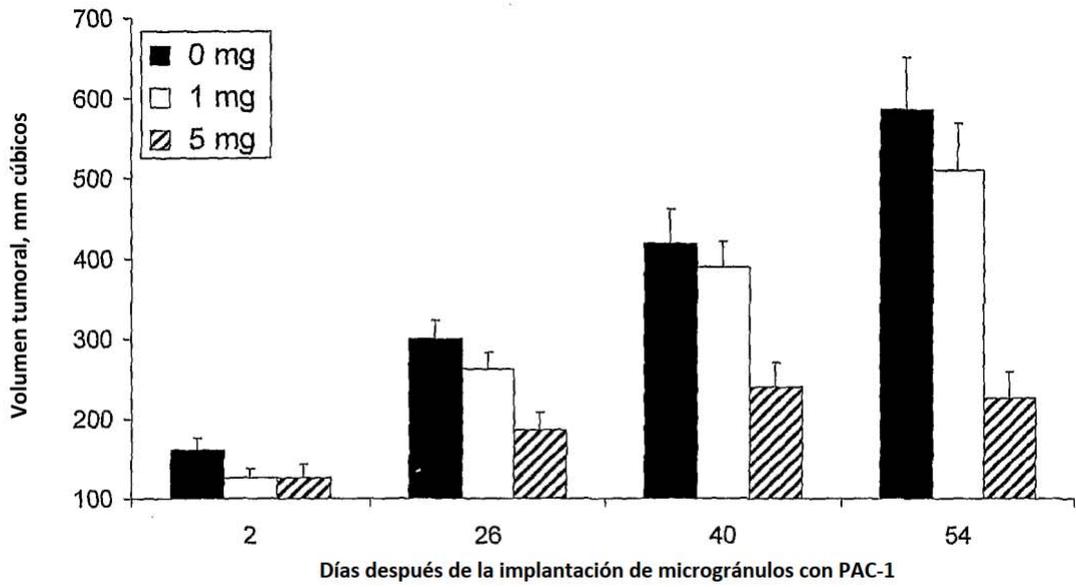


FIG. 5C

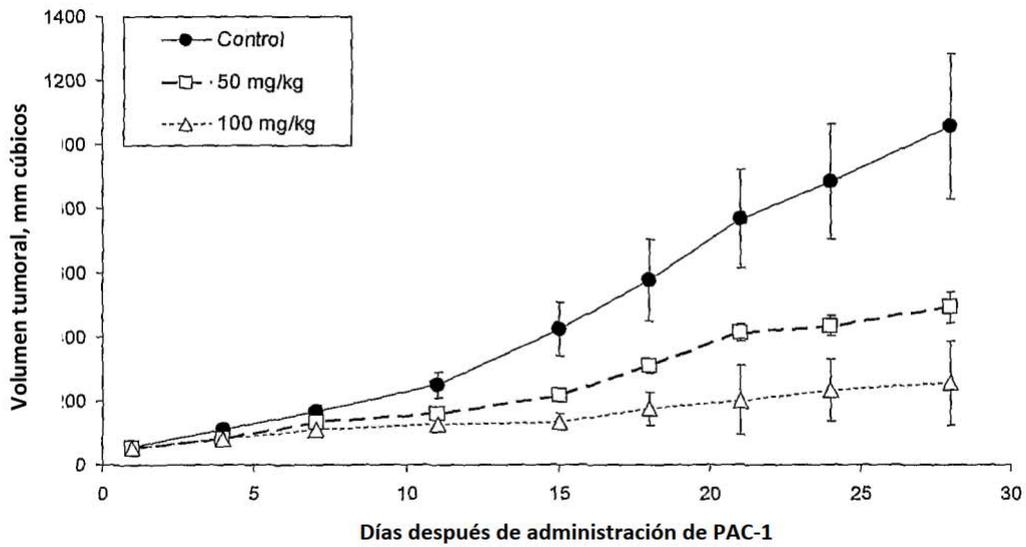
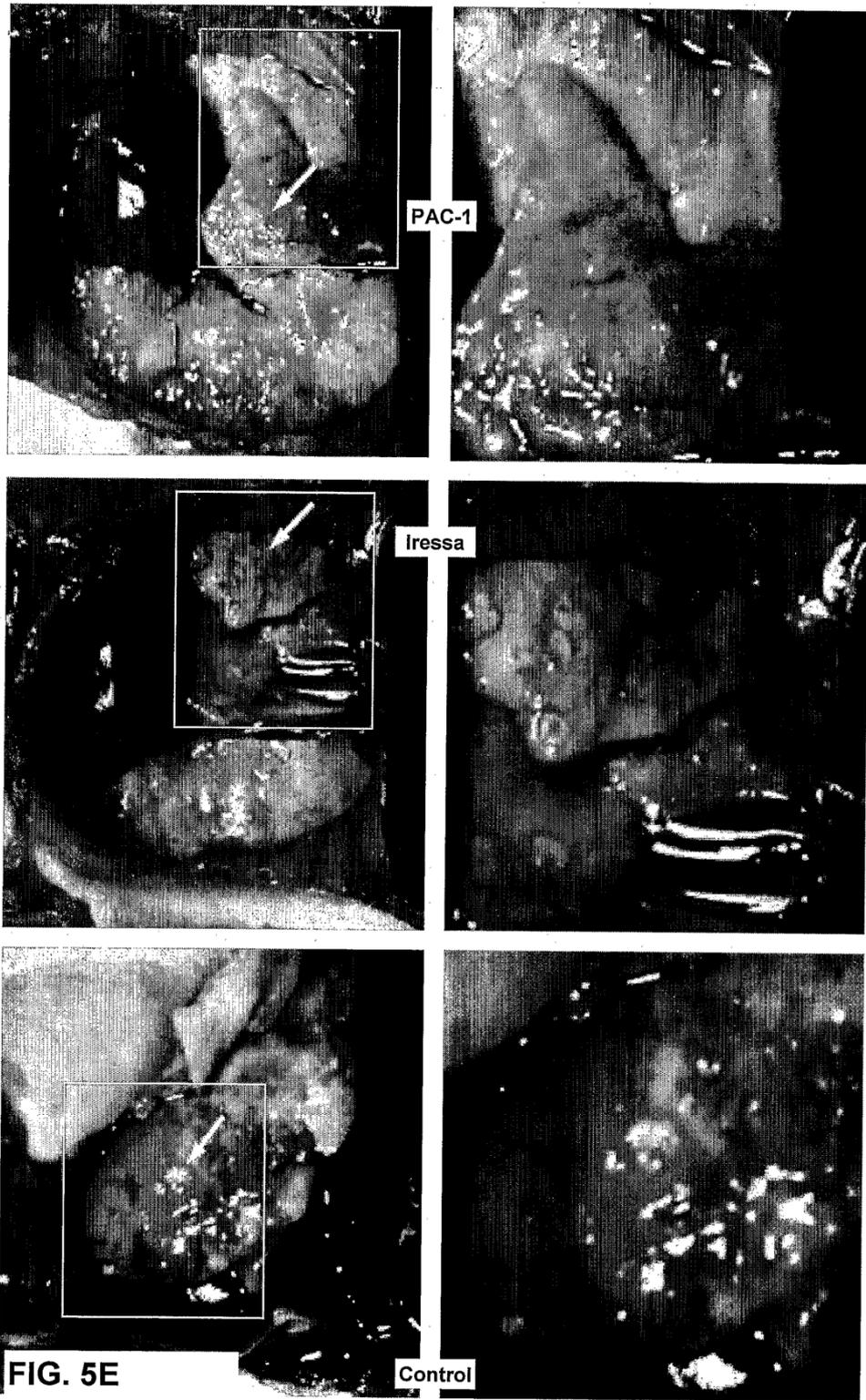


FIG. 5D



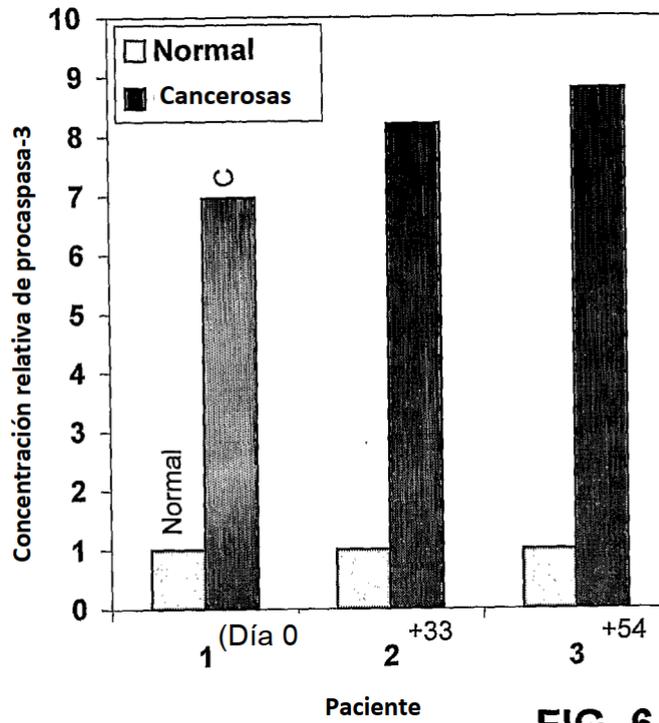


FIG. 6A

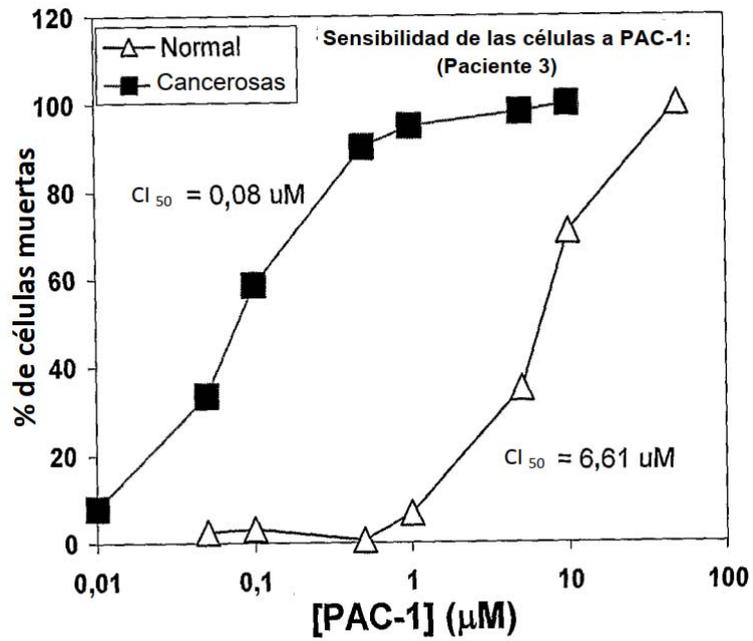


FIG. 6B

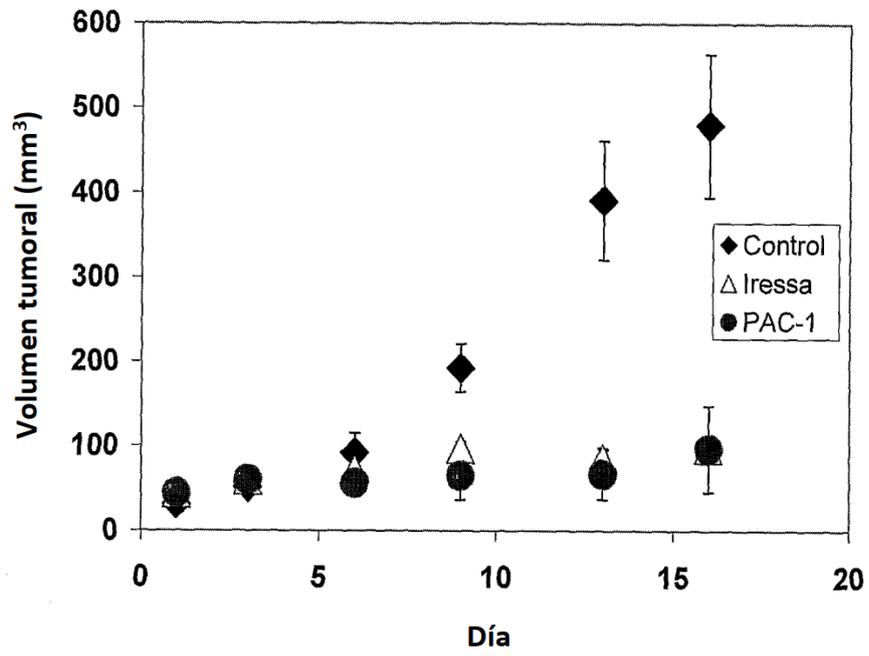


FIG. 7

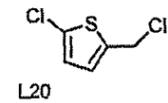
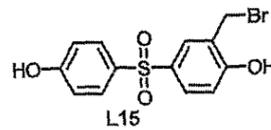
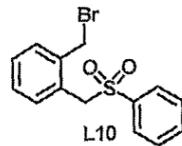
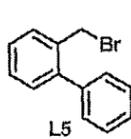
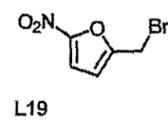
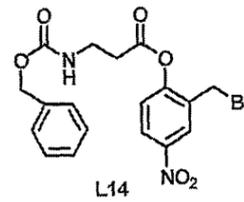
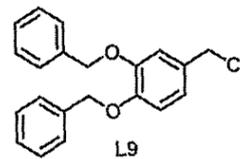
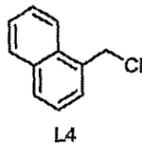
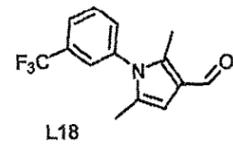
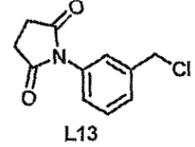
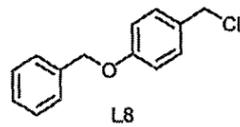
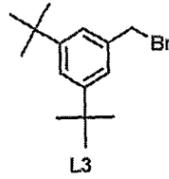
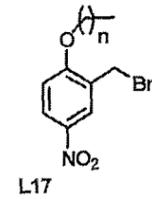
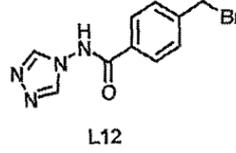
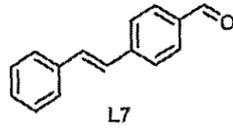
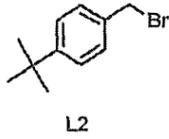
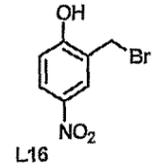
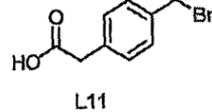
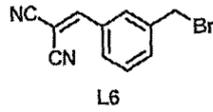
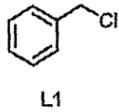
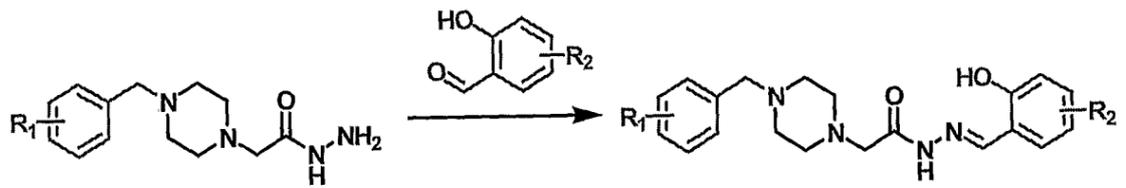


FIG. 8A

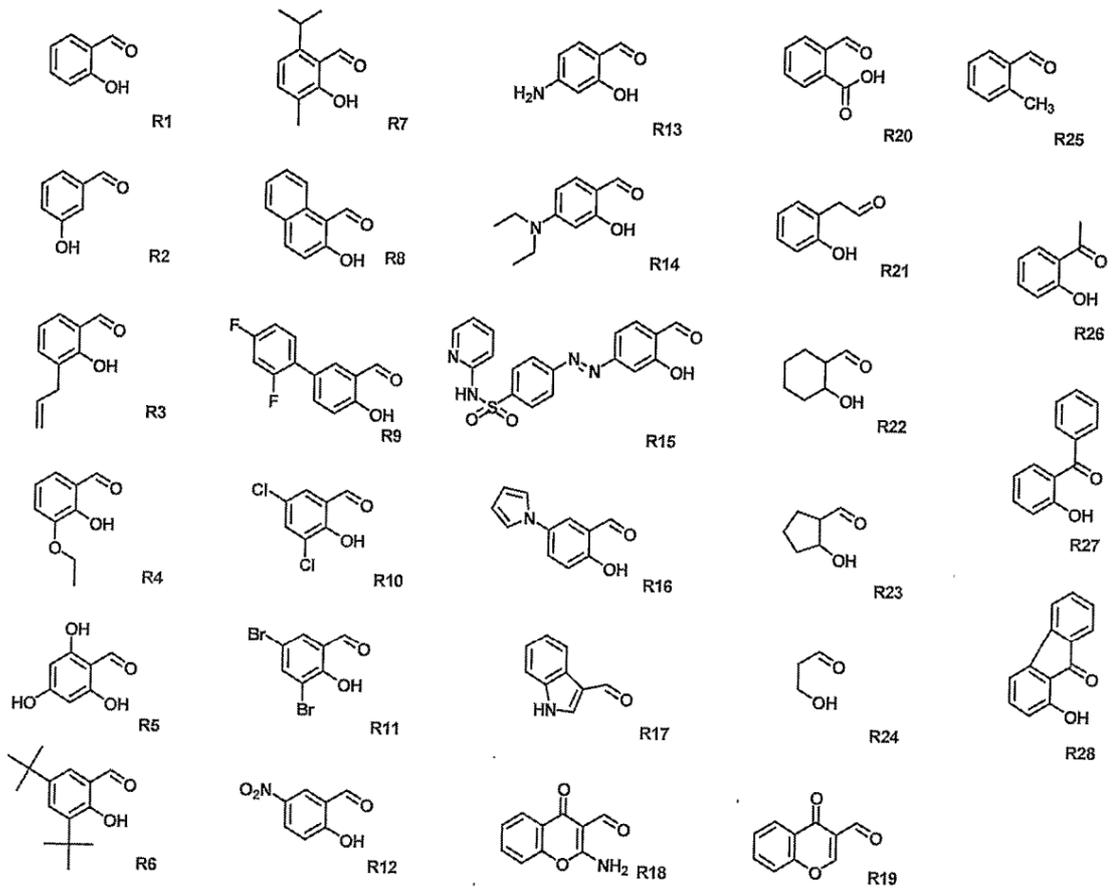


FIG. 8B

ES 2 763 156 T3

• Caspasa 3 (CASP3) de *Homo sapiens*, N.º de Acceso NM_004346

•

```

1   acatctcccg gcggcgggccc gcggaagcag tgcagacgcg gctcctagcg gatgggtgct
61  attgtgaggc ggttgtagaa gagtttcgtg agtgctcgca gctcatacct gtggctgtgt
121 atccgtggcc acagctgggt ggcgctgcct tgaaatocca ggccgtgagg agttagcgag
181 cctgtctcac actcggcgct ctgggttttcg gtgggtgtgc cctgcacctg cctcttcccc
241 cattctcatt aataaaggta tccatggaga aactgaaaaa ctcagtggat tcaaaatcca
301 ttaaaaattt ggaaccaaag atcatacatg gaagcgaatc aatggactct ggaatatccc
361 tggacaacag ttataaaatg gattatcctg agatggggtt atgtataata attaataata
421 agaattttca taaaagcact ggaatgacat ctcggtctgg tacagatgtc gatgcagcaa
481 acctcagggg aacattcaga aacttgaaat atgaagtcag gaataaaaat gatcttacac
541 gtgaagaaat tgtggaattg atgctgtgat tttctaaaga agatcacagc aaaaggagca
601 gttttgtttg tgtgcttctg agccatgggt aagaaggaat aatttttgga acaaatggac
661 ctgttgacct gaaaaaaata acaaaccttt tcagagggga tcggtgtaga agtctaactg
721 gaaaacccaa acttttcatt attcaggcct gccgtgggtac agaactggac tgtggcattg
781 agacagacag tgggtgtgat gatgacatgg cgtgtcataa aataccagtg gaggccgact
841 tcttgtatgc atactccaca gcacctgggt attattcttg gcgaaattca aaggatggct
901 cctggttcat ccagtcgctt tgtgccatgc tgaaacagta tgccgacaag cttgaattta
961 tgcacattct taccgggtt aaccgaaagg tggcaacaga atttgagtcc ttttctttg
1021 acgctacttt tcatgcaaag aaacagattc catgtattgt ttccatgctc acaaaagaac
1081 tctattttta tcaactaaaga aatggttggg tgggtgggtt ttttagttg tatgccagt
1141 gagaagatgg tatatttggg actgtatctt cctctcattt tgacctactc tcatgctgca
1201 gagggtactt taagacatac tcottccatc aaatagaacc actatgaagc tacctcaaac
1261 ttccagtcag gtagttgcaa ttgaattaaa tttagaataa ataaaaatgg atactgggtc
1321 agtcattatg agaggcaatg attgttaatt tacagctttc atgattagca agttacagtg
1381 atgctgtgct atgaattttc aagtaattgt gaaaaagtta aacatgaag taaatgaatt
1441 ttatgatatt ccccccactt aagactgtgt attctagttt tgtcaaacctg tagaaatgat
1501 gatgtggaag aacttaggca tctgtgggca tgggtcaaagg ctcaaacctt tatttttaga
1561 ttgatataca cggatgactt aactgcattt ttagaccatt tatctgggat tatggttttg
1621 tgatgtttgt octgaacact tttgttgtaa aaaaataata ataatgttta atattgagaa
1681 agaaactaat attttatgtg agagaaagtg tgagcaaac aacttgactt ttaaggctaa
1741 aacttaacat tcatagaggg gtggagtttt aactgtaagg tgctacaatg cccctggatc
1801 taccagcata aatatcttct gatttgtccc tatgcatatc agttgagctt catataccag
1861 caatatactt gaagagctat tatataaaaa ccccaaacctg ttgattatta gccaggtaat
1921 gtgaataaat tctataggaa catatgaaaa tacaacttaa ataataaaca gtggaatata
1981 aggaaagcaa taaatgaatg ggctgagctg cctgtaactt gagagtagat ggtttgagcc
2041 tgagcagaga catgactcag cctgttccat gaaggcagag ccatggacca cgcaggaagg
2101 gcctacagcc catttctcca tacgcaactg tatgtgtgga tgatgctgcc agggcgccat
2161 cgccaagtaa gaaagtgaag caaatcagaa acttgtgaag tggaaatgtt ctaaagggtg
2221 tgaggcaata aaaatcatag taactctttgt agcaaaaattc ttaagtatgt tattttctgt
2281 tgaagtttac aatcaaagga aaatagtaat gttttatact gtttactgaa agaaaaagac
2341 ctatgagcac ataggactct agacggcatc cagccggagg ccagagctga gccctcagcc
2401 cgggaggcag gctccaggcc tcagcagggt cggagccgct actgcacca gtctcactgg
2461 ctgtcagtat gacatttcac gggagatctt ttgttgctca aaaaatgagc tcgcatttgt
2521 caatgacagt ttcttttttc ttactagacc tgtaactttt gtaaaatcac atagcatgta
2581 atggtatctt aaagtgtgtt tctatgtgac aattttgtac aaatgtgtta ttttccattt
2641 ttatttcaaa atatacatc aaacttaaaa ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

FIG. 9

ES 2 763 156 T3

Caspasa 7 (CASP7) de *Homo sapiens*, N.º de Acceso NM_001227

```

1  ctcccgcgcg  cgggctcaac  tttgtagagc  gaggggcca  cttggcagag  cgcgaggcca
61  gctttgcaga  gagcgccctc  cagggactat  gcgtgcgggg  acacgggtcg  ctttgggctc
121  ttccaccctt  gcgagcgcga  ctaccctcag  ccaggggcgg  tgcaagcccc  gcccgccct
181  acccagggcg  gctcctccct  cgcagcgcgc  gagactttta  gtttcgcttt  cgctaaaggg
241  gccccagacc  cttgctgcgg  agcgacggag  agagactgtg  ccagtccag  ccgccctacc
301  gccgtgggaa  cgatggcaga  tgatcagggc  tgtattgaag  agcagggggt  tgaggattca
361  gcaaatgaag  attcagtgga  tgctaagcca  gacoggtcct  cgtttgacc  gtccctcttc
421  agtaagaaga  agaaaaatgt  caccatgcga  tccatcaaga  ccaccoggga  ccgagtgcct
481  acatatcagt  acaacatgaa  ttttgaaaag  ctgggcaaat  gcatcataat  aaacaacaag
541  aactttgata  aagtgcacag  tatgggcggt  cgaaacggaa  cagacaaaga  tgccgaggcg
601  ctcttcaagt  gcttccgaag  cctgggtttt  gacgtgattg  tctataatga  ctgctcttgt
661  gccaagatgc  aagatctgct  taaaaaagct  tctgaagagg  accatacaaa  tgccgcctgc
721  ttccgctgca  tcctcttaag  ccattggagaa  gaaaatgtaa  tttatgggaa  agatgggtgc
781  acaccaataa  aggatttgac  agcccacttt  aggggggata  gatgcaaaac  ctttttagag
841  aaacccaaac  tcttcttcat  tcaggcttgc  cgagggaccg  agcttgatga  tggcatccag
901  gccgactcgg  ggcccatcaa  tgacacagat  gctaatactc  gatacaagat  cccagtggaa
961  gctgacttcc  tcttcgccta  ttccacgggt  ccaggctatt  actcgtggag  gagccagga
1021  agaggctcct  ggtttgtgca  agcctctgca  tccatcctgg  aggagcacgg  aaaagacctg
1081  gaaatcatgc  agatcctcac  caggggtgaat  gacagagttg  ccaggcactt  tgaagtctag
1141  tctgatgacc  cacacttcca  tgagaagaag  cagatcccct  gtgtggtctc  catgctoacc
1201  aaggaactct  acttcagtca  atagccatat  caggggtaca  ttctagctga  gaagcaatgg
1261  gtcactcatt  aatgaatcac  atttttttat  gctcttgaaa  tattcagaaa  ttctccagga
1321  ttttaatttc  aggaaaatgt  attgattcaa  caggggaagaa  actttctggg  cctgtctttt
1381  gttctctgaa  ttttcagaga  ctttttttat  aatgttattc  atttggtgac  tgtgtaactt
1441  tctcttaaga  ttaattttct  ctttgtatgt  ctgttacctt  gttaatagac  ttaatacatg
1501  caacagaagt  gacttctgga  gaaagctcat  ggctgtgtcc  actgcaattg  gtggtaacag
1561  tggtagagtc  atgtttgcac  ttggcaaaaa  gaatcccaat  gtttgacaaa  acacagccaa
1621  ggggatattt  actgctcttt  attgcagaat  gtgggtattg  agtgtgattt  gaatgatttt
1681  tcattggcct  agggcagatt  tcoatgcaaa  agttctcata  tgagttagag  gagaaaaagc
1741  ttaatgattc  tgatatgtat  ccatcaggat  ccagtctgga  aacagaaaac  cattctaggt
1801  gtttcaacag  agggagttha  atacaggaaa  ttgaacttaca  tagatgataa  aagagaagcc
1861  aaacagcaag  aagctgttac  cacaccagag  gctatgagga  taatgggaag  aggtttgggt
1921  tcctgtgtcc  agtagtggga  tcatccagag  gagctggaac  catggtgggg  gctgcctagt
1981  gggagttagg  accaccaatg  gattgtggaa  aatggagcca  tgacaagaac  aaagccactg
2041  actgagatgg  agtgagctga  gacagataag  agaatacctt  ggtctcacct  atcctgcctt
2101  cacatcttcc  accagcacct  tactgccag  gcctatctgg  aagccacctc  accaaggacc
2161  ttggaagagc  aagggacagt  gaggcaggag  aagaacaaga  aatggatgta  agcctggccc
2221  ataatgtgaa  cataagtaat  cactaatgct  caacaattta  tccattcaat  catttattca
2281  ttgggtttgc  agatagtcta  tgtatgtgta  aaacaatctg  ttttggcttt  atgtgcaaaa
2341  tctgttatag  ctttaaaata  tatctggaac  tttttagatt  attccaagcc  ttattttgag
2401  taaatatttg  ttacttttag  ttctataagt  gaggaagagt  ttatggcaaa  gatttttggc
2461  actttgtttt  caagatgggt  ttatcttttg  aattcttgat  aaatgactgt  tttttctgca
2521  ctaatagtaa  ctggttaaaa  aacaaatggt  catatttatt  gattaaaaat  gtggttgctt
2581  aattcctaaa  aaaaaaaaaa  aaaaa

```

FIG. 10