(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 773 755**

(51) Int. CI.:

A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2016 PCT/KR2016/002109**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16153185**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2016 E 16736753 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3111951**

(54) Título: **Péptido funcional anticáncer para el tratamiento del cáncer de mama**

(30) Prioridad:

26.03.2015 KR 20150042700

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2020

(73) Titular/es:

SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION (50.0%)
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu
Seoul 08826, KR y
NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING CORPORATION CO., LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

PARK, YOON JEONG;
CHUNG, CHONG-PYOUNG;
LEE, JUE-YEON y
SUH, JIN SOOK

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

DESCRIPCIÓN

Péptido funcional anticáncer para el tratamiento del cáncer de mama

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición anticáncer que comprende un péptido que inhibe la proliferación de células madre cancerosas presentes en el tejido tumoral y que induce la apoptosis de tales células madre cancerosas, y más en particular, a un péptido anticáncer que inhibe la actividad de NF-κB que se sobreexpresa específicamente en células madre cancerosas presentes en tumores.

Antecedentes de la técnica

La presencia de células madre cancerosas fue sugerida por la hipótesis de que la proliferación de tumores es mantenida por ciertas células que tienen una alta malignidad entre las células tumorales. En efecto, las células madre cancerosas se han aislado de cánceres sanguíneos y cánceres sólidos. Dichas células madre cancerosas generalmente pueden formar tumores, pueden inducir la metástasis de tumores *in vivo* y pueden crear otros tipos de células madre cancerosas capaces de diferenciarse en células que tienen varios caracteres (Baccelli I *et al*., J Cell Biol 198: 281-293, 2012). Por lo tanto, estas células madre cancerosas tienen características sobresalientes, ya que se dividen asimétricamente y tienen la capacidad de autorrenovarse y proliferar para formar tumores.

De acuerdo con los informes hasta la fecha, es una teoría común que, debido a la capacidad de las células madre cancerosas para dividirse y metastatizar, los tumores no se pueden eliminar solo mediante la inducción de apoptosis de las células cancerosas presentes en los tumores. Las células madre cancerosas en los tumores tienen como soporte microambientes (nichos) que pueden mantener las características de estas células, y tales ambientes, que incluyen varias células inmunitarias, células estromales, células cancerosas y matriz extracelular, pueden transmitir las características de las células madre cancerosas a otras células distintas de las células madre cancerosas. Sin embargo, las células madre cancerosas permanecen en estado de reposo, a diferencia de otras células cancerosas, y son menos agresivas que las células cancerosas metastásicas. Por lo tanto, las células madre cancerosas superan el desafío de los agentes anticáncer, y si varias células madre cancerosas presentes en los tumores se activan debido al ataque externo de inflamación o sustancias tóxicas, estas células pueden ingresar al ciclo celular a alta velocidad y de este modo tiene la capacidad de proliferar (Wilson A *et al*., Nat Rev Cancer 7: 834-346, 2007).

En experimentos preliminares para la presente invención, se ha descubierto que, cuando una población celular con alta expresión de CD44, que es uno de los marcadores de células madre cancerosas, se aisló de células del cáncer de mama con metástasis y se sometió a un ensayo de fosforilación, la proteína más altamente fosforilada fue el factor nuclear kappa B (en adelante denominado "NF-κB"). En efecto, es sabido que NF-κB está involucrado en la proliferación de las células y se activa en células cancerosas y células madre cancerosas.

Generalmente, NF-κB de un p50/p65 en estado de reposo se une al IκB-α y existe en el citoplasma en un estado inactivo (Simon, T. W. *et al*., Semin. Cancer Biol. 8: 75-82, 1997). Debido a que IκB-α unido a NF-κB enmascara la secuencia de localización nuclear (NLS) de NF-κB e IκB-α contiene una fuerte secuencia de exportación nuclear (NES), NF-κB permanece en el citoplasma sin desplazarse al núcleo (Thomas, H. *et al*., Cell. 68: 1121-1133, 1992). Si se aplican a las células varias señales intracelulares y extracelulares y estrés, se produce la degradación de IκB-α por la proteasa debido a su fosforilación y ubiquitinación, y, por este motivo, la NLS de NF-κB enmascarado por la unión a IκB se desenmascara, por lo que el NF-κB restante en el citoplasma se libera, se desplaza rápidamente al núcleo y se une a su gen diana para activar la transcripción del gen.

Se ha informado que la activación intracelular de NF-κB regula la actividad transcripcional no solo de genes tal como no solo las enzimas relacionadas con la inflamación (ciclooxigenasa II (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)), proteínas de respuesta al estrés, receptores (receptor de interleuquina-2 y receptor de células T), citoquinas (interleuquina-1, -2, -6 y -12, y TNF-α) y quimioquinas (interleuquina 8), que están involucradas en reacciones inflamatorias, sino también genes tal como ciclina D1, TRAF1 (factor 1 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral) y c-IAP (inhibidor de la apoptosis) 1, que están involucrados en la apoptosis y la proliferación celular (Barnes, P *et al*., Engl. J. Med. 366:1066-1071, 1997; Xie, Q *et al*., J. Biol. Chem. 269:4705-4708, 1994; Yamamoto, K. *et al*., J. Biol. Chem. 270:31315-31320, 1995).

En particular, se ha descubierto que la activación anormal de NF-κB regula varios genes que están involucrados no solo en enfermedades relacionadas con la inflamación, sino también en carcinogénesis, proliferación, invasión y angiogénesis celular (Aradhya, S. *et al*., Curr. Opin. Opin. Genet. Dev., 11: 300-7, 2001; Orlowski, R.Z. *et al*., Trnds Mol. Med., 8: 385-9, 2002). Además, se ha informado que la activación anormal de NF-κB cumple un papel importante en la malignidad de las células cancerosas. Además, es sabido que NF-κB confiere resistencia a los fármacos a las células cancerosas tratadas con agentes anticáncer e induce la expresión de genes que promueven la supervivencia de las células cancerosas (Campbell KJ *et al*., Mol Cell 13: 853-865, 2004). Como se describió anteriormente, se espera que la regulación de la actividad de NF-κB no solo inhiba el crecimiento de las células madre cancerosas, sino que también esté involucrado en el mecanismo de señalización de las células cancerosas en microambientes en los que existen células madre cancerosas, de este modo exhibiendo el efecto de inhibición de la proliferación tumoral.

El documento WO 2010/092571 desvela péptidos derivados de β-defensina, tal como el 1,10-cicloRGRKCCRRK, y su uso para reducir o inhibir la metástasis del cáncer y para reducir o inhibir la migración y recirculación de las células malignas que expresan CXCR4 a la médula ósea.

Por consiguiente, los inventores de la presente han realizado grandes esfuerzos para desarrollar un fármaco terapéutico anticáncer eficaz que inhiba la proliferación de células cancerosas y células madre cancerosas y que induzca la apoptosis de tales células. Como resultado, los inventores de la presente han descubierto y sintetizado un péptido funcional a partir de un material orgánico presente *in vivo*, y han descubierto que, cuando las células madre del cáncer de mama se tratan con el péptido, el péptido exhibe el efecto de inhibir la actividad de NF-κB para inhibir la proliferación de las células e inducir la apoptosis de las células, de este modo impidiendo la presente invención.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un uso de un péptido que represente la inhibición del crecimiento y los efectos apoptóticos de las células madre cancerosas.

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición que contiene, como ingrediente activo, un péptido representado por una secuencia de aminoácidos SEQ ID NÚM.: 2 o 3 para uso en el tratamiento del cáncer de mama.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra los resultados de aislar y recolectar poblaciones celulares de acuerdo con el nivel de expresión de CD44 en células del cáncer de mama con metástasis (MDA-MB-231) y realizar un ensayo de fosforilación para descubrir una proteína fosforilada para aumentar su actividad.

La FIG. 2 muestra los resultados de la observación microscópica de barrido láser confocal de la permeabilidad intracelular de un péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas en células madre del cáncer de mama.

La FIG. 3 muestra la formación de colonias suspendidas (mamosferas) inhibidas por un péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas en células madre del cáncer de mama.

La FIG. 4 muestra la formación de colonias adherentes inhibidas por un péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas en células madre del cáncer de mama (A: imágenes de colonias teñidas, y B: gráfico de absorbancia que muestra la formación de colonias).

La FIG. 5 muestra los resultados de la citometría de flujo realizada para medir la apoptosis inducida por un péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas en células madre del cáncer de mama.

La FIG. 6 muestra los resultados del análisis de proteínas relacionadas con la migración celular y la proliferación celular mediante Western blotting para examinar el cambio en las proteínas por un péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas en células madre del cáncer de mama a nivel molecular.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos del experimento, que se describirán a continuación, son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

En la presente invención, se descubrió un péptido funcional a partir de un material orgánico presente *in vivo*, y las células madre del cáncer de mama se trataron con el péptido. Como resultado, se descubrió que el péptido inhibe el movimiento intranuclear de la proteína NF-κB para inhibir la señalización de NF-κB, lo que indica que el péptido exhibe efectos terapéuticos anticáncer mediante la inhibición de la proliferación de células madre cancerosas y la inducción de apoptosis de tales células.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se dirige a una composición que contiene, como ingrediente activo, un péptido representado por una secuencia de aminoácidos SEQ ID NÚM.: 2 o 3 para uso en el tratamiento del cáncer de mama.

En la presente invención, el péptido puede inhibir el movimiento intranuclear de la proteína NF-κB en las células del cáncer de mama o células madre del cáncer de mama para inhibir así la actividad de NF-κB.

En la presente invención, el péptido puede inhibir la proliferación de células del cáncer de mama o células madre del cáncer de mama e inducir la apoptosis de tales células.

En la presente invención, las células madre del cáncer de mama son preferiblemente aquellas incluidas en células del cáncer de mama derivadas de un tumor metastásico de mama. En la presente memoria, el tumor metastásico tiene el

mismo significado que el cáncer.

El tumor metastásico referido se selecciona preferentemente del grupo que consiste en cáncer uterino cervical, cáncer sanguíneo, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de hueso, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma de la piel, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer anal, cáncer de mama, carcinoma de trompa de Falopio, carcinoma endometrial, cáncer vaginal, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de uréter, pero no se limita a estos.

Como se usa en la presente memoria, el término "composición" se considera que incluye no solo un producto que contiene un componente específico sino también cualquier producto obtenido directa o indirectamente por la combinación de un componente específico.

De acuerdo con la descripción, la composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en solución salina fisiológica, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol y etanol, pero no se limita a estos.

Como se desvela en la presente memoria, la composición puede contener además al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un excipiente, un tampón, un conservante antimicrobiano, un tensioactivo, un antioxidante, un agente de ajuste de tonicidad, un conservante, un espesante y un modificador de la viscosidad, pero no se limita a estos.

En la presente invención, la composición farmacéutica se puede formular para administración oral, para administración por inyección, o en forma de un agente gelificante para trasplante local, pero no está limitada a estos. La composición de la presente invención se puede preparar en una formulación adecuada usando una técnica conocida (Joseph Price Remington, Remington’s Pharmaceutical Science, 17th edition, Mack Publishing Company, Easton PA).

El inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas o la composición anticáncer de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a través de vías que generalmente se usan en el campo médico. La composición de la presente invención se administra preferentemente por vía parenteral. La composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intradural, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intrarrectal, sublingual o tópica.

En la presente invención, el agente gelificante para trasplante local comprende un polímero sintético tal como ácido poliláctico glicólico, poloxámero o propilenglicol, o un polímero natural tal como colágeno, ácido algínico, ácido algínico, propilenglicol, sulfato de condroitina o quitosano, pero no se limita a estos.

La dosis del inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas o la composición anticáncer de acuerdo con la presente invención puede variar de acuerdo con el peso, la edad, el sexo, el estado de salud y la dieta del paciente, el tiempo de administración, el modo de administración, la tasa de excreción, la gravedad de la enfermedad, o similares, y puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica en consideración de los factores anteriores.

La composición de la presente invención se puede administrar como un agente terapéutico individual o en combinación con otros agentes terapéuticos, y se puede administrar en forma secuencial o simultánea con agentes terapéuticos convencionales. Además, la composición de la presente invención se puede usar simultáneamente con otro procedimiento terapéutico tal como terapia de radiación.

La presente invención está dirigida a una composición que contiene, como ingrediente activo, un péptido representado por una secuencia de aminoácidos SEQ ID Nos: 2 o 3, para usar en el tratamiento del cáncer de mama.

Como se usa en la presente memoria, el término "tumor" se refiere a un quiste en un órgano o una población celular parenquimatosas en sangre, que está formado por poblaciones celulares cancerosas o de células madre cancerosas y prolifera de manera anormal. El término "tumor metastásico" tiene el mismo significado que "cáncer".

En la presente invención, el término "células cancerosas" significa que incluye células que crecen anormalmente debido a la modificación genética en los mecanismos de proliferación y crecimiento de las células normales y que tienen la capacidad de desplazarse agresivamente a otros órganos, lo que se puede designar como metástasis.

En la presente invención, es sabido que las "**células madre cancerosas**" están presentes en los tumores, y se considera que se producen debido a metástasis anormales de la información genética de las células madre normales. Es sabido que las células madre cancerosas se mantienen y proliferan debido a la presencia de microambientes (nichos) para su supervivencia, y que las células normales, células inmunitarias relacionadas o células cancerosas diferenciadas, que están presentes alrededor de las células madre cancerosas, influyen en el mantenimiento de características y la proliferación de estas células madre cancerosas.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Será evidente para una persona experta en la técnica que estos ejemplos tienen solo fines ilustrativos y no se deben interpretar para limitar el ámbito de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Ejemplo 1: Análisis del conjunto de anticuerpos de fosforilación de células madre cancerosas

Para encontrar proteínas activadas anormalmente sobreexpresadas en células madre cancerosas, se aislaron células madre cancerosas de células del cáncer de mama con metástasis. Específicamente, una población celular con sobreexpresión de CD44 conocida como proteína marcadora de células madre cancerosas se aisló por FACS Aria y se denominó "células $CD44^{altas}$". Por el contrario, una población celular con muy baja expresión de CD44 se denominó "células $CD44^{bajas}$". El patrón de fosforilación de CD44 en células $CD44^{altas}$ similar a las células madre cancerosas se analizó comparativamente con el de las células $CD44^{bajas}$.

El análisis comparativo del patrón de fosforilación se realizó usando un microconjunto de anticuerpos fosfo explorador y un kit de ensayo adquirido de Full Moon Biosystems (USA). Las células aisladas por FACS Aria de acuerdo con los niveles de expresión de CD44 se lisaron, y se obtuvo el microconjunto de anticuerpos fosfo explorador de las soluciones de células lisadas usando el kit adquirido en E-Biogen Inc. (Korea).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 1, cuando los resultados del análisis cuantitativo de las proteínas fosforiladas se dispusieron en orden descendente mediante la división del valor de las células $CD44^{altas}$ por el valor de las células $CD44^{bajas}$, se puede observar que la fosforilación de NF-κB-p65 en el sitio S468 se produjo en la relación más alta. Además, las proteínas candidatas activadas en la población de $CD44^{altas}$ de las células de cáncer de mama metastásicas que se pueden considerar células madre cancerosas se muestran en la FIG. 1, y estas proteínas candidatas tienen un potencial como marcador específico de células madre cancerosas. En particular, el NF-κB más altamente activado es compatible con el informe de que el NF-κB se activa de manera anormal en las células madre cancerosas. Por lo tanto, los inventores de la presente han seleccionado a NF-κB como una proteína diana para la línea de células madre cancerosas o la población de células cancerosas $CD44^{altas}$, y han desarrollado un péptido que inhibe la actividad de la proteína NF-κB.

Ejemplo 2: Síntesis del péptido para inhibir la proliferación de células madre cancerosas

Se sintetizó un péptido de la siguiente SEQ ID NÚM.: 1 a partir del extremo terminal C mediante un procedimiento de síntesis química en fase sólida F-moc usando un sintetizador de péptidos. Específicamente, el péptido se sintetizó usando una resina Rink (0,075 mmol/g, malla 100-200, reticulación DVB 1%) que se había unido al Fmoc-(9-fluorenilmetoxicarbonilo) como grupo bloqueante. Se colocaron 50 mg de la resina Rink en un sintetizador, después de lo que la resina se hinchó con DMF y se trató con una solución de piperidina/DMF 20% para eliminar el grupo Fmoc. De acuerdo con la secuencia que comienza desde el extremo terminal C, se añadieron solución de aminoácidos 0,5 M (disolvente:DMF), DIPEA 1,0 M (disolvente:DMF y NMP) y HBTU 0,5 M (disolvente:DMF) a la resina en cantidades de 5, 10 y 5 equivalentes, respectivamente, y se hicieron reaccionar bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1-2 horas. Después de completar cada una de las etapas de desprotección y acoplamiento, la resina se lavó dos veces con DMF y NMP. Incluso después de que se acopló el último aminoácido, se realizó la desprotección al grupo Fmoc.

La síntesis de péptidos se confirmó usando el procedimiento de prueba de ninhidrina. Después de completar la prueba, la resina sintetizada se secó usando THF o DCM, y después se añadió un cóctel de escisión de TFA a la resina en una cantidad de 20 ml por g de resina, seguido de agitación durante 3 horas. Después, un cóctel que contiene la resina y el péptido disuelto en el mismo se separó por filtración. Después de eliminar la solución filtrada usando un evaporador rotatorio, se añadió éter frío o se añadió una cantidad excesiva de éter frío directamente a la solución de cóctel de TFA que contiene el péptido disuelto en el mismo para cristalizar de ese modo el péptido en un sólido, y el péptido se separó por centrifugación. El péptido separado se lavó varias veces con éter y se centrifugó para de este modo eliminar por completo el cóctel de TFA. El péptido resultante se añadió a agua destilada y se liofilizó.

SEQ ID NÚM.: 1 (hBD3-3): GKCSTRGRKCCRRKK

La secuencia peptídica sintetizada se escindió de la resina, se lavó, se liofilizó y después se purificó por cromatografía líquida. El peso molecular del péptido purificado se analizó por espectrometría de masas.

De la misma manera que la descrita anteriormente, un péptido de la SEQ ID NÚM.: 2, en la que la cisteína en la posición 5 en el extremo terminal C del péptido de la SEQ ID NÚM.: 1 está sustituida con metionina se sintetizó por un procedimiento de síntesis química sólida de F-moc usando un sintetizador de péptidos.

SEQ ID NÚM.: 2 (hBD3-3 M1): GKCSTRGRKCMRRKK

Después, un péptido de SEQ ID NÚM.: 3, en el que la cisteína en la posición 6 en el extremo terminal C del péptido de SEQ ID NÚM.: 1 está sustituida con metionina se sintetizó mediante un procedimiento de síntesis química sólida de F-moc usando un sintetizador de péptidos.

SEQ ID NÚM.: 3 (hBD3-3 M2): GKCSTRGRKMCRRKK

Ejemplo 3: Examen de la permeabilidad intracelular del péptido para inhibir la proliferación de células madre cancerosas

3-1: Síntesis de un colorante fluorescente para el péptido para inhibir la proliferación de células madre cancerosas

Los péptidos de la SEQ ID NÚM.: 1-3, sintetizados en el Ejemplo 2, se marcaron con un colorante fluorescente dada su capacidad de penetrar en las células. Se acoplaron 10 equivalentes de rodamina B al extremo terminal N de cada uno de los péptidos sintetizados usando trietilamina, y el peso molecular de cada uno de los péptidos marcados se analizó por espectrometría de masas para confirmar la síntesis de los mismos.

Mediante el uso de cromatografía líquida de fase inversa, se realizaron el análisis y la purificación. Para el análisis, se pasaron TFA/H_2O 0,1% y TFA/acetonitrilo 0,092% por una columna C18 (diámetro: 4,6 mm) con un gradiente de 0 a 60% a un caudal de 1 ml/min durante 30 minutos. En la presente memoria, se ajustó un detector UV a una longitud de onda de 220 nm. La purificación se realizó a un caudal de 20 ml/min usando una columna (diámetro: 2,2 cm) y los mismos disolventes y la misma longitud de onda de detección que los usados en el análisis. Solo se recogieron péptidos puros, y los disolventes se eliminaron con un evaporador rotatorio, seguido de liofilización.

3-2: Medición de imágenes de fluorescencia de la permeabilidad celular del péptido para inhibir la proliferación de células madre cancerosas

Para medir la permeabilidad celular del péptido para la inhibición de la proliferación de células madre cancerosas para confirmar de ese modo su función eficaz, se sembraron hBCSC (células madre del cáncer de mama humano, Celprogen, USA; positivas para CD44) en un portaobjetos de cámara de 4 pocillos a una densidad de 1 x 10^4 células por pocillo, y después se cultivaron en medio completo hBCSC (Celprogen, USA) durante 20 horas. Se añadieron a cada pocillo 200 µM de cada uno de los péptidos marcados con fluorescencia para inhibir la proliferación de células madre cancerosas, obtenidas mediante el acoplamiento de un colorante fluorescente (Rodamina B, SIGMA, USA) al extremo terminal N de cada uno de los péptidos (SEQ ID NÚM.: 1-3), y aislamiento y purificación de los péptidos marcados, y 10 minutos después de la adición de los péptidos, cada pocillo se lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y después se observó con un microscopio de barrido confocal (IX 70, Olympus Co., Tokyo, Japan).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 2, cuando las células se trataron con cada uno de los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas, que se marcaron con el colorante fluorescente (rodamina B, rojo), se observaron partículas fluorescentes en las células 10 minutos después del tratamiento en todos los casos tratados con los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas (SEQ ID NÚM.: 1-3). Esto sugiere que el 50% o más de los aminoácidos catiónicos incluidos en el péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas penetraron las células en poco tiempo debido a su gravedad específica.

Ejemplo 4: Examen del efecto del péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas sobre la inhibición de la autorrenovación

4-1: Examen de la capacidad del péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas para formar colonias suspendidas

Para confirmar la capacidad del péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas para inhibir la autorrenovación similar a las células madre, se sembraron 1x10^3 hBCSC en una placa de 6 pocillos y después se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, USA) que contiene suplemento libre de suero B27 (1:50; Invitrogen), 50 ng/ml de hrEGF y hrbFGF (factor de crecimiento epidérmico recombinante humano y factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano) (Peprotech, USA). Las células se trataron con 0, 100 y 200 µM de cada uno de los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas (SEQ ID NÚM.: 1-3) a intervalos de 48 horas después de la siembra celular. Se añadió 1 ml de medio una vez cada 4 días, y se verificó un cambio en el tamaño de las colonias suspendidas formadas mediante control continuo.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 3, después de 14 días de cultivo, el tamaño de las colonias producidas difirió significativamente entre el grupo tratado con el péptido y el grupo no tratado con el péptido. En el grupo no tratado con el péptido, las células sembradas formaron colonias que se reunieron para formar colonias más grandes y, por lo tanto, se produjeron colonias suspendidas que tienen un diámetro de aproximadamente 100 µm o más en el punto de tiempo de observación. Sin embargo, en el grupo tratado con el péptido, se formaron colonias muy pequeñas a concentraciones de péptido de 100 y 200 µM, y sus diámetros máximos no superaron 20 µm o más. Sin embargo, este patrón se observó claramente a una concentración de péptido de 200 µM. Además, se pudo observar que el número de células suspendidas fue menor que el del grupo tratado con péptido. Estos resultados indican que el tratamiento de las células madre cancerosas con el péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas inhibe la capacidad de autorrenovación de las células madre cancerosas para retrasar así la producción de colonias o reducir el número de células viables.

4-2: Examen de la capacidad del péptido de proliferación de células madre cancerosas para formar colonias adherentes

Para confirmar la capacidad del péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas para inhibir la autorrenovación similar a las células madre, a diferencia del procedimiento de observación de las colonias suspendidas, se indujo a las células a crecer en condiciones de cultivo generales de modo que los cambios celulares producidos bajo condiciones estables se pueden observar en poco tiempo. Se sembraron $5x10^2$ hBCSC en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, y después se cultivaron en medio completo hBCSC (Celprogen, USA). Después de la siembra de células, las células se trataron con 0, 1, 10, 50, 100 y 200 μM de cada uno de los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas (SEQ ID NÚM.: 1-3) a intervalos de 48 horas. El medio se reemplazó una vez cada 3 días, y se verificó un cambio en las colonias formadas mediante control continuo. 5 días después del inicio del cultivo, las células se fijaron usando fijador de Carnoy (metanol 75% y ácido acético 25%) a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante, después de lo que las células se secaron al aire. Las colonias producidas se tiñeron con violeta cristal 0,4% durante 5 minutos. Después de la succión de la solución, las colonias se lavaron dos veces con agua destilada y se barrieron (Figura 4A). Para evaluar el grado de tinción de las colonias confirmadas, las colonias se lisaron mediante agitación con ácido acético 10% a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se transfirieron a una placa de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 590 nm (FIG. 4B).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 4, se pudo observar una reducción en la producción de colonias en los grupos tratados con 100 μM y 200 μM del péptido. Esta reducción era dependiente de la concentración a una concentración de 100 μM o superior, pero no hubo diferencia en el grado de reducción entre las secuencias peptídicas. Dichos resultados son compatibles con los resultados del Ejemplo 4-1 y, por lo tanto, muestran que la proliferación de las células madre cancerosas se inhibió mediante el tratamiento con una cierta concentración del péptido independientemente de la diferencia entre los ambientes en los que se suspendieron y adhirieron las células.

Ejemplo 5: Examen del efecto del péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas sobre la apoptosis

Se analizó si el efecto inhibidor de la proliferación celular del péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas puede inducir finalmente la apoptosis mediante un ensayo de tinción con anexina V/yoduro de propidio (PI). El principio del ensayo de tinción es el siguiente. En las células vivas normales, la fosfatidil serina (PS) se encuentra en el citoplasma. Sin embargo, si las células entran en la fase de muerte a través del mecanismo apoptótico, la PS se expone en el exterior de la membrana celular. En este momento, la anexina V se une a la PS en presencia de iones de calcio para emitir luz. Particularmente, en la etapa inicial de la apoptosis, la tinción con PI del núcleo no puede pasar a través de la membrana celular, y por lo tanto las células son positivas para la tinción de anexina V y son negativas para PI. Sin embargo, si las células son positivas para los dos colorantes, se puede observar que las células experimentaron el estado tardío de apoptosis o necrosis.

Para analizar cuantitativamente el grado de apoptosis, se sembraron $5x10^5$ hBCSC en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y después se cultivaron en medio completo hBCSC (Celprogen, USA). Después de 20 horas, las células se trataron con 0 y 200 μM de cada uno de los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas (SEQ ID NÚM.: 1-3). Después de 8 horas, las células se recogieron con medio mediante el raspado con un raspador de células y se centrifugaron para eliminar el sobrenadante, y este procedimiento se repitió dos veces. Un grupo de control positivo se trató con 50 μM de camptotecina en lugar del péptido. Se disolvieron 1X de anexina V y 100 ng de PI en 1X de tampón de unión a anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, pH 7,4) y se añadieron a cada uno de los grupos celulares hasta un volumen total de 100 μl. Después del tratamiento a temperatura ambiente durante 15 minutos, se observó el tamaño de las células y el cambio en la población celular mediante el tratamiento con el péptido a FL-1/2 (488 nm y 585 nm) usando FACSCalibur (BD, USA).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 5, las células positivas para anexina V formaron 50% del grupo de prueba tratado con cada uno de los péptidos, y este valor fue significativamente mayor que el de un grupo de control negativo (6,39%). Por el contrario, no hubo grandes cambios en el número de células en la población celular, que fueron positivas para PI, lo que indica que los péptidos inhibieron el crecimiento de las células madre cancerosas mediante la transducción de una señal que induce apoptosis en lugar de necrosis.

Ejemplo 6: Examen del cambio en las células por el péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas a nivel celular molecular

Para examinar el cambio en las células mediado por NF-κB por el péptido inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas a nivel celular molecular, se sembraron $5x10^2$ hBCSC en una placa de 10 cm, y después se cultivaron en medio completo hBCSC (Celprogen, USA). Después de 20 horas de cultivo, las células se trataron con 200 μM de cada uno de los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas y los péptidos de la SEQ ID NÚM.: 1-3 durante 2 horas.

Después, para comparar los niveles de expresión de proteínas en las células, las células tratadas con cada uno de los péptidos inhibidores de la proliferación de células madre cancerosas se trataron con el reactivo de extracción de células RIPA (Pierce, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para obtener lisados celulares. Las proteínas en

los lisados de hBCSC aislados se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% a 120 voltios durante 4 horas. Después, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando tampón de transferencia (Tris 12,5 mM, glicina 0,1 M, pH 8,3) a 310 mA durante 2 horas. Las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo (leche en polvo sin grasa 5%, en TBS), y después se hicieron reaccionar con anticuerpos primarios (IκBα fosforilada (pIκBα), p65 fosforilada (pp65); Cell Signaling, USA, N-Cadherina, p16, Fer, Actina; Santa Cruz, USA, Fosfato alcalino (ALP), Fer fosforilado (pFer); Abcam, USA), añadidos a la solución de bloqueo a una concentración de 1 μg/ml, a 4 ° C durante la noche. En la mañana del día siguiente, se añadió anticuerpo secundario para cada uno de los anticuerpos primarios a la solución de bloqueo en una proporción de 1:2000, y las membranas se hicieron reaccionar con los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, las membranas se visualizaron con una película de rayos X utilizando ECL (quimio-luminol potenciado) en una habitación oscura.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 6, cuando las células se lisaron y se examinó el cambio en las actividades proteicas en las células mediante el tratamiento con el péptido, se observó que los péptidos de la SEQ ID NÚM.: 1-3 inhibieron la fosforilación de IκBα y p65 en las células, y redujeron los niveles de expresión de Fer y pFer en proporción con esta inhibición. Es sabido que Fer pertenece a la familia FPS/FES e influye en la adhesión celular y la reconstitución de la proteína del citoesqueleto, tal como actina. Particularmente, es sabido que Fer está involucrado en la metástasis al causar un cambio en la agresividad de las células cancerosas y que a medida que aumenta la expresión de Fer, también aumenta la agresividad de las células cancerosas. Además, se observó que la expresión de N-cadherina, que es una proteína marcadora de células madre cancerosas o células cancerosas metastásicas agresivas, también disminuyó en el grupo tratado con péptidos. Esto indica que el péptido inhibe el NF-κB entre las proteínas en las células madre cancerosas y, al mismo tiempo, afecta el mecanismo de crecimiento y la agresividad (metástasis) de las células madre cancerosas al inducir un cambio en la adhesión celular.

Aplicabilidad industrial

El péptido que inhibe la proliferación de células madre cancerosas e induce la apoptosis de tales células madre cancerosas inhibe el movimiento intranuclear de la proteína de NF-κB en las células madre cancerosas para inhibir el crecimiento de las células madre cancerosas e inducir la apoptosis de dichas células, y por lo tanto se puede utilizar como ingrediente activo de la composición anticáncer.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es solo para una realización preferida y no limita el ámbito de la presente invención. Por lo tanto, el ámbito sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

<110> Seoul National University R&DB Foundation

<120> Péptido anticáncer para la inhibición de la proliferación en las células madre cancerosas y su uso

<130> PP-B1682

<150> KR 10-2015-0042700

<151> 2015-03-26

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BD3-3

<400> 1

Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys
1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BD3-3M1

<400> 2

Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Met Arg Arg Lys Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BD3-3M2

<400> 3

```
Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Met Cys Arg Arg Lys Lys
  1               5                  10                  15
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene, como un ingrediente activo, un péptido representado por una secuencia de aminoácidos SEQ ID NÚM.: 2 o 3 para su uso en el tratamiento del cáncer de mama.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la actividad de NF-κB en las células del cáncer de mama o células madre del cáncer de mama.

3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la proliferación de las células del cáncer de mama o células madre del cáncer de mama.

4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que el péptido induce la apoptosis de las células del cáncer de mama o células madre del cáncer de mama.

5. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que las células madre del cáncer de mama se incluyen en las células del cáncer de mama derivadas de un tumor de mama metastático.

6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición se formula para administración oral, para administración por inyección, o en la forma de un agente gelificante para el trasplante local.

7. La composición para el uso de la reivindicación 6, en el que el agente gelificante para el trasplante local comprende un polímero sintético o un polímero natural.

8. La composición para el uso de la reivindicación 7, en el que el polímero sintético es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico glicólico, poloxámero y propilenglicol.

9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en el que el polímero natural es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en colágeno, ácido algínico, ácido algínico de propilenglicol, sulfato de condroitina y quitosano.

FIG. 1

Sitio de fosforilación	Relación forma no fosfo	Relación forma fosfo	Relación de fosforilación
NF-κB-p65 (Fosfo-Ser^{468})	1,003095525	3,183445355	3,173621332
FER (Fosfo-Tyr^{402})	0,752488793	2,17325882	2,888094603
14-3-3 theta/tau (Fosfo-Ser^{232})	0,998098774	2,354112065	2,35859629
c-Jun (Fosfo-Thr^{93})	0,648592839	1,524220897	2,350042748
MEK1 (Fosfo-Thr^{286})	0,885167263	1,865387041	2,107383677
HSL (Fosfo-Ser^{554})	0,60481566	1,219610098	2,016498874
Ciclina D1 (Fosfo-Thr^{286})	1,071960689	2,074133852	1,934897309
p44/42 MAP quinasa (Fosfo-Thr^{202})	0,933178517	1,728534022	1,852307989
B-RAF (Fosfo-Thr^{598})	0,589540569	1,086527282	1,843006808
STAT5A (Fosfo-no-Ser^{780})	0,750525346	1,328368116	1,769917728
PDGF R beta (Fosfo-Tyr^{1021})	0,680069926	1,194955588	1,757106942
14-3-3 zeta (Fosfo-Ser^{58})	0,846025703	1,468103418	1,735294108
P38 MAPK (Fosfo-Thr^{180})	0,69858361	1,212099052	1,735080862

El valor más alto de la relación de fosforilación entre las células CD44^{alta} versus célulasCD44^{baja} significó mayor estado de fosforilación en las células CD44^{alta} en comparación con las célulasCD44^{baja}

FIG. 2

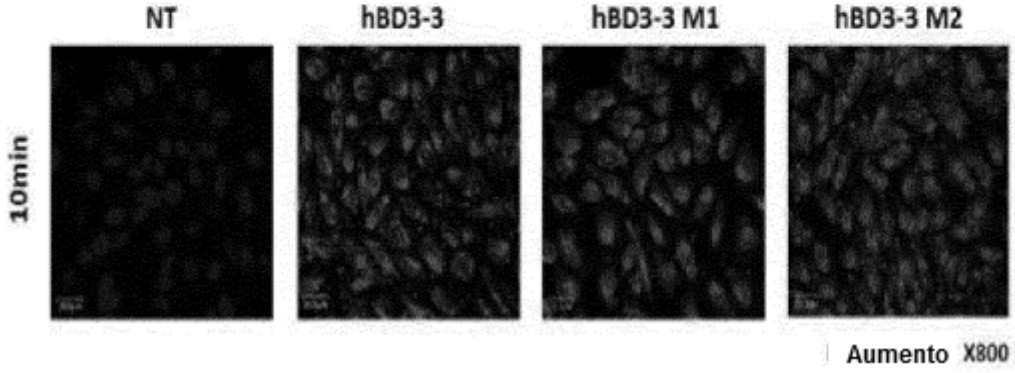


FIG. 3

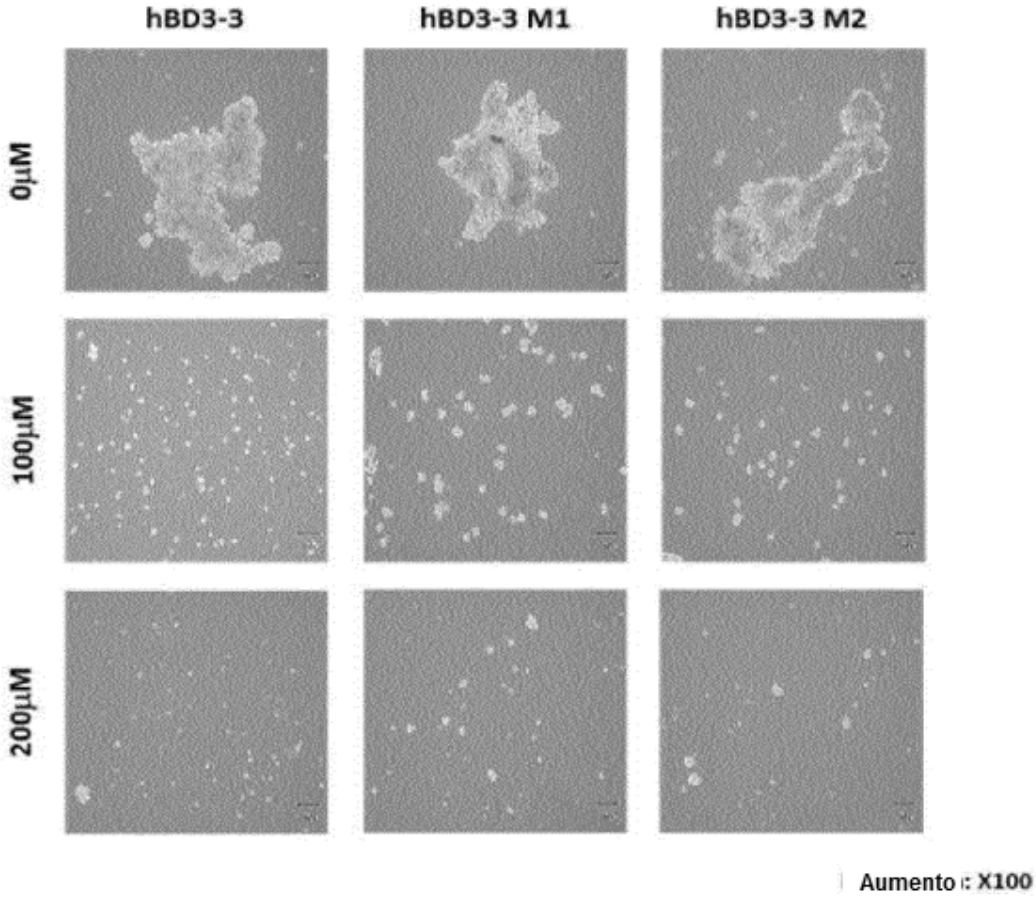


FIG. 4

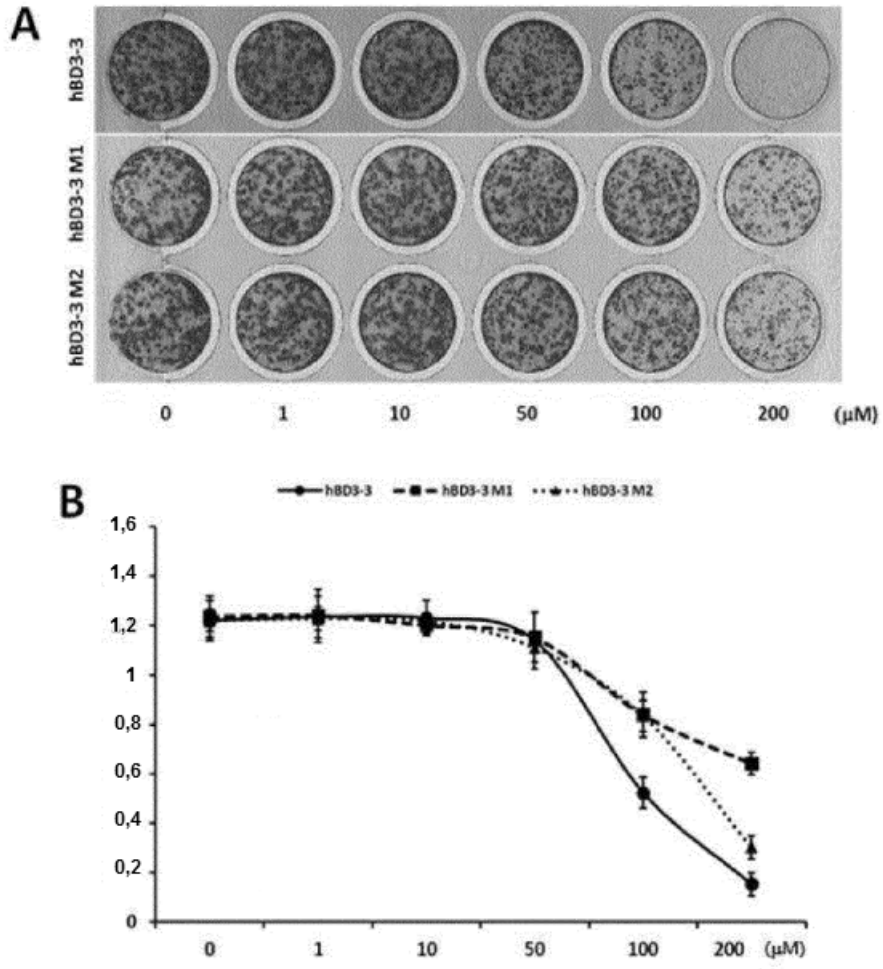

A
hBD3-3
hBD3-3 M1
hBD3-3 M2
0
1
10
50
100
200
(μM)
B
hBD3-3
hBD3-3 M1
hBD3-3 M2
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
1
10
50
100
200
(μM)

FIG. 5

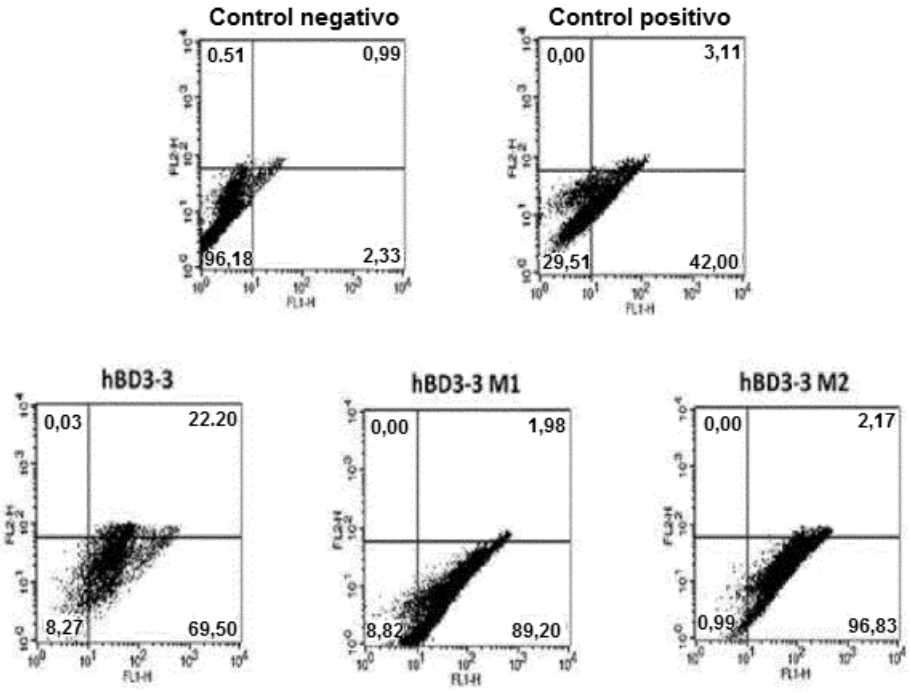
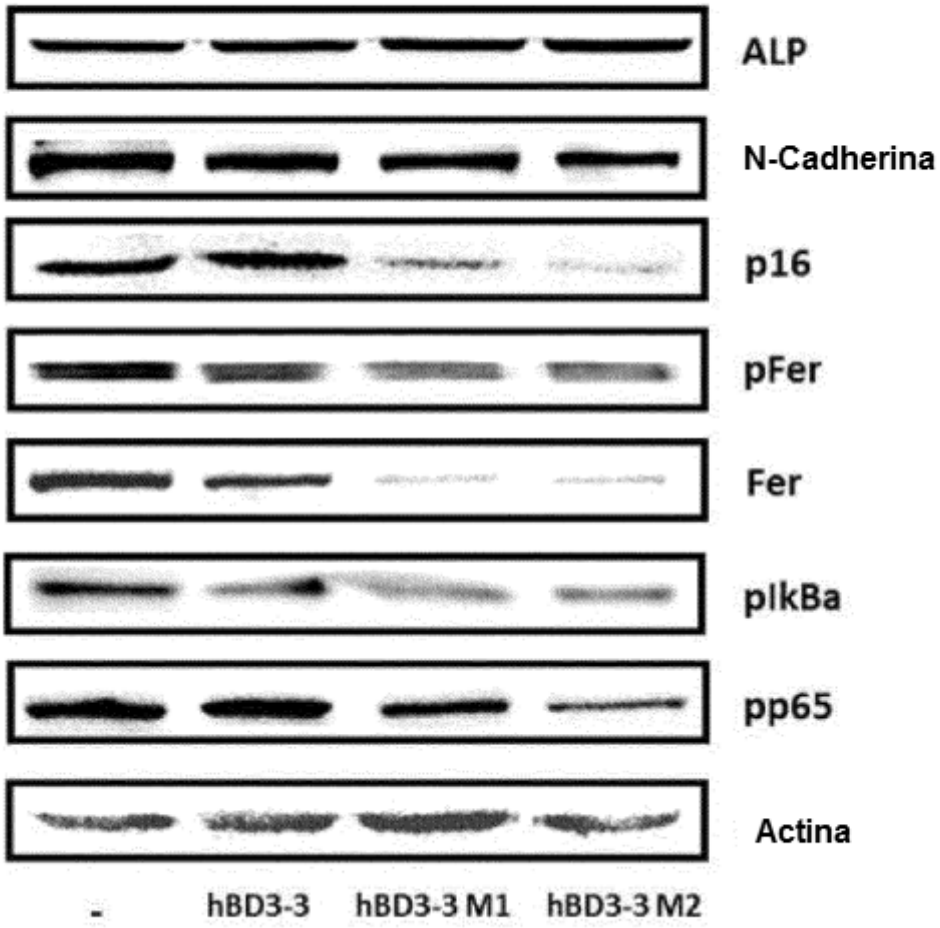

Control negativo
0.51
0,99
96,18
2,33
Control positivo
0,00
3,11
29,51
42,00
hBD3-3
0,03
22.20
8,27
69,50
hBD3-3 M1
0,00
1,98
8,82
89,20
hBD3-3 M2
0,00
2,17
0,99
96,83
FL1-H
FL2-H

FIG. 6


ALP
N-Cadherina
p16
pFer
Fer
pIkBa
pp65
Actina
-
hBD3-3
hBD3-3 M1
hBD3-3 M2