

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 964**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2015 PCT/EP2015/053307**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15121496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2015 E 15705594 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3107932**

54 Título: **Polipéptidos para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

**17.02.2014 EP 14305210**

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

**15.07.2020**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris;  
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (33.3%) y  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**POYET, JEAN-LUC;  
BRUZZONI-GIOVANELLI, HERIBERTO y  
JAGOT-LACOUSSIERE, LÉONARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 773 964 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**

Polipéptidos para el tratamiento de cáncer

**CAMPO DE LA INVENCIÓN:**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer.

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:**

Recientemente se han desarrollado tratamientos contra el cáncer que se dirigen a varias rutas dentro de las células cancerosas. Sin embargo, algunos tipos de cánceres exhiben diferentes interrupciones de la ruta conocidas o desconocidas o desarrollan resistencia al tratamiento. De este modo, estos tratamientos contra el cáncer son limitados, ya que no causan la muerte celular en este tipo de células cancerosas, y son ineficaces tratando diversos tipos de cáncer.

En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar nuevos enfoques y fármacos que serán adecuados para un tratamiento eficaz y eficiente del cáncer, y para seleccionar como dianas a diversos tipos de cáncer. De esta manera, se ha sugerido que la caracterización de nuevos compuestos terapéuticos en el cáncer que induce la muerte celular a través de la membranólisis de las células cancerosas puede ser altamente deseable.

15 AAC-11 es una proteína antiapoptótica (clon antiapoptosis 11) (Tewari et al., 1997), también llamada Api5 o FIF (Morris et al., 2006; Van den Berghe et al., 2000). AAC-11 es una proteína nuclear cuya expresión se ha demostrado que previene la apoptosis después de la privación del factor de crecimiento (Kim et al., 2000; Tewari et al., 1997). La acción antiapoptótica de AAC-11 aparece por la supresión de la apoptosis inducida por el factor de transcripción E2F1 (Morris et al., 2006). Se ha demostrado que el gen AAC-11 se expresa altamente en múltiples líneas celulares de cáncer, así como en algunos tejidos de ganglios linfáticos metastásicos y en leucemia linfocítica crónica de células B (Clegg et al., 2003; Kim et al., 2000; Krejci et al., 2007; Morris et al., 2006; Sasaki et al., 2001; Tewari et al., 1997; Van den Berghe et al., 2000). La expresión de AAC-11 parece conferir un mal resultado en subgrupos de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico, mientras que su agotamiento parece ser letal para células tumorales en condiciones de bajo estrés sérico (Krejci et al., 2007; Sasaki et al., 2001). De forma interesante, se ha informado de que la sobreexpresión de AAC-11 promueve el crecimiento y la invasividad de las células de cáncer cervical (Kim et al., 2000). Combinadas, estas observaciones implican a AAC-11 como un supuesto oncogén metastásico.

Rigou et al., 2009, describen un péptido correspondiente al subdominio LZ de AAC-11 y su efecto sobre las células cancerosas.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN:**

30 La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN:**

Los inventores demostraron que algunos péptidos derivados de la proteína AAC-11 alteran selectivamente las funciones celulares vitales en una pluralidad de células cancerosas, en un intervalo micromolar. En particular, los inventores encontraron sorprendentemente que los péptidos se dirigen específicamente a la membrana plasmática de las células cancerosas. Sin estar atados a ninguna teoría, los péptidos probablemente se unen a una pareja específica presente en la membrana celular del cáncer. Esta unión podría permitir que los péptidos permanezcan en la membrana, donde podría experimentar la formación de poros, como se describe para otros péptidos activos en la membrana. Los inventores también demuestran que, en condiciones de suero bajo, los péptidos inducen una muerte celular rápida a través de la membranólisis de las células cancerosas. Finalmente, los inventores demuestran que los péptidos inhiben la migración e invasión celulares. Los estudios in vivo que usan modelos de tumor de ratón indican que estos péptidos inhiben el crecimiento tumoral en ratones atímicos con xenoinjertos subcutáneos de cáncer de pulmón microcítico humano A549 y ratones atímicos con xenoinjertos subcutáneos de tumor de mama triplemente negativo derivados de biopsias de pacientes. En un modelo de ratón con leucemia promielocítica aguda (APL), los péptidos exhibieron un efecto pronunciado sobre la supervivencia de los ratones. Debido a que la muerte celular inducida por péptidos de AAC-11 es independiente del estado del supresor tumoral p53, dicha estrategia puede tener un amplio espectro de actividad terapéutica. De este modo, los inventores dan a conocer en el presente documento péptidos anticancerígenos que perjudican la migración e invasión celulares e inducen específicamente la muerte de células tumorales, y ofrecen un potencial terapéutico prometedor.

**Péptidos derivados de AAC-11-LZ**

50 La presente invención proporciona péptidos derivados de cremallera de leucina (LZ) de AAC-11 aislados, sintéticos o recombinantes ("péptidos derivados de AAC-11-LZ") como se define en las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, el término "AAC-11" tiene su significado general en la técnica, y se refiere a la proteína del clon 11 antiapoptosis que también se conoce como Api5 o FIF. Una secuencia polipeptídica humana

ejemplar de AAC-11 está depositada con el número de acceso de la base de datos GenBank: Q9BZZ5, expuesta como SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 para AAC-11 Q9BZZ5

MPTVEELYRNYGILADATEQVVGQHKDAYQVILDGVKGGTKEKRLAAQFI PKFFKHFPPELADSAINAQDL  
 CEDEDVSIIRRQAIKELPQFATGENLPRVADILTLQLLQTDSSAEFNLVNNALLSIFKMDAKGTLGGLFSQI  
 LQGEDIVRERAIKFLSTKLKTLTPDEVLTKEVEELILTESKKVLEDVTGEEFVLFMKILSGLKSLQTVSGR  
 QQLVELVAEQADLEQTFNPSDDPCVDRLLQCTROAVPLFSKNVHSTREVTYFCEQVLPNLGTLTTPVEGL  
 DIQLEVLKLLAEMSSFCGDMEKLETNLRKLFDFKLLLEYMPLPPEEAENGENAGNEEPKLQFSYVECLLYSF  
 HQLGRKLPDFLTAKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQKGTGEALKTEENKIKVVALKITNN  
 INVLIKDLFHIPPYKSTVTLSWKPVQKVEIGKRASEDTTSGSPPKKSSAGPKRDARQIYNPPSGKYSS  
 NLGNFNYEQRGAFRGRGGRGWGTRGNRSRGRLY

5 En el presente documento se describe un polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1, o

10 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1, o

15 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

20 Además, se describe en el presente documento un polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1, o

25 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1, o

30 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

35 Además, se describe en el presente documento un polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

40 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

5 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

En una realización particular, el polipéptido de la invención consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

10 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

15 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

20 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 al resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

Además, se describe en el presente documento un polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

25 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1. o

30 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

35 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

Además, se describe en el presente documento un polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

40 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

45 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

50 En alguna realización, el polipéptido de la invención consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

5 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

10 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

En alguna realización, el polipéptido de la invención consiste en

15 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

20 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

25 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

En alguna realización, el polipéptido de la invención consiste en

30 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

35 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1,

40 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

En alguna realización, el polipéptido de la invención consiste en

45 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

50 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1,

5 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

En alguna realización, el polipéptido de la invención consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

10 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

15 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1,

20 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y no consiste en la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de alanina en la posición 363 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

25 Según la invención, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; o 99% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. La identidad de la secuencia de aminoácidos se determina preferiblemente usando un algoritmo de alineación de secuencia adecuado y parámetros predeterminados, tales como BLAST P (Karlin y Altschul, 1990).

La expresión "secuencia de aminoácidos retro-inversa" se refiere a una forma isomérica de una secuencia de aminoácidos en la que se invierte la dirección de la secuencia de aminoácidos y se invierte la quiralidad de cada resto de aminoácido. La secuencia de aminoácidos retro-inversa de la presente invención puede estar compuesta por D-aminoácidos ensamblados en el orden inverso del de la secuencia de la secuencia de aminoácidos parental.

30 Los polipéptidos descritos aquí pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100 aminoácidos. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender menos de 50 aminoácidos, menos de 30 aminoácidos, menos de 25 aminoácidos, 35 menos de 20 aminoácidos, o menos de 15 aminoácidos.

Proteínas de fusión de la invención

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención que está fusionado con al menos un polipéptido heterólogo.

40 La expresión "proteína de fusión" se refiere al polipéptido según la invención que se fusiona directamente o por medio de un espaciador a al menos un polipéptido heterólogo.

Según la invención, la proteína de fusión comprende el polipéptido según la invención que se fusiona directamente o mediante un espaciador en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido heterólogo, o en su extremo N-terminal al extremo C-terminal del polipéptido heterólogo.

45 Como se usa en el presente documento, el término "directamente" significa que el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N o C-terminal) del polipéptido se fusiona con el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N o C-terminal) del polipéptido heterólogo.

50 En otras palabras, en esta realización, el último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido está directamente unido por un enlace covalente al primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido heterólogo, o el primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido está directamente unido por un enlace covalente al último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido heterólogo.

Como se usa en el presente documento, el término “espaciador” se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que une el polipéptido de la invención al polipéptido heterólogo. Tal espaciador puede ser útil para prevenir impedimentos estéricos.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo es un péptido penetrante de células, una secuencia penetrante de células del Transactivador de la Transcripción (TAT), un péptido permeable a las células o una secuencia penetrante membranosa.

La expresión “péptidos penetrantes de células” es bien conocida en la técnica, y se refiere a la secuencia permeable a las células o la secuencia penetrante membranosa como la penetratina, la secuencia penetrante mitocondrial TAT y compuestos (Bechara y Sagan, 2013; Jones y Sayers, 2012; Khafagy et al. y Morishita, 2012; Malhi y Murthy, 2012).

10 En una realización particular, el polipéptido heterólogo es una secuencia de internalización derivada del homeodominio de la proteína Drosophila Antennapedia/Penetratina (Antp) (aminoácidos 43-58; SEQ ID NO: 2) o las secuencias penetrantes de células del Transactivador de la Transcripción (TAT) (SEQ ID NO: 12).

En una realización particular, se añaden uno, dos o tres restos de glicina en el extremo C-terminal de las secuencias penetrantes de células TAT (SEQ ID NO: 12).

15 En algunas realizaciones, la proteína de fusión de la presente invención comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17.

En otra realización, el polipéptido heterólogo es un polipéptido terapéutico contra el cáncer.

20 La expresión “polipéptido terapéutico contra el cáncer” se refiere a cualquier polipéptido que tenga actividades anticancerígenas (por ejemplo, inhibición de la proliferación, inhibición del crecimiento, inducción de la apoptosis, inhibición de la metástasis, inhibición de la adhesión, inhibición de la neovascularización). Varios de estos polipéptidos son conocidos en la técnica. (Véanse, por ejemplo, (Boohaker et al., 2012; Choi et al., 2011; Janin, 2003; Li et al., 2013; Sliwkowski y Mellman, 2013)).

En alguna realización, el polipéptido heterólogo es un agente dirigido contra tumores.

25 El agente dirigido contra tumores incluye, pero no se limita a, anticuerpos dirigidos contra el dominio EDB de fibronectina, anticuerpos o agentes que se unen al receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular, anticuerpos o moléculas que se unen al receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico, anticuerpos o agentes que interactúan con CD31, anticuerpos o agentes que interactúan con el endotelio linfático tumoral (podoplanina, Lyve-1), o anticuerpos o agentes que se unen a la integrina  $\alpha\beta3$  tales como péptidos RGD, o anticuerpos o agentes que interactúan con dianas intracelulares y unidas a la membrana tumoral.

30 Producción de polipéptidos y proteínas de fusión

Los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida per se en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

35 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos polipéptidos o proteínas de fusión, mediante técnicas estándar para la producción de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando un método de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Alternativamente, los polipéptidos o las proteínas de fusión de la invención pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante como ahora se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en los vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedantes eucariotas o procariontes adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir de los cuales pueden ser aislados más tarde usando técnicas bien conocidas.

Los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención pueden usarse en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o contenida en un vector, tal como una membrana o vesícula lipídica (por ejemplo, un liposoma).

50 En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos o las proteínas de fusión de acuerdo con la invención se puedan modificar para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de compuestos terapéuticos puede usarse para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio, o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes puede disminuirse significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución.

Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de aclaramiento del cuerpo. Para lograr un efecto de seleccionador de diana o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte de la cadena principal, o como grupos colgantes en la cadena de polímero.

Por ejemplo, la pegilación es un enfoque bien establecido y validado para la modificación de una gama de polipéptidos (Chapman, 2002). Los beneficios incluyen, entre otros: (a) semividas circulantes notablemente mejoradas *in vivo* debido a la evasión del aclaramiento renal como resultado de que el polímero aumente el tamaño aparente de la molécula por encima del límite de filtración glomerular, y/o mediante la evasión de mecanismos de aclaramiento celular; (b) antigenicidad e inmunogenicidad reducidas de la molécula a la que está unido el PEG; (c) farmacocinética mejorada; (d) resistencia proteolítica mejorada de la proteína conjugada (Cunningham-Rundles et al., 1992); y (e) estabilidad térmica y mecánica mejorada del polipéptido PEGilado.

Por lo tanto, ventajosamente, los polipéptidos de la invención pueden unirse covalentemente con uno o más grupos de polietilenglicol (PEG). Un experto en la técnica puede seleccionar una masa molecular adecuada para PEG, en función de cómo se usará terapéuticamente el polipéptido pegilado al considerar diferentes factores que incluyen la dosis deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis, la inmunogenicidad, etc.

En una realización, el PEG de la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH<sub>3</sub> ("metoxi PEG"). Además, dicho PEG puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que están unidas entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG ramificados. Los PEG ramificados se pueden preparar, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a varios polioles, que incluyen glicerol, pentaeritriol y sorbitol. Por ejemplo, se puede preparar un PEG ramificado de cuatro brazos a partir de pentaeritriol y óxido de etileno. Una forma de PEG incluye dos cadenas laterales de PEG (PEG2) unidas a través de los grupos amino primarios de una lisina (Monfardini et al., 1995).

Para efectuar la unión covalente de grupos PEG al polipéptido, los grupos terminales hidroxilo de la molécula de polímero deben proporcionarse en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos (ejemplos de los cuales incluyen grupos amino primarios, hidrazida (HZ), tiol, succinato (SUC), succinimidil succinato (SS), succinimidil succinamida (SSA), succinimidil propionato (SPA), succinimidil carboximetilato (SCM), benzotriazol carbonato (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, nitrofenilcarbonato (NPC), y tresilato (TRES)). Moléculas de polímero activadas adecuadas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA, o de PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK. Alternativamente, las moléculas de polímero pueden activarse por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento WO 90/13540. Se describen ejemplos específicos de moléculas de polímeros lineales o ramificados activadas para uso en la presente invención en los Catálogos de 1997 y 2000 de Shearwater Polymers, Inc. (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives, incorporados aquí como referencia). Los ejemplos específicos de polímeros de PEG activados incluyen los siguientes PEG lineales: NHS-PEG (por ejemplo SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, y SCM-PEG), y NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG, y MAL-PEG, y PEG ramificados tales como PEG2-NHS.

La conjugación de los polipéptidos o proteínas de fusión y las moléculas de polímero activadas se realiza mediante el uso de cualquier método convencional. Los métodos convencionales son conocidos por el experto en la técnica. La persona experta sabrá que el método de activación y/o la química de conjugación a usar depende del grupo o grupos de unión de los polipéptidos, así como de los grupos funcionales de la molécula de PEG (por ejemplo, amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, cetona, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona o haloacetato).

En una realización, los polipéptidos se conjugan con PEG en el aminoácido D y E (para COOH), T, Y y S (para OH), K (para NH<sub>2</sub>), C (para SH si se conserva al menos una cisteína) o/y Q y N (para la función amida).

En una realización, se pueden introducir sitios adicionales para PEGilación mediante mutagénesis dirigida al sitio mediante la introducción de uno o más restos de lisina. Por ejemplo, uno o más restos de arginina pueden mutar a un resto de lisina. En otra realización, se introducen químicamente sitios de PEGilación adicionales modificando aminoácidos en los polipéptidos de la invención.

En una realización, los PEG se conjugan con los polipéptidos o proteínas de fusión a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por la persona experta. Un ejemplo preferido es el cloruro cianúrico ((Abuchowski et al., 1977); documento US 4.179.337).

Las técnicas de separación y purificación convencionales conocidas en la técnica pueden usarse para purificar polipéptidos pegilados de la invención, tales como cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración en gel) y de intercambio iónico. Los productos también se pueden separar usando SDS-PAGE.

En una realización, los polipéptidos pegilados proporcionados por la invención tienen una semivida en suero *in vivo* al menos 50%, 75%, 100%, 150% o 200% mayor que la de un polipéptido no modificado.

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes recombinantes

Además, se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una proteína de fusión según la invención.

5 Como se usa en el presente documento, una secuencia que "codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína, o enzima, es una secuencia nucleotídica que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína, o enzima, es decir, la secuencia nucleotídica codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína, o enzima. Una secuencia codificante para una proteína puede incluir un codón de inicio (generalmente ATG) y un codón de parada.

10 Estas secuencias de ácido nucleico pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en un vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector vírico.

15 De este modo, en este documento se describe adicionalmente un vector y un casete de expresión en el que una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una proteína de fusión de la invención se asocia con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular, promotor, potenciador y, opcionalmente, terminador) y, opcionalmente traducción, y también los vectores recombinantes en los que se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína de fusión de acuerdo con la invención. Estos vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación, o vectores de expresión.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula hospedante, para transformar el hospedante y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

25 Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji et al., 1990), pAGE103 (Mizukami y Itoh, 1987), pHSG274 (Brady et al., 1984), pKCR (O'Hare et al., 1981), pSG1 beta d2-4 (Miyaji et al., 1990) y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares.

30 Otros ejemplos de vectores víricos incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

35 Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami e Itoh, 1987), el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana et al., 1987), el promotor (Mason et al., 1985) y potenciador (Gillies et al., 1983) de la cadena H de inmunoglobulina, y similares.

40 Además, se describe en el presente documento una célula hospedante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una proteína de fusión de acuerdo con la invención o un vector como se describe anteriormente. En particular, un sujeto de la presente invención es una célula hospedante procarionota o eucariota transformada genéticamente con al menos una molécula o vector de ácido nucleico como se describe anteriormente.

45 El término "transformación" significa la introducción de una secuencia génica, de ADN o ARN "extraña" (es decir, intrínseca o extracelular) a una célula hospedante, de modo que la célula hospedante expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula hospedante que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

50 En una realización particular, para expresar y producir polipéptidos o proteínas de fusión de la invención, se escogerán células procarionotas, en particular células de *E. coli*. En realidad, de acuerdo con la invención, no es obligatorio producir el polipéptido o la proteína de fusión de la invención en un contexto eucariota que favorecerá las modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, glicosilación). Además, las células procarionotas tienen las ventajas de producir proteínas en grandes cantidades. Si se necesita un contexto eucariota, las levaduras (por ejemplo, cepas de *Saccharomyces*) pueden ser particularmente adecuadas ya que permiten la producción de grandes cantidades de proteínas. De lo contrario, podrían usarse líneas celulares eucariotas típicas tales como CHO, BHK-

21, COS-7, C127, PER.C6, YB2/0 o HEK293, por su capacidad para procesar las modificaciones postraduccionales correctas de la proteína de fusión de la invención.

La construcción de vectores de expresión como se describió anteriormente, y la transformación de las células hospedantes, pueden llevarse a cabo usando técnicas convencionales de biología molecular. El polipéptido o la proteína de fusión de la invención, por ejemplo, puede obtenerse cultivando células genéticamente transformadas como se describió anteriormente y recuperando el polipéptido o la proteína de fusión expresada por dicha célula, del cultivo. Entonces, si es necesario, pueden purificarse mediante procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc. En particular, los métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes pueden usarse para producir las proteínas de acuerdo con la invención.

Además, se describe en el presente documento un método para producir un polipéptido o una proteína de fusión de la invención, que comprende la etapa que consiste en: (i) cultivar una célula hospedante transformada como se describe anteriormente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y (ii) recuperar el polipéptido o la proteína de fusión expresados.

#### Métodos y usos terapéuticos

El polipéptido o la proteína de fusión de la invención se pueden usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al polipéptido o a la proteína de fusión de la invención para uso como un medicamento.

En una realización, la presente invención se refiere al polipéptido o la proteína de fusión de la invención para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" representa un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un sujeto afectado o susceptible de sufrir un cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica, e incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores transmitidos por la sangre. El término cáncer incluye enfermedades de la piel, tejidos, órganos, huesos, cartílagos, sangre y vasos. El término "cáncer" abarca además cánceres tanto primarios y metastásicos. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante los métodos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, no diferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfopitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide cístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquiolalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucopidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecomoma, maligno; tumor de células granulosas, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioideas; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabiomiomasarcoma; rabiomiomasarcoma embrionario; rabiomiomasarcoma alveolar; sarcoma del estroma; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filodes, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; estroma ovárico, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing;

tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no de Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; linfosarcoma; leucemia de células; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, leucemia promielocítica aguda (AML), cáncer hematológico, linfoma, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma no de Hodgkin de células B, leucemia linfoblástica aguda de células T, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de colon, melanoma, síndrome de Sezary.

En el presente documento se describe el polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 384 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En el presente documento se describe el polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de isoleucina en la posición 388 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En el presente documento se describe el polipéptido que comprende o que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

5 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En una realización particular, la presente invención se refiere al polipéptido que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

10 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

15 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En el presente documento se describe el polipéptido que comprende o que consiste en

20 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

25 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

30 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de glutamina en la posición 378 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En el presente documento se describe el polipéptido que comprende o que consiste en

35 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

40 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

45 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En alguna realización, la presente invención se refiere al polipéptido que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

5 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1,

10 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En alguna realización, la presente invención se refiere al polipéptido que consiste en

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

15 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

20 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En el presente documento se describe el polipéptido que comprende o que consiste en

25 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

30 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

35 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de fenilalanina en la posición 380 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En alguna realización, la presente invención se refiere al polipéptido que consiste en

40 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

45 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En alguna realización, la presente invención se refiere al polipéptido que consiste en

- 5 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o
- ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o
- 10 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o
- iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1,

15 en el que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención se refiere al polipéptido o la proteína de fusión de la invención para uso en la prevención de metástasis en cáncer metastásico.

En una realización, la presente invención se refiere al polipéptido o la proteína de fusión de la invención para uso en un método para causar membranólisis en células cancerosas en un sujeto que lo necesite.

20 El término "membranólisis" se refiere a la formación de poros en las membranas celulares de las células cancerosas, causando membranólisis, que permite la extrusión de los contenidos intracelulares desde el interior de la célula cancerosa, lo que compromete la integridad de la célula. Una vez que comienza la membranólisis, la célula finalmente sufre necrosis o muerte celular, como resultado del tratamiento con los métodos y composiciones de la presente invención.

25 En una realización, la presente invención se refiere al polipéptido o la proteína de fusión de la invención para uso en la mejora de la eficacia terapéutica del tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En una realización particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la invención se pueden administrar de forma secuencial o concomitante con uno o más agentes terapéuticamente activos tales como agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos.

30 Los ejemplos de sustancias quimioterapéuticas incluyen, pero no se limitan a, fludarabina, gemcitabina, capecitabina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido, camptotecinas tales como irinotecán y topotecán, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, L-asparaginasa, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo y 5-fluorouracilo combinado con leucovorina, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, levamisol, estramustina, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, mesilato de imatinib, hexametilmelamina, inhibidores de cinasas, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de ATPasa, tirfostinas, inhibidores de proteasas, inhibidores herbimicina A, genisteína, erbatatina, y lavendustina A. En una realización, se pueden

35 seleccionar agentes activos terapéuticos adicionales de, pero no se limitan a, uno o una combinación de la siguiente clase de agentes: agentes alquilantes, alcaloides vegetales, inhibidores de la topoisomerasa de ADN, antifolatos, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos de ADN, taxanos, podofilotoxinas, terapias hormonales, retinoides, fotosensibilizadores o terapias fotodinámicas, inhibidores de la angiogénesis, agentes antimetabólicos, inhibidores de la isoprenilación, inhibidores del ciclo celular, actinomicina, bleomicina, antraciclinas, inhibidores de la

40 MDR, e inhibidores de Ca<sup>2+</sup> ATPasa.

Se pueden seleccionar agentes activos terapéuticos adicionales de, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores inhibidores del crecimiento, hormonas, receptores solubles, receptores señuelo, anticuerpos monoclonales o policlonales, mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos, anticuerpos, monocuerpos, policuerpos.

50 El agente activo terapéutico adicional puede ser un agente antiemético. Los agentes antieméticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, metoclopramida, domperidona, proclorperazina, prometazina, clorpromazina, trimetobenzamida, ondansetrón, granisetron, hidroxizina, acetileucina, alizaprida, azasetron, benzquinamida, bietanautina, bromoprida, buclizina, cleboprida, ciclizina, dimenhidrinato, difenidol, dolasetron, meclizina, metalatal,

metopimazina, nabilona, pipamazina, escopolamina, sulpirida, tetrahidrocannabinoles, tietilperazina, tioproperazina y tropisetron. En una realización preferida, el agente antiemético es granisetron u ondansetron.

5 En otra realización, el agente activo terapéutico adicional puede ser un factor estimulante de colonias hematopoyéticas. Los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas adecuados incluyen, pero no se limitan a, filgrastim, sargramostim, molgramostim y epoyetina alfa.

10 En aún otra realización, el otro agente activo terapéutico puede ser un agente analgésico opioide o no opioide. Los agentes analgésicos opioides adecuados incluyen, pero no se limitan a, morfina, heroína, hidromorfona, hidrocodona, oximorfona, oxicodona, metopon, apomorfina, buprenorfina, meperidina, loperamida, etoheptazina, betaprodina, difenoxilato, fentanilo, sufentanilo, alfentanilo, remifentanilo, levorfanol, dextrometorfano, fenazona, pemazocina, ciclazocina, metadona, isometadona y propoxifeno. Los agentes analgésicos no opioides adecuados incluyen, pero no se limitan a, aspirina, celecoxib, rofecoxib, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, indometacina, ketorolaco, meclofenamato, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, piroxicam y sulindaco.

15 En todavía otra realización, el agente activo terapéutico adicional puede ser un agente ansiolítico. Los agentes ansiolíticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, buspirona y benzodiazepinas tales como diazepam, lorazepam, oxazepam, clorazepato, clonazepam, clordiazepóxido y alprazolam.

20 La expresión "agente radioterapéutico", como se usa en el presente documento, pretende referirse a cualquier agente radioterapéutico conocido por un experto en la técnica como eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente tal como los administrados en braquiterapia o terapia con radionúclidos. Tales métodos pueden comprender opcionalmente además la administración de una o más terapias adicionales contra el cáncer, tales como, pero sin limitarse a, quimioterapias y/u otra radioterapia.

#### Composiciones farmacéuticas

25 También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende el polipéptido o la proteína de fusión o la secuencia de ácido nucleico o el vector de expresión o la célula hospedante como se describió anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Típicamente, el polipéptido o la proteína de fusión o la secuencia de ácido nucleico o el vector de expresión o la célula hospedante como se describió anteriormente se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

30 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar no tóxico sólido, semisólido o líquido de cualquier tipo.

35 En las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y disoluciones o suspensiones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal, y formas de administración rectales.

45 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Éstos pueden ser en particular disoluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete, o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

55 Las disoluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas

de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El polipéptido o proteína de fusión de la invención puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína, y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente filtrada estéril del mismo.

También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos en un área tumoral pequeña.

Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debe amortiguar adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido se vuelve primero isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán, a la luz de la presente descripción, los medios acuosos estériles que pueden emplearse. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

El péptido o la proteína de fusión de la invención puede formularse dentro de una mezcla terapéutica que comprende alrededor de 0,0001 a 1,0 miligramos, o alrededor de 0,001 a 0,1 miligramos, o alrededor de 0,1 a 1,0 miligramos, o alrededor de 1 a 10 miligramos, o incluso alrededor de 10 a 100 miligramos por dosis, más o menos. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma usada actualmente.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica como se describe anteriormente, que comprende uno o más agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

#### FIGURAS:

Figura 1: Muerte celular inducida por el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). (A) Las células Karpas 1106, SU-DHL-5, SeAx y HUT-78 se sembraron a densidades de  $6 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se trataron durante 24 horas en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) con concentraciones

crecientes de Antp-AAC-11-LZ (363-399). Después, se añadieron 20  $\mu$ l de reactivo MTS a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 4 horas adicionales. La absorbancia se midió a 490 nm usando un lector de placas de 96 pocillos. La medida a la que el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) inhibió la proliferación celular se calculó como un porcentaje de la absorbancia en cada pocillo que contiene el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) con respecto a pocillos que no contienen péptido (control negativo). Cada barra representa la media  $\pm$  s.d. de al menos tres experimentos independientes. (B) Las células indicadas se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) a diversas concentraciones (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento. (C) El péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) pero no el péptido mutante Antp-AAC-11-LZ (363-399) L/G indujo la muerte celular en condiciones de privación de suero. Las células A549 se sembraron en placas a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Los medios se eliminaron de las células y se reemplazaron por medios que contenían los péptidos indicados a 10  $\mu$ M (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento.

Figura 2: Los péptidos TAT-AAC-11-LZ (363-399), RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) y Cter-Antp-AAC-11-LZ (363-399) exterminan preferentemente las células tumorales. (A) Las células A549 se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). El medio se eliminó de las células, y se reemplazó por medio que contenía los péptidos indicados a diversas concentraciones (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo) de péptido en ausencia de suero, y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento. (B) Las células A549 o HaCat se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía los péptidos indicados a péptido 10  $\mu$ M (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo) de péptido en ausencia de suero, y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento.

Figura 3: La muerte celular inducida por péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) no es apoptosis dependiente de caspasa. Las células A549 se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Las células se dejaron sin tratar, o se pretrataron con 100  $\mu$ M de Z-VAD-FMK durante 2 h. El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) a diversas concentraciones (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo) o cisplatino 50  $\mu$ M en presencia o en ausencia de 100  $\mu$ M de Z-VAD-FMK, y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento.

Figura 4: El péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) indujo muerte celular necrótica en condiciones de suero bajo. (A) Las células SeAx o HaCat cultivadas en ausencia de FBS al 10% se dejaron sin tratar o se trataron con 4  $\mu$ M o 10  $\mu$ M, respectivamente, del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) durante los períodos indicados. Las células fueron analizadas entonces por citometría de flujo para la tinción de PI. Los resultados representan el número medio de células PI-positivas  $\pm$  S.D. de al menos tres experimentos independientes. (B) Las células A549 y HaCat se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) 10  $\mu$ M (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y las placas se incubaron durante los períodos indicados. Después, se evaluó la actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de cultivo, y los datos se expresaron como un porcentaje del nivel máximo (Max) de la actividad de LDH determinada después de la lisis celular total  $\pm$  SD de al menos tres experimentos independientes.

Figura 5: Los péptidos Antp-AAC-11 LZ indujeron la muerte celular. (A) Las células A549 se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía los péptidos Antp-AAC-11-LZ indicados a varias concentraciones (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento. (B) Las células A549 o HaCat se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía los péptidos indicados a 10  $\mu$ M (100  $\mu$ l de volumen total por pocillo) de péptido en ausencia de suero, y las placas se incubaron durante 24 horas. Después, el ensayo de MTT se completó, y se realizó el análisis de datos como se describe en este documento.

Figura 6: Los péptidos Antp-AAC-11-LZ indujeron muerte celular necrótica en condiciones de suero bajo. (A) SeAx cultivadas en ausencia de FBS al 10% se dejaron sin tratar o se trataron con 4  $\mu\text{M}$  de los péptidos Antp-AAC-11-LZ indicados, durante varios tiempos. Las células fueron analizadas entonces por citometría de flujo para la tinción de PI. Los resultados representan el número medio de células PI-positivas  $\pm$  S.D. (B) Las células A549 se sembraron a densidades de  $4,5 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos (100  $\mu\text{l}$  de volumen total por pocillo), y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C (5% de  $\text{CO}_2$ ). El medio se eliminó de las células y se reemplazó por medio que contenía los péptidos Antp-AAC-11-LZ indicados a 10  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{l}$  de volumen total por pocillo), y las placas se incubaron durante los períodos indicados. La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de cultivo se evaluó entonces, y los datos se expresaron como un porcentaje del nivel máximo (Max) de la actividad de LDH determinada después de la lisis celular total  $\pm$  S.D.

Figura 7: El péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) inhibe la migración e invasión celulares. (A) Se añadieron células D3H2LN al pocillo superior de las placas de la cámara de Boyden modificada (transwell) con un vehículo o con 2  $\mu\text{M}$  del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) o el péptido solo Antp, y se sometieron a un ensayo de migración de transwell como se describe en Materiales y métodos. Se permitió que las células migraran hacia 10% de FBS durante 12 h. Se usaron pocillos triplicados para cada uno de los tres experimentos independientes. Los resultados se expresan con respecto a la migración de las células no tratadas (= 100%). Columna: media de tres experimentos. Barra: s.e. El valor P se determinó mediante la prueba de la t de Student (\* $P < 0,01$ ). (B) Las células D3H2LN se sembraron en una cámara de Boyden recubierta con Matrigel con un vehículo o con 2  $\mu\text{M}$  del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) o el péptido solo Antp, y se sometieron a un ensayo de migración transwell como se describe en Materiales y métodos. Se permitió que las células migraran hacia 10% de FBS durante 24 h. Se usaron pocillos triplicados para cada uno de los tres experimentos independientes. Los resultados se expresan con respecto a la migración de las células no tratadas (= 100%). Columna: media de tres experimentos. Barra: s.e. El valor P se determinó mediante la prueba de la t de Student (\* $P < 0,01$ ).

Figura 8: (A) Efecto de la inyección del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) sobre el peso corporal. Los ratones atímicos se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas con disolución salina normal o las dosis indicadas del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) ( $n = 3-4$  ratones por grupo), y se monitorizaron diariamente para determinar el peso corporal (media  $\pm$  s.e.m). (B) Reducción del crecimiento tumoral en modelos de ratón de cáncer de mama triple negativo como resultado de la administración sistémica del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). Se implantaron dos xenoinjertos de cáncer de mama triple negativo humano (PDX01 y PDX02) en ratones atímicos para experimentación. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño medio de 150  $\text{mm}^3$ , los ratones se clasificaron entonces en grupos de tratamiento ( $n = 6$ ) que recibieron 7 inyecciones diarias de vehículo o péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (2,4 mg/kg). El volumen tumoral se representó gráficamente en función del tiempo (media  $\pm$  SEM).  $\pm$

Figura 9: El tratamiento con péptidos Antp-AAC-11-LZ (363-399) de ratones leucémicos protege contra la progresión de la enfermedad. Los ratones se expusieron a  $10^4$  células leucémicas aisladas de ratones transgénicos hMRP8-PML/RAR $\alpha$ , se dejaron injertar durante 10 días, y después se inyectaron intraperitonealmente cada día durante 7 días consecutivos con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (1,8 mg/kg) o vehículo (disolución salina normal), o se implantaron por vía subcutánea con un pelete de liberación de 21 días que contiene 5 mg de ATRA ( $n = 6$  para cada tratamiento). Los ratones se monitorizaron para determinar la supervivencia.

Figura 10: El péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) inhibe la migración e invasión celulares. (A) Se añadieron células U2OS al pocillo superior de las placas de la cámara de Boyden modificada (transwell) en medio sin suero que contenía BSA al 0,4% con un vehículo o con 7,5  $\mu\text{M}$  del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) o el péptido AAC-11-LZ (377-399), y se sometieron a un ensayo de migración transwell como se describe en Materiales y métodos. Se permitió que las células migraran hacia 10% de FBS durante 24 h. Se usaron pocillos triplicados para cada uno de los tres experimentos independientes. Los resultados se expresan con respecto a la migración de las células no tratadas (= 100%). Columna: media de tres experimentos. Barra: s.e. El valor P se determinó mediante la prueba de la t de Student (\* $P < 0,01$ ). (B) Las células U2OS se sembraron en una cámara de Boyden recubierta con Matrigel en medio sin suero que contenía BSA al 0,4% con un vehículo o con 7,5  $\mu\text{M}$  del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) o el péptido AAC-11-LZ (377-399), y se sometieron a un ensayo de migración transwell como se describe en Materiales y métodos. Se permitió que las células migraran hacia 10% de FBS durante 48 h. Se usaron pocillos triplicados para cada uno de los tres experimentos independientes. Los resultados se expresan con respecto a la migración de las células no tratadas (= 100%). Columna: media de tres experimentos. Barra: s.e. El valor P se determinó mediante la prueba de la t de Student (\* $P < 0,01$ ).

Figura 11: (A) Efecto de la inyección del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) sobre el peso corporal. Los ratones atímicos se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas con disolución salina normal o las dosis indicadas de péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) ( $n = 3-4$  ratones por grupo), y se monitorizaron diariamente para determinar el peso corporal (media  $\pm$  s.e.m). (B) Reducción del

5 crecimiento tumoral en un modelo de ratón de adenocarcinoma de pulmón como resultado de la administración sistémica del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399). Las células A549 se implantaron por vía subcutánea en ratones atímicos hembra. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se clasificaron entonces en grupos de tratamiento (n = 6) que recibieron 7 inyecciones diarias de vehículo, péptido AAC-11-LZ (377-399) o péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) (5 mg/kg). El volumen tumoral se representó gráficamente en función del tiempo (media ± SEM).

**Ejemplo:**

Material y métodos

Cultivo celular

10 Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (A549, H1299, MCF-7, Skov3, CT-26, 1205, B16, U2OS, WM-266-4, HaCat, NCTC y células de fibroblastos de piel humana), medios esenciales mínimos (D3H2LN) o RPMI 1640 (células Karpas\_1106, DHL-5, Seax, HuT-78) (Life Technologies), suplementadas con suero fetal bovino (FBS) al 10%, penicilina 200 mg/ml y sulfato de estreptomina 100 mg/ml.

Análisis de muerte celular

15 La muerte celular se evaluó tras la tinción con yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo.

La viabilidad de las células cultivadas en las placas de cultivo de 96 pocillos se evaluó midiendo la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, usando el ensayo colorimétrico CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En estos ensayos, se usa MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna] en combinación con reactivos aceptores intermedios de electrones etilsulfato de fenazina (PES) que pueden penetrar células viables, reducirse en el citoplasma o en la superficie celular, y salir de las células en las que pueden convertir el compuesto de tetrazolio MTS en un producto de formazano coloreado que es soluble en medio de cultivo de tejidos. El número de células proliferantes (viables) es directamente proporcional al nivel de producto de formazano creado. El color se puede cuantificar entonces usando un ensayo colorimétrico simple. Los resultados se leen en un espectrofotómetro de barrido de paredes múltiples (lector de ELISA).

Detección de la actividad del lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de cultivo.

La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) citoplásmica en el sobrenadante del cultivo celular se produce al dañar la membrana plasmática y, de este modo, se considera un sello característico típico de la necrosis. Se recogieron medios de placas de 96 pocillos en tubos de microcentrífuga, y se centrifugaron brevemente a 200 g para eliminar posibles restos celulares. La actividad de LDH se midió usando el ensayo CytoTox 96® (Promega) mediante la reducción de lactato a piruvato en presencia de NAD<sup>+</sup>. El NADH resultante reduce INT, una sal de tetrazolio, para formar un producto rojo de formazano que es detectable a 490 nm. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas. Los datos de absorbancia de longitud de onda visible se recopilan usando un lector de placas estándar de 96 pocillos. Los resultados se normalizaron a la liberación máxima de LDH después del tratamiento con Triton X-100 al 0,8% según las indicaciones del fabricante.

Diseño y síntesis de péptidos

Los inventores han diseñado péptidos que abarcan el dominio de cremallera de leucina (LZ) de AAC-11 (restos 363-399). Además, hemos diseñado péptidos que tienen los restos de leucina (posición 377, 384 y 391, numeración de AAC-11) mutados a glicina para determinar si estas células tumorales seguirán siendo letales en condiciones de privación de suero. Los péptidos (> 98% puro) fueron sintetizados por Proteogenics Estrasburgo-Francia. En comparación con los péptidos AAC-11-LZ descritos en nuestro artículo anterior (Rigou et al., 2009), los péptidos usados aquí fueron modificados por acetilación N-terminal y amidación C-terminal. Se descubrió que estas modificaciones químicas aumentan drásticamente la estabilidad frente a digestiones por las aminopeptidasas y aumentan la permeabilidad de las células, lo que da como resultado un aumento notable de la eficiencia de los péptidos (efecto citotóxico hacia las células cancerosas). Los péptidos se diluyeron a una concentración de 1 mM en H<sub>2</sub>O, y se mantuvieron congelados a -70°C. Las secuencias de péptidos usados se enumeran en la Tabla 1.

Inmunocitoquímica

Los cubreobjetos se lavaron en PBS, y las células se fijaron en paraformaldehído al 3% durante 7 minutos y finalmente se lavaron dos veces 5 minutos en PBS con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Las células se permeabilizaron con 0,5% de saponina durante 10 minutos a 37°C. El bloqueo se llevó a cabo lavando dos veces 5 minutos en amortiguador de bloqueo (PBS, 0,5% de saponina y 3% de BSA). La incubación de anticuerpos primarios y secundarios se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora en amortiguador de bloqueo, y los lavados se realizaron usando amortiguador de bloqueo. AAC-11 se detectó usando el anticuerpo policlonal anti-AAC-11 (ab65836, Abcam) en combinación con Alexa fluor 647. Los núcleos se contratiñeron con 4'-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal en un microscopio de láser confocal Zeiss LSM 510 META (Zeiss,

Oberkochen, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite Plan Apochromat 63X N.A.1.4 usando el software LSM510 v4.0 (Zeiss).

#### Transferencia Western

5 Las células se lisaron en Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM que contenía NP-40 al 1%, 10 µg.ml<sup>-1</sup> de leupeptina y aprotinina, y PMSF 0,1 mM, y se clarificaron por centrifugación a 15.000 g durante 15 min. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE, y se transfirieron a la membrana PVDF (Biorad). La inmunotransferencia se realizó usando anticuerpo anti-AAC-11 (ab65836, Abcam) y anticuerpo policlonal anti-tubulina A5441 (Sigma). La señal se detectó usando reactivo de detección de quimioluminiscencia mejorada (Amersham).

#### Ensayos de migración e invasión transwell

10 Los ensayos se realizaron usando una cámara de Boyden modificada (Corning Costar, Rochester, NY, USA) que contenía un filtro de membrana de policarbonato recubierto de gelatina (6,5 mm de diámetro, tamaño de poros de 8 µm). Para los ensayos de invasión, la superficie superior del filtro se revistió con 20 µl o 50 µl de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). La cámara superior contenía células en medio de cultivo (1,5×10<sup>5</sup>/ml) con FBS al 1% o BSA al 0,4%, y la cámara inferior contenía medio de cultivo con FBS al 10% (quimioatrayente). Las células se incubaron durante 12 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> o 24 h para ensayos de migración o durante 48 h para ensayos de invasión a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las células que no migraron o invadieron se rasparon de la superficie superior de la membrana con un bastoncillo de algodón, y las células restantes que quedaron en la superficie inferior se contaron en cinco campos elegidos al azar bajo el microscopio óptico después de teñir con violeta de cristal.

#### Animales

20 Todos los procedimientos cumplieron con las regulaciones europeas o nacionales.

#### Modelo de adenocarcinoma de pulmón.

25 Se inyectaron células A549 (1,25×10<sup>6</sup>) por vía subcutánea a ratones hembra nu/nu de seis semanas de edad. Después del trasplante (n = 5-6 por modelo), se evaluó el crecimiento tumoral midiendo el tamaño del tumor en dos dimensiones usando un calibrador Vernier. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula [3,14 × eje largo × eje corto × eje corto]/6 (Kjonniksen et al., 1989). El tratamiento comenzó después de la aleatorización cuando los volúmenes tumorales alcanzaron un tamaño de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, y consistió en inyección intraperitoneal de péptidos AAC-11-LZ (377-399) o Antp-AAC-11-LZ (377-399) (5 mg/kg) o vehículo (disolución salina normal) cada día durante 7 días consecutivos. Los ratones se pesaron, y el tamaño del tumor se midió con un calibrador y se registró diariamente. Veintiocho días después del comienzo del tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Se tomaron y se fijaron los tumores, riñones, pulmones, corazón, hígado, páncreas y bazo. Se prepararon secciones embebidas en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para el análisis histológico.

#### Xenoinjertos de tumor primario (PDX) derivado de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

35 Se obtuvieron fragmentos de cáncer de mama de pacientes en el momento de la cirugía, con el consentimiento informado por escrito del paciente. Después de que se realizaron biopsias tumorales humanas guiadas por imagen, se injertaron subcutáneamente fragmentos de 30 a 60 mm<sup>3</sup> en ratones atímicos NMRI de 6 semanas de edad (Centre-Elevage-Janvier, Francia), bajo anestesia xilasina (10 mg/kg)/ketamina (100 mg/kg). Los ratones se mantuvieron en alojamientos de animales específicos libres de patógenos (Institut Universitaire d'Hématologie), y recibieron estrógeno (17 mg/ml) diluido en agua potable. Los xenoinjertos se caracterizaron y posteriormente se trasplantaron subcutáneamente de ratón a ratón. La histología, el perfil biológico y la respuesta a los tratamientos estándar de estos xenoinjertos mostraron una gran similitud con los cánceres originales (Marangoni et al., 2007; Varna et al., 2009). Se usaron dos modelos de xenoinjertos de cáncer de mama triple negativo humano (HBC) en nuestros experimentos (PDX01 y PDX02). PDX01 mostró una respuesta parcial a la quimioterapia, y PDX02 no respondió (Bousquet G. et al., Manuscrito en preparación). Después del trasplante (n = 6 por modelo), se evaluó el crecimiento tumoral midiendo el tamaño del tumor en dos dimensiones usando un calibrador Vernier. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula [3,14 × eje largo × eje corto × eje corto]/6 (Kjonniksen et al., 1989). El tratamiento comenzó después de la aleatorización cuando los volúmenes tumorales alcanzaron un tamaño de aproximadamente 150 mm<sup>3</sup>, y consistió en inyección intraperitoneal de péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (2,4 mg/kg) o vehículo (disolución salina normal) cada día durante 7 días consecutivos. Los ratones se pesaron, y el tamaño del tumor se midió con un calibrador y se registró diariamente. Catorce días después del comienzo del tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Se tomaron y se fijaron los tumores, riñones, pulmones, corazón, hígado, páncreas y bazo. Se prepararon secciones embebidas en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para el análisis histológico.

#### Modelo de leucemia promielocítica aguda (APL).

55 Usamos un modelo APL in vivo establecido basado en injertos singénicos de blastos leucémicos de ratones transgénicos hMRP8-PML/RARα, según lo descrito por Brown et al. (Brown et al., 1997). Este modelo imita la APL humana, tanto en sus características biológicas como en su respuesta a fármacos terapéuticos convencionales tal

como el ácido todo-trans retinoico (ATRA), y el 100% de los ratones mueren de la enfermedad (Brown et al., 1997; Kogan et al., 2000; Lallemand-Breitenbach et al., 1999). Se inyectaron 104 células leucémicas aisladas de médula ósea, bazo o ganglios linfáticos de ratones transgénicos hMRP8-PML/RAR $\alpha$  leucémicos (Brown et al., 1997) en la vena de la cola de ratones FVB/N singénicos de 6-7 semanas de edad. El establecimiento de la leucemia se evaluó por la aparición recuentos de altos leucocitos y bajos de plaquetas alrededor del día 8 (Brown et al., 1997). Diez días después del trasplante, los ratones implantados con células leucémicas fueron asignados aleatoriamente a cualquier tipo de tratamiento (n = 6). El péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (1,8 mg/kg) o el vehículo (disolución salina normal) se inyectó intraperitonealmente cada día durante 7 días consecutivos. El ácido retinoico se administró por implantación subcutánea de un pelete de liberación de 21 días que contenía 5 mg de ATRA (Innovative Research of America). Los ratones se monitorizaron entonces para determinar la supervivencia.

#### Análisis estadístico

Los datos se representan como media y SD. Las diferencias estadísticas entre dos grupos se evaluaron mediante la prueba de la *t* independiente. El análisis de varianza de una vía se usó para las comparaciones entre tres o más grupos. Un valor de *P* <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

## 15 Resultados

### Diseño de péptido de cremallera de leucina AAC-11

Los inventores diseñaron péptidos permeables a las células (CPPs) que abarcan la LZ de AAC-11 como agentes citotóxicos de las células cancerosas. El péptido de tipo salvaje (AAC-11-LZ (363-399), Tabla 1) consistió en la región de los restos 363-399 del AAC-11 fusionado en el N-terminal o en el C-terminal a una secuencia de internalización derivada del homeodominio de la proteína Drosophila Antennapedia/Penetratina (Antp) (aminoácidos 43-58) (péptidos Antp-AAC-11-LZ (363-399) y Cter-Antp-AAC-11-LZ (363-399), respectivamente) o las secuencias penetrantes de células de Transactivador de Transcripción (TAT) (péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399)). El péptido mutante (Antp-AAC-11-LZ (363-399) L/G) era idéntico, excepto que las leucinas 377, 384 y 391 en la LZ se mutaron a glicinas.

### 25 Efectos citotóxicos del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) permeable a las células en varias células cancerosas

Los inventores evaluaron la capacidad del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) para inducir la muerte celular en un panel de líneas celulares tumorales hematológicas y sólidas, tanto positivas para P53 como negativas para P53, derivadas de diferentes tejidos de origen, bajo condiciones de suero bajo (0,5-5%). Los inventores evaluaron primero la sensibilidad de las líneas celulares de cáncer hematológico (líneas celulares de linfoma no de Hodgkin de células B Karpas 1106 y SU-DHL-5, y líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda T SeAx y HUT-78) con respecto a concentraciones crecientes del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). Como se muestra en la (Figura 1A), se observó una pérdida drástica de la viabilidad celular para todas las líneas celulares tras la exposición al péptido Antp-AAC-11 LZ (363-399), de una manera relacionada con la dosis. Los inventores estudiaron entonces el efecto citotóxico del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) en una serie de líneas celulares tumorales sólidas, así como células normales (HaCat, NCTC y fibroblastos primarios humanos). Como se muestra en la Figura 1B, se observó una marcada pérdida de viabilidad celular de las líneas celulares cancerosas con respecto a concentraciones crecientes del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). Además, esta toxicidad parecía ser independiente del estado P53 de las líneas celulares cancerosas, ya que se usaron en este ensayo tanto las células positivas para P53 (las células A549 de adenocarcinoma de pulmón, por ejemplo) como las células nulas para P53 (las células H1299 de adenocarcinoma de pulmón, por ejemplo). De forma interesante, el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) provocó una toxicidad muy reducida en las células normales analizadas (HaCat, NCTC y fibroblastos primarios) (Figura 1B), lo que indica que el péptido Antp-AAC-11 LZ (363-399) exhibe toxicidad específica para las células cancerosas. En contraste con lo observado con el péptido de tipo salvaje, ni el péptido de Penetratina solo, el péptido AAC-11-LZ (363-399) sin el enlace de Penetratina, ni el péptido mutante Antp-AAC-11-LZ (363-399) L/G indujeron la muerte celular de las células A549 (Figura 1C). Esto indica que el efecto citotóxico del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) es específico de la secuencia de aminoácidos y no es un efecto inespecífico del péptido o la secuencia líder. Es de destacar que las osmolaridades de los diferentes medios que contienen o no un 10% de suero fueron similares (alrededor de 280 mOsmol para medios que contienen suero frente a 270 mOsmol para medios sin suero, datos no mostrados), excluyendo así cualquier papel para del efecto osmolárico para la citotoxicidad del péptido Antp-AAC-11 LZ (363-399) observada. Estos datos sugieren que el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) es letal para células cancerosas a concentraciones micromolares en condiciones de privación del factor de crecimiento.

Después, los inventores investigaron el efecto de la secuencia de internalización sobre la toxicidad de las células cancerosas mediante la conjugación del dominio de AAC-11 (363-399) con la secuencia penetrante de células del Transactivador de Transcripción (TAT), una secuencia peptídica básica derivada de la proteína TAT del VIH (aminoácidos 49-57). La conjugación TAT se ha usado ampliamente para el suministro *in vitro* e *in vivo* de péptidos y proteínas biológicamente activos (Heitz et al., 2009). La absorción del péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) resultante fue comparable al péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (datos no mostrados). Después, analizamos la citotoxicidad del péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) en células tanto normales y tumorales. Los análisis de respuesta frente a la dosis indican que el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) fue al menos tan eficaz en comparación con el péptido Antp-

AAC-11-LZ (363-399) disminuyendo la viabilidad de las células cancerosas A549 cuando se cultivó en condiciones de suero bajo (Figura 2A). Se obtuvieron resultados similares cuando se usó el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) en las líneas celulares tumorales sólidas H1299, MCF7, U2OS, D3H2LN, Skov3, CT-26, 1205, B16, WM266-4, y líneas celulares tumorales hematológicas Karpas\_1106, DHL-5, Seax y HuT-78 (datos no mostrados). De forma interesante, las células no malignas fueron en gran medida más resistentes al péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) (Figura 2B). Estos resultados indican que el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) es preferentemente tóxico para las células tumorales, como se observa con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). Finalmente, la unión de la secuencia de Antp en el terminal C en oposición al terminal N no tuvo influencia en las propiedades citotóxicas del dominio de AAC-11 (363-399), puesto que el péptido Cter-Antp-AAC-11-LZ (363-399) resultante mostró una citotoxicidad similar a la del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) hacia las células cancerosas, pero no hacia las células normales (Figura 2A y 2B). La absorción del péptido Cter-Antp-AAC-11-LZ (363-399) fue comparable al péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (datos no mostrados). Por lo tanto, los péptidos quiméricos que contienen el dominio de AAC-11 (363-399), que usan CPPs diferentes como sus péptidos líderes, muestran un grado similar de toxicidad en las células tumorales, al tiempo que evitan las células no malignas.

A pesar de su capacidad para unir proteínas con alta afinidad y especificidad insuperable, la susceptibilidad de los péptidos a la degradación proteolítica *in vivo* a menudo sigue siendo problemática para su uso como sustancias terapéuticas. Una forma de hacer que un péptido sea resistente a las proteasas implica el uso de D-aminoácidos en lugar de la forma L natural. Los péptidos de retro-inversión están compuestos de D-aminoácidos ensamblados en el orden inverso al de la secuencia L parental. Esta doble inversión de la estructura del péptido se postula para preservar la topología general de la superficie del péptido L original (Chorev y Goodman, 1995), lo que conduce así a un alto grado de equivalencia topoquímica y, al mismo tiempo, proporciona una alta estabilidad a la proteólisis (Fischer, 2003). Debido a su mayor estabilidad, los péptidos retro-inversos a menudo muestran una mayor potencia. De este modo, sintetizamos una versión retro-inversa del péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) y comparamos el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) resultante y el isómero L parental en busca de sus propiedades citotóxicas. De forma interesante, los análisis de respuestas frente a la dosis indicaron que el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) fue más eficaz que el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) para disminuir la viabilidad de las células cancerosas A549 bajo condiciones de suero bajo (Figura 2A), mientras que se produjo muy poca citotoxicidad en las células no malignas analizadas (Figura 2B). Se obtuvieron resultados similares cuando se usó el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) en las líneas celulares tumorales sólidas H1299, MCF7, U2OS, D3H2LN, Skov3, CT-26, 1205, B16, WM266-4 y las líneas de células tumorales hematológicas Karpas\_1106, DHL-5, Seax y HuT-78 (no mostrado). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) conserva la funcionalidad completa y, al igual que el isómero L parental, su efecto citotóxico es selectivo para las células transformadas.

La muerte celular puede ocurrir por necrosis o apoptosis. Para determinar si el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) induce apoptosis dependiente de caspasa en condiciones de suero bajo, evaluamos la viabilidad celular de las células A549 tratadas con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) en presencia o ausencia del inhibidor de pancaspasa Z-VAD-FMK. Como se ve en la Figura 3, Z-VAD-FMK no rescató, pero de alguna manera aumentó, la citotoxicidad inducida por el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399), lo que sugiere que la muerte celular observada no depende de las caspasas, mientras que, como control, Z-VAD-FMK pudo inhibir eficazmente la muerte celular inducida por cisplatino. Se observaron los mismos resultados con el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) y el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) (datos no mostrados).

Para determinar si la síntesis de proteínas estaba involucrada en el efecto citotóxico del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399), evaluamos la viabilidad celular de las células A549 tratadas con diversas concentraciones del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHx). La cicloheximida no tuvo influencia sobre la citotoxicidad inducida por el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) en comparación con el péptido solo (datos no mostrados), lo que sugiere que el péptido AAC-11-LZ (363-399) no depende de la síntesis de proteínas *de novo* para su acción citotóxica. Se observaron los mismos resultados con el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) y el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) (datos no mostrados).

La pérdida de la integridad de la membrana plasmática, como lo demuestra la capacidad de un yoduro de propidio (PI) impermeable a la membrana para marcar el núcleo, representa un enfoque directo para demostrar la necrosis. Por lo tanto, evaluamos la muerte celular necrótica de las células SeAx tratadas con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) mediante el ensayo de absorción de PI después de diferentes exposiciones temporales. En estas condiciones experimentales, las células con membranas intactas excluyen el PI y, de este modo, la positividad del PI puede tomarse como un índice de necrosis. Como se muestra en la Figura 4A, las células SeAx mostraron una pérdida creciente de integridad de la membrana plasmática extremadamente rápida después de la exposición a 4  $\mu$ M del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). De hecho, el 90% de las células fueron PI positivas después de solo 5 minutos de tratamiento con péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) 4  $\mu$ M, lo que indica pérdida de integridad de la membrana y fuga. Este valor permaneció sin cambios hasta 60 minutos. Se obtuvieron resultados similares con las células DHL-5, HuT-78 y A549 (datos no mostrados). De forma interesante, el tratamiento con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) de las células no malignas HaCat dio como resultado una pérdida mucho menor de la integridad de la membrana celular (Figura 4A). Se obtuvieron resultados similares con el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) y el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la exposición muy corta (minuto) de las concentraciones micromolares del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) induce la

pérdida de la integridad de la membrana plasmática en las células cancerosas, pero no en las células normales, cuando se cultivan en condiciones de suero bajo, como ocurre típicamente por muerte celular necrótica.

La necrosis se evaluó adicionalmente en función de la liberación de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo. LDH es una enzima citosólica soluble que se libera en el medio de cultivo después de la pérdida de integridad de la membrana como resultado de la necrosis. La actividad de LDH en el medio celular, por lo tanto, puede usarse como un indicador de la integridad de la membrana celular, y sirve como un indicador general de necrosis celular. Como se muestra en la Figura 4B, la exposición al péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) dio como resultado un aumento drástico en la liberación de LDH en los sobrenadantes de las células A549, lo que indica daño en la membrana y muerte celular necrótica, mientras que las células no tratadas o las células HaCat no malignas mostraron poca liberación de LDH. Este efecto fue extremadamente rápido, ya que después de solo 5 minutos de tratamiento con péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) 10  $\mu$ M, se detectaron niveles altos (casi 40%) de liberación de LDH en los sobrenadantes de células A549. En comparación con la liberación máxima de LDH después del tratamiento con 0,8% de Triton X-100, se observó 80% de liberación de LDH después de 1 hora de exposición a 10  $\mu$ M de péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399). Se obtuvieron resultados similares con el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) y el péptido RI-TAT-AAC-11-LZ (363-399) (datos no mostrados). Combinados, estos datos indican que el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) induce necrosis extremadamente rápida, a través de la membranólisis, de células cancerosas.

Para comprender mejor la función del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) y descifrar los determinantes de secuencia para su fenotipo citotóxico, realizamos análisis de secuencia del péptido. Generamos una serie de variantes truncadas N-terminales y/o C-terminales fusionadas a una Penetratina N-terminal, para determinar la secuencia mínima requerida para la citotoxicidad del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) hacia las células cancerosas (véase la Tabla 1). El efecto de estas variantes sobre la muerte celular se midió en células A549 usando un ensayo de MTT. Este enfoque debería permitirnos determinar si la secuencia de Antp-AAC-11-LZ (363-399) constituye el límite de tamaño inferior, o si los péptidos más cortos pueden exhibir propiedades de muerte de células cancerosas.

Sorprendentemente, como se observa en la Figura 5A, los análisis de respuesta a la dosis indicaron que el truncamiento de los aminoácidos N-terminales 1-7 (numeración de la secuencia del dominio de AAC-11) del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) dio como resultado un marcado aumento de la potencia de citotoxicidad en comparación con el péptido parental cuando las células se cultivaron en condiciones de suero bajo. De hecho, cuando se usan a 2  $\mu$ M, los péptidos Antp-AAC-11-LZ (371-399) y Antp-AAC-11-LZ (377-399) resultantes redujeron la viabilidad celular al 33,2% y 5% del control, respectivamente, en comparación con el 97% de control con el péptido parental.

La eliminación adicional de los últimos dos (péptido Antp-AAC-11-LZ (371-397)) u ocho (péptido Antp-AAC-11-LZ (371-391)) restos C-terminales dio como resultado una citotoxicidad reducida en comparación con el péptido Antp-AAC-11-LZ (371-399), pero todavía ambas variantes de los péptidos Antp-AAC-11-LZ (371-397) o Antp-AAC-11-LZ (371-391) provocaron una muerte celular significativamente mayor en comparación con el péptido parental Antp-AAC-11-LZ (363-399) (Figura 5A).

De forma muy interesante, la eliminación de un dominio central de 5 restos del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) dio como resultado una forma con la mayor actividad para inducir la muerte de las células cancerosas. De hecho, cuando se usa a 2  $\mu$ M, el Antp-AAC-11-LZ (377-399  $\Delta$ 385-390) resultante redujo la viabilidad celular al 3% del control, respectivamente, en comparación con el 97% del control con el péptido parental. Esto indica que los restos 377-384 son necesarios para la toxicidad de las células cancerosas. Para estrechar aún más la secuencia activa dentro del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399), se evaluaron los truncamientos N-terminales. La eliminación de los primeros diecisiete restos del péptido parental Antp-AAC-11-LZ (363-399) dio como resultado una reducción concomitante de la actividad, ya que el péptido resultante Antp-AAC-11-LZ (380-399) indujo una muerte celular sustancial pero más débil que el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) (Figura 5A). Se obtuvieron resultados similares cuando los péptidos truncados se usaron en las líneas celulares tumorales sólidas H1299, MCF7, U2OS, D3H2LN, Skov3, CT-26, 1205, B16, WM266-4, y las líneas celulares tumorales hematológicas Karpas\_1106, DHL-5, Seax y HuT-78 (no mostrado). Finalmente, en comparación con las células malignas, esos péptidos produjeron una citotoxicidad muy reducida en las células no malignas HaCat (Figura 5B). Combinados, estos resultados muestran que los péptidos truncados AAC-11-LZ, como la contraparte peptídica parental, inducen la muerte celular de cáncer preferencial a concentraciones micromolares, y sugieren que los restos 377-391 (numeración de secuencia específica de AAC-11) del péptido AAC-11-LZ (363-399) se requieren para su toxicidad, y los restos 380-384 (numeración de secuencia específica de AAC-11) del péptido AAC-11-LZ (363-399) constituyen la secuencia mínima para su toxicidad hacia células cancerosas.

A continuación, los inventores examinaron si la citotoxicidad mediada por los péptidos AAC-11 truncados estaba relacionada con la pérdida de la integridad de la membrana celular, por tanto con la necrosis. El análisis de exclusión de PI indicó que el tratamiento de células SeAx con 4  $\mu$ M de los péptidos truncados indujo una rápida permeabilidad de la membrana plasmática (Figura 6A). De hecho, después de 5 minutos de tratamiento, casi el 90% de las células fueron PI positivas cuando se expusieron a todos los péptidos ensayados. Además, los análisis del curso temporal indican que las células A549 tratadas con los péptidos truncados mostraron una liberación masiva de LDH (Figura 6A). Una vez más, este efecto fue extremadamente rápido, ya que después de solo 5 minutos de tratamiento, los péptidos exhibieron 30-50% de liberación de LDH (Figura 6B). Combinados, estos datos indican que los péptidos

truncados inducen la membranólisis de las células cancerosas, lo que da como resultado la muerte celular necrótica, y que el fragmento 377-391, particularmente 380-384, constituye el motivo activo del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) de longitud completa.

El péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) perjudica la migración e invasión de las células cancerosas

5 Una característica distintiva de las células tumorales es la capacidad de adquirir un fenotipo invasivo y metastatizarse desde el tumor primario, y el bloqueo de la invasión es una estrategia principal para inhibir las etapas  
 10 iniciales de la diseminación metastásica. Aunque las rutas moleculares que controlan la metástasis ahora se conocen relativamente bien, todavía no hay herramientas para inhibir eficazmente las etapas críticas de la cascada de metástasis y, finalmente, la formación de metástasis. Informes anteriores han indicado que AAC-11 puede  
 15 controlar la migración celular, ya que se descubrió que la sobreexpresión de AAC-11 aumenta las células de cáncer cervical y aumenta la colonización de células de cáncer cervical (Kim et al., 2000). Por lo tanto, evaluamos el impacto del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) sobre la migración de las células D3H2LN derivadas de la línea  
 20 celular de cáncer de mama MDA-MB-231 altamente invasivas usando un ensayo de migración de cámara de Boyden transwell. Como se muestra en la Figura 7A, el tratamiento con péptidos Antp-AAC-11-LZ (363-399) disminuyó sustancialmente la migración de células D3H2LN, mientras que el péptido solo Antp no mostró ningún  
 efecto. Se observaron resultados similares con el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399) (no mostrado). Es de destacar que ni los péptidos Antp-AAC-11-LZ (363-399) o TAT-AAC-11-LZ (363-399) perjudicaron la proliferación de las  
 células D3H2LN en las concentraciones usadas, descartando así la posibilidad de que la migración alterada fue una consecuencia de la disminución de la proliferación (no mostrado). A continuación, evaluamos si el péptido Antp-  
 AAC-11-LZ (363-399) podría obstaculizar la invasión celular. Como se muestra en la Figura 7B, en un ensayo de  
 "invasión", en el que las células migraron a través de barreras seriales que consisten en una capa de Matrigel y el  
 filtro poroso, el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) evitó la invasión de las células D3H2LN, mientras que el péptido  
 solo Antp no mostró ningún efecto.

25 El suministro sistémico del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) inhibe el crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto derivado de pacientes con tumor de mama triple negativo (PDX)

Los inventores investigaron a continuación el efecto del péptido AAC-11-LZ (363-399) sobre el crecimiento tumoral  
 sólido distante mediante el uso de modelos de ratón de tumor de mama triple negativo PDX. Los tumores de mama  
 triple negativos se escogieron como modelos para nuestros estudios de xenoinjerto in vivo ya que existe una  
 30 necesidad clínica de desarrollar nuevas terapias porque no son candidatos para la terapia dirigida. Primero evaluamos la toxicidad del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) en ratones atímicos que fueron inyectados  
 intraperitonealmente dos veces por semana durante 4 semanas con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) o  
 disolución salina normal (intervalo de dosis: 0,8-4,8 mg de péptido/kg de peso corporal; n = 3-4 ratones por grupo). Ningún ratón murió durante el experimento, y no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos en el  
 peso corporal (Figura 8A). Al final del experimento, no se observó toxicidad obvia en los riñones, pulmones, corazón,  
 35 hígado, páncreas y bazo de ratones inyectados con el péptido (datos no mostrados).

Los inventores evaluaron entonces la capacidad del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) para inhibir el crecimiento  
 tumoral usando dos grupos de ratones atímicos con xenoinjertos de tumor de mama triple negativo subcutáneo  
 derivados de biopsias de dos pacientes diferentes (PDX01 y PDX02). La respuesta a los tratamientos estándar de  
 40 estos xenoinjertos mostró una gran similitud con los cánceres originales, siendo PDX01 un respondedor débil, y  
 siendo PDX02 un no respondedor (Bousquet G. et al., manuscrito en preparación). Como se muestra en la Figura  
 8B, los ratones tratados con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) desarrollaron tumores significativamente más  
 pequeños que los ratones tratados con vehículo, para ambos grupos. De hecho, los tumores en ratones que  
 recibieron el péptido AAC-11 LZ (363-399) alcanzaron un volumen medio final inferior al 35% (PDX01) o inferior al  
 45 50% (PDX02) que el de los tumores en los ratones tratados con control ( $p = 0,01$ ). Estos datos demuestran que el  
 péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) puede inhibir por sí mismo el crecimiento de tumores ya formados y de  
 proliferación agresiva.

Tratamiento con péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) de la leucemia promielocítica aguda

Para ampliar estos resultados, los inventores evaluaron la eficacia del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) en un  
 modelo de ratón de leucemia promielocítica aguda (APL). Este modelo, basado en injertos singénicos de blastos  
 50 leucémicos de ratones transgénicos PML/RAR $\alpha$ , imita la APL humana, tanto en sus características biológicas como  
 en su respuesta a fármacos terapéuticos convencionales tal como el ácido todo-trans retinoico (ATRA) (Brown et al.,  
 1997; Kogan et al., 2000; Lallemand-Breitenbach et al., 1999). Los ratones de control sucumbieron a la carga  
 tumoral dentro de un intervalo de tiempo estrecho (tiempo de supervivencia medio de 27 días) (Figura 9). Como se  
 esperaba, los ratones tratados con ATRA tuvieron una supervivencia significativamente mayor en comparación con  
 55 el grupo de control (tiempo de supervivencia medio de 56 días). De forma interesante, el tratamiento con el péptido  
 Antp-AAC-11-LZ (363-399) dio como resultado una supervivencia superior a la obtenida con ATRA (tiempo medio de  
 supervivencia de 68,5 d). Cuatro de 6 ratones inyectados con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) sobrevivieron  
 hasta 67 días, y 2 ratones de ese grupo sobrevivieron hasta 76 días, mientras que solo un ratón del grupo de ATRA  
 sobrevivió hasta 67 días. La ampliación de los órganos y el examen de la sección de tejido confirmaron que la causa  
 60 de la muerte fue APL (Lallemand-Breitenbach et al., 1999) para todos los grupos. Estas observaciones demuestran

que el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) posee un fuerte efecto antileucémico, lo que da como resultado una esperanza de vida significativamente mayor.

El péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) deteriora la migración e invasión de las células cancerosas

5 Una característica distintiva de las células tumorales es la capacidad de adquirir un fenotipo invasivo y metastatizarse desde el tumor primario, y el bloqueo de la invasión es una estrategia principal para inhibir las etapas iniciales de la diseminación metastásica. Aunque las rutas moleculares que controlan la metástasis ahora se conocen relativamente bien, todavía no hay herramientas para inhibir eficazmente las etapas críticas de la cascada de metástasis y, finalmente, la formación de metástasis. Informes anteriores han indicado que AAC-11 puede controlar la migración celular, ya que se descubrió que la sobreexpresión de AAC-11 aumenta las células de cáncer cervical y aumenta la colonización de células de cáncer cervical (Kim et al., 2000). Por lo tanto, evaluamos el impacto del péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) sobre la migración de las células U2OS de osteosarcoma óseo altamente invasivas usando un ensayo de migración de cámara de Boyden transwell. Como se muestra en la Figura 10A, el tratamiento con péptidos Antp-AAC-11-LZ (377-399) disminuyó sustancialmente la migración de células U2OS, mientras que el péptido AAC-11-LZ (377-399) no mostró ningún efecto. Se observaron resultados similares con el péptido Antp-AAC-11-LZ (363-399) o el péptido TAT-AAC-11-LZ (363-399). Es de destacar que ninguno de los péptidos perjudicó la proliferación de las células U2OS a las concentraciones usadas, descartando así la posibilidad de que la migración perjudicada fuera una consecuencia de la disminución de la proliferación. A continuación, evaluamos si el péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) podría obstaculizar la invasión celular. Como se muestra en la Figura 10B, en un ensayo de "invasión", en el que las células migraron a través de barreras seriales que consisten en una capa de Matrigel y el filtro poroso, el péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) evitó la invasión de las células U2OS, mientras que el péptido AAC-11-LZ (377-399) no mostró ningún efecto.

El suministro sistémico del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) inhibe el crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico A549

25 Los inventores investigaron a continuación el efecto del péptido AAC-11-LZ (377-399) sobre el crecimiento tumoral sólido distante mediante el uso de modelos de ratón de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico A549. Primero evaluamos la toxicidad del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) en ratones atómicos que fueron inyectados intraperitonealmente dos veces por semana durante 4 semanas con el péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) o disolución salina normal (intervalo de dosis: 1-6 mg de péptido/kg de peso corporal; n = 3-4 ratones por grupo). Ningún ratón murió durante el experimento, y no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos en el peso corporal (Figura 11A). Al final del experimento, no se observó toxicidad obvia en los riñones, pulmones, corazón, hígado, páncreas y bazo de ratones inyectados con el péptido.

35 Los inventores evaluaron entonces la capacidad del péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) para inhibir el crecimiento tumoral usando modelos de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico A549. Como se muestra en la Figura 11B, los ratones tratados con el péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) desarrollaron tumores significativamente más pequeños que los ratones tratados con el péptido AAC-11-LZ (377-399) o vehículo. De hecho, los tumores en ratones que recibieron el péptido AAC-11 LZ (377-399) alcanzaron un volumen medio final inferior al 25% del de los tumores en los ratones tratados con control ( $p = 0,01$ ). Estos datos demuestran que el péptido Antp-AAC-11-LZ (377-399) puede inhibir por sí mismo el crecimiento de tumores ya formados y de proliferación agresiva.

TABLA 1: secuencia de aminoácidos de péptidos derivados de AAC-11 LZ recubiertos con Penetratina

Nombre	Secuencia
Penetratina sola	RQIKIWFKKQNRMMKWKK (SEQ ID NO:2)
AAC-11-LZ (363-399)	AKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:3)
Antp-AAC-11-LZ (363-399)	RQIKIWFKKQNRMMKWKKAKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:4)
Antp-AAC-11-LZ (363-399)/L/G	RQIKIWFKKQNRMMKWKKAKLNAEKLKDFKIRGQYFARGGQVYIRQGRALALQGKT (SEQ ID NO:5)
Antp-AAC-11-LZ (371-399)	RQIKIWFKKQNRMMKWKKKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:6)
Antp-AAC-11-LZ (371-397)	RQIKIWFKKQNRMMKWKKKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQG (SEQ ID NO:7)
Antp-AAC-11-LZ (371-391)	RQIKIWFKKQNRMMKWKKKDFKIRLQYFARGLQVYIRQL (SEQ ID NO:8)
Antp-AAC-11-LZ	RQIKIWFKKQNRMMKWKKLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:9)

Nombre	Secuencia
(377-399)	
Antp-AAC-11-LZ (380-399)	RQIKIWFKKQNRMMKWKKFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:10)
Cter-Antp-AAC-11-LZ (363-399)	AKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKTRQIKIWFKKQNRMMKWKK (SEQ ID NO:11)
AAC-11-LZ (377-399)	LQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO: 16)
Antp-AAC-11-LZ (377-399 Δ385-390)	RQIKIWFKKQNRMMKWKKLQYFARGLLRLALQGKT (SEQ ID NO: 17)

TABLA 2: secuencia de aminoácidos de péptidos derivados de AAC-11 LZ recubiertos con TAT

Nombre	Secuencia
TAT sola	YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:12)
AAC-11 LZ (363-399)	AKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:3)
TAT-AAC-11-LZ (363-399)	YGRKKRRQRRRGGGAKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT (SEQ ID NO:13)
TAT-AAC-11-LZ (363-399)RI (D-aminoácidos)	RRRQRRKKRGYGTGQLALRLQRIYVQLGRAFYQLRIKFDKLKEANLKA (SEQ ID NO:14)

TABLA 3: péptidos penetrantes de células

Nombre	Secuencia	Referencia
Penetratina	RQIKIWFKKQNRMMKWKK	Patente US 5888762
TAT (47-57)	YGRKKRRQRRR	Wender, PA. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13003 (2000)
TAT (47-57) (RI)	RRRQRRKKRGY (D-aminoácidos)	SEQ ID NO:15

5

REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan aquí como referencia en la presente descripción.

10 Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C., y Davis, F.F. (1977). Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *The Journal of biological chemistry* 252, 3578-3581.

Bechara, C., y Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters* 587, 1693-1702.

15 Boohaker, R.J., Lee, M.W., Vishnubhotla, P., Perez, J.M., y Khaled, A.R. (2012). The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Current medicinal chemistry* 19, 3794-3804.

Brady, G., Jantzen, H.M., Bernard, H.U., Brown, R., Schutz, G., y Hashimoto-Gotoh, T. (1984). New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning. *Gene* 27, 223-232.

20 Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Weissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P.G., Atwater, S., y Bishop, J.M. (1997). A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2551-2556.

- Chapman, A.P. (2002). PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Advanced drug delivery reviews* 54, 531-545.
- Choi, Y.S., Lee, J.Y., Suh, J.S., Lee, S.J., Yang, V.C., Chung, C.P., y Park, Y.J. (2011). Cell penetrating peptides for tumor targeting. *Current pharmaceutical biotechnology* 12, 1166-1182.
- 5 Chorev, M., y Goodman, M. (1995). Recent developments in retro peptides and proteins--an ongoing topochemical exploration. *Trends in biotechnology* 13, 438-445.
- Clegg, N., Ferguson, C., True, L.D., Arnold, H., Moorman, A., Quinn, J.E., Vessella, R.L., y Nelson, P.S. (2003). Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *The Prostate* 55, 55-64.
- 10 Fischer, P.M. (2003). The design, synthesis and application of stereochemical and directional peptide isomers: a critical review. *Current protein & peptide science* 4, 339-356.
- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., y Tonegawa, S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33, 717-728.
- Heitz, F., Morris, M.C., y Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology* 157, 195-206.
- 15 Janin, Y.L. (2003). Peptides with anticancer use or potential. *Amino acids* 25, 1-40.
- Jones, A.T., y Sayers, E.J. (2012). Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161, 582-591.
- Karlin, S., y Altschul, S.F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2264-2268.
- 20 Khafagy el, S., y Morishita, M. (2012). Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide. *Advanced drug delivery reviews* 64, 531-539.
- Kim, J.W., Cho, H.S., Kim, J.H., Hur, S.Y., Kim, T.E., Lee, J.M., Kim, I.K., y Namkoong, S.E. (2000). AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80, 587-594.
- 25 Kjonniksen, I., Storeng, R., Pihl, A., McLemore, T.L., y Fodstad, O. (1989). A human tumor lung metastasis model in athymic nude rats. *Cancer research* 49, 5148-5152.
- Kogan, S.C., Hong, S.H., Shultz, D.B., Privalsky, M.L., y Bishop, J.M. (2000). Leukemia initiated by PMLRARalpha: the PML domain plays a critical role while retinoic acid-mediated transactivation is dispensable. *Blood* 95, 1541-1550.
- 30 Krejci, P., Pejchalova, K., Rosenbloom, B.E., Rosenfelt, F.P., Tran, E.L., Laurell, H., y Wilcox, W.R. (2007). The antiapoptotic protein Api5 and its partner, high molecular weight FGF2, are up-regulated in B cell chronic lymphoid leukemia. *Journal of leukocyte biology* 82, 1363-1364.
- Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., y Kurosawa, Y. (1987). Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and biophysical research communications* 149, 960-968.
- 35 Lallemand-Breitenbach, V., Guillemin, M.C., Janin, A., Daniel, M.T., Degos, L., Kogan, S.C., Bishop, J.M., y de The, H. (1999). Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine* 189, 1043-1052.
- 40 Li, G.N., Wang, S.P., Xue, X., Qu, X.J., y Liu, H.P. (2013). Monoclonal antibody-related drugs for cancer therapy. *Drug discoveries & therapeutics* 7, 178-184.
- Malhi, S.S., y Murthy, R.S. (2012). Delivery to mitochondria: a narrower approach for broader therapeutics. *Expert opinion on drug delivery* 9, 909-935.
- 45 Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Auger, N., Degeorges, A., Assayag, F., de Cremoux, P., de Plater, L., Guyader, C., De Pinieux, G., Judde, J.G., et al. (2007). A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 13, 3989-3998.
- Mason, J.O., Williams, G.T., y Neuberger, M.S. (1985). Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* 41, 479-487.

- Miyaji, H., Harada, N., Mizukami, T., Sato, S., Fujiyoshi, N., e Itoh, S. (1990). Expression of human lymphotoxin in Namalwa KJM-1 cells adapted to serum-free medium. *Cytotechnology* 4, 39-43.
- Mizukami, T., e Itoh, S. (1987). A new SV40-based vector developed for cDNA expression in animal cells. *Journal of biochemistry* 101, 1307-1310.
- 5 Monfardini, C., Kieber-Emmons, T., VonFeldt, J.M., O'Malley, B., Rosenbaum, H., Godillot, A.P., Kaushansky, K., Brown, C.B., Voet, D., McCallus, D.E., et al. (1995). Recombinant antibodies in bioactive peptide design. *The Journal of biological chemistry* 270, 6628-6638.
- Morris, E.J., Michaud, W.A., Ji, J.Y., Moon, N.S., Rocco, J.W., y Dyson, N.J. (2006). Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS genetics* 2, e196.
- 10 O'Hare, K., Benoist, C., y Breathnach, R. (1981). Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 1527-1531.
- Rigou, P., Piddubnyak, V., Faye, A., Rain, J.C., Michel, L., Calvo, F., y Poyet, J.L. (2009). The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *The EMBO journal* 28, 1576-1588.
- 15 Sasaki, H., Moriyama, S., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Nakashima, Y., Kaji, M., Fukai, I., Kiriya, M., Yamakawa, Y., y Fujii, Y. (2001). Expression of the antiapoptosis gene, AAC-11, as a prognosis marker in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 34, 53-57.
- Sliwkowski, M.X., y Mellman, I. (2013). Antibody therapeutics in cancer. *Science (New York, NY)* 341, 1192-1198.
- 20 Tewari, M., Yu, M., Ross, B., Dean, C., Giordano, A., y Rubin, R. (1997). AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer research* 57, 4063-4069.
- Van den Berghe, L., Laurell, H., Huez, I., Zanibellato, C., Prats, H., y Bugler, B. (2000). FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 14, 1709-1724.
- 25 Varna, M., Lehmann-Che, J., Turpin, E., Marangoni, E., El-Bouchtaoui, M., Jeanne, M., Grigoriu, C., Ratajczak, P., Leboeuf, C., Plassa, L.F., et al. (2009). p53 dependent cell-cycle arrest triggered by chemotherapy in xenografted breast tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer* 124, 991-997.

Listado de secuencias

- <110> Inserm
- 30 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER
- <130> BIO13321-POYET
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 35 <211> 524
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 773 964 T3

Met Pro Thr Val Glu Glu Leu Tyr Arg Asn Tyr Gly Ile Leu Ala Asp  
 1 5 10 15

Ala Thr Glu Gln Val Gly Gln His Lys Asp Ala Tyr Gln Val Ile Leu  
 20 25 30

Asp Gly Val Lys Gly Gly Thr Lys Glu Lys Arg Leu Ala Ala Gln Phe  
 35 40 45

Ile Pro Lys Phe Phe Lys His Phe Pro Glu Leu Ala Asp Ser Ala Ile  
 50 55 60

Asn Ala Gln Leu Asp Leu Cys Glu Asp Glu Asp Val Ser Ile Arg Arg  
 65 70 75 80

Gln Ala Ile Lys Glu Leu Pro Gln Phe Ala Thr Gly Glu Asn Leu Pro  
 85 90 95

Arg Val Ala Asp Ile Leu Thr Gln Leu Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala  
 100 105 110

Glu Phe Asn Leu Val Asn Asn Ala Leu Leu Ser Ile Phe Lys Met Asp  
 115 120 125

Ala Lys Gly Thr Leu Gly Gly Leu Phe Ser Gln Ile Leu Gln Gly Glu  
 130 135 140

Asp Ile Val Arg Glu Arg Ala Ile Lys Phe Leu Ser Thr Lys Leu Lys  
 145 150 155 160

Thr Leu Pro Asp Glu Val Leu Thr Lys Glu Val Glu Glu Leu Ile Leu  
 165 170 175

ES 2 773 964 T3

Thr Glu Ser Lys Lys Val Leu Glu Asp Val Thr Gly Glu Glu Phe Val  
 180 185 190

Leu Phe Met Lys Ile Leu Ser Gly Leu Lys Ser Leu Gln Thr Val Ser  
 195 200 205

Gly Arg Gln Gln Leu Val Glu Leu Val Ala Glu Gln Ala Asp Leu Glu  
 210 215 220

Gln Thr Phe Asn Pro Ser Asp Pro Asp Cys Val Asp Arg Leu Leu Gln  
 225 230 235 240

Cys Thr Arg Gln Ala Val Pro Leu Phe Ser Lys Asn Val His Ser Thr  
 245 250 255

Arg Phe Val Thr Tyr Phe Cys Glu Gln Val Leu Pro Asn Leu Gly Thr  
 260 265 270

Leu Thr Thr Pro Val Glu Gly Leu Asp Ile Gln Leu Glu Val Leu Lys  
 275 280 285

Leu Leu Ala Glu Met Ser Ser Phe Cys Gly Asp Met Glu Lys Leu Glu  
 290 295 300

Thr Asn Leu Arg Lys Leu Phe Asp Lys Leu Leu Glu Tyr Met Pro Leu  
 305 310 315 320

Pro Pro Glu Glu Ala Glu Asn Gly Glu Asn Ala Gly Asn Glu Glu Pro  
 325 330 335

Lys Leu Gln Phe Ser Tyr Val Glu Cys Leu Leu Tyr Ser Phe His Gln  
 340 345 350

Leu Gly Arg Lys Leu Pro Asp Phe Leu Thr Ala Lys Leu Asn Ala Glu  
 355 360 365

Lys Leu Lys Asp Phe Lys Ile Arg Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu  
 370 375 380

Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Leu Gln Gly Lys Thr Gly  
 385 390 395 400

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

Ile Thr Asn Asn Ile Asn Val Leu Ile Lys Asp Leu Phe His Ile Pro  
 420 425 430

ES 2 773 964 T3

Pro Ser Tyr Lys Ser Thr Val Thr Leu Ser Trp Lys Pro Val Gln Lys  
435 440 445

Val Glu Ile Gly Gln Lys Arg Ala Ser Glu Asp Thr Thr Ser Gly Ser  
450 455 460

Pro Pro Lys Lys Ser Ser Ala Gly Pro Lys Arg Asp Ala Arg Gln Ile  
465 470 475 480

Tyr Asn Pro Pro Ser Gly Lys Tyr Ser Ser Asn Leu Gly Asn Phe Asn  
485 490 495

Tyr Glu Gln Arg Gly Ala Phe Arg Gly Ser Arg Gly Gly Arg Gly Trp  
500 505 510

Gly Thr Arg Gly Asn Arg Ser Arg Gly Arg Leu Tyr  
515 520

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Penetratina

<400> 2

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

Lys Lys

10 <210> 3

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> AAC-11-LZ (363-399)

<400> 3

Ala Lys Leu Asn Ala Glu Lys Leu Lys Asp Phe Lys Ile Arg Leu Gln  
1 5 10 15

Tyr Phe Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala  
20 25 30

Leu Gln Gly Lys Thr

35

<210> 4

20 <211> 55

ES 2 773 964 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antp-AAC-11-LZ (363-399)

5

<400> 4

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

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

Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg  
35 40 45

Leu Ala Leu Gln Gly Lys Thr  
50 55

<210> 5

<211> 55

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Antp-AAC-11-LZ (363-399)L/G

<400> 5

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

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

Gly Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Gly Gln Val Tyr Ile Arg Gln Gly Arg  
35 40 45

Leu Ala Leu Gln Gly Lys Thr  
50 55

15

<210> 6

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> Antp-AAC-11-LZ (371-399)

<400> 6

ES 2 773 964 T3

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

Lys Lys Lys Asp Phe Lys Ile Arg Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu  
20 25 30

Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Leu Gln Gly Lys Thr  
35 40 45

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

5

<213> Artificial

<220>

<223> Antp-AAC-11-LZ (371-397)

<400> 7

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

Lys Lys Lys Asp Phe Lys Ile Arg Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu  
20 25 30

Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Leu Gln Gly  
35 40 45

10

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Antp-AAC-11-LZ (371-391)

<400> 8

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

Lys Lys Lys Asp Phe Lys Ile Arg Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu  
20 25 30

Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu  
35

<210> 9

<211> 41

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antp-AAC-11-LZ (377-399)

ES 2 773 964 T3

<400> 9

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

Lys Lys Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln  
20 25 30

Leu Arg Leu Ala Leu Gln Gly Lys Thr  
35 40

<210> 10

<211> 38

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antp-AAC-11-LZ (380-399)

<400> 10

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

Lys Lys Phe Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu  
20 25 30

Ala Leu Gln Gly Lys Thr  
35

10

<210> 11

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cter-Antp-AAC-11-LZ (363-399)

<400> 11

Ala Lys Leu Asn Ala Glu Lys Leu Lys Asp Phe Lys Ile Arg Leu Gln  
1 5 10 15

Tyr Phe Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala  
20 25 30

Leu Gln Gly Lys Thr Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Lys Lys Gln Asn  
35 40 45

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
50 55

<210> 12

20

<211> 11

<212> PRT

ES 2 773 964 T3

<213> Artificial

<220>

<223> TAT sola

<400> 12

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

<210> 13

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> TAT-AAC-11-LZ (363-399)

<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly Ala Lys  
1 5 10 15

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

Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Leu Gln  
35 40 45

Gly Lys Thr  
50

<210> 14

15 <211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TAT-AAC-11-LZ (363-399)RI (D-aminoácidos)

20 <400> 14

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr Gly Thr Lys Gly Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Leu Arg Leu Gln Arg Ile Tyr Val Gln Leu Gly Arg Ala Phe  
20 25 30

Tyr Gln Leu Arg Ile Lys Phe Asp Lys Leu Lys Glu Ala Asn Leu Lys  
35 40 45

Ala

<210> 15

<211> 11

ES 2 773 964 T3

<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> TAT (47-57) (RI)  
5 <400> 15  
Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr  
1 5 10  
<210> 16  
<211> 23  
<212> PRT  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> AAC-11-LZ (377-399)  
<400> 16  
Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu Gln Val Tyr Ile Arg Gln Leu Arg  
1 5 10 15  
  
Leu Ala Leu Gln Gly Lys Thr  
20  
15 <210> 17  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Antp-AAC-11-LZ (377-399 ?385-390)  
<400> 17  
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Lys Lys Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp  
1 5 10 15  
  
Lys Lys Leu Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Leu Leu Arg Leu Ala Leu Gln  
20 25 30  
  
Gly Lys Thr  
35

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que consiste en:

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

5 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

10 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de tirosina en la posición 379 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1.

2. Un polipéptido que consiste en:

15 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

20 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de glicina en la posición 397 en SEQ ID NO: 1.

3. Un polipéptido que consiste en:

25 i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

30 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1, o

iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de leucina en la posición 391 en SEQ ID NO: 1.

35 4. Un polipéptido que consiste en:

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

40 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

45 iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de lisina en la posición 371 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.

5. Un polipéptido que consiste en:

i) una secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o

- ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o
- 5 iii) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión de la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1, o
- iv) una secuencia de aminoácidos que es una retro-inversión que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de leucina en la posición 377 hasta el resto de treonina en la posición 399 en SEQ ID NO: 1.
- 10 6. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se fusiona con al menos un polipéptido heterólogo.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17.
8. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.
- 15 9. La proteína de fusión para uso según la reivindicación 8, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, leucemia promielocítica aguda (AML), cáncer hematológico, linfoma, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma no Hodgkin de células B, leucemia linfoblástica aguda de células T, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de colon, melanoma, síndrome de Sezary.
- 20

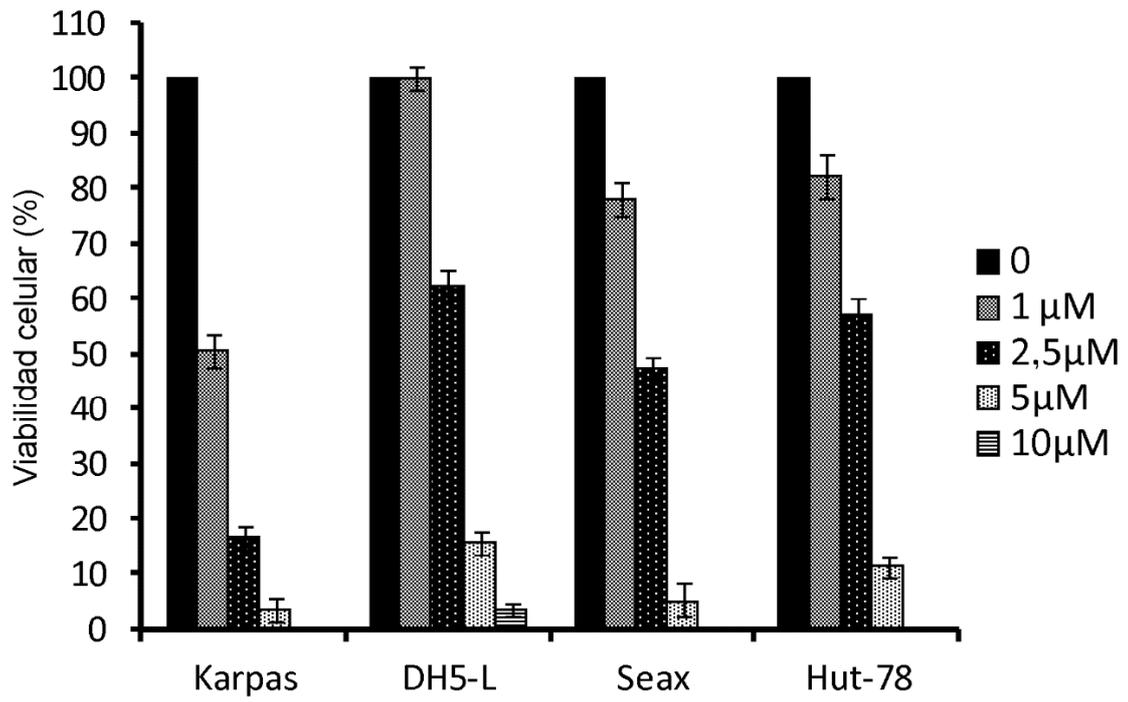


Figura 1A

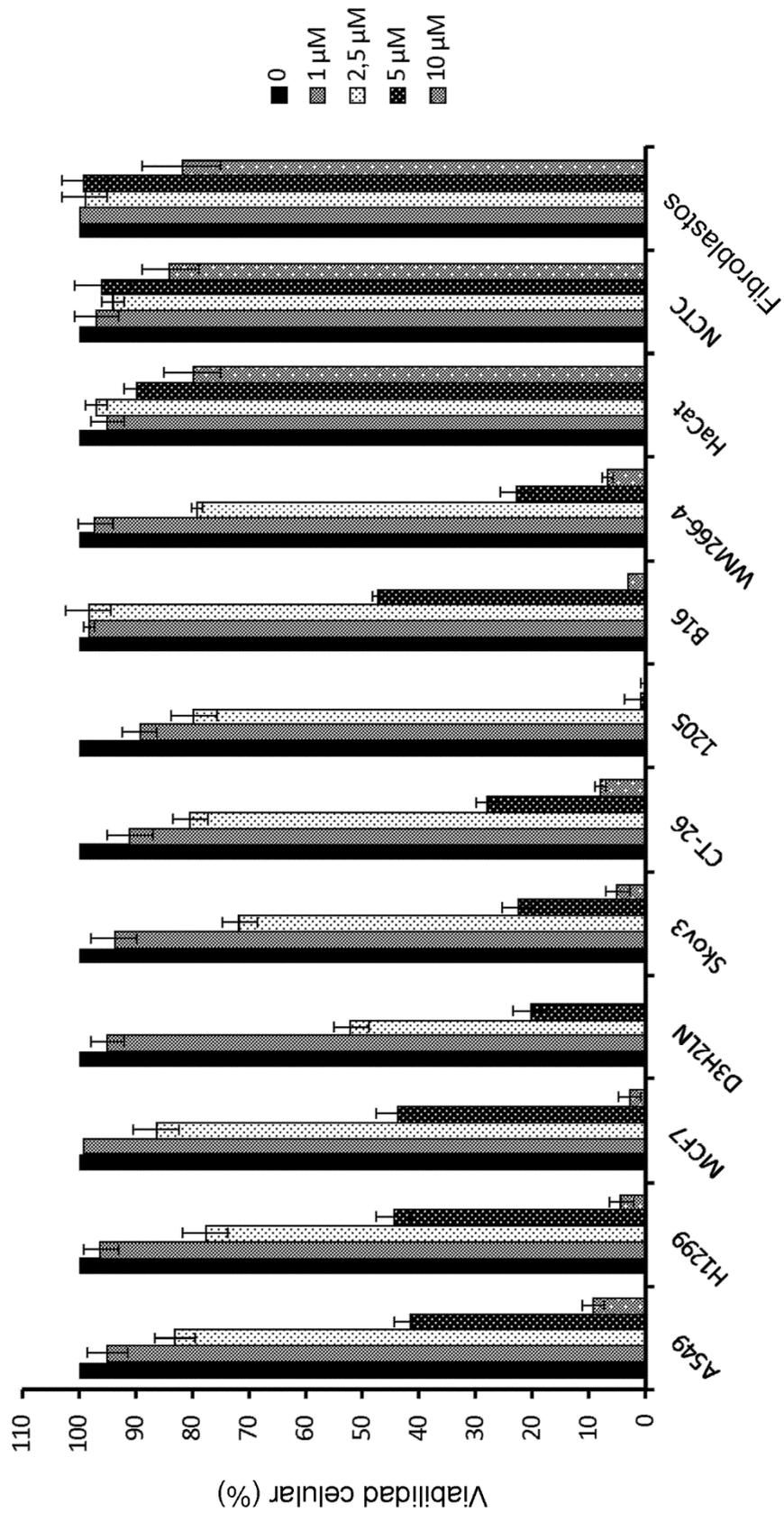


Figura 1B

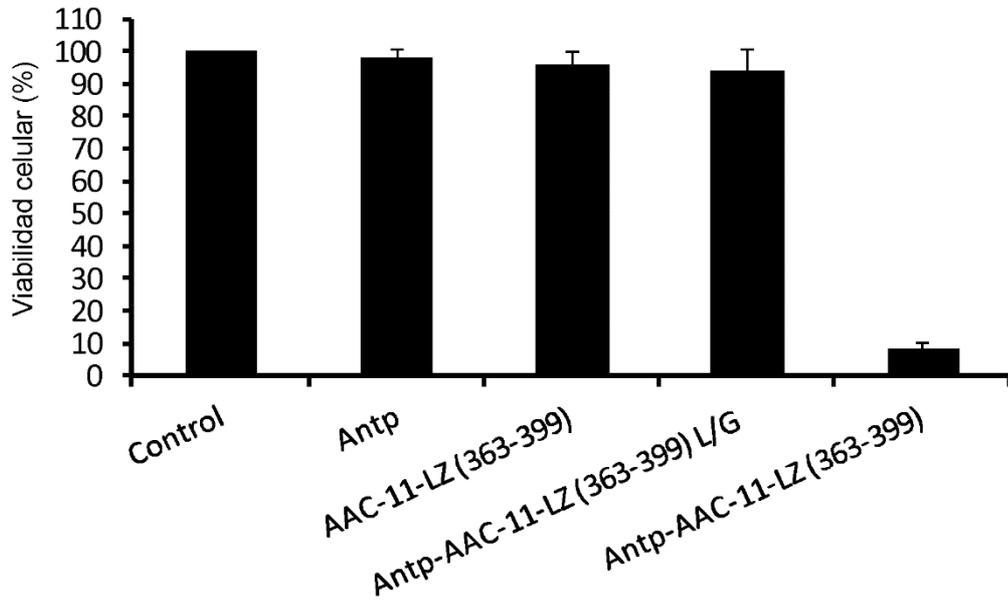


Figura 1C

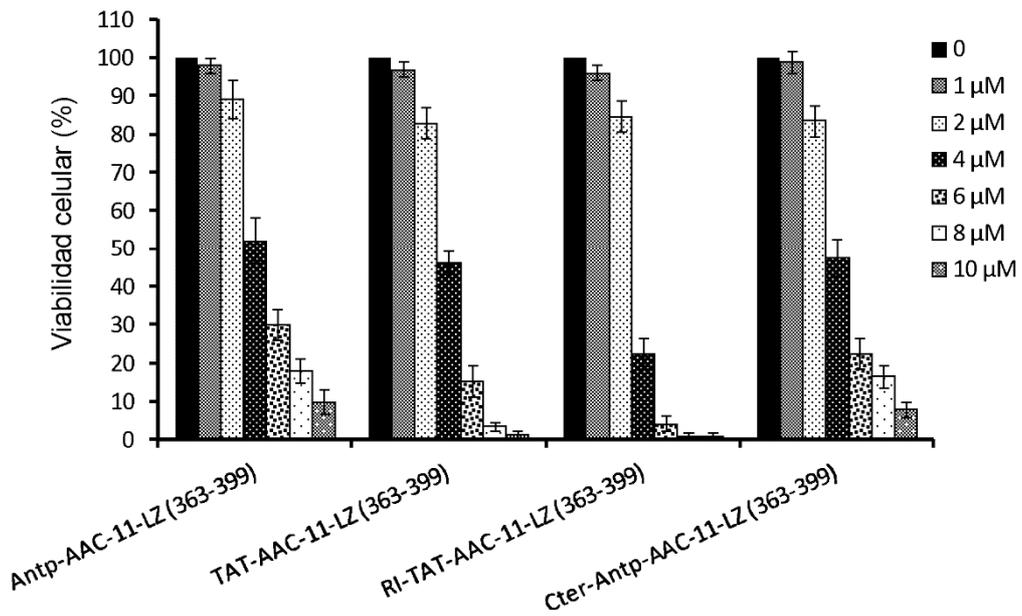


Figura 2A

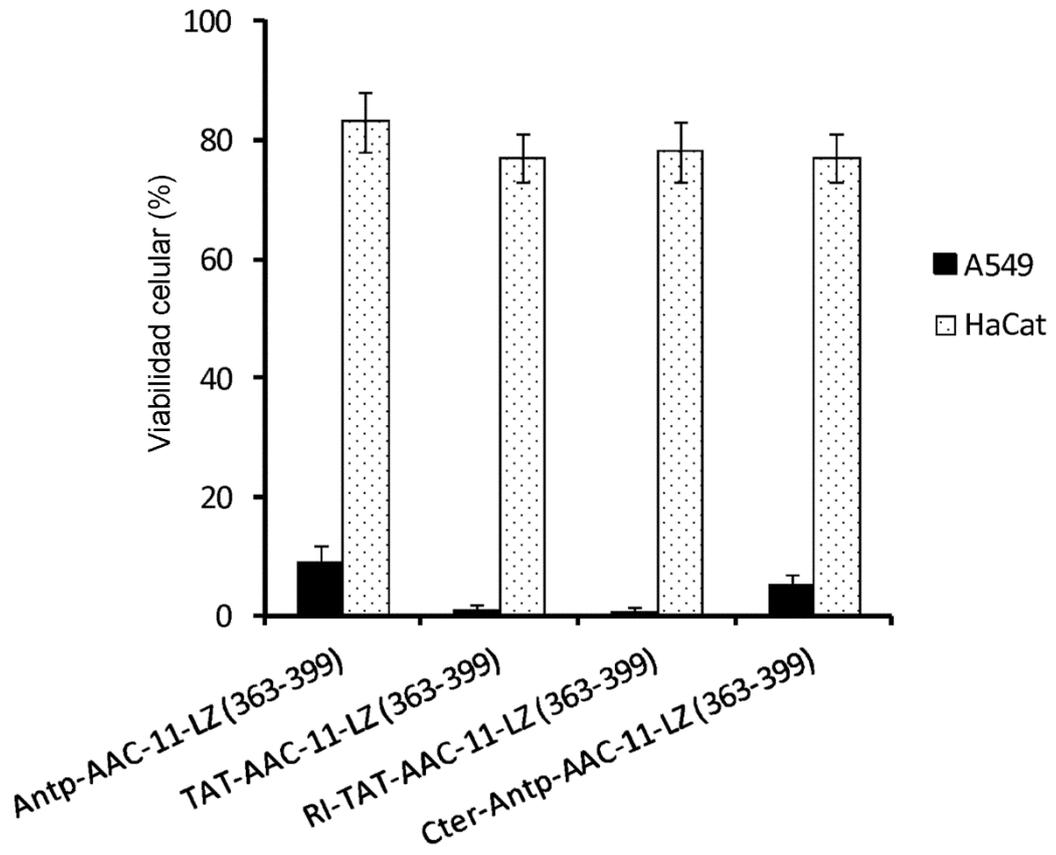


Figura 2B

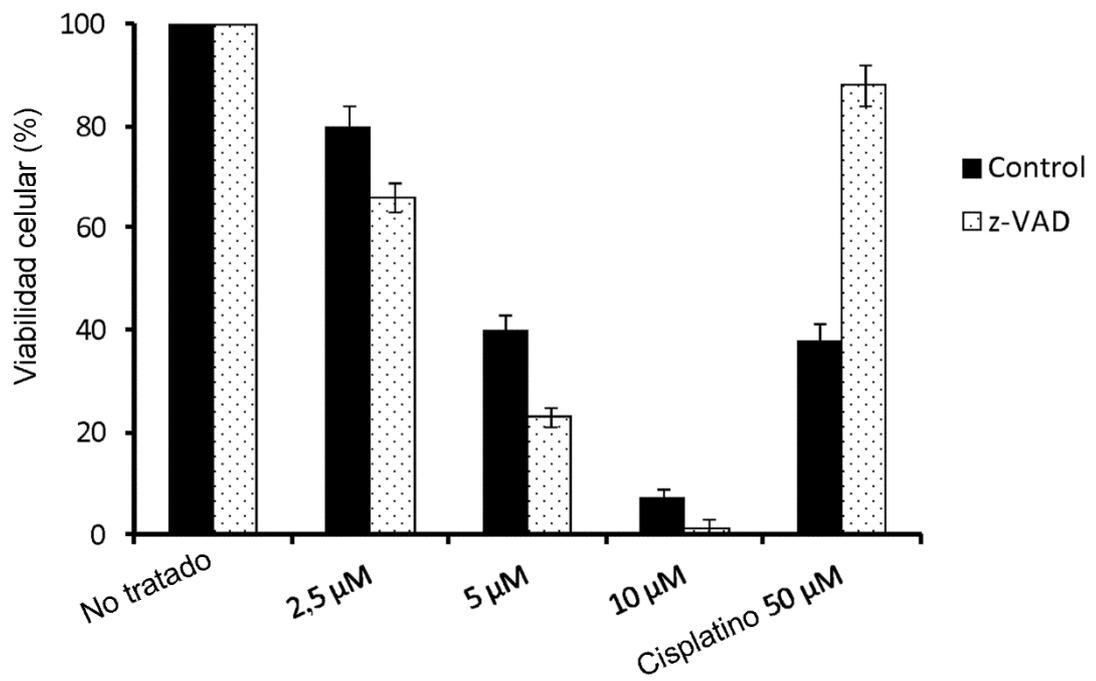


Figura 3

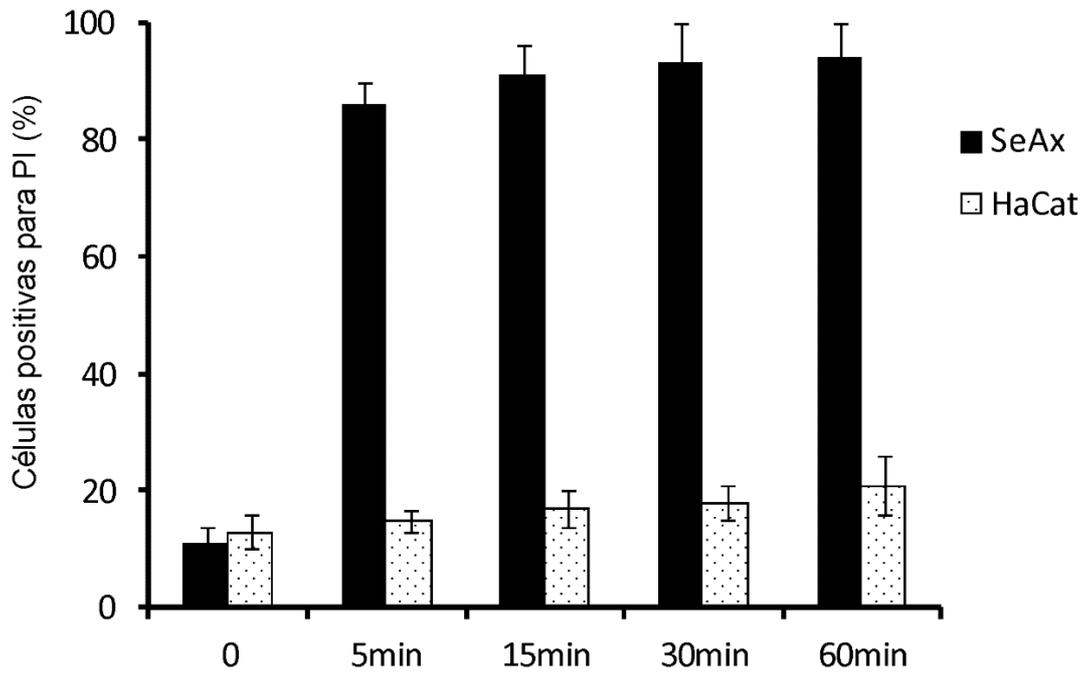


Figura 4A

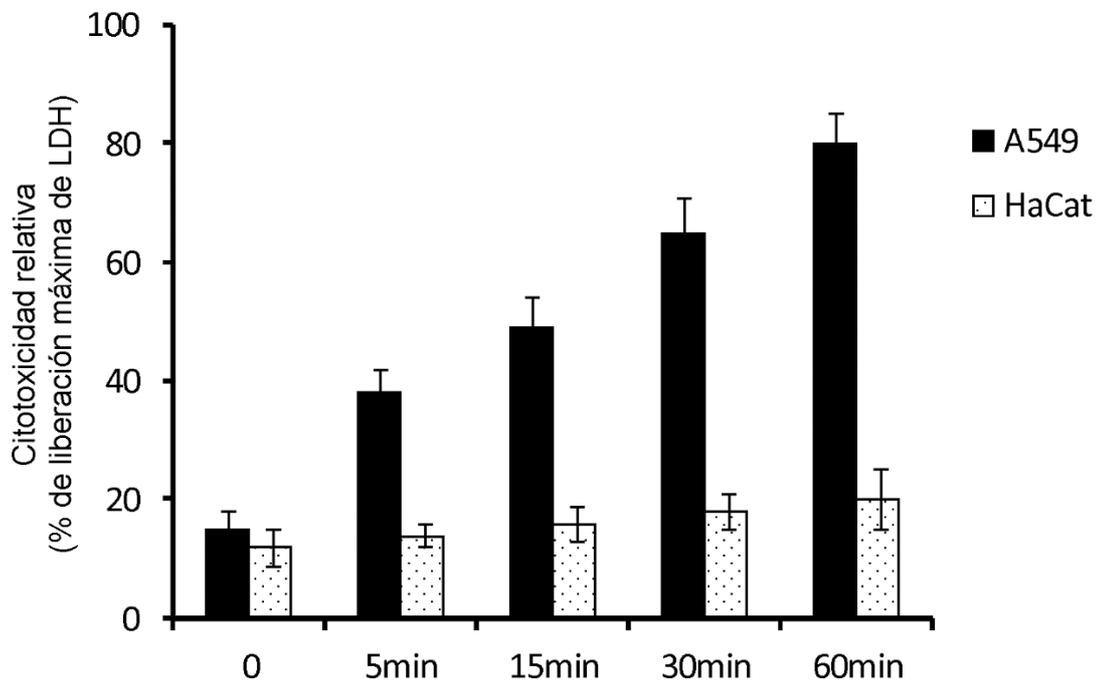


Figura 4B

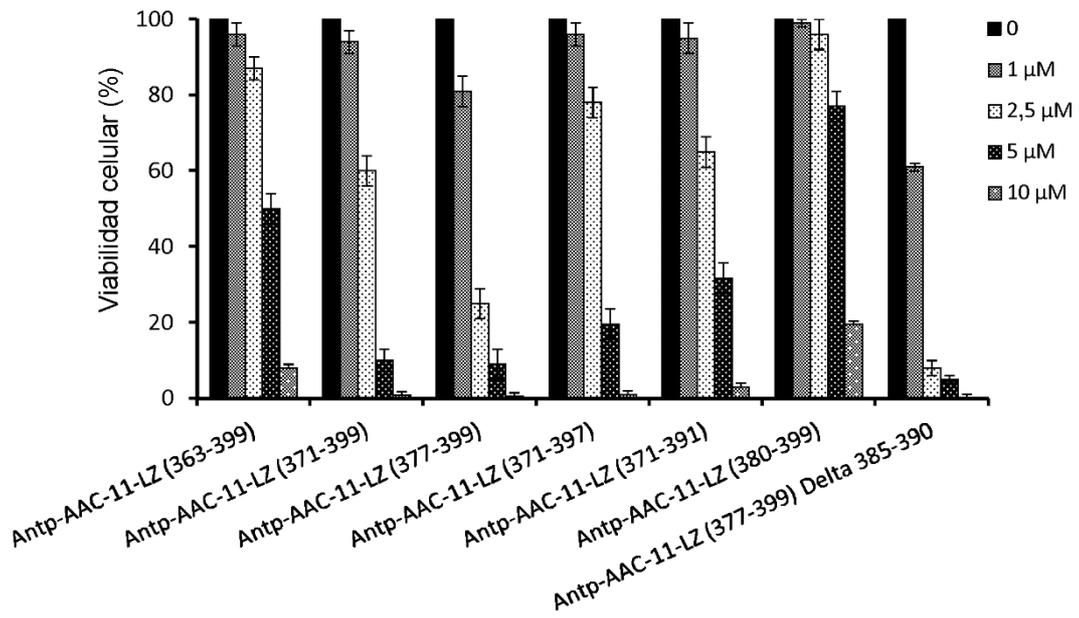


Figura 5A

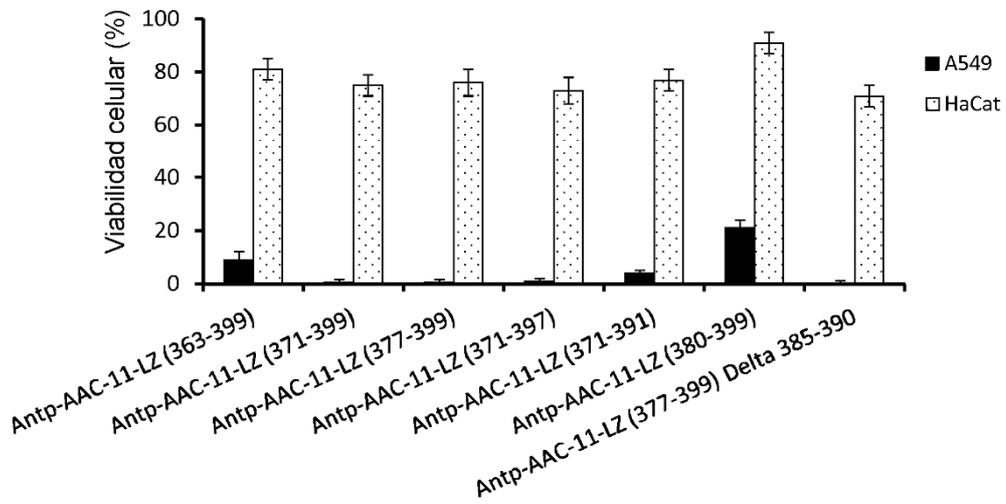


Figura 5B

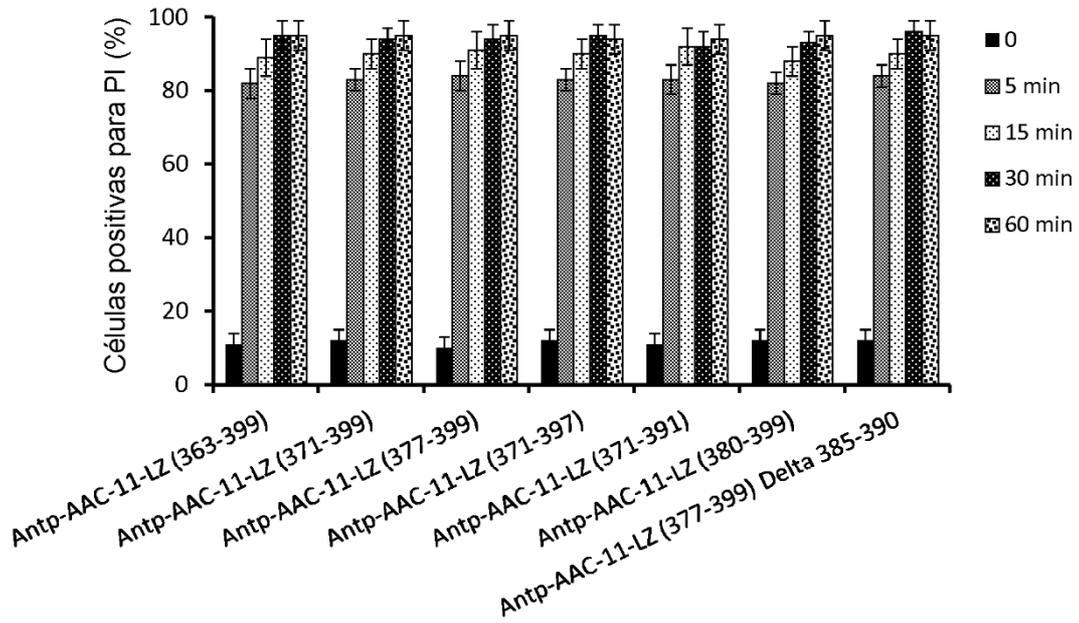


Figura 6A

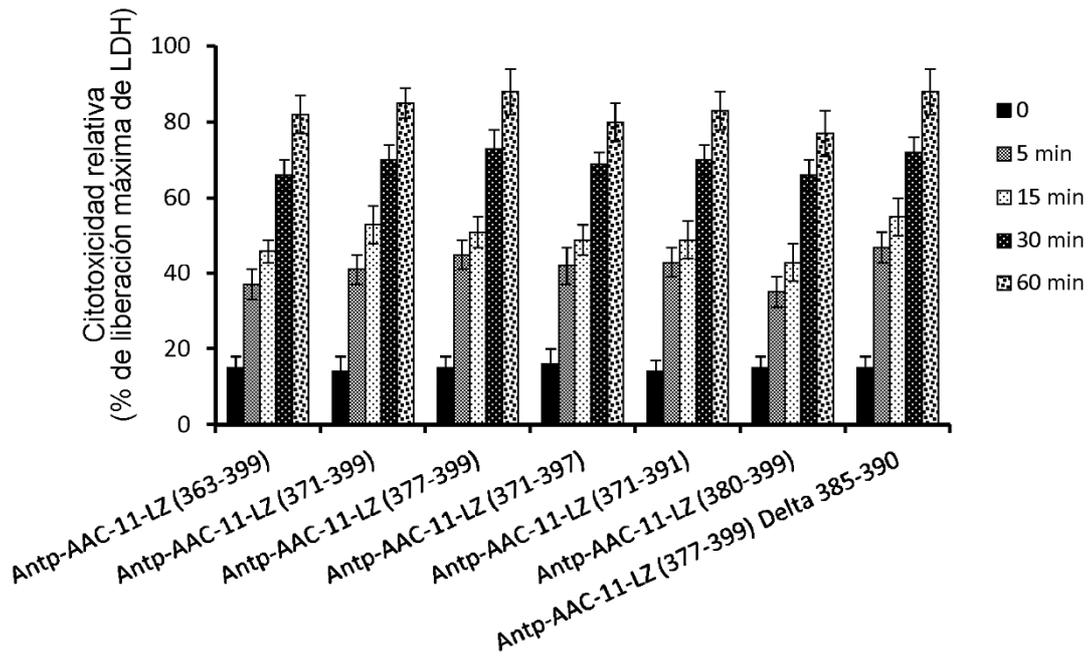


Figura 6B

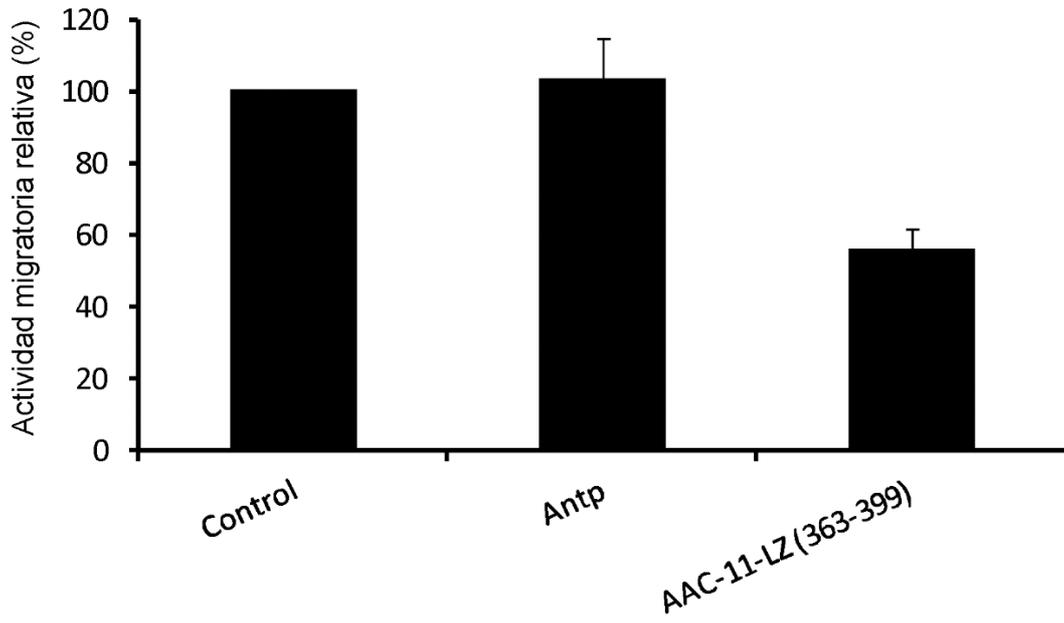


Figura 7A

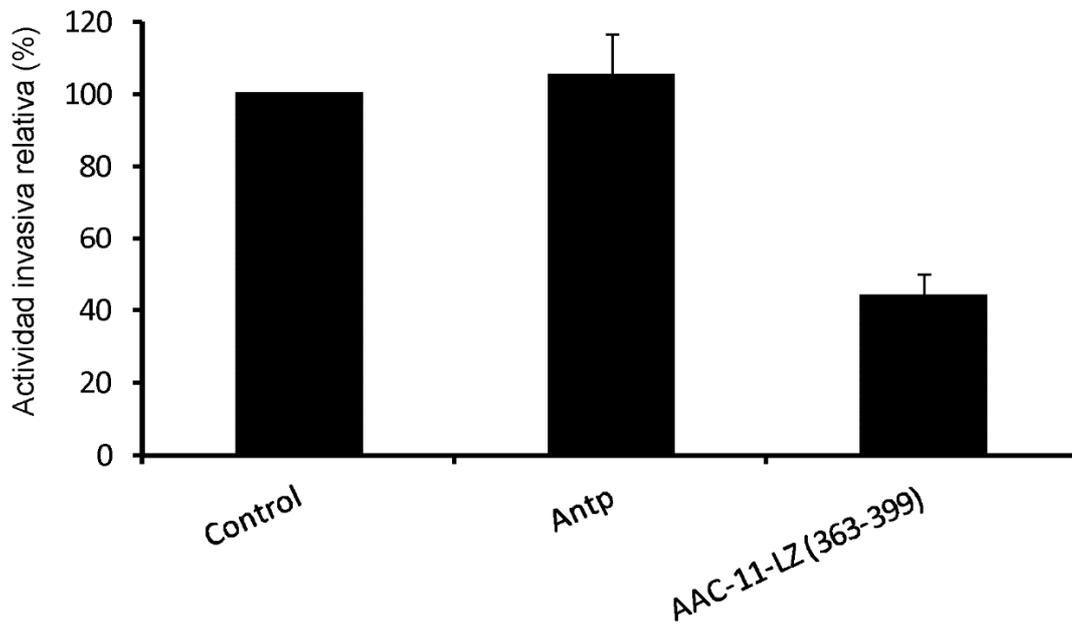


Figura 7B

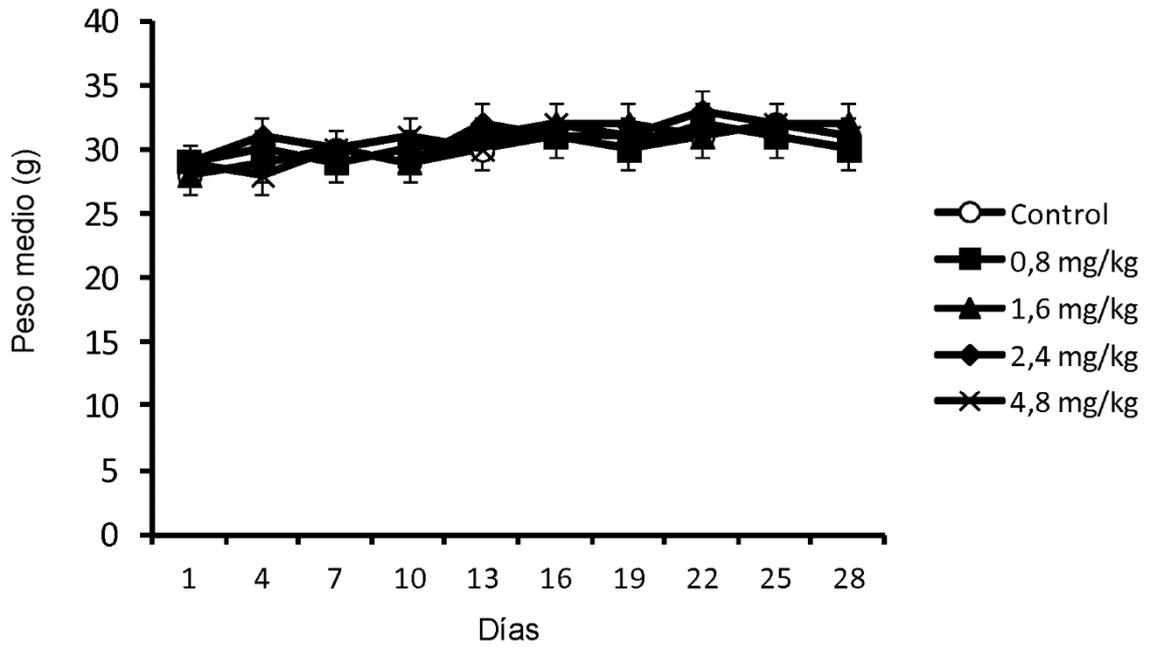


Figura 8A

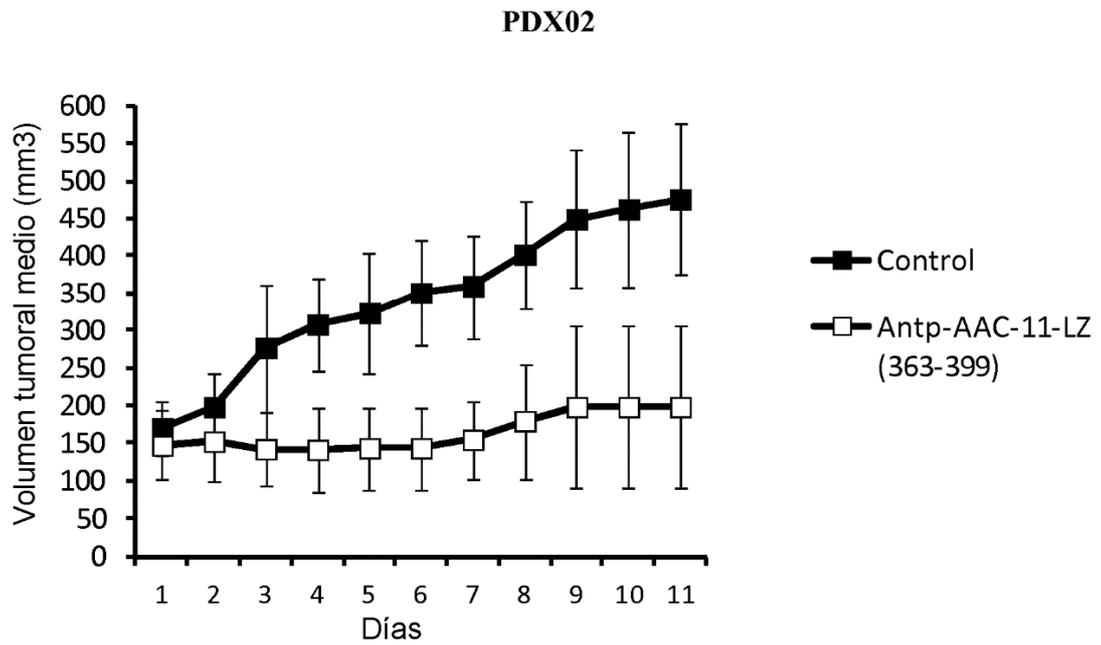
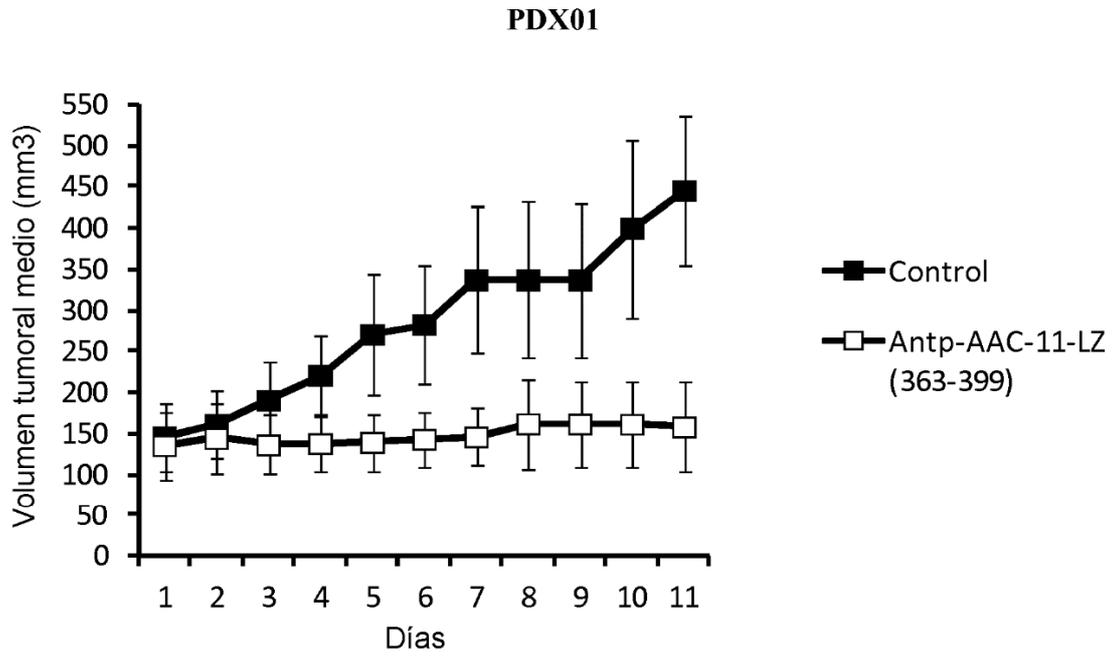


Figura 8B

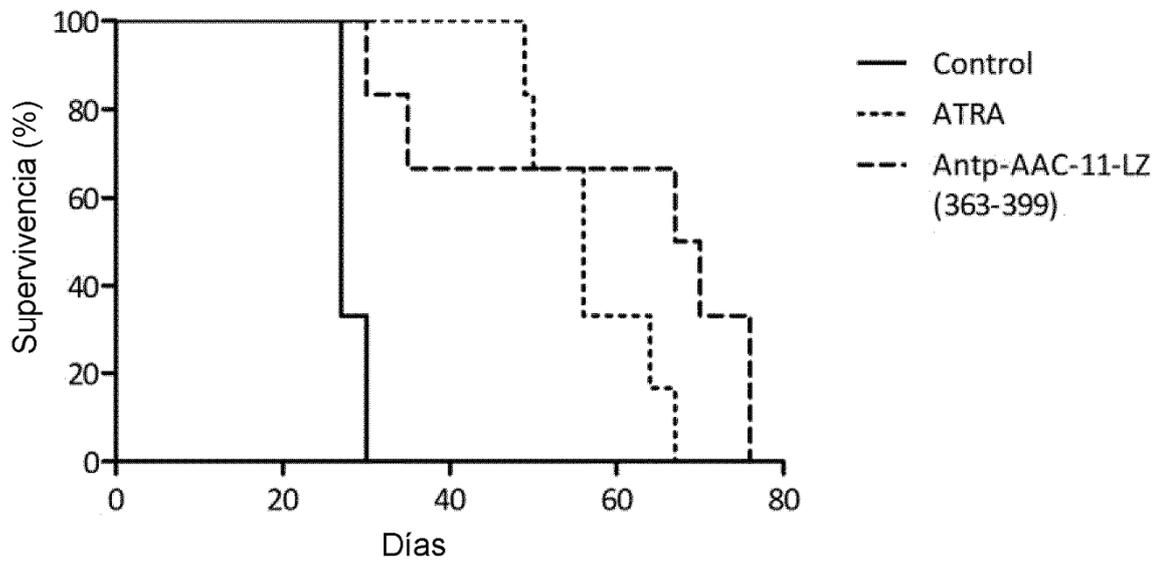


Figura 9

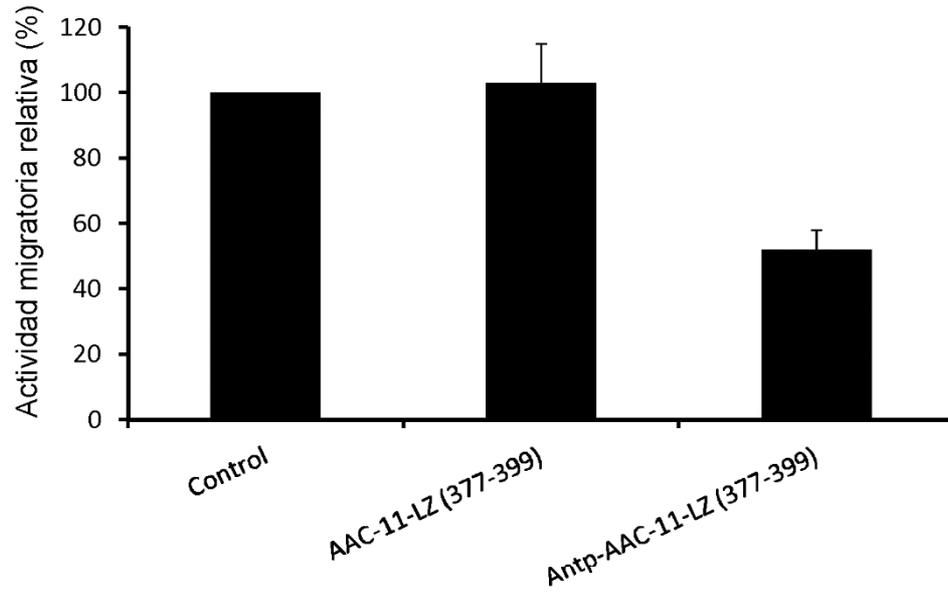


Figura 10A

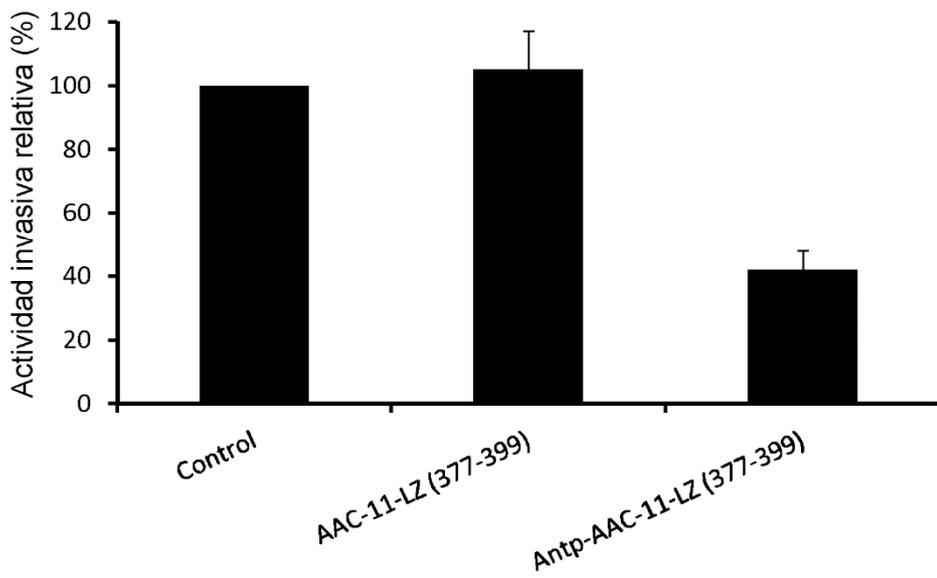


Figura 10B

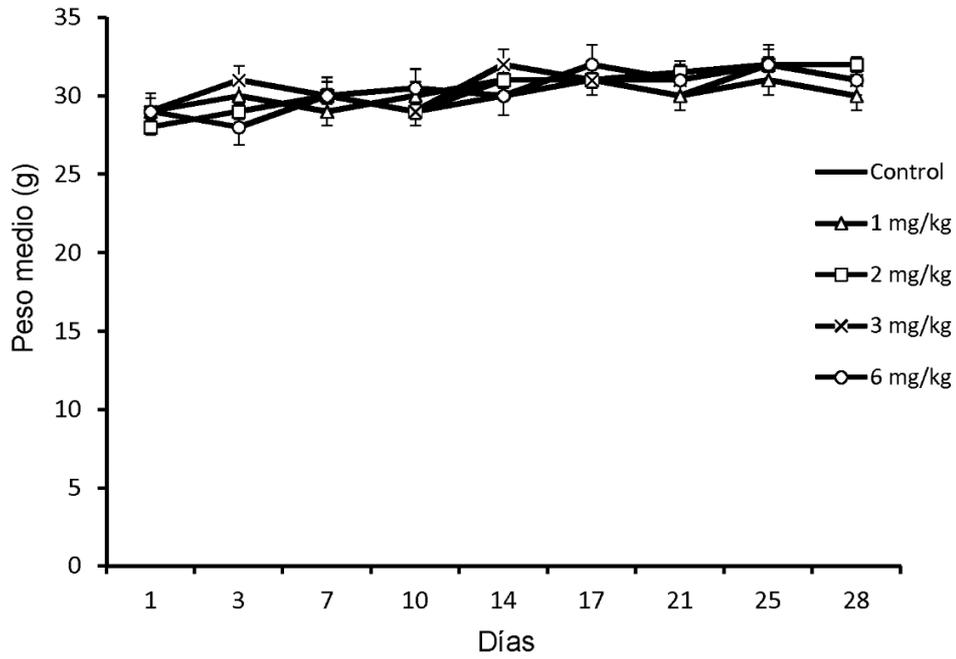


Figura 11A

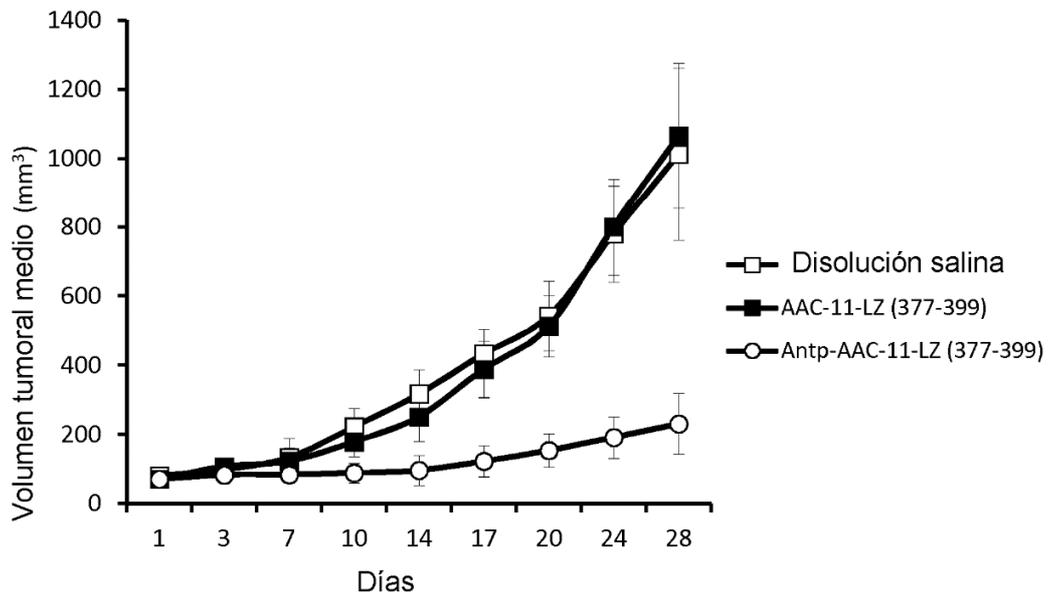


Figura 11B