

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 967**

51 Int. Cl.:

C07K 14/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2017** **PCT/EP2017/067998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018** **WO18011433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2017** **E 17746413 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3484913**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

15.07.2016 EP 16382339

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

08.11.2024

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
ONCOLÒGICA DE VALL-HEBRON (50.0%)**

Natzaret, 115-117

08035 Barcelona, ES y

**INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (50.0%)**

72 Inventor/es:

SOUCEK, LAURA;

JAUSET GONZÁLEZ, TONI y

BEAULIEU, MARIE-EVE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 985 967 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

Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

La invención se refiere al campo del cáncer y, más particularmente, a polipéptidos, a composiciones y a su uso en medicina, particularmente en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

El fármaco ideal contra el cáncer debe seleccionar como diana una función no redundante necesaria de manera continua para el mantenimiento del tumor, pero prescindible para el mantenimiento y la función de cualquier tejido normal. Por tanto, lo más lógico es seleccionar como diana productos génicos que están mutados específicamente en cáncer, partiendo de la base de que estas moléculas mutantes serían probablemente “conductoras” del cáncer y, quizá, menos críticas para tejidos normales. Por estos motivos, se ha centrado mucho la atención en catalogar lesiones recurrentes en tipos específicos de cáncer. Desgraciadamente, hay varios problemas con este enfoque. En primer lugar, la mayoría de los cánceres humanos sólidos pasan por episodios de inestabilidad genómica y presentan un ruido mutacional que puede ocultar las mutaciones “conductoras” y sus rutas efectoras auxiliares. En segundo lugar, los cánceres son el resultado final de un proceso que implica transiciones a través de múltiples cuellos de botella evolutivos. Cada cuello de botella puede requerir un tipo específico de mutación cuya función es después prescindible para el mantenimiento del tumor y, en consecuencia, no es una buena diana terapéutica tras este punto en la evolución del tumor.

Myc es una proteína con cremallera de leucina de hélice-bucle-hélice básica (b-HLH-LZ) implicada en el control del crecimiento y el cáncer, que opera en una red de proteínas relacionadas estructuralmente Max, Mad y Mnt. Los dímeros Myc/Max activan la transcripción génica e inducen la proliferación o apoptosis celular. Los complejos Mad/Max y Mnt/Max actúan como represores y producen diferenciación y detención del crecimiento celular. Todos los dímeros reconocen el mismo sitio consenso de ADN, la caja E CACGTG.

Myc está estrechamente regulada en las células normales, donde sus niveles son superiores en células en proliferación e inferiores en células no en proliferación. La actividad de Myc alta y/o desregulada de manera aberrante está implicada causalmente en la mayoría de los cánceres y a menudo está asociada con tumores agresivos, escasamente diferenciados y angiogénicos. La desregulación de la expresión de Myc se debe a la sobreexpresión a través de amplificaciones génicas, pérdida de control transcripcional, degradación afectada o estabilización aumentada. Esto da como resultado proliferación aberrante, supervivencia aumentada, cambios en el metabolismo, angiogénesis e inflamación, representando todos ellos los sellos distintivos principales del cáncer. Múltiples estudios corroboraron el papel crucial de Myc en la regulación los aspectos intracelulares y extracelulares de la tumorigénesis sugiriendo que seleccionar como diana su función sería terapéuticamente valioso.

Se sabe que la regulación por disminución de Myc mediante un inhibidor del bromodominio BET da como resultado la regresión de múltiples tipos tumorales. Aunque este enfoque muestra un buen potencial, presenta algunas limitaciones tales como toxicidad y numerosos efectos fuera de diana. Muchas moléculas pequeñas que alteran la interacción Myc/Max han mostrado baja especificidad *in cellulo*.

Sin embargo, todavía tiene que disponerse clínicamente de un inhibidor de Myc y su diseño presenta diversas consideraciones: en primer lugar, Myc es un factor de transcripción nuclear, que en consecuencia es más difícil de conseguir que las moléculas de membrana o citoplasmáticas; en segundo lugar, Myc no tiene un "sitio activo" enzimático que pueda seleccionarse como diana; en tercer lugar, la familia de Myc comprende 3 proteínas diferentes, c-, N y L- Myc, que en determinadas condiciones son funcionalmente redundantes, por lo que todas ellas requieren la inhibición simultánea. Además, ha habido preocupaciones de que la inhibición de Myc induciría efectos secundarios graves inhibiendo la proliferación de tejidos normales. Por todos estos motivos, la obtención de un fármaco inhibidor de Myc constituye un reto.

Omomyc es un mutante de MYC dominante-negativo que comprende el dominio b-HLH-LZ de Myc y que porta cuatro sustituciones de aminoácidos en la cremallera de leucina de Myc (Soucek, L. *et al.*, 1998, *Oncogene* 17, 2463-2472; Soucek, L. *et al.* (2002), *Cancer Res* 62: 3507-3510). Las sustituciones de aminoácidos E61T, E68I, R74Q y R75N confieren especificidad de dimerización alterada a la proteína, que conserva la capacidad para unirse a su pareja natural Max y para formar homodímeros consigo misma, así como heterodímeros con c-, N- y L-Myc silvestres.

Debido a estas propiedades, Omomyc puede impedir funciones de transactivación génica dependiente de Myc tanto *in vitro* como *in vivo* invalidando la capacidad de Myc para unirse a su sitio de unión de reconocimiento de ADN, la caja E. Al mismo tiempo, Omomyc potencia fuertemente la apoptosis inducida por Myc de una manera dependiente del nivel de expresión de Myc y de ese modo refuerza la actividad de transrepresión de Myc. Omomyc, por tanto, impide que Myc se una a las cajas E promotoras y la transactivación de genes diana a la vez que conserva la unión dependiente de Miz-1 a promotores y la transrepresión. En presencia de Omomyc, el interactoma de Myc se canaliza a represión y su actividad cambia desde una prooncogénica hasta una supresora de tumores.

En los documentos EP2801370 A1 y WO 2014/180889 A1 se demostró que el propio péptido Omomyc puede transducirse eficazmente a través de la membrana celular y translocarse al núcleo, en el que ejerce su efecto supresor de tumores.

Sin embargo, todavía existe la necesidad en el estado de la técnica de desarrollar enfoques terapéuticos novedosos y mejorados para el tratamiento del cáncer.

Breve resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, o a una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que tiene un grado de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1 mayor del 90% y que tiene una treonina en la posición correspondiente a la posición 61 de SEQ ID NO: 1, una isoleucina en la posición correspondiente a la posición 68 de SEQ ID NO: 1, una glutamina en la posición correspondiente a la posición 74 de SEQ ID NO: 1 y una asparagina en la posición correspondiente a la posición 75 de SEQ ID NO: 1, y en la que el residuo X en la posición correspondiente a la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- a. el polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención y

b. un resto químico que facilita la captación celular del polipéptido según la invención o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la invención o a un conjugado según la invención.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido según la invención.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un polipéptido de la invención, un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención o un vector de la invención.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención, un conjugado según la invención, un polinucleótido según la invención, un vector según la invención o una célula huésped según la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención, a un conjugado según la invención, a un polinucleótido según la invención, a un vector según la invención, a una célula huésped según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para su uso en medicina.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención, a un conjugado según la invención, a un polinucleótido según la invención, a un vector según la invención, a una célula huésped según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El ensayo de viabilidad celular muestra que OmoCS (que porta el cambio C89S) inhibe el crecimiento de células de glioma maligno U87 (panel A) y células de adenocarcinoma de pulmón A549 (panel B) más eficazmente que Omomyc (a concentración inferior). Lipofectamine (Lipo) no produce efecto. Se usó la prueba de la t para calcular la significación estadística. ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.

Figura 2. El ensayo de densidad celular muestra que OmoCA (que porta el cambio C98A) inhibe el crecimiento de células de adenocarcinoma de pulmón A549 tan eficazmente como OmoCS (que porta el cambio C98S) a concentración inferior. Lipofectamine (Lipo) no produce efecto.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que un polipéptido de SEQ ID NO: 1, en el que la cisteína en la posición 89 está reemplazada por una serina, denominado OmoCS, puede ejercer su efecto supresor de tumores más eficazmente que Omomyc (ejemplo 1). Este efecto supresor de tumores se mantiene cuando la cisteína en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 se reemplaza por otros aminoácidos. El ejemplo 2 muestra que un polipéptido de SEQ ID NO: 1, en el que la cisteína en la posición 89 se reemplaza por una alanina, denominado OmoCA, tiene el mismo efecto supresor de tumores que OmoCS.

Polipéptido de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, o a una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que tiene un grado de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1 mayor del 90% y que tiene una treonina en la posición correspondiente a la posición 61 de SEQ ID NO: 1, una isoleucina en la posición correspondiente a la posición 68 de SEQ ID NO: 1, una glutamina en la posición correspondiente a la posición 74 de SEQ ID NO: 1 y una asparagina en la posición correspondiente a la posición 75 de SEQ ID NO: 1, y en la que el residuo X en la posición correspondiente a la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, en la que dicha variante funcionalmente equivalente conserva la actividad supresora de tumores de la SEQ ID NO: 1, en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína.

La SEQ ID NO: 1 se corresponde a

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVI LKKATA
YILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SEQ ID NO: 1)

El polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia proteica de Omomyc, pero el residuo X en la posición 89 no es una cisteína. El término "Omomyc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que consiste en una versión mutada del dominio bHLHZip de la proteína Myc que porta las mutaciones E61T, E68I, R74Q y R75N (en las que la numeración en las posiciones mutadas se facilita con respecto a la secuencia de la región de Myc correspondiente a los aminoácidos 365-454 del polipéptido tal como se define con en número de registro NP_002458 en la base de datos de NCBI, versión de 15 de marzo de 2015). La secuencia de c-Myc proporcionada en la base de datos de NCBI con el número de registro NP_002458 se muestra a continuación (SEQ ID NO: 5), en la que la región de la que se deriva Omomyc se muestra subrayada:

1 M D F F R V V E N Q Q P P A T M P L N V S F T N R N Y D L D Y D S V Q P Y F Y C D E E E N F Y Q Q Q Q Q S E L Q P P A P
61 S E D I W K K F E L L P T P P L S P S R R S G L C S P S Y V A V T P F S L R G D N D G G G G S F S T A D Q L E M V T E L
121 L G G D M V N Q S F I C D P D D E T F I K N I I I Q D C M W S G F S A A A K L V S E K L A S Y Q A A R K D S G S P N P A
181 R G H S V C S T S S L Y L Q D L S A A A S E C I D P S V V F P Y P L N D S S S P K S C A S Q D S S A F S P S S D S L L S
241 S T E S S P Q G S P E P L V L H E E T P P T T S S D S E E E Q E D E E E I D V V S V E K R Q A P G K R S E S G S P S A G
301 G H S K P P H S P L V L K R C H V S T H Q H N Y A A P P S T R K D Y P A A K R V K L D S V R V L R Q I S N N R K C T S P
361 R S S D T E E N V K R R T H N V L E R Q R R N E L K R S F F A L R D Q I P E L E N N E K A P K V V I L K K A T A Y I L S
421 V Q A E E Q K L I S E E D L L R K R R E Q L K H K L E Q L R N S C A (SEQ ID NO: 5)

El término "Myc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de factores de transcripción que incluye c-Myc, N-Myc y L-Myc. La proteína Myc activa la expresión de muchos genes a través de unión a secuencias consenso CACGTG (secuencias de caja potenciadora (*Enhancer Box*) o cajas E) y el reclutamiento de histona acetil-transferasas o HAT. Sin embargo, Myc también puede actuar como represor de la transcripción. Mediante la unión del factor de transcripción Miz-1 y el desplazamiento del co-activador p300, inhibe la expresión de genes diana de Miz-1. Myc también tiene un papel directo en el control de la replicación de ADN.

El dominio b-HLH-LZ de Myc o dominio de cremallera de leucina de hélice-bucle-hélice de región básica de Myc se refiere a una región que determina la dimerización de Myc con la proteína Max y la unión a genes diana de Myc. Esta región corresponde a los aminoácidos 365-454 de Myc humana y se caracteriza por dos hélices alfa conectadas mediante un bucle (Nair, S. K., & Burley, S. K., 2003, Cell, 112: 193-205).

En una realización preferida, el polipéptido que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1 comprende, consiste en o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 3 mostrada a continuación.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKAT
AYILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SEQ ID NO: 3)

En este contexto, "que consiste esencialmente en" significa que la molécula especificada no contendría ninguna secuencia adicional que pudiera alterar la actividad de SEQ ID NO: 3.

La invención se refiere a un polipéptido que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína. Dicho polipéptido puede derivarse del dominio bHLHZip de cualquier proteína Myc conocida en la técnica, siempre que conserven las mutaciones que dan como resultado el efecto supresor de tumores. Por tanto, el polipéptido que puede usarse en la presente invención puede derivarse de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferiblemente, el polipéptido de la invención se deriva de la proteína Myc humana (número de registro NP_002458, versión de 15 de marzo de 2015).

En una realización preferida, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, o a una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que tiene un grado de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1 mayor del 90% y que tiene una treonina en la posición correspondiente a la posición 61 de SEQ ID NO: 1, una isoleucina en la posición correspondiente a la posición 68 de SEQ ID NO: 1, una glutamina en la posición correspondiente a la posición 74 de SEQ ID NO: 1 y una asparagina en la posición correspondiente a la posición 75 de SEQ ID NO: 1, y en la que el residuo X en la posición correspondiente a la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, en la que dicha variante funcionalmente equivalente conserva la actividad supresora de tumores de la SEQ ID NO: 1, en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína.

Según la presente invención, el residuo en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína.

"Cisteína", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un aminoácido con la fórmula $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$. Está codificado por los codones UGU y UGC. El término también incluye cisteína no natural.

La cisteína puede formar enlaces disulfuro en la forma homodimérica de Omomyc, por tanto, su mutación a cualquier otro aminoácido dará como resultado la incapacidad de formación de enlaces disulfuro y debe conducir a las mismas propiedades de eficacia que se obtienen con OmoCS. Por tanto, el residuo en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 puede ser cualquier aminoácido natural, no natural o sintético excepto cisteína, y particularmente cualquier aminoácido que no pueda reticularse con otro monómero del polipéptido de la invención para formar un homodímero.

El término “aminoácido” o “residuo” se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácido que funcionan de modo similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento mediante o bien sus símbolos de tres letras conocidos comúnmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

El término aminoácido incluye aminoácidos que se producen de manera natural (Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), aminoácidos naturales no comunes y aminoácidos no naturales (sintéticos). Los aminoácidos están preferiblemente en la configuración L, pero también se consideran la configuración D, o mezclas de aminoácidos en las configuraciones D y L.

El término “aminoácidos naturales” comprende aminoácidos alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina), aminoácidos hidroxilados (serina y treonina), aminoácidos sulfurados (metionina), aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas (ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y glutamina), aminoácidos que tienen dos grupos básicos (lisina, arginina e histidina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y aminoácidos cíclicos (prolina). En una realización, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido alifático. En otra realización, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido sulfurado. En otra realización, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido dicarboxílico o sus amidas. En otra realización, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido que tiene dos grupos básicos. En otra realización, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido aromático. En otra realización, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido cíclico. En una realización preferida, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido hidroxilado, preferiblemente serina. En una realización preferida, el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado de serina, treonina y alanina, preferiblemente seleccionado de serina y alanina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido no natural” se refiere a un ácido carboxílico, o un derivado del mismo, sustituido con un grupo amina y que está relacionado estructuralmente con un aminoácido natural. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de aminoácidos modificados o no comunes incluyen ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metil-lisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de aminoácidos no comunes son hidroxilisina e hidroxiprolina, tiroxina, N-metilarginina y N-acetil-lisina.

En una realización preferida, el residuo X en la posición 89 es cualquier otro aminoácido que no pueda reticularse con el otro monómero del polipéptido de la invención para formar un par homodimérico.

En una realización más preferida del polipéptido de la invención, el residuo en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es el aminoácido serina.

"Serina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a ácido 2-amino-3-hidroxipropanoico codificado en seres humanos por los codones UCU, UCC, UCA, UCG, AGU y AGC. El término también incluye serinas modificadas tales como serina fosforilada o sulfonatada, a modo de ejemplo ilustrativo no limitativo N-benzoil-(2R,3S)-3-fenilisoserina, D-cicloserina, L-isoserina, fenilserina.

En una realización preferida, el polipéptido de la invención comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVI LKKATA
YILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA (SEQ ID NO: 2)

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención consiste o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 4.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVI LKKAT
AYILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA (SEQ ID NO: 4)

En una realización más preferida del polipéptido de la invención, el residuo en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 es el aminoácido alanina.

"Alanina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a ácido 2-aminopropanoico codificado en seres humanos por los codones GCU, GCC, GCA y GCG. El término también incluye alaninas modificadas tales como N-acetil-L-alanina.

En una realización preferida, el polipéptido de la invención comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 63.

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVI LKKATA
YILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA (SEQ ID NO: 63)

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención consiste o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 64.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVI LKKAT
AYILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA (SEQ ID NO: 64)

El término "variante funcionalmente equivalente", cuando se refiere a la SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, se refiere a cualquier polipéptido que resulte de la delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos con respecto al polipéptido de SEQ ID NO: 1 o que resulta de la modificación química del polipéptido de SEQ ID NO: 1 y que conserva la actividad supresora de tumores de la SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, preferiblemente que conserva la actividad supresora de tumores de OmoCS. El experto entenderá que la conservación de la actividad supresora de tumores requiere que la variante pueda dimerizarse con Myc y/o su pareja obligada p21/p22Max e inhibir la actividad de Myc una vez que se encuentra en el núcleo, que pueda translocarse a través de la membrana celular y que pueda translocarse a través de la envuelta nuclear. En algunas realizaciones, la variante funcionalmente equivalente del polipéptido de la invención se homodimeriza menos que Omomyc, o no se fuerza a dar lugar a homodímeros mediante la formación del enlace disulfuro. En particular, la formación del enlace disulfuro en la forma de homodímero del polipéptido de la invención es menor que en el polipéptido OmoMyc.

"Menos homodimerización", tal como se usa en el presente documento se refiere a la menor capacidad de formación de homodímeros obligados del polipéptido de la invención incluso en condiciones reductoras. En una realización preferida, la capacidad es de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% menos que la capacidad de formación de homodímeros de Omomyc. Condiciones reductoras, tal como se usa en el presente documento se refiere a la presencia de un agente reductor, un compuesto que dona un electrón a otra especie química en una reacción química redox. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de agentes reductores son DTT (ditiotretitol), b-mercaptoetanol o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina). Es posible que la cantidad de homodímeros sea la misma *in vitro*, y que la diferencia entre el polipéptido de la invención y Omomyc esté presente solo en células en presencia de parejas de heterodimerización donde la ausencia de enlaces disulfuro permite una formación de heterodímeros potencialmente superior.

Pueden usarse varios ensayos para determinar la homodimerización de un péptido, a modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, mediante desnaturalización térmica monitorizada por dicroísmo circular, por lo que la dimerización puede detectarse a través de cuantificación de estabilidad térmica y plegamiento.

Las variantes funcionalmente equivalentes adecuadas incluyen polipéptidos que consisten esencialmente en el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína.

En este contexto, "que consiste esencialmente en" significa que la molécula especificada no contendría ninguna secuencia adicional que pudiera alterar la actividad de la SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína.

Variantes funcionales adecuadas del péptido de direccionamiento son aquellas que muestran un grado de identidad con respecto al péptido de SEQ ID NO: 1 (preferiblemente con respecto a OmoCS, SEQ ID NO: 4) mayor del 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos informáticos y métodos que los expertos en la técnica conocen ampliamente. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente mediante el uso del algoritmo BLASTP tal como se describió anteriormente [manual de BLAST, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 1990;215: 403-410]. En una realización preferida, la identidad de secuencia se determina a través de la longitud completa del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o a través de la longitud completa de la variante o de ambos.

Las variantes funcionalmente equivalentes del polipéptido de la invención también pueden incluir modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, acetilación, isoprenilación, miristoilación, procesamiento proteolítico, etc.

Alternativamente, variantes funcionales adecuadas del péptido de direccionamiento son aquellas en las que una o más posiciones dentro del polipéptido de la invención contienen un aminoácido que es una sustitución conservativa del aminoácido presente en la proteína mencionada anteriormente. "Sustituciones conservativas de aminoácido" resultan de reemplazar un aminoácido con otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares. Por ejemplo, los siguientes seis grupos contienen

cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). La selección de tales sustituciones conservativas de aminoácido está dentro de la capacidad de un experto habitual en la técnica y se describe, por ejemplo, por Dordo *et al.*, (J. Mol. Biol, 1999, 217;721-739) y Taylor *et al.*, (J. Theor. Biol., 1986, 119:205-218).

En una realización preferida, la totalidad de la secuencia de la variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 no contiene un aminoácido de cisteína. Se entenderá que las variantes funcionalmente equivalentes de la SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína contiene mutaciones en las posiciones que corresponden a las mutaciones E61T, E68I, R74Q y R75N encontradas en Omomyc derivado de c-Myc humana. La posición en la que tienen que producirse dichas mutaciones en la variante funcionalmente equivalente pueden determinarse mediante una alineación de secuencias múltiples de diferentes secuencias de Myc e identificarse mediante la alineación de aquellas posiciones correspondientes a las posiciones 61, 68, 74 y 75 dentro de la secuencia de Omomyc derivada de c-Myc humana.

Una alineación de secuencias múltiples es una extensión de alineación por emparejamiento para incorporar más de dos secuencias a la vez. Los métodos de alineación múltiple alinean todas las secuencias en un conjunto de consulta dado. Un programa preferido de alineación de secuencias múltiples (y su algoritmo) es ClustalW, Clustal2W o ClustalW XXL (véase Thompson *et al.* (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680). Una vez que se comparan (se alinean) las secuencias de c-Myc de diferentes organismos y de la variante tal como se describe en el presente documento, el experto en la técnica puede identificar fácilmente las posiciones dentro de cada una de las secuencias correspondientes a las posiciones E61T, E68I, R74Q y R75N encontradas en Omomyc e introducir dentro de la variante de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, mutaciones correspondientes a las mutaciones E61T, E68I, R74Q y R75N encontradas en Omomyc derivadas de c-Myc humana.

Los ensayos adecuados para determinar si un polipéptido puede considerarse una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína incluyen, sin limitación:

- Ensayos que miden la capacidad del polipéptido para formar complejos diméricos con Max y Myc, tal como los ensayos basados en la expresión de un gen indicador tal como se describe en Soucek *et al.* (Oncogene, 1998, 17: 2463 - 2472) así como PLA (ensayo de ligamiento de proteínas) o co-inmunoprecipitación.
- Ensayos que miden la capacidad del polipéptido para unirse al sitio de reconocimiento de Myc/Max dentro del ADN (el sitio CACGTG), tal como el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) descrito en Soucek *et al.* (citado anteriormente).
- Ensayos que miden la capacidad para reprimir la transactivación inducida por Myc, tal como el ensayo basado en la expresión de un gen indicador bajo el control de los sitios de unión a ADN específicos para Myc/Max tal como se describe por Soucek *et al.* (citado anteriormente).
- Ensayos basados en la capacidad del producto génico o el polipéptido para inhibir el crecimiento de células que expresan el oncogén myc, tal como se describe por Soucek *et al.* (citado anteriormente).

- Ensayos que miden la capacidad del polipéptido para potenciar la apoptosis inducida por myc, tales como los ensayos descritos por Soucek *et al.* (Oncogene, 1998: 17, 2463 - 2472). Además, puede usarse cualquier ensayo conocido comúnmente en la técnica para evaluar la apoptosis en una célula, tal como tinción de Hoechst, tinción con yoduro de propidio (PI) o anexina V, azul de tripano, desarrollo escalonado/fragmentación de ADN y TUNEL.

En una realización preferida, una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína incluye aquellas secuencias que tienen una o más, preferiblemente todas las características siguientes: capacidad para dimerizarse con Myc e inhibir su actividad, translocación a través de la membrana celular, translocación al núcleo, incapacidad para formar homodímeros o capacidad reducida para formar homodímeros en comparación con Omomyc, una viabilidad celular en un ensayo *in vitro* tal como se realiza en el ejemplo 1 inferior a la de Omomyc en una cantidad de 12,5 nM de ARNm que codifica para el polipéptido de la invención. En una realización preferida, la variante funcionalmente equivalente de la invención corresponde a una secuencia que media en una viabilidad celular en un ensayo *in vitro* tal como se realiza en el ejemplo 1 inferior a la de Omomyc en una cantidad de 12,5 nM de ARNm que codifica para el polipéptido de la invención.

En una realización preferida, un polipéptido se considera una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína si muestra una actividad en uno o más de los ensayos anteriores que es al menos del 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% de la actividad de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína (preferiblemente de la actividad de OmoCS).

Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de SEQ ID NO: 1 en las que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, también pueden transducir células una vez que la variante se pone en contacto con dicha célula.

En una realización preferida, un polipéptido se considera una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína si puede transducir una célula diana de manera al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% tan eficaz como SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína (preferiblemente como OmoCS, SEQ ID NO: 4). Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, también pueden translocarse al núcleo de la célula tumoral diana.

En una realización preferida, un polipéptido se considera una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína si puede translocarse al núcleo de las células tumorales diana de manera al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% tan eficaz como la SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína (preferiblemente como OmoCS, SEQ ID NO: 4).

Los ensayos adecuados para determinar si un polipéptido es una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína en lo que se refiere a su capacidad para translocarse a través de la membrana celular y al núcleo incluyen

el marcaje doble de una célula con un reactivo específico para el polipéptido y con un colorante que marca específicamente el núcleo de la célula (tal como el colorante DAPI o Hoechst). En una realización preferida, la detección del polipéptido de la invención se realiza mediante microscopía confocal o mediante microscopía de fluorescencia.

El polipéptido de la invención de SEQ ID NO: 1 también contiene el dominio M2 de c-Myc, que tiene la secuencia RQRRNELKRSF (SEQ ID NO: 55) (véase Dang y Lee, Mol. Cell. Biol., 1988, 8:4048-4054), y que corresponde a una señal de localización nuclear.

En otra realización preferida, la variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína comprende la secuencia SEQ ID NO: 55.

El término “señal de localización nuclear”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 4-20 residuos de aminoácido de longitud, que sirve para dirigir una proteína al núcleo. Normalmente, la secuencia de localización nuclear es rica en aminoácidos básicos y secuencias a modo de ejemplo bien conocidas en la técnica (Gorlich D. (1998) EMBO 5,17:2721-7). En algunas realizaciones, la NLS se selecciona del grupo que consiste en la NLS del antígeno T grande de SV40 (PKKKRKV, SEQ ID NO: 6); la NLS de nucleoplasmina (KRPAATKKAGQAKKKK, SEQ ID NO: 7); la NLS de CBP80 (RRRHSDENDGGQPHKRRK, SEQ ID NO: 8); la NLS de la proteína REV del VIH-I (RQARRNRRRWE, SEQ ID NO: 9); la proteína Rex del VLTH-I (MPKTRRRPRRSQRKPPT, SEQ ID NO: 10); la NLS de RNPnh A (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFKPRNQGGY, SEQ ID NO: 11); la NLS de rpL23a (VSHSKKKKIRTSPFTTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLDHY, SEQ ID NO: 12). En una realización de la invención, la señal de localización nuclear comprende el motivo K (K/ R) X (K/ R) (SEQ ID NO: 13).

Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína también pueden alcanzar los núcleos de las células transducidas una vez que la variante se pone en contacto con dicha célula. Se entenderá que las variantes funcionalmente equivalentes de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína contienen la NLS encontrada en SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína u otra NLS funcional. En otra realización, el polipéptido de la invención no contiene la NLS nativa encontrada en SEQ ID NO: 1 y contiene otra NLS funcional que reemplaza a dicha NLS encontrada en SEQ ID NO: 1 o en cualquier otra parte del polipéptido de la invención.

Conjugado de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- a) el polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención y
- b) un resto químico que facilita la captación celular del polipéptido según la invención o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención.

El término “conjugado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más compuestos que se unen covalentemente entre sí de modo que se conserve la función de cada compuesto en el conjugado.

En realizaciones preferidas, los conjugados según la invención comprenden al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más restos químicos que facilitan la captación celular del polipéptido o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.

En una realización, el resto químico que facilita la captación celular del polipéptido es un lípido o un ácido graso.

Un ácido graso generalmente es una molécula que comprende una cadena carbonada con un resto ácido (por ejemplo, ácido carboxílico) en un extremo de la cadena. La cadena carbonada de un ácido graso puede ser de cualquier longitud, sin embargo, se prefiere que la longitud de la cadena carbonada sea de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más átomos de carbono, y cualquier intervalo derivable de la misma. En determinadas realizaciones, la longitud de la cadena carbonada es de desde 4 hasta 18 átomos de carbono en la parte de cadena del ácido graso. En determinadas realizaciones, la cadena carbonada del ácido graso comprende un número impar de átomos de carbono, sin embargo, puede preferirse un número par de átomos de carbono en la cadena en determinadas realizaciones. Un ácido graso que comprende solo enlaces sencillos en su cadena carbonada se denomina saturado, mientras que un ácido graso que comprende al menos un doble enlace en su cadena se denomina insaturado. El ácido graso puede estar ramificado, aunque en realizaciones preferibles de la presente invención, no está ramificado. Los ácidos grasos específicos incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linolénico, ácido esteárico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido araquídico, ácido palmitoleico, ácido araquidónico.

En una realización preferida, el resto químico que facilita la captación celular del polipéptido es una secuencia peptídica de penetración celular, en cuyo caso, el conjugado es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la invención o la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido y la secuencia peptídica de penetración celular.

El término "proteína de fusión" se refiere a proteínas generadas mediante tecnología génica que consiste en dos o más dominios funcionales derivados de diferentes proteínas. Una proteína de fusión puede obtenerse mediante medios convencionales, por ejemplo, por medio de expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión en una célula adecuada. Se entenderá que el péptido de penetración celular se refiere a un péptido de penetración celular que es diferente del péptido de penetración celular que forma parte del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.

El término "secuencia peptídica de penetración celular" se usa en la presente memoria descriptiva de manera intercambiable con "CPP", "dominio de transducción de proteínas" o "PTD". Se refiere a una cadena peptídica de longitud variable que dirige el transporte de una proteína dentro de una célula. El proceso de administración al interior de la célula se produce comúnmente mediante endocitosis, pero el péptido también puede internalizarse al interior de la célula por medio de translocación de membrana directa. Los CPP normalmente tienen una composición de aminoácidos que o bien contiene una abundancia relativa alta de aminoácidos cargados positivamente tales como lisina o arginina o tiene secuencias que contienen un patrón alternante de aminoácidos polares/cargados y aminoácidos no polares, hidrófobos. Los ejemplos de CPP que pueden usarse en la presente invención incluyen, sin limitación, el CPP encontrado en la proteína de *Drosophila antennapedia*

(RQIKWIFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 14), el CPP encontrado en la proteína de unión a ADN VP22 del virus del herpes simple 1 (VHS-1) (DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRRPVE; SEQ ID NO: 15), el CPP de Bac-7 (RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG; SEQ ID NO: 16), los CPP de la proteína TAT de VIH-1 que consiste en los aminoácidos 49-57 (RKKRRQRRR; SEQ ID NO: 17), los aminoácidos 48-60 (GRKKRRQRRRTPQ; SEQ ID NO: 18), los aminoácidos 47-57 (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 19), el CPP del péptido S413-PV (ALWKTLLKKVLKAPKKKRKV; SEQ ID NO: 20), el CPP de penetratina (RQIKWIFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 21), el CPP de SynB1 (RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SEQ ID NO: 22), el CPP de SynB3 (RRLSYSRRRF; SEQ ID NO: 23), el CPP de PTD-4 (PIRRRKLRRLK; SEQ ID NO: 24), el CPP de PTD-5 (RRQRRTSKLMKR; SEQ ID NO: 25), el CPP de la cubierta-(35-49) del FHV (RRRRNRTRNRNRVR; SEQ ID NO: 26), el CPP de Gag-(7-25) de VMB (KMTRAQRRAAARNRWTA; SEQ ID NO: 27), el CPP de Rex-(4-16) del VLTH-II (TRRQRTRRARRNR; SEQ ID NO: 28), el CPP de D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29), el CPP de R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SEQ ID NO: 30), el CPP de MAP (KLALKLALKLALKLA; SEQ ID NO: 31), el CPP de SBP (MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 32), el CPP de FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 33), el CPP de MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya; SEQ ID NO: 34), el CPP de MPG(ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-cya; SEQ ID NO: 35), el CPP de Pep-1 (ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya; SEQ ID NO: 36), el CPP de Pep-2 (ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-cya; SEQ ID NO: 37), una secuencia de poliarginina que tiene la estructura R_N (en la que N es de entre 4 y 17), la secuencia GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38), la secuencia RRRRRRLR (SEQ ID NO: 39), la secuencia RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 40); Transportan GWTLSAGILLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 41); KALAWKALAKALAKALAKHLAKALAKALCEA (SEQ ID NO: 42); RQIKWIFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 43), la secuencia YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 44); la secuencia RKKRRQRR (SEQ ID NO: 45); la secuencia YARAAARQARA (SEQ ID NO: 46); la secuencia THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 47); la secuencia GGRRARRRRR (SEQ ID NO: 48).

En una realización preferida, dicho péptido de penetración celular no es el endógeno contenido en SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida, el CPP es el CPP de la proteína TAT de VIH-1 que consiste en los aminoácidos 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 49). En otra realización preferida, el CPP es la secuencia GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 50) o RRRRRRRR (SEQ ID NO: 51).

En una realización, la secuencia peptídica de penetración celular se fusiona al extremo N-terminal del polipéptido de la invención o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido. En otra realización, el péptido de penetración celular se fusiona al extremo C-terminal del polipéptido de la invención o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.

En realizaciones preferidas, los conjugados o proteína de fusión según la invención comprenden, además del propio péptido de penetración celular encontrado en el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más péptidos de penetración celular adicionales.

Las proteínas de fusión adecuadas de la invención incluyen los polipéptidos OmoCS*TAT y OmoCS*LZArg tal como se define a continuación:

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
OmoCS*TAT	52	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVV LKKATAYILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNS SAGF KRRQRRR
OmoCS*LZArg	53	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVV LKKATAYILSVQAETQKLI SEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNS SARF RRRRR

En otra realización preferida, los conjugados o proteínas de fusión de la invención comprenden el polipéptido de la invención o una variante funcionalmente equivalente del mismo y comprenden además una señal de localización nuclear N-terminal o C-terminal.

El experto en la técnica entenderá que puede ser deseable que la proteína de fusión comprenda además uno o más péptidos flexibles que conectan el polipéptido de la invención o la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido, la secuencia peptídica de penetración celular y/o la NLS. Por tanto, en una realización particular, el polipéptido de la invención se conecta directamente a la secuencia peptídica de penetración celular. En otra realización particular, el polipéptido de la invención se conecta a la secuencia peptídica de penetración celular a través de un péptido flexible. En una realización, el polipéptido de la invención se conecta directamente a la NLS. En otra realización, el polipéptido de la invención se conecta a la NLS a través de un péptido flexible.

En una realización particular, el polipéptido de la invención se conecta directamente a la secuencia peptídica de penetración celular y a la NLS.

En una realización, la NLS es una de la NLS que aparece de manera endógena en la secuencia de Myc, tal como el péptido M1 (PAAKRVKLD, SEQ ID NO: 54) o el péptido M2 (RQRRNELKRSF, SEQ ID NO: 55).

En otra realización, la NLS adicional se refiere a una NLS que es diferente de la NLS endógena encontrada en el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o en la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.

En realizaciones preferidas, los conjugados o proteínas de fusión según la invención comprenden, además de la NLS endógena encontrada en el polipéptido de la invención o en la variante funcionalmente equivalente del mismo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 NLS.

En otra realización particular, el polipéptido de la invención se conecta a la secuencia peptídica de penetración celular a través de un primer ligador de péptido flexible y a la NLS a través de un segundo ligador de péptido flexible.

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido flexible", "péptido espaciador" o "péptido ligador" se refiere a un péptido que se une covalentemente a dos proteínas o restos pero que no forma parte de ningún polipéptido, que permite el movimiento de uno con respecto al otro, sin producir un efecto perjudicial sustancial sobre la función ni de la proteína ni del resto. Por tanto, el ligador flexible no afecta a la actividad supresora de tumores de la secuencia polipeptídica, a la actividad de penetración celular del péptido de penetración celular ni a la capacidad de localización nuclear de la NLS.

El péptido flexible comprende al menos un aminoácido, al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cuatro aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos seis aminoácidos, al menos siete aminoácidos, al menos ocho aminoácidos, al menos nueve aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos, al menos 18 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 35 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 45 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido flexible permitirá el movimiento de una proteína con respecto a la otra con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína y/o mejorar su actividad. Las regiones de ligador adecuadas incluyen una región de poli-glicina, la secuencia GPRRRR (SEQ ID NO: 56) de combinaciones de residuos de glicina, prolina y alanina.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de la invención puede comprender un resto químico adicional que incluye, entre otros, grupos fluorescentes, biotina, polietilenglicol (PEG), análogos de aminoácidos, aminoácidos no naturales, grupos fosfatos, grupos glicosilo, marcadores radioisótopos y moléculas farmacéuticas. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo puede comprender uno o más grupos químicamente reactivos incluyendo, entre otros, cetona, aldehído, residuos de Cys y residuos de Lys.

En una realización particular, los conjugados o proteínas de fusión de la invención comprenden una etiqueta unida al conjugado o al dominio C-terminal o N-terminal de dicha proteína de fusión o variante de dicho polipéptido. Dicha etiqueta es generalmente un péptido o secuencia de aminoácidos que puede usarse en el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión. Por tanto, dicha etiqueta puede unirse a uno o más ligandos, por ejemplo, uno o más ligandos de una matriz de afinidad tal como una perla o soporte de cromatografía con alta afinidad. Un ejemplo de dicha etiqueta es una etiqueta de histidina (etiqueta de His o HT), tal como una etiqueta que comprende 6 residuos de histidina (His6 o H6), que puede unirse a una columna de níquel (Ni²⁺) o cobalto (Co²⁺) con alta afinidad. La etiqueta de His tiene la característica deseable de que puede unirse a sus ligandos en condiciones que son desnaturizantes para la mayoría de las proteínas y desestabilizadoras para la mayoría de las interacciones proteína-proteína. Por tanto, puede usarse para retirar la proteína cebo etiquetada con H6 tras la desestabilización de las interacciones proteína-proteína con las que ha participado el cebo.

Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, adicionales de etiquetas útiles para el aislamiento o la purificación de una proteína de fusión incluyen etiqueta Arg, etiqueta FLAG (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 57), etiqueta Strep (WSHPQFEK; SEQ ID NO: 58), un epítipo que puede reconocerse por un anticuerpo, tal como la etiqueta c-myc (reconocida por un anticuerpo anti-c-myc), etiqueta HA (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 59), etiqueta V5 (GKIPNPLLGLDST; SEQ ID NO: 60), etiqueta SBP, etiqueta S, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, etiqueta glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, etiqueta Avi, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 60:523-525), una secuencia de aminoácidos tal como AHGHRP (SEQ ID NO: 61) o PIHDHDHPLVHSGMTCXXC (SEQ ID NO: 62), β -galactosidasa.

La etiqueta puede usarse, si se desea, para el aislamiento o la purificación de dicha proteína de fusión.

Polinucleótido, vector y célula huésped de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la invención o a un conjugado según la invención.

Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan de manera intercambiable para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/u otros análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas monocatenarias, bicatenarias y de triple hélice, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Además de una molécula nativa de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico de la presente invención también puede comprender moléculas de ácido nucleicos modificadas. Tal como se usa en el presente documento, ARNm se refiere a un ARN que puede traducirse en una célula.

En una realización preferida, el polinucleótido de la invención es un ARNm. El ARNm puede sintetizarse químicamente, puede obtenerse por medio de transcripción *in vitro* o puede sintetizarse *in vivo* en la célula diana. Las secuencias de nucleótidos que forman el polinucleótido que codifica para el conjugado o proteína de fusión de la invención están en el marco de lectura correcto para la expresión del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido de la invención. El término "vector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias necesarias de modo que tras transcribir y traducir dichas secuencias en una célula se genera un polipéptido codificado por el polinucleótido de la invención. Dicha secuencia se une operativamente a segmentos adicionales que proporcionan su replicación autónoma en una célula huésped de interés. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión, que se define como un vector que, además de las regiones de la replicación autónoma en una célula huésped, contiene regiones unidas operativamente al ácido nucleico de la invención y que pueden potenciar la expresión de los productos del ácido nucleico de la invención. Los vectores de la invención pueden obtenerse por medio de técnicas ampliamente conocidas en la técnica.

Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y determinadas células eucariotas, tales como células productoras. Vectores adecuados que comprenden un polinucleótido de la invención son vectores derivados de vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, pBluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCRI, RP4, fagos y vectores "lanzadera" tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmido de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insecto tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores basados en vectores

virales (adenovirus, virus asociados con adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1. En una realización preferida, el polinucleótido de la invención está comprendido en un vector seleccionado del grupo que consiste en los vectores retrovirales pEGFP o pBabe y los vectores lentivirales pTRIPZ o pSLIK.

El vector de la invención puede usarse para transformar, transfectar o infectar células que pueden transformarse, transfectarse o infectarse por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas.

El vector comprende preferiblemente el polinucleótido de la invención unido operativamente a secuencias que regulan la expresión del polinucleótido de la invención. Las secuencias reguladoras de uso en la presente invención pueden ser promotores nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/u otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En principio, puede usarse cualquier promotor en la presente invención siempre que dicho promotor sea compatible con las células en las que va a expresarse el polinucleótido. Por tanto, los promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, promotores constitutivos tales como derivados de genomas de virus eucariotas tales como poliomavirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de metalotioneína, el promotor del gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple, las regiones LTR de retrovirus, el promotor del gen de inmunoglobulina, el promotor del gen de actina, el promotor del gen de EF-1alfa así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o señal exógena, tal como sistemas de tetraciclina, el sistema NFκB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores de la ARN polimerasa II regulables descritos en el documento WO/2006/135436 y promotores específicos tisulares.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un polipéptido de la invención, un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención o un vector de la invención.

Las células adecuadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero, vegetales, de insecto, fúngicas y bacterianas. Las células bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de bacterias Gram positivas tales como especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas*. Las células fúngicas preferiblemente incluyen células de levadura tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Las células de insecto incluyen, pero no se limitan a, células de *Drosophila* y células Sf9. Las células vegetales incluyen, entre otras, células de plantas de cultivo tales como cereales, plantas medicinales u ornamentales o de bulbos. Las células de mamífero adecuadas para la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células de la glía (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (de ovario de hámster chino), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células de ECC NTERA-2 humanas, células D3 de la línea mESC, células madre embrionarias humanas tales como células HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células MSCh.

Todos los términos y las realizaciones descritos anteriormente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

Composición farmacéutica de la invención

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención, un conjugado según la invención, un polinucleótido según la invención, un vector según la invención o una célula huésped según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 Tal como se usa en la presente invención, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a una formulación que se ha adaptado para administrar una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un animal en el que la división celular está descontrolada, tal como cáncer.
- 15 La expresión “cantidad farmacéutica eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se entiende como una cantidad que puede proporcionar un efecto terapéutico, y que puede determinarse por el experto en la técnica mediante medios usados comúnmente. La cantidad del polipéptido de la invención o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, el conjugado, el polinucleótido, el vector o de la célula huésped de la invención o del compuesto antitumoral que puede combinarse en las composiciones farmacéuticas según la invención variará dependiendo del sujeto y del modo de administración particular. Los expertos en la técnica apreciarán que las dosificaciones también pueden determinarse con la orientación de The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición (1996), apéndice II, págs. 1707-1711 de Goodman y Goldman y The Pharmacological Basis of Therapeutics, décima edición (2001), apéndice II, págs. 475-493 de Goodman y Goldman.
- 20 La dosificación apropiada del principio o los principios activos dentro de la composición farmacéutica dependerá del tipo del cáncer que va a tratarse, de la gravedad y del transcurso de la enfermedad, de si la composición se administra para fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de su respuesta al péptido o polipéptido y del criterio del médico que atiende. La cantidad del polipéptido de la invención o de la variante funcionalmente equivalente del mismo, del conjugado, del polinucleótido, del vector o de la célula huésped de la invención se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, un nivel de dosificación apropiado será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal de paciente al día que puede administrarse en una dosis única o múltiple. Preferiblemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg al día; más preferiblemente de
- 25 aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg al día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser aproximadamente de 0,01 a 250 mg/kg al día, aproximadamente de 0,05 a 100 mg/kg al día, o aproximadamente de 0,1 a 50 mg/kg al día. Dentro de este intervalo, la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg al día. Para la administración oral, las composiciones se facilitan preferiblemente en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de
- 30
- 35
- 40

la dosificación para el paciente que va a tratarse. Los compuestos pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces al día, preferiblemente una vez o dos veces al día.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también contienen uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende como una sustancia terapéuticamente inactiva que se dice que va a usarse para incorporar el principio activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. El excipiente o portador también incluye cualquier sustancia que sirva para mejorar la administración y la eficacia del principio activo dentro de la composición farmacéutica. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la semivida o la eficacia de la proteína de fusión o de las composiciones que forman parte de las composiciones farmacéuticas. Ejemplos de portadores apropiados se conocen bien en la bibliografía (véase por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Ejemplos de portadores sin limitación son una serie de sacáridos tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; una serie de almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; una serie de celulosas tales como celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio e hidroxipropilmetilcelulosa; y una serie de cargas tales como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, puede añadirse un disgregante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o alginato de sodio.

El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de dosificación deseada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen por el experto en la técnica (Faulí y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Dichas composiciones pueden prepararse por medio de los métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica ("Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, EE.UU.).

Para composiciones farmacéuticas que comprenden un agente que es una molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de administración conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo ácido nucleico y sistemas de expresión bacterianos, virales y de mamífero tales como, por ejemplo, constructos de expresión recombinantes tal como se facilita en el presente documento. Las técnicas para incorporar ADN en tales sistemas de expresión se conocen bien por los expertos habituales en la técnica. El ADN también puede estar "desnudo", tal como se describe, por ejemplo, en Ulmer *et al.*, Science 259:1745-49, 1993 y se revisa por Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo puede aumentarse recubriendo el ADN sobre perlas biodegradables, que se transportan eficazmente al interior de las células.

Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse al interior de una célula según uno cualquiera de varios métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, Akhtar *et al.*, Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer *et al.*, Mol. Membr. Biol. 16:129-40 (1999); Hofland y Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-92 (1999); Lee *et al.*, ACS Symp. Ser. 752:184-92 (2000); patente estadounidense n.º 6.395.713; publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 94/02595); Selbo *et al.*, Int. J. Cancer 87:853-59 (2000); Selbo *et al.*, Tumour Biol. 23:103-12 (2002); publicaciones de solicitud de patente estadounidenses n.ºs 2001/0007666 y 2003/077829). Tales métodos de administración conocidos por los expertos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis o mediante la incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables; hidrogeles; ciclodextrinas (véase, por ejemplo, Gonzalez *et al.*, Bioconjug. Chem. 10: 1068-74 (1999); Wang *et al.*, publicaciones de solicitud internacional n.ºs WO 03/47518 y WO 03/46185); ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y microesferas de PLGA (también útiles para la administración de péptidos y polipéptidos y otras sustancias) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.447.796; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/130430); nanocápsulas biodegradables; y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteicos (publicación de solicitud internacional n.º WO 00/53722). En otra realización, las moléculas de ácido nucleico para su uso en alterar (suprimir o potenciar) una respuesta inmunitaria en una célula inmunitaria y para tratar una enfermedad o trastorno inmunológico también pueden formularse o complejarse con polietilenimina y derivados de la misma, tales como derivados de polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL) (véase también, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0077829).

En una realización preferida, la composición farmacéutica o combinación farmacéutica según la invención comprende además conjuntamente o por separado un agente antitumoral.

Tal como se usa en el presente documento, "agente antitumoral" se entiende como dicho compuesto biológico o químico que trata tumores o impide la formación de los mismos. En una realización preferida, dicho agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente antimetastásico y un agente antiproliferativo.

Tal como se usa en la presente invención, el término "agente citotóxico" se refiere a un agente que puede promover la muerte celular y que tiene capacidad para reducir el crecimiento, detener el crecimiento o destruir células y, particularmente, células que proliferan rápidamente y, aún más particularmente, células tumorales. La muerte celular puede producirse mediante cualquier mecanismo, tal como por ejemplo apoptosis, aunque no se limita a esta causa, mediante la inhibición del metabolismo, la interferencia con la organización del citoesqueleto o la modificación química del ADN. El término agente citotóxico comprende cualquier agente quimioterápico incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos y similares; toxinas; enzimas; citocinas; radioisótopos o agentes radioterápicos.

"Agente antiangiogénico" se entiende como una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, la angiogénesis.

Los agentes antiangiogénicos que pueden usarse con el polipéptido según el primer aspecto de la invención o con la proteína de fusión según el segundo aspecto de la invención incluyen, sin limitación, un agente antiangiogénico seleccionado del grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol,

prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, ácido dextrometorfano-acético, ácido dimetilxantenona-acético, endostatina, IM-862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticuerpos anti-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, angiostatina KI-3, angiostatina KI-5, Captopril, DL-alfa-difluorometilornitina, HCl de DL-alfa-difluorometilornitina, endostatina, fumagilina, herbimicina A, 4-hidroxiifenilretinamida, juglona, laminina, hexapéptido de laminina, pentapéptido de laminina, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de ribonucleasa de placenta, suramina, trombospondina, anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibidores de tirosina cinasa de bajo peso molecular de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inhibidores de mTOR (por ejemplo Torisel); interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de la metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU1248, vitaxina; inhibidores de PDGFR (por ejemplo Gleevec); NM3 y 2-ME2; ciclopéptidos tales como cilengitida.

"Agente antimetastático" se entiende como una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la metástasis, es decir, la propagación en distancia, fundamentalmente mediante la corriente linfática o sanguínea, de las células que producen cáncer, y el crecimiento de nuevos tumores en los sitios de destino de dicha metástasis.

"Agente antiproliferativo" se entiende como una sustancia química o biológica que puede impedir o inhibir la formación o el crecimiento de tumores. Los agentes antiproliferativos incluyen, pero no se limitan a, (i) antimetabolitos tales como antimetabolitos de ácido fólico (aminopterina, denopterina, metotrexato, edatrexato, trimetrexato, nolatrexed, lometrexol, pemetrexed, raltitrexed, piritrexim, pteropterina, leucovorina, 10-propargil-5,8-dideazafolato (PDDF, CB3717)), análogos de purina (cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina) y análogos de pirimidina (capecitabina, citarabina o ara-C, decitabina, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, doxifluridina, floxuridina y gemcitabina) (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos tales como alcaloides de la vinca tales como vindesina, vincristina, vinblastina, vinorelbina; taxanos tales como paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™); colchicina (NSC 757), tiocolchicina (NSC 361792), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410) y alocolchicina (NSC 406042); halicondrina B (NSC 609395); dolastatina 10 (NSC 376128); maitansina (NSC 153858); rizoxina (NSC 332598); epotilona A, epotilona B; discodermolida; estramustina; nocodazol; (iii) hormonas y antagonistas de las mismas tales como tamoxifeno, toremifeno, anastrozol, arzoxifeno, lasofoxifeno, raloxifeno, nafoxidina, fulvestrant, aminoglutetimida, testolactona, atamestano, exemestano, fadrozol, formestano, letrozol, goserelina, leuprorelina o leuprolida, buserelina, histrelina, megestrol y fluoximesterona; (iv) agentes biológicos, tales como vectores virales, interferón alfa e interleucinas; (v) compuestos basados en platino tales como carboplatino, cisplatino [cis-diaminodicloroplatino, (CDDP)], oxaliplatino, iproplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, tetraplatino, satraplatino (JM216), JM118 [cis-amino-dicloro (II)], JM149 [cis-amino-dicloro-(ciclohexilamina)-trans-dihidroxiplatino (IV)], JM335 [trans-amino-dicloro-dihidroxiplatino (IV)], transplatino, ZD0473, cis, trans, cis-Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OOCCH₃H₇)₂Cl, malanato-I,2-diaminociclohexanoplatino(II), 5-sulfosalicilato-trans-(1,2-diaminociclohexano)platino (II) (SSP), poli-[(trans-1,2-diaminociclohexano)platino]-carboxiamilosa (POLI-PLAT) y acetato de 4-hidroxi-sulfonilfenilo (trans-1,2-diaminociclohexano)platino

(II) (SAP) y similares y (vi) fármacos alquilantes de ADN tales como mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, derivados etilenimina, sulfonatos de alquilo y triazenos, incluyendo, pero sin limitarse a, ciclofosfamida (CytosanTM), busulfano, improsulfano, piposulfano, pipobromano, melfalán (L-sarcolisina), clorambucilo, mecloretamina o mustina, uramustina o mostaza de uracilo, novembicina, fenesterina, trofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), clorozotocina, fotemustina, nimustina, ranimustina, semustina (metil-CCNU), estreptozocina, tiotepa, trietilenmelamina, trietilentionfosforamina, procarbazona, altretamina, dacarbazina, mitozolomida y temozolomida.

En el caso de las composiciones farmacéuticas o combinaciones según la invención que contienen un agente antitumoral, la composición puede presentarse como una formulación individual (por ejemplo, como un comprimido o una cápsula que comprende una cantidad fija de cada uno de los componentes) o, por otra parte, puede presentarse como formulaciones separadas que van a combinarse más tarde para su administración conjunta, secuencial o separada. Las composiciones o combinaciones de la invención también incluyen la formulación como un kit de partes en el que los componentes se formulan por separado pero se envasan en el mismo recipiente. Los expertos en la técnica apreciarán que la formulación de los diferentes componentes en el caso de la segunda composición farmacéutica según la invención puede ser similar, en otras palabras, puede formularse de manera similar (en comprimidos o píldoras), lo que permite su administración por la misma vía. En el caso en que los diferentes componentes de la invención se formulen por separado, los dos componentes pueden presentarse en un blíster. Cada blíster contiene los fármacos que deben consumirse durante el día. Si los fármacos deben administrarse varias veces al día, los fármacos que corresponden a cada administración pueden colocarse en diferentes secciones del blíster, preferiblemente registrando en cada sección del blíster la hora del día en que deben administrarse. Alternativamente, los componentes de la composición de la invención pueden formularse de manera diferente de modo que los diferentes componentes se administren de manera diferente. Por tanto, es posible que el primer componente se formule como un comprimido o cápsula para su administración oral y que el segundo componente se formule para administración intravenosa o viceversa. La razón entre los componentes que forman parte de las composiciones usadas en la segunda composición farmacéutica según la invención puede ajustarse por el experto dependiendo del agente antitumoral usado en cada caso particular, así como de la indicación deseada. Por tanto, la invención prevé composiciones en las que la razón entre las cantidades de los dos componentes puede oscilar entre 50:1 y 1:50, en particular entre 20:1 y 1:20, entre 1:10 y 10:1 o entre 5:1 y 1:5.

Las composiciones o combinaciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, vía tópica, por inhalación o vía parenteral de modo que se incluyan los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de dosificación deseada. La vía de administración preferida de dichas composiciones farmacéuticas es la vía endovenosa.

"Vía oral" se entiende como la composición farmacéutica incorporada en el organismo tras la deglución. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención puede estar en una forma de dosificación adecuada para su administración por vía oral, ya sea sólida o líquida. Las formas de dosificación adecuadas para su administración por vía oral pueden ser comprimidos, cápsulas, jarabes o disoluciones, y pueden contener cualquier excipiente convencional conocido en la

técnica, tal como aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol o polivinilpirrolidona; agentes de carga, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para compresión, por ejemplo, estearato de magnesio; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato de sodio. Las composiciones orales sólidas pueden prepararse por medio de procedimientos convencionales de mezclado, llenado o compresión. Pueden usarse operaciones de mezclado repetitivas para distribuir completamente el principio activo en aquellas composiciones que usan altas cantidades de agentes de carga. Dichas operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos pueden prepararse, por ejemplo, por medio de granulación en húmedo o en seco y, opcionalmente, pueden recubrirse según los procedimientos conocidos en la práctica farmacéutica común, particularmente con un recubrimiento entérico.

Por otra parte, "vía tópica" se entiende como una administración por vía no sistémica, e incluye la aplicación de una composición farmacéutica de la invención externamente sobre la epidermis, en la cavidad oral y la instilación de dicha composición en oídos, ojos y nariz, y en la que no entra significativamente en el torrente sanguíneo. "Vía sistémica" se entiende como la administración por vía oral, vía intravenosa, vía intraperitoneal y vía intramuscular. "Inhalación" se entiende como la administración por vía intranasal y por inhalación oral. Las formas de dosificación adecuadas para dicha administración, tal como una formulación en aerosol o un inhalador dosificado, pueden prepararse por medio de técnicas convencionales. En una realización, la vía de administración es la vía intranasal.

Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral", incluye administración por vía intravenosa, vía intraperitoneal, vía intramuscular o vía subcutánea. Generalmente se prefieren formas de dosificación subcutáneas, intramusculares e intravenosas de administración parenteral.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden adaptarse para su administración parenteral, tal como disoluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles en forma de unidad de dosificación apropiada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua), o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para su administración por vía intravenosa, algunos portadores adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril, y debe ser fluida hasta el punto en que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento, y debe protegerse de la acción de la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomersal, y similares. En la mayoría de los casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares; polialcoholes tales como manitol, sorbitol; o cloruro de sodio en la

composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante la inclusión de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las disoluciones estériles inyectables pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con una o una combinación de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización mediante filtración a través de membranas estériles. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de los componentes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones estériles inyectables, los procedimientos de preparación preferidos son liofilización y secado a vacío que dan lugar a un polvo con el principio activo más cualquier componente adicional deseado a partir de una disolución estéril filtrada previamente de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse de manera adecuada por medio de infusión por pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes de la composición. Preferiblemente, la dosis se administra por medio de inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo parcialmente de si la administración es aguda o crónica.

En una realización, las composiciones farmacéuticas primera o segunda de la invención se preparan con portadores que protegerán dicho polipéptido de una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para preparar dichas formulaciones pueden estar claras para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

Las composiciones de liberación sostenida también incluyen preparaciones de cristales de anticuerpo suspendidos en formulaciones adecuadas que pueden mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones, cuando se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal, pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan por medio de métodos conocidos tales como Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

Pese al hecho de que el polipéptido de la invención y los conjugados y proteínas de fusión que contienen el polipéptido de la invención pueden translocarse a través de las membranas biológicas, el experto en la técnica entenderá que también puede ser conveniente formular los conjugados o proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos de la invención en nanopartículas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier material que tenga dimensiones en el intervalo de 1-1.000 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen dimensiones en el intervalo de 2-200 nm, preferiblemente en el intervalo de 2-150 nm, e incluso más preferiblemente en el intervalo de 2-100 nm.

Las nanopartículas pueden contribuir a conservar la integridad del polipéptido en los fluidos biológicos hasta que alcanzan el órgano diana. Además, en el caso de composiciones que comprenden un agente antitumoral, la encapsulación de la composición puede disminuir los efectos secundarios

producidos por el agente antitumoral. Finalmente, las nanopartículas can también pueden modificarse para incluir restos que permiten el direccionamiento de la nanopartícula a un órgano de interés.

Por tanto, en otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden los conjugados, proteínas de fusión y composiciones según la invención que forman parte de una nanopartícula.

Las nanopartículas adecuadas que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen materiales a nanoescala tales como una nanopartícula a base de lípidos, una nanopartícula superparamagnética, una nanocubierta, un nanocristal semiconductor, un punto cuántico, una nanopartícula a base de polímero, una nanopartícula a base de silicio, una nanopartícula a base de sílice, una nanopartícula a base de metal, un fullereno y un nanotubo.

La administración dirigida puede lograrse mediante la adición de ligandos sin poner en peligro la capacidad de las nanopartículas para administrar sus cargas de polipéptidos. Se contempla que esto permitirá la administración a células, tejidos y órganos específicos. La especificidad de direccionamiento de los sistemas de administración basados en ligando se basa en la distribución de los receptores de ligandos en diferentes tipos celulares. El ligando de direccionamiento puede asociarse o bien no covalentemente o bien covalentemente con una nanopartícula, y puede conjugarse con las nanopartículas mediante una variedad de métodos tal como se comenta en el presente documento.

Los ejemplos de proteínas o péptidos que pueden usarse para dirigir nanopartículas incluyen transferrina, lactoferrina, TGF- β , factor de crecimiento nervioso, albúmina, péptido Tat del VIH, péptido RGD e insulina, así como otros.

Se entenderá que no se pretende la formulación del producto de la invención en una nanopartícula o que solo se pretende para facilitar el acceso del producto al interior de la célula, pero para proteger el producto de la degradación y/o para facilitar el direccionamiento de la nanopartícula al órgano de interés.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración a cualquier tipo de animal, preferiblemente a un ser humano.

Todos los términos y realizaciones descritos anteriormente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

Usos médicos

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención, a un conjugado según la invención, a un polinucleótido según la invención, a un vector según la invención, a una célula huésped según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la invención, a un conjugado según la invención, a un polinucleótido según la invención, a un vector según la invención, a una célula huésped según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

"Prevención" se entiende como la administración de un compuesto en una fase inicial o temprana de la enfermedad, o también para prevenir su comienzo.

El término "tratamiento" se usa para designar la administración de un compuesto para controlar la progresión de la enfermedad antes o después de que aparezcan los signos clínicos. El control de la progresión de la enfermedad se entiende como los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de las condiciones patológicas (evitando específicamente el empeoramiento adicional), retraso de la progresión de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como completa). El control de la progresión de la enfermedad también implica una prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se aplicó el tratamiento.

Un "sujeto," tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que tiene un cáncer o que presenta un síntoma de cáncer, o que está en riesgo de padecer un cáncer o de presentar un síntoma de cáncer. Los sujetos (pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o un perro). Se incluyen primates no humanos y, preferiblemente, pacientes humanos.

El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por división celular descontrolada (o por un aumento de la supervivencia o resistencia a apoptosis), por la capacidad de dichas células para invadir otros tejidos circundantes (invasión) o por la extensión a otras zonas del cuerpo donde las células no se ubican normalmente (metástasis), a través de los vasos linfáticos y sanguíneos. Dependiendo de si los tumores pueden extenderse o no mediante invasión y metástasis, se clasifican o bien como benignos o bien como malignos: los tumores benignos son tumores que no pueden extenderse por invasión o metástasis, es decir, solo crecen localmente; mientras que los tumores malignos son tumores que pueden extenderse por invasión y metástasis. Los métodos según la presente invención son útiles para el tratamiento local y tumores malignos. Tal como se usa en el presente documento, el término cáncer incluye, pero no se limita a, los siguiente tipos de cáncer: cáncer de mama; cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro incluyendo glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasia hematológica incluyendo leucemia mielógena y linfocítica aguda; linfoma/leucemia linfoblástica aguda de células T; tricoleucemia; leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple; leucemias asociadas con SIDA y linfoma/leucemia de células T adultas; neoplasias intraepiteliales incluyendo enfermedad de Bowen y enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas incluyendo enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer bucal incluyendo carcinoma de células escamosas; cáncer de ovarios incluyendo los que surgen a partir de células epiteliales, células estromales, células reproductoras y células mesenquimatosas; cáncer pancreático; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas incluyendo leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel incluyendo melanoma, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basales y cáncer de células escamosas; cáncer testicular incluyendo tumores de órganos reproductores tales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores estromales y tumores de células reproductoras; cáncer tiroideo incluyendo adenocarcinoma tiroideo y carcinoma medular; y cáncer renal incluyendo adenocarcinoma y tumor de Wilms. Otros cánceres serán conocidos para un experto habitual en la técnica. En una realización preferida, el cáncer tratado es

cáncer de pulmón, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, más preferiblemente un adenocarcinoma de pulmón activado por KRas.

En una realización preferida, el cáncer es un tumor sólido.

En la presente invención se incluyen todas las combinaciones de compuestos de la invención y tipos de cáncer.

En una realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

"Glioblastoma", también conocido como glioblastoma y astrocitoma de grado IV, es el cáncer más común y más agresivo que comienza dentro del cerebro.

El término "CPCNP" o "cáncer de pulmón de células no pequeñas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de enfermedades heterogéneas agrupadas entre sí porque su pronóstico y tratamiento es aproximadamente idéntico según la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud/Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (Travis WD *et al.* Histological typing of lung and pleural tumours. 3ª ed. Berlín: Springer-Verlag, 1999):

1. El carcinoma de células escamosas (CCE), que representa del 30% al 40% de los CPCNP, comienza en los tubos respiratorios más grandes, pero crece más lentamente lo que significa que el tamaño de estos tumores varía según el diagnóstico.
2. El adenocarcinoma es el subtipo más común de CPCNP, que representa del 50% al 60% de los CPCNP, que comienza cerca de la superficie de intercambio de gases del pulmón y que incluye un subtipo, el carcinoma bronquioalveolar, que puede tener diferentes respuestas al tratamiento.
3. El carcinoma de células grandes es una forma de crecimiento rápido que crece cerca de la superficie del pulmón. Principalmente es un diagnóstico de exclusión, y cuando se realiza más investigación, habitualmente se reclasifica a carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma.
4. El carcinoma adenoescamoso es un tipo de cáncer que contiene dos tipos de células: células escamosas (células delgadas, planas que revisten determinados órganos) y células de tipo glándula.
5. Los carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos. Este es un grupo de tumores poco comunes que reflejan una continuidad en la heterogeneidad histológica, así como diferenciación epitelial y mesenquimatosa.
6. El tumor carcinoide es un tumor de pulmón neuroendocrino de crecimiento lento y comienza en células que pueden liberar una hormona en respuesta a un estímulo proporcionado por el sistema nervioso.
7. Los carcinomas del tipo de glándula salival comienzan en las células de las glándulas salivales ubicadas dentro de las vías respiratorias grandes del pulmón.
8. Los carcinomas no clasificados incluyen cánceres que no se ajustan a ninguna de las categorías de cáncer de pulmón mencionadas anteriormente.

Todos los términos y realizaciones descritos anteriormente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

La invención se detalla a continuación por medio de los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y de ningún modo limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS**Materiales y métodos***Transfección de células con ARNm de Omomyc y OmoCS*

Se adquirió ARNm para el mutante OmoCS y Omomyc de Trilink Biotechnologies a concentraciones de 0,782 mg/ml y 0,876 mg/ml, respectivamente (con extremo ocupado con ARCA y sustituido completamente con 5-metil-C y modificado con pseudo-U).

Se introdujo la secuencia de ADN o bien de Omomyc o bien de OmoCS en un vector posterior al promotor de la ARN polimerasa de T7 y una cola de poli(T) ubicada en el extremo 3p. Se produjo ARN modificado con 5-metilcitidina-5'-trifosfato y pseudouridina-5'-trifosfato a través de transcripción *in vitro* usando una ARN polimerasa de T7. También se ocupó el extremo de ARN usando el análogo estructural de ocupación de extremos de ARN [3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G]. Se degradó el vector de ADN de molde usando ADNasa y se retiró el trifosfato residual mediante un tratamiento con fosfatasa. Entonces se purificó el producto de ARN y se evaluó la integridad y la cantidad mediante electroforesis en gel de agarosa y Nanodrop, respectivamente. Se almacenó el ARN a -80°C.

Se adquirió el reactivo de transfección Lipofectamine MessengerMAX de Thermo Fisher Scientific. Se sembraron las líneas celulares A549 y U87 a 500 y 1000 células por pocillo, respectivamente, en placas de 96 pocillos. Se hicieron crecer las células en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y L-glutamina al 1% (medios completos). Tras 24 horas, se transfectaron las células con complejos de Lipofectamine-ARNm. Se diluyeron por separado 3 µg de ARNm por cada 2 µl de Lipofectamine en medios libres de suero y se incubaron durante 10 minutos. Entonces se mezclaron el ARNm y Lipofectamine y se incubaron durante 5 minutos para permitir que se formaran complejos. Se lavaron los pocillos con medio libre de suero dos veces. Se diluyeron en serie las células comenzando desde 1 µg hasta 0,0625 µg de ARNm por pocillo en 100 µl de medios libres de suero totales. Para cada concentración, se trataron las células control con Lipofectamine solo y se usaron triplicados para cada condición. Tras 4 horas de transfección, se retiraron los medios libres de suero y los complejos de ARNm-Lipofectamine de los pocillos y se sustituyeron con medios completos. Se incubaron las células durante 3 días. Entonces, se evaluó la viabilidad usando CellTiter-Blue de Promega. Se calculó la absorbancia relativa para los pocillos sin tratar para cada condición. Se calculó la significación estadística mediante la prueba de la t.

1. Transfección de células con ARNm de OmoCS y OmoCA

Se adquirió ARNm para los mutantes OmoCS y OmoCA de Trilink Biotechnologies (con extremo ocupado con ARCA y sustituido completamente con 5-metil-C y modificado con pseudo-U). Se determinaron las concentraciones de ARNm para OmoCS y OmoCA a 0,845 mg/ml y 0,832 mg/ml, respectivamente, usando un Nanodrop. Se adquirió el reactivo de transfección Lipofectamine MessengerMAX de Thermo Fisher Scientific. Se sembraron células A549 a 500 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se hicieron crecer las células en medio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementado con el 10% de suero bovino fetal (FBS) y el 1% de L-glutamina (medios completos). Después de 24, se transfectaron las células con complejos de Lipofectamine-ARNm. Se diluyeron por separado 2 µg de ARNm por cada 1,5 µl de Lipofectamine en medios libres de suero y se incubaron durante 10 minutos. Luego se mezclaron las diluciones de ARNm y Lipofectamine y se

incubaron durante 5 minutos para permitir que se formaran los complejos. Se lavaron los pocillos con medio libre de suero dos veces. Se trataron las células con diluciones en serie 1:2 comenzando a partir de 1 μ g de ARNm por pocillo en 50 μ l de medios libres de suero total (200 nM). Para cada concentración, las células o bien no se trataron (no tratadas) o bien se trataron con Lipofectamine solo (Lipo solo) como pocillos de control. Se realizaron triplicados para cada condición. Después de 4 horas de transfección, se retiraron los medios libres de suero y los complejos de ARNm-Lipofectamine de los pocillos y se sustituyeron con medios de RPMI completos. Se incubaron las células durante 3 días. En ese momento, se evaluó la densidad celular usando tinción con cristal violeta. Se calculó la absorbancia en relación con los pocillos no tratados para cada concentración.

Ejemplo 1

Sorprendentemente, el mutante OmoCS muestra inhibición superior del crecimiento celular en comparación con la secuencia de Omomyc original a baja concentración (figura 1). Esta eficacia mejorada en comparación con la secuencia de Omomyc original podría explicarse al menos parcialmente mediante la hipótesis de que la cisteína interfacial oxidada del homodímero Omomyc impediría la heterodimerización de Omomyc con Myc o con Max, limitando la actividad de Omomyc a una mera competencia por la unión a la caja E. En cambio, el mutante OmoCS favorecería otras actividades biológicas de Omomyc promoviendo la formación de poblaciones heterodiméricas.

Ejemplo 2

Sorprendentemente, el mutante OmoCA se comporta exactamente que OmoCS en el mismo ensayo de proliferación (figura 2).

Reivindicaciones

1. Polipéptido que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que tiene un grado de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1 mayor del 90% y que tiene una treonina en la posición correspondiente a la posición 61 de SEQ ID NO: 1, una isoleucina en la posición correspondiente a la posición 68 de SEQ ID NO: 1, una glutamina en la posición correspondiente a la posición 74 de SEQ ID NO: 1 y una asparagina en la posición correspondiente a la posición 75 de SEQ ID NO: 1, y en la que el residuo X en la posición correspondiente a la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína, en la que dicha variante funcionalmente equivalente conserva la actividad supresora de tumores de la SEQ ID NO: 1, en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que la variante funcionalmente equivalente puede dimerizarse con Myc y/o su pareja obligada p21/p22Max e inhibir la actividad de Myc una vez que se encuentra en el núcleo, pudiendo translocarse a través de la membrana celular y a través de la envuelta nuclear.
3. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un polipéptido que consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 1, en la que el residuo X en la posición 89 de SEQ ID NO: 1 no es una cisteína o consiste en una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según la reivindicación 1; y
 - b. un polipéptido que consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 3, en la que el residuo en la posición 90 de SEQ ID NO: 3 no es una cisteína.
4. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el residuo X es serina o alanina.
5. Polipéptido según la reivindicación 4, que consiste en SEQ ID NO: 4.
6. Conjugado que comprende:
 - a. el polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y
 - b. un resto químico que facilita la captación celular del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que el resto químico que facilita la captación celular del polipéptido o de la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido es una secuencia peptídica de penetración celular y en el que dicha secuencia peptídica de penetración celular y dicho polipéptido o la variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido forman una proteína de fusión, preferiblemente la secuencia peptídica de penetración celular se selecciona del grupo que consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38) y RRRRRRLR (SEQ ID NO: 39).
8. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende además una señal de localización nuclear adicional, particularmente la señal de localización nuclear se selecciona del grupo que consiste en PKKKRKV (SEQ ID NO: 6), PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 54) y KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 7).

9. Polinucleótido que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 9.
- 5 11. Célula huésped que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, polinucleótido según la reivindicación 9 o vector según la reivindicación 10.
12. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, polinucleótido según la reivindicación 9, vector según la reivindicación 10 o célula huésped según la reivindicación 11, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 13. Polipéptido o variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, polinucleótido según la reivindicación 9, vector según la reivindicación 10, célula huésped según la reivindicación 11 o composición farmacéutica según la reivindicación 12 para su uso en medicina.
- 15 14. Polipéptido o variante funcionalmente equivalente del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, polinucleótido según la reivindicación 9, vector según la reivindicación 10, célula huésped según la reivindicación 11 o composición farmacéutica según la reivindicación 12 para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.
- 20 15. Polipéptido o variante funcionalmente equivalente del mismo, conjugado, polinucleótido, vector, célula huésped o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 14, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 25

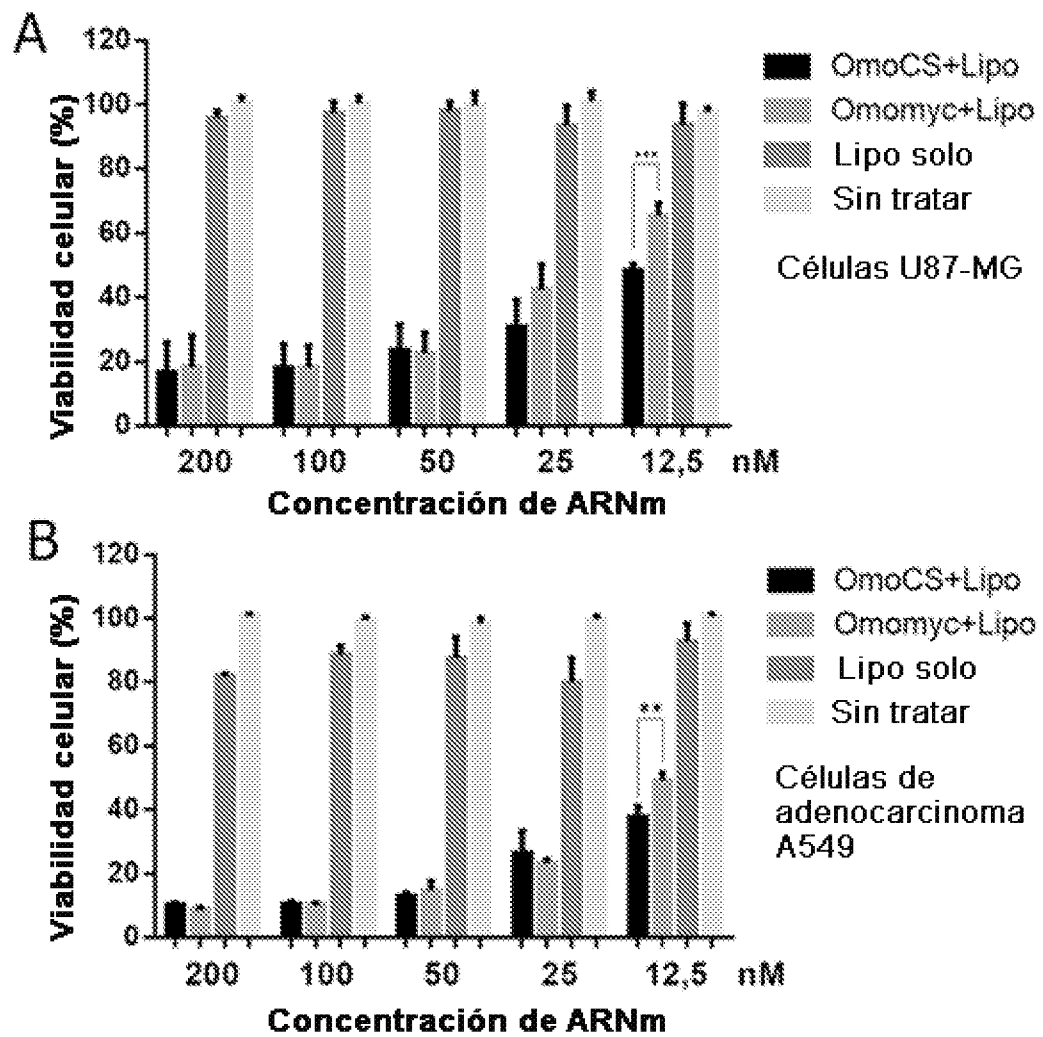


Fig. 1

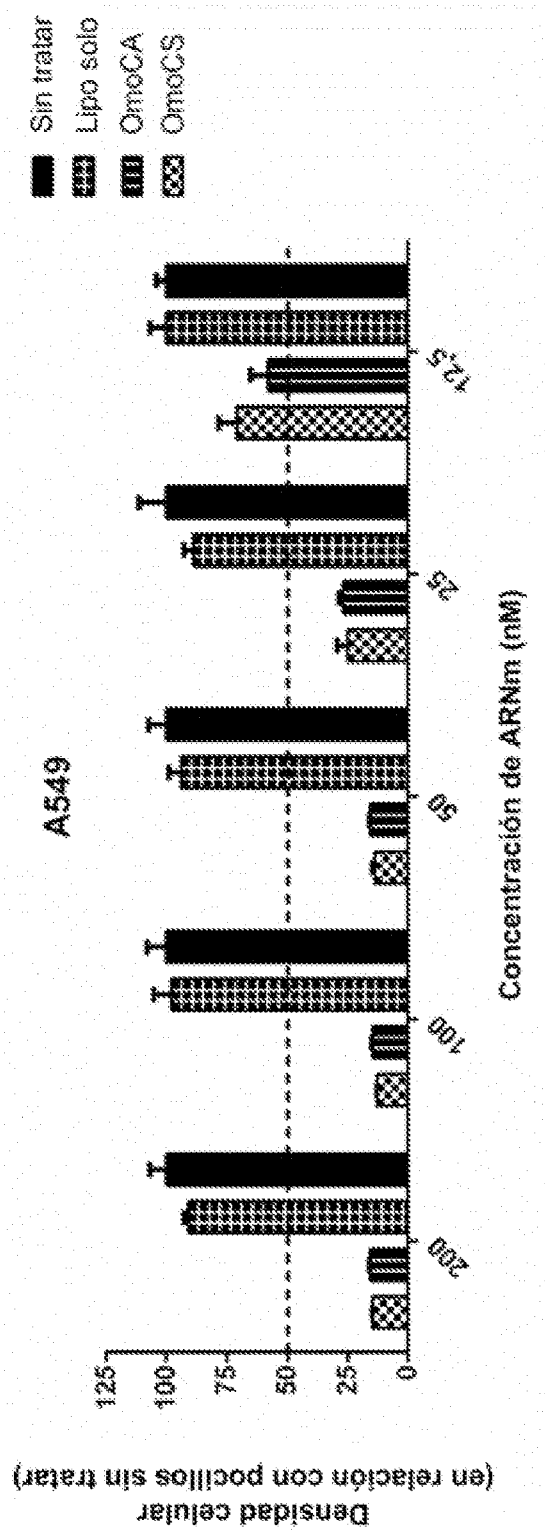


Fig 2