

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
12 de enero de 2023 (12.01.2023)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
**WO 2023/280330 A1**

(51) Clasificación internacional de patentes:

C12N 9/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)

(71) Solicitante: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Avenida 31 No. 15802, entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CU2022/050007

(22) Fecha de presentación internacional:

07 de julio de 2022 (07.07.2022)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

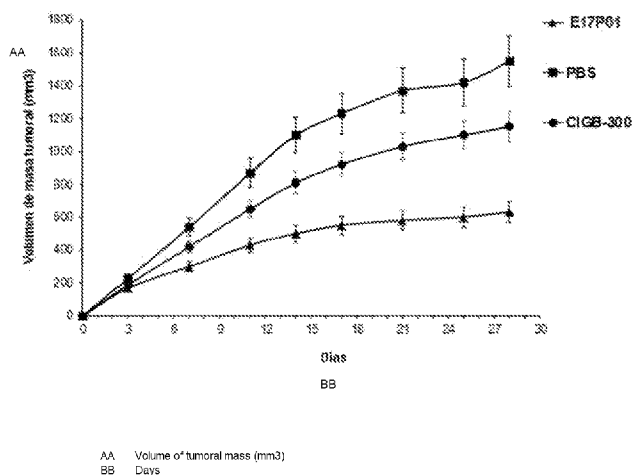
2021-0058 09 de julio de 2021 (09.07.2021) CU

(72) Inventores: MASFORROL GONZÁLEZ, Yordanka; Cepero No. 159, apto 7, entre Santo Tomás y San Salvador, Cerro, La Habana 10600 (CU). GARAY PÉREZ, Hilda, Elisa; Ave. 31 No. 18207, Apto 20, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). REYES ACOSTA, Osvaldo; Ave. 31 No. 18207, Apto 20, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). PERERA NEGRIN, Yasser; Calle 186 e/ 31 y 33 No. 3117, apto 12J, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU). CABALLERO MENÉNDEZ, Evelin; Avenida 31A Edificio C-17 Apto. 5 entre 186 y 188, Playa, La Habana 11600 (CU). GONZÁLEZ LÓPEZ, Luis, Javier; Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33, apto C, piso 8, Playa, La Habana 11600 (CU). BESADA PÉREZ, Vladimir, Armando; Calle 33 entre 186 y 188, edificio C-15, Apto. 3,

(54) Title: LINEAR PEPTIDES INHIBITING CK2-MEDIATED PHOSPHORYLATION AND COMPOSITIONS COMPRISING SAME

(54) Título: PÉPTIDOS LINEALES QUE INHIBEN LA FOSFORILACIÓN MEDIADA POR CK2 Y COMPOSICIONES QUE LOS COMPRENDEN

Figura 10



(57) Abstract: Linear peptides that inhibit phosphorylation mediated by the enzyme casein kinase 2 (CK2), which have an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequences identified as SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, and SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62, as well as polypeptides comprising said peptides and an intracellular penetrating peptide. A pharmaceutical composition comprising at least one of these linear peptides or polypeptides and a pharmaceutically acceptable excipient. The invention also discloses the use of said peptides or polypeptides for the manufacture of a drug, and a method of treating solid or liquid tumors where said drug is administered.

(57) Resumen: Péptidos lineales que inhiben la fosforilación mediada por la enzima Caseína Kinasa 2 (CK2), que poseen una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62, así como los polipéptidos que comprenden dichos péptidos y un péptido de penetración intracelular. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de esos péptidos o polipéptidos lineales y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también revela el uso de dichos péptidos o polipéptidos para la fabricación de

[Continúa en la página siguiente]

Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU). **PEREA RODRIGUEZ, Silvio, Ernesto**; Ave 31 #18207 Apto 32, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **GUILLÉN NIETO, Gerardo, Enrique**; Avenida 31 Edif. 18207 Apto. 34, entre 182 y 184, Playa, La Habana 11600 (CU). **GONZÁLEZ BLANCO, Sonia**; Calle 186, edificio 3112 apto 42, entre avenida 31 y avenida 33, Playa, La Habana 11600 (CU).

(74) **Mandatario: GONZÁLEZ BLANCO, Sonia**; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Departamento de Patentes, Avenida 31 No. 15802, entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 11600 (CU).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

un medicamento, y un método de tratamiento de tumores sólidos o líquidos donde se administra dicho medicamento.

## PÉPTIDOS LINEALES QUE INHIBEN LA FOSFORILACIÓN MEDIADA POR CK2 Y COMPOSICIONES QUE LOS COMPRENDEN

### Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con la rama de la farmacología molecular y la medicina humana. En particular, la invención se relaciona con la obtención de péptidos lineales que inhiben el evento de fosforilación mediado por la enzima Caseína Kinasa 2 (CK2), a través de la interacción directa con el sitio fosfoaceptor en el sustrato. Por su actividad biológica, los péptidos y polipéptidos de la invención son útiles para el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos y de otros orígenes.

### Estado de la técnica anterior

La CK2 es una enzima serina/treonina que está involucrada en el incremento de la proliferación celular, y su localización intracelular es fundamentalmente nuclear durante el proceso de transformación maligna (Tawfic S., *et al.*, 2001, *Histol. Histopathol.* 16:573-582). Por ello, dicha enzima constituye un blanco terapéutico atractivo (Duncan J.S., *et al.*, 2008, *Biochim. Biophys. Acta*, 1784: 33-47).

El evento de fosforilación mediado por la enzima CK2 ha sido manipulado en oncología experimental, mediante el uso de compuestos químicos derivados del 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) (Pagano M.A., *et al.*, 2004, *J. Med. Chem.*, 47: 6239–6247), oligonucleótidos antisentido (Slaton J.W., *et al.*, 2004, *Mol. Cancer Res.* 2:712-720) y péptidos bloqueadores de la interacción entre las subunidades catalíticas y regulatorias de la enzima (Laudet B., *et al.*, 2007, *Biochem. J.*, 408: 363-373). El compuesto químico CX-4945 inhibe las dos subunidades catalíticas de la enzima CK2 (Siddiqui-Jain A., *et al.*, 2010, *Cancer Res.* 70: 10288-10298), y es un potente inhibidor de la proliferación celular *in vitro*, con una concentración inhibitoria media máxima (CI<sub>50</sub>) de 5,5 µM. Sin embargo, se requieren altas dosis de dicho compuesto (25 y 75 mg/kg), y un agresivo régimen de administración, para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Solamente este inhibidor de la enzima CK2 ha sido evaluado satisfactoriamente en humanos, donde se registraron parámetros farmacocinéticos y de seguridad favorables en estudios clínicos Fase I (Lim J.K.C., *et al.*, 2010, *Cancer Res.* 70: 2763-2766). La inhibición de dicho evento de fosforilación por interacción directa de una molécula con el sitio fosfoaceptor de la enzima CK2 en el sustrato se describió por primera vez con el péptido denominado CIGB-300 (Solicitud de patente WO03/054002; Perea S.E., *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 7127-7129).

El péptido CIGB-300 es una molécula quimérica, que contiene un péptido cíclico que interacciona con el sitio fosfoceptor de la CK2 en el sustrato y un péptido de “penetración intracelular”, proveniente de la proteína Tat1 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), para garantizar su internalización en la célula. El CIGB-300 ha demostrado propiedades antiproliferativas y proapoptóticas, *in vitro* e *in vivo*, en varias líneas de tumores sólidos como pulmón, cervix, laringe (Perera Y., *et al.*, 2014, Mol Clin Oncol, 2 (6): 935–944) y en tumores líquidos como leucemia linfocítica crónica (Martins L., *et al.*, 2013, Oncotarget, 5(1): 258-263) y leucemia linfoblástica aguda tipo T (Perera Y., *et al.*, 2020, Cancers, 12, 1377). Además, este péptido mostró signos de beneficio clínico, comprobados en estudios clínicos Fase I/II (Perea S., *et al.*, 2011, Mol Cell Biochem., 356 (1-2): 45-50) (Sarduy M., *et al.*, 2015, Br. J. Cancer, 112: 1636–1643).

Sin embargo, el CIGB-300 es un péptido de 25 aminoácidos, que contiene metionina en su secuencia y un puente disulfuro intramolecular. Estas son fuentes de inestabilidad química en la molécula, y pueden ser la causa de inconsistencias en las etapas superiores de desarrollo del producto, ya sea en la formulación líquida o liofilizada y en los estudios de estabilidad (Frokjaer S. *et al.*, 2000, Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Taylor & Francis). Las principales impurezas presentes en este péptido se deben a la oxidación de la metionina y la formación de agregados (dímeros y trímeros), por formación de enlaces disulfuro intermoleculares (Garay H., *et al.*, 2018, J Pept Sci. 24(6): e3081). Por otra parte, los procesos de síntesis de péptidos que contienen cisteínas son más engorrosos (Albericio F., *et al.*, 2000, Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach. Oxford University Press Inc, New York. Capítulo 4, 77-114), y la formación del enlace disulfuro intramolecular introduce un paso extra en los procesos productivos, lo que incrementa los costos de producción. Por tanto, sigue siendo de interés la obtención de inhibidores de la fosforilación mediada por la enzima CK2, del tipo péptido lineal, de menor tamaño y complejidad estructural, cuya síntesis sea más sencilla y económica, para el desarrollo de terapias contra diferentes tipos de tumores.

### 30 Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, al proveer péptidos lineales que inhiben la fosforilación mediada por la enzima CK2 y que poseen una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias

identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62. Dichas secuencias se muestran a continuación:

|    |               |                  |
|----|---------------|------------------|
| a) | SEQ ID NO: 45 | RKRSRYWP         |
| b) | SEQ ID NO: 49 | RKRWRYWP         |
| c) | SEQ ID NO: 50 | RKRSWYWP         |
| d) | SEQ ID NO: 57 | R(D-Lys)RWRYWP   |
| e) | SEQ ID NO: 58 | RK(D-Arg)WRYWP   |
| f) | SEQ ID NO: 59 | RKRWR(NMe-Tyr)WP |
| g) | SEQ ID NO: 60 | R(D-Lys)RSWYWP   |
| h) | SEQ ID NO: 61 | RK(D-Arg)SWYWP   |
| i) | SEQ ID NO: 62 | RKRSW(NMe-Tyr)WP |

Estos péptidos se diferencian del CIGB-300 en que son lineales, de menor tamaño y  
 5 químicamente más estables. No presentan ni metionina ni cisteína en su secuencia, lo que representa una ventaja. Además, desde el punto de vista productivo, su obtención es más factible.

Los péptidos lineales identificados como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62 se seleccionaron por su capacidad de  
 10 interactuar con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en el sustrato E7 del Virus Papiloma Humano (VPH)-16 (LNDSSSEEDEI), y además por su capacidad de inhibir la fosforilación mediada por CK2 de esta oncoproteína. Como se aprecia en los ejemplos de la presente invención, estos péptidos lineales son capaces de inhibir la fosforilación mediada por CK2 en la proteína E7 de manera similar al péptido CIGB-  
 15 300.

Para lograr la acción intracelular sobre los sustratos endógenos de CK2, los péptidos de la invención se pueden conjugar químicamente con péptidos de “penetración intracelular”, pertenecientes a proteínas tales como la proteína Tat1 del VIH (Schwarze S.R., et al., 2000, Trends Pharmacol, 21: 45-48), la proteína VP22 del Virus  
 20 Herpes Simplex (Lindgreen M., et al., 2000, Trends Pharmacol Sci, 21: 99-103), el *Penetratin* y el *Transportan* (Gariépy J., et al., 2001, Trends Biotech 19: 21-28), entre otros.

Por tanto, la invención también provee polipéptidos que comprenden los péptidos lineales que poseen una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre las

secuencias identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62 y un péptido de penetración intracelular.

En una materialización de la invención, el péptido de penetración intracelular en esos polipéptidos es un péptido proveniente de la proteína Tat1 del VIH. En una realización de la misma, el péptido de penetración intracelular posee una secuencia de aminoácidos que se identifica como SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66.

En una realización particular, el polipéptido de la invención posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56. Dichas secuencias se muestran a continuación:

- a) SEQ ID NO: 35 GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYWP
- b) SEQ ID NO: 47 GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWRYWP
- c) SEQ ID NO: 48 GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSWYWP
- d) SEQ ID NO: 51 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RWRYWP
- e) SEQ ID NO: 52 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)WRYWP
- f) SEQ ID NO: 53 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRWR(NMe-Tyr)WP
- g) SEQ ID NO: 54 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RSWYWP
- h) SEQ ID NO: 55 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)SWYWP
- i) SEQ ID NO: 56 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRSW(NMe-Tyr)WP

La mayoría de estos polipéptidos son más activos que el péptido CIGB-300, ya que poseen una  $CI_{50}$  menor en varias líneas celulares de cáncer (pulmón, vejiga, laringe, páncreas y leucemia). Los polipéptidos fueron capaces de producir un efecto de manera dosis-dependiente sobre la proliferación de las células cancerígenas. Por su parte, el polipéptido identificado como SEQ ID NO: 35 muestra valores de  $CI_{50}$  similares a las del CIGB-300 en estas líneas celulares. Sin embargo, se considera superior porque posee una secuencia de aminoácidos lineal, de menor tamaño y más estable químicamente, con ventajas productivas que aceleran el desarrollo del producto terapéutico.

Para la identificación de los péptidos descritos en la invención se sintetizó una biblioteca combinatoria de péptidos lineales del tipo "una-perla-un-compuesto" que contenía más de 16 millones de secuencias peptídicas diferentes y se realizó el pesquiasaje con un péptido sintético que comprendía la región 28-38 de la oncoproteína E7 modificado con Biotina. Con el empleo de la espectrometría de

masas se asignaron las secuencias de los péptidos contenidos en las nueve perlas que resultaron positivas al pesquijaje. Los péptidos identificados como SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 9 se sintetizaron químicamente, y se confirmó que eran capaces de inhibir la fosforilación mediada por CK2 en la oncoproteína E7 de VPH-16. Con el  
5 objetivo de lograr la acción intracelular sobre los sustratos endógenos de CK2, se diseñaron y sintetizaron polipéptidos que contenían los nueve péptidos, en los que se añadía en el N-terminal el péptido de penetración intracelular correspondiente a la proteína Tat1 del VIH (GRKKRRQRRPPQ, identificado como SEQ ID NO: 65). A continuación, se evaluó el efecto de estos nueve polipéptidos sobre el crecimiento  
10 celular de la línea NCI-H125 (cáncer de células no pequeñas de pulmón). Ninguno de los polipéptidos alcanzó valores de inhibición similares al CIGB-300, en el rango de concentraciones evaluadas. Solo tres de ellos, identificados como SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 20, inhibieron entre un 20% y un 30% la proliferación celular a la máxima concentración estudiada, por lo que se hicieron modificaciones a sus secuencias para  
15 mejorar la actividad biológica.

Se diseñó y obtuvo una biblioteca de barrido de posición de Trp, para evaluar el impacto de la incorporación del Trp en la actividad biológica de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 20. Seguidamente, se evaluó el efecto antiproliferativo de los 24 polipéptidos generados en la biblioteca de Trp  
20 (identificados como SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 44) en la línea celular NCI-H125. Seis de los 24 polipéptidos, identificados como SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 43, mostraron porcentajes de inhibición de la proliferación celular similares al péptido CIGB-300 a la máxima concentración evaluada. Los valores de  $Cl_{50}$  del polipéptido identificado como SEQ  
25 ID NO: 35 y del CIGB-300, obtenidos en las líneas celulares NCI-H125 y AsPC-1 (adenocarcinoma de páncreas) son comparables. Particularmente, el polipéptido identificado como SEQ ID NO: 35 se considera superior al CIGB-300, porque es una secuencia lineal de menor tamaño, más estable químicamente y con ventajas productivas.

30 Otros dos polipéptidos lineales más activos que el péptido CIGB-300, identificados en la invención como SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48, son el resultado de un estudio donde se introdujo un segundo residuo Trp en tres posiciones del polipéptido identificado como SEQ ID NO: 35. Se demostró que los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 son más potentes que el péptido CIGB-300,

en su capacidad de inhibir la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de páncreas (AsPC-1, PanC-1) y leucemia mieloide aguda (OCI-AML3), y fueron similares al CIGB-300 en la línea celular de cáncer de pulmón empleada (NCI-H125). Como resultado de la introducción de aminoácidos no naturales en las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48, en sitios propensos a la degradación enzimática, se obtuvieron seis nuevos polipéptidos lineales más activos que el CIGB-300, los que se identificaron como SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56. Los ensayos antiproliferativos se realizaron en las líneas celulares NCI-H125, Hep2C (carcinoma de laringe) y en dos líneas de cáncer de vejiga (MGH-U3 y MGH-U4). Los valores de  $CI_{50}$  de los péptidos identificados como SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56, obtenidos en las líneas celulares NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 y MGH-U4, son menores que los obtenidos para el CIGB-300, lo que demuestra que son más potentes. En el caso de las líneas de cáncer de vejiga (MGH-U3 y MGH-U4), los valores de  $CI_{50}$  son inferiores en un orden de magnitud respecto al CIGB-300, lo cual es muy atractivo por ser un nicho poco explorado, no resuelto y con una alta incidencia en salud. La introducción de los aminoácidos no naturales se realizó para aumentar la estabilidad a proteasas. Sin embargo, sorprendentemente también se logró potenciar la capacidad de dichos polipéptidos de inhibir la fosforilación mediada por CK2.

La invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido lineal que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62, o al menos un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes que pueden formar parte de las composiciones farmacéuticas de la invención son conocidos por los versados en este campo de la técnica. En una realización de la invención, la composición farmacéutica es formulada para su administración por ruta sistémica, intratumoral, oral o mucosal. En una materialización de la invención, las composiciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento de tumores sólidos o líquidos en un individuo que lo requiera.

Es objeto de la invención, el uso de los péptidos lineales que poseen una secuencia que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ

ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62, o de los polipéptidos que poseen una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56, para fabricar un medicamento.

- 5 En una materialización de la invención, dicho medicamento se emplea en el tratamiento de tumores sólidos o líquidos.

En otro aspecto, la invención revela un método de tratamiento de tumores sólidos o líquidos en un individuo que lo necesita que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende  
10 al menos un péptido lineal que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62, o al menos un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 47,  
15 SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56. En una realización de la invención, el tumor sólido que se trata es un tumor de pulmón, cervix, laringe, páncreas, o vejiga. En otra realización de la invención, el tumor líquido que se trata es leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda tipo T o leucemia mieloide aguda.

## 20 Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Efecto de los péptidos sintéticos de SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 9 sobre la fosforilación de la proteína E7 de VPH-16 mediada por CK2. Se emplearon como controles dos péptidos que no interaccionan con el sitio fosfoaceptor de la enzima CK2 (identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11). En el eje Y se representan  
25 los conteos por minuto (cpm).

**Figura 2.** Porcentaje de inhibición de la proliferación celular (% I) en la línea celular NCI-H125 para los nueve polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 20. Los péptidos CIGB-300 y Tat se utilizaron como control positivo y negativo del ensayo, respectivamente. Se seleccionaron los polipéptidos que mostraron un  
30 porcentaje de inhibición de la proliferación celular  $\geq 20\%$ .

**Figura 3.** Curvas dosis-efecto de los polipéptidos F11P19, F11P20 y F11P21 (SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 20) en la línea celular NCI-H125. Se incluye la curva dosis-efecto del péptido CIGB-300 que se empleó como control positivo del ensayo. % I: Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. C: concentración.

**Figura 4.** Porcentaje de inhibición de la proliferación celular (% I) en la línea celular NCI-H125 para los polipéptidos generados a partir de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 20, por barrido de posición del residuo Trp en el cargo (SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 44). **A.** Porcentaje de inhibición alcanzada por los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 44, a dos concentraciones. Se incluyeron los péptidos precursores identificados como SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 20 y el CIGB-300 como control positivo. El recuadro discontinuo enmarca los seis polipéptidos que mostraron más del 60% de inhibición de la proliferación celular a 200  $\mu$ M y el CIGB-300. **B.** Porcentaje de inhibición alcanzado por los seis polipéptidos más activos a varias concentraciones entre 12,5  $\mu$ M y 200  $\mu$ M.

**Figura 5.** Curvas dosis-efecto de los polipéptidos A14P27 (SEQ ID NO: 21), A14P31 (SEQ ID NO: 25), A14P33 (SEQ ID NO: 27), A14P43 (SEQ ID NO: 32), A14P46 (SEQ ID NO: 35), A14P59 (SEQ ID NO: 43) en la línea celular NCI-H125. Se incluye la curva dosis-efecto del péptido CIGB-300 empleado como péptido control. % I: Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. C: concentración.

**Figura 6.** Curvas dosis-efecto del polipéptido A14P46 (SEQ ID NO: 35) y el péptido CIGB-300 en la línea celular AsPC-1. % I: Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. C: concentración.

**Figura 7.** Curvas dosis-efecto de los polipéptidos A15P35, A15P36 y A15P37 (SEQ ID NO: 46 - SEQ ID NO: 48) en la línea celular NCI-H125. Se incluyen las curvas dosis-efecto del polipéptido precursor A14P46 (SEQ ID NO: 35) y del péptido CIGB-300 que se empleó como control. % I: Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. C: concentración.

**Figura 8.** Curvas de dosis-efecto de los polipéptidos E17P01, E17P02 y E17P03 (SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 53) en la línea celular NCI-H125. Se incluyen las curvas dosis-efecto del polipéptido precursor A15P36 (SEQ ID NO: 47) y del CIGB-300 que se empleó como control. % I: Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. C: concentración.

**Figura 9.** Curvas de dosis-efecto de los polipéptidos D17P78, D17P79 y D17P80 (SEQ ID NO: 54 - SEQ ID NO: 56) en la línea celular NCI-H125. Se incluyen las curvas dosis-efecto del polipéptido precursor A15P37 (SEQ ID NO: 48) y del CIGB-300 que se empleó como control. % I: Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. C: concentración.

**Figura 10.** Efecto antitumoral del polipéptido inhibidor de la fosforilación por CK2 E17P01 (SEQ ID NO: 51) en un modelo de tumor de vejiga humano implantado en ratones atímicos.

5 **Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización**

**Ejemplo 1. Selección de péptidos lineales que interaccionan con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en la proteína E7 de VPH-16.**

Para la identificación de los péptidos lineales bioactivos que interaccionan con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2, se pesquisó una biblioteca combinatoria de péptidos lineales sintéticos del tipo "una-perla-un-compuesto" nombrada BCP-1, que contenía  
10 más de 16 millones de secuencias peptídicas diferentes. Esta biblioteca se diseñó para ser compatible con el análisis de la secuencia por espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) (Masforrol Y., *et al.*, 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9). El pequisaje se realizó con un péptido sintético  
15 biotinilado, que se denominó BIOT, que contiene el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en el sustrato E7 del VPH-16 (LNDSSSEEEDEI, identificado como SEQ ID NO: 63). Se empleó el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina como molécula de reconocimiento, y como sustrato para el revelado se utilizó la sal de *p*-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP). El color azul facilita la diferenciación visual de  
20 las perlas que contienen secuencias bioactivas reconocidas por el péptido BIOT, respecto al color amarillo claro brillante que tiene la resina TentaGel de la biblioteca BCP-1. El péptido BIOT se sintetizó sobre la resina 4-metilbencidrilamina (MBHA), con el empleo de la química Fmoc/tBu (Field GB y Noble RL. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990; 35(3):161-214). Se purificó por cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)  
25 y se corroboró su identidad por ESI-MS. Se obtuvo con más del 95% de pureza, y el análisis por ESI-MS confirmó su masa molecular (MM) de 1574,6 Da.

La biblioteca BCP-1 se colocó en un reactor de polipropileno con un sistema de filtración al vacío y con agitación mecánica. Se lavó con agua purificada y disolución tampón fosfato salina (PBS) pH 7,4; y se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA)  
30 al 1% en PBS pH 7,4 durante una hora. Los disolventes y reactivos se eliminaron por filtración al vacío. La biblioteca se incubó con 80 mL de una disolución del péptido BIOT a 150 µg/mL en BSA al 1% en PBS pH 7,4, durante 16h a 4°C. Se lavó con Tween-PBS (T-PBS) pH 7,4; y se incubó con el conjugado estreptavidina - fosfatasa alcalina (0,4 µg/mL) en una disolución de BSA al 1% en PBS pH 7,4. A las dos horas,

se lavó con T-PBS pH 7,4 y se incubó con BCIP (0,5 mg/mL) en disolución sustrato durante 30 min. Cuando apareció el color azul, se detuvo la reacción por filtración y abundantes lavados con PBS pH 7,4.

Las perlas positivas se separaron del resto mediante exploración visual, con la ayuda de una lente ocular, se trasvasaron a un reactor con una frita, y se regeneraron. Posteriormente, se hicieron ensayos para descartar reconocimientos inespecíficos por el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina y por el BCIP. Se realizó un pesquiasaje en condiciones de mayor astringencia, para seleccionar las secuencias de mayor afinidad y reducir el número de perlas positivas, para ello se redujo la concentración del péptido BIOT a 120 µg/mL. Las perlas positivas se regeneraron y se procedió a la identificación de la secuencia por nanoESI-MS/MS, según el procedimiento descrito anteriormente (Masforrol Y., *et al*, 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9).

Como resultado del pesquiasaje inicial con el péptido BIOT a 150 µg/mL se seleccionaron 56 perlas positivas. Después del segundo pesquiasaje con menor concentración de BIOT (120 µg/mL), se seleccionaron nueve perlas positivas que mostraron una coloración azul más intensa que el resto de las perlas positivas al pesquiasaje inicial, lo que evidenció la mayor afinidad de estos péptidos por el sitio fosfoceptor de CK2. Los espectros nanoESI-MS/MS obtenidos de las nueve perlas positivas fueron analizados de forma paralela, mediante la secuenciación manual *de novo* y la secuenciación automática, con el empleo del programa Mascot para la búsqueda en las bases de datos de BCP-1. En la Tabla 1 se muestra la secuencia de los nueve péptidos identificados (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 9). A partir del análisis de las secuencias asignadas a cada péptido, se obtiene total correspondencia de la asignación de las señales de m/z entre la identificación manual y la secuenciación automática, lo que permitió la identificación certera de las secuencias peptídicas en cada caso.

Se apreció una similitud en la composición aminoacídica de los nueve péptidos mostrados en la Tabla 1. Esta se caracteriza por el predominio de aminoácidos básicos (K, R) y la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (L, A, V, F, Y).

**Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de los péptidos identificados en las nueve perlas positivas aisladas en el pesquiasaje de la biblioteca BCP-1 con el péptido BIOT.**

| Perla | Secuencia del péptido en la perla | SEQ ID. No |
|-------|-----------------------------------|------------|
| 1     | RLRRKADP                          | 1          |
| 2     | LRRRKADP                          | 2          |
| 3     | TYRYRRDP                          | 3          |
| 4     | VARRRYDP                          | 4          |
| 5     | AVRRRYDP                          | 5          |
| 6     | TFYRRYDP                          | 6          |
| 7     | RKRSRYDP                          | 7          |
| 8     | GYRYKRD                           | 8          |
| 9     | VKKRRLDP                          | 9          |

- 5 Para corroborar que las nueve secuencias identificadas por nanoESI-MS/MS interaccionan con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en la proteína E7, se sintetizaron los péptidos directamente sobre la resina Tentagel, con el empleo de la química Fmoc/tBu (Field G.B. *et al.*, 1990, Int. J. Peptide Protein Res., 35(3):161-214). Se desarrolló una reacción enzimática sobre el péptido acoplado a la resina, con el
- 10 péptido BIOT a la concentración de 120 µg/mL. Se empleó el conjugado estreptavidina- fosfatasa alcalina como molécula de reconocimiento, y como sustrato para el revelado se utilizó el BCIP. Nueve reactores que contenían 15 mg de los péptidos codificados (P1-P9) acoplados a resina se colocaron en un sistema de filtración al vacío, con agitación mecánica. Se emplearon dos péptidos controles
- 15 acoplados a la resina (P10 identificado como SEQ ID NO: 10 y P11 identificado como SEQ ID NO: 11) que no interaccionan con el sitio fosfoceptor de la CK2 en la proteína E7. Se ajustó el procedimiento para reproducir el ensayo de pesquiasaje de la biblioteca BCP-1 en un volumen de trabajo de 500 µL para cada reactor. Los resultados mostraron que los nueve péptidos acoplados a la resina (P1-P9) desarrollaron un color
- 20 azul intenso después de ensayo enzimático, lo que evidencia la capacidad de los nueve péptidos lineales identificados de interactuar con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en el sustrato E7 modelo. Por el contrario, los péptidos controles acoplados a la resina (P10 y P11) no desarrollaron coloración azul.

**Ejemplo 2. Efecto de los péptidos identificados como SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 9 sobre la fosforilación de la proteína E7 de VPH-16 mediada por CK2.**

Los péptidos se sintetizaron sobre la resina MBHA con el empleo de la química Fmoc/tBu (Field GB y Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214).

- 5 Los péptidos se purificaron por RP-HPLC y se corroboró su identidad por ESI-MS. Para la síntesis, se denominaron como F11P04 - F11P12, y sus secuencias de aminoácidos se corresponden con las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 9. Como se observa en la Tabla 2, todos se obtuvieron con más del 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró su identidad.

10 **Tabla 2. Caracterización de los péptidos sintéticos que contienen las secuencias identificadas tras el pesquiasaje de la biblioteca BCP-1 con BIOT.**

| SEQ ID NO: | Código de síntesis | Secuencia | Pureza (%) | MM (Da) |
|------------|--------------------|-----------|------------|---------|
| 1          | F11P04             | RLRRKADP  | 99,1       | 1009,6  |
| 2          | F11P05             | LRRRKADP  | 99,1       | 1009,6  |
| 3          | F11P06             | TYRYRRDP  | 98,1       | 1124,6  |
| 4          | F11P07             | VARRRYDP  | 99,3       | 1030,6  |
| 5          | F11P08             | AVRRRYDP  | 98,6       | 1030,6  |
| 6          | F11P09             | TFYRRYDP  | 98,9       | 1115,5  |
| 7          | F11P10             | RKRSRYDP  | 98,8       | 1075,7  |
| 8          | F11P11             | GYRYKRDP  | 97,9       | 1052,5  |
| 9          | F11P12             | VKKRRLDP  | 99,6       | 1009,7  |
| 10         | D10P94             | EQPAFHDP  | 98,5       | 938,6   |
| 11         | D10P95             | VAGFFLDP  | 98,7       | 863,4   |

- El ensayo para medir el efecto de estos péptidos sobre la fosforilación de la proteína E7 de VPH-16, mediada por CK2, se basó en una reacción de fosforilación *in vitro*, donde se empleó la oncoproteína E7 del VPH-16 expresada en *Escherichia coli* como sustrato. Esta oncoproteína se obtuvo como proteína de fusión a Glutathion S-Transferasa. El ensayo se realizó según el procedimiento descrito previamente (Perea S.E., *et al.*, 2004, Cancer Res., 64: 7127-7129). Los resultados se observan en la Figura 1, e indican que los péptidos identificados como SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 9 son capaces de inhibir la fosforilación mediada por CK2 en la proteína E7 del VPH-16.

**Ejemplo 3. Efecto de los polipéptidos sintéticos identificados como SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 20 sobre el crecimiento celular en la línea de cáncer de células no pequeñas de pulmón NCI-H125.**

Con el objetivo de lograr la acción intracelular sobre los sustratos endógenos de CK2, a las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 9 se les adicionó en el N-terminal el péptido de penetración intracelular Tat, correspondiente a la proteína Tat1 del VIH, (GRKKRRQRRRPPQ). Se introdujo un residuo de betaAlanina ( $\beta$ A) como espaciador entre el péptido de interés y el péptido Tat. Los polipéptidos se codificaron como F11P13- F11P21 para la síntesis, y se corresponden con las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 20, como se muestra en la Tabla 3. El péptido CIGB-300 se identificó como SEQ ID NO: 64, y el péptido Tat se identificó como SEQ ID NO: 65. La síntesis, purificación y análisis de identidad de los péptidos se realizó como se muestra en el Ejemplo 2. Como se aprecia en la Tabla 3, todos se obtuvieron con más del 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró su identidad.

**Tabla 3. Caracterización de los polipéptidos sintéticos identificados como SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 20.**

| SEQ ID NO: | Código de síntesis | Secuencia                                                                          | Pureza (%) | MM (Da) |
|------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------|
| 12         | F11P13             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RLRRKADP                                                  | 98,7       | 2780,8  |
| 13         | F11P14             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-LRRRKADP                                                  | 98,7       | 2780,7  |
| 14         | F11P15             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-TYRYRRDP                                                  | 96,6       | 2895,8  |
| 15         | F11P16             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-VARRRYDP                                                  | 97,2       | 2801,7  |
| 16         | F11P17             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-AVRRRYDP                                                  | 98,2       | 2801,7  |
| 17         | F11P18             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-TFYRRYDP                                                  | 96,9       | 2886,8  |
| 18         | F11P19             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RKRSRYDP                                                  | 96,6       | 2846,7  |
| 19         | F11P20             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-GYRYKRDP                                                  | 97,4       | 2823,7  |
| 20         | F11P21             | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-VKKRRLDP                                                  | 97,4       | 2780,7  |
| 64         | CIGB-300           | ciclo (Cys <sub>15</sub> -Cys <sub>25</sub> ) GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-CWMSPRHLGTC | 99,2       | 3057,6  |
| 65         | Tat                | GRKKRRQRRRPPQ                                                                      | 98,3       | 1717,1  |

La evaluación de la actividad antiproliferativa de los polipéptidos F11P13-F11P21 (SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 20) se realizó en la línea celular NCI-H125. La línea

celular exhibe una alta sensibilidad a bajas concentraciones del fármaco en evaluación (HU L.-Y., *et al.*, 2018, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 22: 4551-4556). El efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 ha sido ampliamente caracterizado en esta línea (Cirigliano S.M., *et al.*, 2017, Cancer Cell International, 17, 42), por lo que se seleccionó como control positivo. Se empleó como control negativo el péptido Tat. Los polipéptidos se evaluaron a las concentraciones de 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M. El ensayo de proliferación celular se realizó por un procedimiento descrito previamente (Perera Y., *et al.*, 2012, J. Pept. Sci, 18 (4):215-23).

En la Figura 2 se muestra el resultado del ensayo antiproliferativo en las células NCI-H125. Cada barra se corresponde con los valores del porcentaje de inhibición de la proliferación celular (% I) alcanzado para las concentraciones de los polipéptidos evaluadas (25, 50, 100 y 200  $\mu$ M). Se seleccionaron los polipéptidos que mostraron un valor de inhibición de la proliferación celular mayor o igual a 20%, ya que este valor de por ciento se encuentra dentro del coeficiente de variación del ensayo. Solo los polipéptidos F11P19, F11P20 y F11P21 inhibieron la proliferación celular entre un 20% y un 30%, a la concentración de 200  $\mu$ M. Solo se alcanzó el 50% de inhibición de la proliferación con el péptido CIGB-300, utilizado como control.

En la Figura 3 se presentan las curvas dosis-efecto de los polipéptidos F11P19, F11P20 y F11P21, en comparación con el péptido CIGB-300. Los valores de  $CI_{50}$  para los polipéptidos F11P19, F11P20, F11P21 y para CIGB-300 fueron 336  $\mu$ M, 305  $\mu$ M, 668  $\mu$ M y 64  $\mu$ M, respectivamente. Los valores de  $CI_{50}$  de los polipéptidos F11P19, F11P20, F11P21 aún distan del valor de  $CI_{50}$  obtenido para el CIGB-300, por lo que se hace necesario optimizar dichas estructuras primarias para mejorar su actividad biológica.

#### **Ejemplo 4. Optimización de las secuencias identificadas como SEQ ID NO:18-SEQ ID NO: 20 mediante un barrido de Triptófano en el cargo.**

El aminoácido Trp fue excluido en la síntesis de la biblioteca BCP-1 por diseño (Masforrol Y., *et al.*, 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9). Por ello, se diseñaron bibliotecas de barrido de posición de Trp para las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 20, en los que se realizó la sustitución puntual de cada residuo de aminoácido por el Trp en el cargo (Tabla 4). Esto permitió estudiar la contribución del Trp en cada posición de la secuencia del cargo.

Los polipéptidos de la biblioteca de barrido de posición de Trp se sintetizaron sobre

la resina MBHA, con el empleo de la química Fmoc/tBu (Field GB y Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214), se purificaron RP-HPLC y se corroboró la identidad por ESI-MS. Como se aprecia en la Tabla 4, que muestra las secuencias de aminoácidos, todos se obtuvieron con más del 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró la identidad con la molécula diseñada.

**Tabla 4. Caracterización de los polipéptidos generados por barrido de posición de Trp identificados como SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 44.**

| SEQ ID NO: | Origen                                    | Código | Secuencia                                                  | Pureza (%) | MM (Da) |
|------------|-------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------|------------|---------|
| 21         | Derivado del polipéptido de SEQ ID NO: 19 | A14P27 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-WYRYKRDP | 96,5       | 2952,6  |
| 22         |                                           | A14P28 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GWRYKRDP | 97,8       | 2846,6  |
| 23         |                                           | A14P29 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GYWYKRDP | 96,4       | 2853,5  |
| 24         |                                           | A14P30 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GYRWKRDP | 97,8       | 2846,6  |
| 25         |                                           | A14P31 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GYRYWRDP | 97,8       | 2881,6  |
| 26         |                                           | A14P32 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GYRYKWDP | 97,7       | 2853,6  |
| 27         |                                           | A14P33 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GYRYKRWP | 95,7       | 2894,6  |
| 28         |                                           | A14P34 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-GYRYKRDW | 95,1       | 2912,6  |
| 29         | Derivado del polipéptido de SEQ ID NO: 18 | A14P40 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-WKRSRYDP | 96,7       | 2876,6  |
| 30         |                                           | A14P41 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RWRSRYDP | 95,9       | 2904,6  |
| 31         |                                           | A14P42 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RKWSRYDP | 97,6       | 2876,6  |
| 32         |                                           | A14P43 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RKRWRYDP | 98,7       | 2945,6  |
| 33         |                                           | A14P44 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RKRSWYDP | 95,7       | 2876,6  |
| 34         |                                           | A14P45 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RKRSRWDP | 99,1       | 2869,6  |
| 35         |                                           | A14P46 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RKRSRYWP | 99,7       | 2917,6  |
| 36         |                                           | A14P47 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-RKRSRYDW | 99,3       | 2935,7  |
| 37         | Derivado del polipéptido de SEQ ID NO: 20 | A14P53 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-WKKRRLDP | 98,1       | 2867,8  |
| 38         |                                           | A14P54 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VWKRRLDP | 98,8       | 2838,7  |
| 39         |                                           | A14P55 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VKWRRLDP | 99,7       | 2838,7  |
| 40         |                                           | A14P56 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VKKWRLDP | 99,0       | 2810,7  |
| 41         |                                           | A14P57 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VKKRWLDP | 99,3       | 2810,7  |
| 42         |                                           | A14P58 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VKKRRWDP | 96,3       | 2853,8  |
| 43         |                                           | A14P59 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VKKRRLWP | 99,6       | 2851,8  |
| 44         |                                           | A14P60 | GRKKRRQRRRPPQ- <i><b><math>\beta</math></b></i> A-VKKRRLDW | 99,3       | 2869,8  |

En negrita se destacan las modificaciones realizadas a las secuencias de aminoácidos del cargo.

Para corroborar que la modificación con Trp no afecta la capacidad de los polipéptidos de interaccionar con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en la proteína E7, se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Los 24 polipéptidos acoplados a la resina desarrollaron un color azul intenso después de ensayo enzimático, lo que evidencia la interacción con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en el sustrato E7 modelo. Por otra parte, para demostrar que la modificación con Trp no afecta el efecto de los polipéptidos sobre la fosforilación de la proteína E7 por la CK2, se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los 24 polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 21- SEQ ID NO: 44 mantuvieron la capacidad de inhibir la fosforilación de la proteína E7 del VPH-16, mediada por la CK2, ya que se obtuvieron valores de inhibición de la fosforilación entre 60-85%. El CIGB-300 mostró 87% de inhibición de la fosforilación.

La evaluación de la actividad antiproliferativa de los polipéptidos sintéticos generados por barrido de posición de Trp (SEQ ID NO: 21- SEQ ID NO: 44) se realizó en la línea celular NCI-H125. El ensayo se realizó por el procedimiento descrito previamente (Perera Y., *et al.*, 2012, J. Pept. Sci, 18 (4): 215-23). Se incluyeron como controles positivos los polipéptidos precursores (F11P19, F11P20, F11P21) y el péptido CIGB-300. Los polipéptidos se evaluaron a las concentraciones de 12,5; 25; 50; 100 y 200  $\mu$ M. En la Figura 4A se muestran los resultados del porcentaje de inhibición de la proliferación celular para las concentraciones de polipéptido de 100 y 200  $\mu$ M. Los resultados demuestran que seis de los 24 polipéptidos evaluados (A14P27 (SEQ ID NO: 21), A14P31 (SEQ ID NO: 25), A14P33 (SEQ ID NO: 27), A14P43 (SEQ ID NO: 32), A14P46 (SEQ ID NO: 35), A14P59 (SEQ ID NO: 43)) mostraron más del 60% de inhibición de la proliferación celular a 200  $\mu$ M, similar al efecto encontrado con el péptido CIGB-300. En la Figura 4B se representan los valores del porcentaje de inhibición de la proliferación celular obtenidos para los seis polipéptidos seleccionados, a las concentraciones evaluadas. Como se observa, el polipéptido A14P46 inhibe más del 50% de la proliferación celular a las concentraciones superiores de 100 y 200  $\mu$ M, similar al comportamiento del CIGB-300. A las concentraciones inferiores, el polipéptido A14P46 mostró una mejor correlación dosis-efecto comparado con el comportamiento del péptido CIGB-300.

En la Figura 5 se presentan las curvas dosis-efecto de los polipéptidos A14P27, A14P31, A14P33, A14P43, A14P46, A14P59 y CIGB-300. Por su parte, en la Tabla 5 se muestra que los valores de  $CI_{50}$  para estos seis polipéptidos son menores que los

obtenidos para sus polipéptidos precursores F11P19 (336  $\mu$ M), F11P20 (305  $\mu$ M) y F11P21 (668  $\mu$ M). La  $CI_{50}$  del polipéptido A14P46 (72  $\mu$ M) es comparable a la  $CI_{50}$  del péptido de referencia CIGB-300 (64  $\mu$ M)

**Tabla 5. Valores de  $CI_{50}$  de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 43 en el ensayo de proliferación celular con la línea NCI-H125.**

| SEQ ID NO: | Código   | Secuencia                                                 | $CI_{50}$ ( $\mu$ M) |
|------------|----------|-----------------------------------------------------------|----------------------|
| 21         | A14P27   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-WYRYKRDP                         | 165                  |
| 25         | A14P31   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-GYRYWRDP                         | 135                  |
| 27         | A14P33   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-GYRYKRWP                         | 124                  |
| 32         | A14P43   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RKRWRYP                          | 107                  |
| 35         | A14P46   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RKRSRYWP                         | 72                   |
| 43         | A14P59   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-VKKRRLWP                         | 140                  |
| 64         | CIGB-300 | ciclo (Cys15-Cys 25) GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-CWMSPRHLGTC | 64                   |

El estudio estructural realizado en la secuencia peptídica  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ , permitió concluir que el cambio de D por W en la posición  $X_7$  es esencial para mejorar la actividad biológica (A14P46 >> A14P33 > A14P59), con la mejor respuesta para el polipéptido A14P46. De forma adicional, se pudo concluir que las posiciones  $X_4 > X_5 > X_1$  también mostraron resultados notables respecto a la actividad biológica, lo cual sugirió la introducción de un segundo aminoácido W en sustitución de dichas posiciones.

Para corroborar que la actividad biológica del polipéptido A14P46 (SEQ ID NO: 35) solamente se atribuye al cargo (RKRSRYWP), se sintetizó un péptido similar sin la secuencia Tat y la  $\beta$ A, con el empleo del procedimiento de síntesis descrito en este ejemplo. El péptido D14P165, identificado como SEQ ID NO: 45, se obtuvo con 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró su MM de 1146,7 Da. El ensayo de inhibición de la fosforilación se realizó según se describe en el Ejemplo 2 y se obtuvo un 85% de inhibición, lo que confirmó la capacidad del péptido de inhibir la fosforilación de la proteína E7 del VPH-16 mediada por la CK2.

Teniendo en cuenta que el polipéptido A14P46 mostró resultados de actividad biológica similares al CIGB-300 en la línea celular NCI-H125, se estudió el

comportamiento del mismo polipéptido en la línea tumoral de adenocarcinoma de páncreas (AsPC-1), en comparación con el CIGB-300. El ensayo de proliferación celular se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente (Perera Y, *et al.*, 2012, J. Pept. Sci, 18 (4):215-23). Como se observa en la Figura 6, ambas moléculas son capaces de producir un efecto de manera dosis-dependiente sobre la proliferación de las células AsPC-1. Se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  de 125  $\mu$ M para el A14P46 y de 102  $\mu$ M para el CIGB-300, lo que evidencia que ambos tienen similar potencia en esta línea celular.

Se demuestra que el polipéptido A14P46 (SEQ ID NO: 35) es comparable al CIGB-300 en su capacidad de inhibir la proliferación celular en las líneas celulares NCI-H125 y AsPC-1 (Figuras 5 y 6), pero lo supera por ser un polipéptido lineal de menor tamaño, químicamente más estable, por no presentar metionina ni cisteína en su secuencia, lo que lo hace más atractivo desde el punto de vista productivo.

**Ejemplo 5. Optimización del polipéptido identificado como SEQ ID NO: 35 por introducción de un segundo residuo Trp en su secuencia.**

Basado en los resultados obtenidos en el Ejemplo 4, se introdujo otro residuo de Trp en las posiciones  $X_1$ ,  $X_4$  y  $X_5$  del polipéptido A14P46, y se evaluó su impacto en la actividad biológica. Los polipéptidos se sintetizaron sobre la resina MBHA con el empleo de la química Fmoc/tBu (Field GB y Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214), se purificaron RP-HPLC y se corroboró la identidad por ESI-MS. Como se aprecia en la Tabla 6, los tres péptidos se obtuvieron con más del 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró la identidad de la molécula.

**Tabla 6. Caracterización de los péptidos generados para la optimización del péptido identificado como SEQ ID NO: 35.**

| SEQ ID NO: | Código | Secuencia                                   | Pureza (%) | MM (Da) |
|------------|--------|---------------------------------------------|------------|---------|
| 46         | A15P35 | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A- <b>WK</b> RSRYWP  | 99,7       | 2947,7  |
| 47         | A15P36 | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A- RK <b>R</b> WRYWP | 95,1       | 3016,8  |
| 48         | A15P37 | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A- RK <b>R</b> SWYWP | 95,1       | 2947,7  |

En negrita se destaca la introducción del segundo residuo Trp en la secuencia del péptido identificado como SEQ ID NO: 35.

La evaluación de la actividad antiproliferativa de los polipéptidos sintéticos A15P35, A15P36 y A15P37 (SEQ ID NO: 46 - SEQ ID NO: 48) se realizó en las líneas celulares

NCI-H125, AsPC-1, PanC-1 (carcinoma de páncreas) y OCI-AML3 (leucemia mieloide aguda-3). El ensayo se llevó a cabo por el procedimiento descrito previamente (Perera Y, et al., 2012, J. Pept. Sci, 18 (4):215-23). En la Figura 7 se presentan las curvas de dosis-efecto de los tres polipéptidos en la línea celular NCI-H125, en comparación con su precursor A14P46 y el péptido control CIGB-300. Los polipéptidos A15P35, A15P36 y A15P37 fueron capaces de producir un efecto de manera dosis-dependiente sobre la proliferación de las células NCI-H125. En las líneas AsPC-1, PanC-1 y OCI-AML3 los tres polipéptidos también mostraron un patrón dosis-respuesta.

En la Tabla 7 se resumen los valores de  $Cl_{50}$  de los polipéptidos A15P35, A15P36 y A15P37 obtenidos en las líneas celulares NCI-H125, AsPC-1, PanC-1 y OCI-AML3, en comparación con su precursor A14P46 y con el péptido control CIGB-300. Los valores de  $Cl_{50}$  del polipéptido A15P35 son similares a los obtenidos para su precursor A14P46 y para el CIGB-300, en las cuatro líneas estudiadas, lo que evidencia que la introducción del Trp en la posición X1 de la secuencia es irrelevante. Por el contrario, los valores de  $Cl_{50}$  obtenidos para los polipéptidos A15P36 y A15P37 fueron menores que los obtenidos para el polipéptido A14P46 y el péptido CIGB-300, sobre todo en las líneas celulares de cáncer de páncreas (AsPC-1, PanC-1) y de leucemia mieloide aguda (OCI-AML3).

**Tabla 7. Valores de  $Cl_{50}$  de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 46 – SEQ ID NO: 48 en el ensayo de proliferación celular con las líneas NCI-H125, AsPC-1, PanC-1 y OCI-AML3.**

| SEQ ID NO: | Código   | $Cl_{50}$ ( $\mu$ M) |        |        |          |
|------------|----------|----------------------|--------|--------|----------|
|            |          | NCI-H125             | AsPC-1 | PanC-1 | OCI-AML3 |
| 46         | A15P35   | 106                  | 127    | 145    | 130      |
| 47         | A15P36   | 42                   | 26     | 54     | 9        |
| 48         | A15P37   | 46                   | 23     | 65     | 21       |
| 35         | A14P46   | 72                   | 125    | 166    | 70       |
| 64         | CIGB-300 | 64                   | 102    | 156    | 63       |

Se incluyen los valores obtenidos para los péptidos controles A14P46 y CIGB-300.

Para corroborar que la actividad biológica de los polipéptidos A15P36 (SEQ ID NO: 47) y A15P37 (SEQ ID NO: 48) solo se atribuye a los cargos RKRWRYP y RKRSWYP, se sintetizaron ambos péptidos sin la secuencia Tat ni la  $\beta$ A, con el

empleo del procedimiento de síntesis descrito en este ejemplo. Los péptidos D15P105 (SEQ ID NO: 49) y D15P106 (SEQ ID NO: 50) se obtuvieron con más de 95% de pureza, y el análisis por ESI-MS corroboró sus masas moleculares de 1245,7 Da y 1176,6 Da, respectivamente. El ensayo de fosforilación se realizó según se describe en el Ejemplo 2, y se obtuvieron valores de inhibición de la fosforilación de 87% y 82%, respectivamente, lo que confirmó la capacidad de ambos péptidos de inhibir la fosforilación mediada por CK2 en la proteína E7 del VPH-16.

Los resultados de este ejemplo evidencian que la introducción de un segundo Trp en las posiciones X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> de la secuencia del polipéptido A14P46 (SEQ ID NO: 35), favorece la interacción del péptido con el sitio fosfoceptor, y por tanto su capacidad de inhibir la fosforilación por CK2. Se demuestra que los polipéptidos A15P36 y A15P37 son más potentes que el CIGB-300 en su capacidad de inhibir la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de páncreas (AsPC-1, PanC-1) y leucemia mieloide aguda (OCI-AML3). Ambos polipéptidos tienen la ventaja adicional de que son secuencias lineales de menor tamaño, químicamente más estables, por no presentar residuos sensibles como metionina y cisteína. Además, son más atractivos desde el punto de vista productivo.

**Ejemplo 6. Optimización de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 por introducción de aminoácidos no naturales (D- y L-N-metil aminoácidos).**

Con el objetivo de proteger los polipéptidos A15P36 (SEQ ID NO: 47) y A15P37 (SEQ ID NO: 48) de la acción de las endopeptidasas en los fluidos biológicos, se introdujeron aminoácidos no naturales en aquellos sitios de la secuencia más propensos a la degradación por tripsina y quimotripsina. Los sitios más sensibles a la proteólisis se predijeron con la ayuda del sitio Expasy (<http://www.expasy.org>) (Gasteiger E., et al., 2003, Nucleic Acids Research. 31(13): 3784–3788). Se incorporó D-Arg en la R<sub>8</sub> del Tat y se evaluó la protección de la K<sub>16</sub>, la R<sub>17</sub> y la Y<sub>20</sub>, con la introducción de D-Lys, D-Arg y NMe-Tyr, respectivamente. Se acetiló el N-terminal de cada polipéptido para protegerlo de las N-peptidasas. Los polipéptidos E17P01, E17P02 y E17P03 (SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 53) son derivados del A15P36 y los polipéptidos D17P78, D17P79 y D17P80 (SEQ ID NO: 54 - SEQ ID NO: 56) son derivados del A15P37. Los polipéptidos se sintetizaron sobre la resina MBHA con el empleo de la química Fmoc/tBu, se purificaron por RP-HPLC y se corroboró la identidad por ESI-MS. Como se aprecia en la Tabla 8, todos se obtuvieron con más

del 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró la identidad de la molécula.

**Tabla 8. Caracterización de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 51-SEQ ID NO: 56.**

| SEQ ID NO: | Código | Secuencia                                      | Pureza (%) | MM (Da) |
|------------|--------|------------------------------------------------|------------|---------|
| 51         | E17P01 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-R(D-Lys) RWRYP   | 98,4       | 3058,8  |
| 52         | E17P02 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RK(D-Arg)WRYP    | 96,3       | 3058,8  |
| 53         | E17P03 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RKRWR(NMe-Tyr)WP | 96,6       | 3072,8  |
| 54         | D17P78 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-R(D-Lys)RSWYP    | 97,3       | 2989,7  |
| 55         | D17P79 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RK(D-Arg)SWYP    | 98,2       | 2989,7  |
| 56         | D17P80 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RKRSW(NMe-Tyr)WP | 95,7       | 3003,7  |

- 5 Para corroborar que la introducción de los aminoácidos no naturales no afecta la capacidad de los polipéptidos de interaccionar con el sitio fosfoceptor de la enzima CK2 en la proteína E7, se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Los seis polipéptidos acoplados a la resina desarrollaron un color azul intenso después del ensayo enzimático, lo que evidencia la interacción con el sitio fosfoceptor de la
- 10 enzima CK2 en el sustrato E7 modelo. Por otra parte, para demostrar que la modificación no afecta el efecto de los péptidos sobre la fosforilación por la enzima CK2 en la proteína E7, se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los polipéptidos E17P01-E17P03 y D17P78-D17P80, identificados con las SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56, mantienen la capacidad de inhibir la fosforilación mediada
- 15 por CK2 en la proteína E7 del VPH-16, se obtuvieron valores de inhibición de la fosforilación entre 83 y 90%.

Los ensayos antiproliferativos se realizaron en las líneas celulares NCI-H125, Hep2C (carcinoma de laringe) y en dos líneas de cáncer de vejiga (MGH-U3 y MGH-U4). El ensayo se llevó a cabo por el procedimiento descrito previamente (Perera Y., *et al*,

20 2012, Pept. Sci, 18 (4):215-23).

En las Figuras 8 y 9 se presentan las curvas de dosis-efecto en la línea celular NCI-

H125 de los polipéptidos E17P01, E17P02 y E17P03 (SEQ ID NO: 51- SEQ ID NO: 53) y D17P78, D17P79 y D17P80 (SEQ ID NO: 54- SEQ ID NO: 56), respectivamente. En cada caso se incluye el péptido control CIGB-300 y los polipéptidos precursores A15P36 y A15P37, respectivamente. Los seis polipéptidos fueron capaces de producir un efecto de manera dosis-dependiente sobre la proliferación de las células de la línea NCI-H125. En las líneas celulares Hep2C, MGH-U3 y MGH-U4 los seis polipéptidos también mostraron un patrón dosis-respuesta.

En la Tabla 9 se resumen los valores de  $Cl_{50}$  de los polipéptidos E17P01, E17P02, E17P03, D17P78, D17P79 y D17P80 (SEQ ID NO: 51- SEQ ID NO: 56) obtenidos en las líneas celulares NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 y MGH-U4, en comparación con sus precursores y el péptido control CIGB-300.

**Tabla 9. Valores de  $Cl_{50}$  de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56 en las líneas celulares NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 y MGH-U4.**

| SEQ ID NO: | Código   | $Cl_{50}$ ( $\mu$ M) |       |        |        |
|------------|----------|----------------------|-------|--------|--------|
|            |          | NCI-H125             | Hep2C | MGH-U3 | MGH-U4 |
| 51         | E17P01   | 20                   | 11    | 65     | 53     |
| 52         | E17P02   | 27                   | 26    | 55     | 38     |
| 53         | E17P03   | 47                   | 11    | 29     | 33     |
| 54         | D17P78   | 14                   | 20    | 86     | 89     |
| 55         | D17P79   | 21                   | 18    | 77     | 69     |
| 56         | D17P80   | 13                   | 24    | 65     | 70     |
| 47         | A15P36   | 42                   | 44    | -      | -      |
| 48         | A15P37   | 46                   | 48    | -      | -      |
| 64         | CIGB-300 | 64                   | 61    | 327    | 335    |

Se incluyen los valores obtenidos para los polipéptidos controles A15P36, A15P37 y CIGB-300.

En la Tabla 9 se observa que los valores de  $Cl_{50}$  de los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56, en las líneas celulares NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 y MGH-U4, son menores que los obtenidos para el péptido CIGB-300, lo que demuestra que son más potentes en cuanto a su efecto antiproliferativo. En el caso de las líneas de cáncer de vejiga (MGH-U3 y MGH-U4), sorprendentemente, los

valores de  $CI_{50}$  llegan a ser inferiores en un orden de magnitud respecto al CIGB-300, lo cual es muy atractivo, por ser un nicho poco explorado, no resuelto y con una alta incidencia en salud. Las modificaciones en los polipéptidos A15P36 y A15P37 se introdujeron para aumentar la estabilidad a proteasas. Sin embargo, de manera sorprendente, también se logró potenciar la capacidad de inhibir la fosforilación por CK2.

Para corroborar que la actividad biológica de los péptidos identificados como SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56 solo se atribuye a sus cargos, se sintetizaron péptidos sin la secuencia Tat y la  $\beta A$ , con el empleo del procedimiento de síntesis descrito en este mismo ejemplo. Los péptidos D17P81- D17P86 (SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62) se obtuvieron con más de 95% de pureza y el análisis por ESI-MS corroboró la identidad de las moléculas obtenidas con las diseñadas (Tabla 10).

**Tabla 10. Caracterización de los péptidos identificados como SEQ ID NO: 57- SEQ ID NO: 62.**

| SEQ ID NO: | Código | Secuencia        | Pureza (%) | MM (Da) |
|------------|--------|------------------|------------|---------|
| 57         | D17P81 | R(D-Lys) RWRYP   | 98,5       | 1245,7  |
| 58         | D17P82 | RK(D-Arg)WRYP    | 97,6       | 1245,7  |
| 59         | D17P83 | RKRWR(NMe-Tyr)WP | 95,8       | 1259,7  |
| 60         | D17P84 | R(D-Lys)RSWYP    | 96,3       | 1176,7  |
| 61         | D17P85 | RK(D-Arg)SWYP    | 97,8       | 1176,7  |
| 62         | D17P86 | RKRSW(NMe-Tyr)WP | 95,5       | 1190,6  |

El ensayo de fosforilación se realizó según se describe en el Ejemplo 2, y se obtuvieron valores de inhibición de la fosforilación entre 83 y 90%, lo que confirmó la capacidad de dichos péptidos de inhibir la fosforilación mediada por CK2 en la proteína E7 del VPH-16.

En resumen, los polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56 son más potentes que el péptido CIGB-300, en cuanto a su capacidad de inhibir la proliferación celular, en particular fue sorprendente su actividad inhibitoria en las líneas de cáncer de vejiga (MGH-U3 y MGH-U4). Además, estos péptidos son lineales, de menor tamaño, y químicamente más estables, lo que trae indudables ventajas desde el punto de vista productivo.

**Ejemplo 7. Efecto antitumoral de polipéptido inhibidor de la fosforilación por CK2 en un modelo de tumor humano de vejiga implantado en ratones atímicos.**

Para estos ensayos se utilizaron ratones BalbC atímicos, de sexo femenino, de entre 6 y 8 semanas de nacidos. Se emplearon células MGH-U3, procedentes de carcinoma de células de vejiga. Para la implantación del tumor en este modelo, las células fueron resuspendidas en PBS, a una concentración de 1 000 000 células por mililitro. La suspensión celular fue inoculada por vía subcutánea en la cavidad abdominal de los animales. La administración del polipéptido E17P01 (identificado como SEQ ID NO: 51) o del CIGB-300 se inició 5 días después de inoculadas las células tumorales, y continuó durante 5 días consecutivos, por vía intraperitoneal. El polipéptido y el péptido se disolvieron en PBS. La dosis administrada fue de 20 µg, que se corresponde con 1 mg/kg de peso. A diferentes tiempos, se midió el volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>), como parámetro para evaluar el efecto antitumoral del polipéptido. Como se observa en la Figura 10, el polipéptido E17P01 mostró su capacidad de inhibir la progresión del tumor, que fue mayor que la observada para el CIGB-300. Estos resultados evidenciaron la eficacia antitumoral del polipéptido identificado como SEQ ID NO: 51 en un modelo de tumores humanos implantados en animales de experimentación.

**REIVINDICACIONES****PÉPTIDOS LINEALES QUE INHIBEN LA FOSFORILACIÓN MEDIADA POR CK2 Y  
COMPOSICIONES QUE LOS COMPRENDEN**

1. Péptido lineal que inhibe la fosforilación mediada por la enzima Caseína Kinasa 2 (CK2) que se caracteriza porque posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 62.
2. Polipéptido que comprende el péptido lineal que inhibe la fosforilación mediada por la enzima Caseína Kinasa 2 (CK2) de la reivindicación 1 y un péptido de penetración intracelular.
3. El polipéptido de la reivindicación 2 donde el péptido de penetración intracelular es un péptido proveniente de la proteína Tat1 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
4. El polipéptido de la reivindicación 2 donde el péptido de penetración intracelular posee una secuencia de aminoácidos que se identifica como SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66.
5. El polipéptido de la reivindicación 4 que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 51 - SEQ ID NO: 56.
6. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido lineal que inhibe la fosforilación mediada por Caseína Kinasa 2 (CK2) de la reivindicación 1 o un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 que es formulada para su administración por ruta sistémica, intratumoral, oral o mucosal.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 que es útil para el tratamiento de tumores sólidos o líquidos.
9. Uso del péptido lineal que inhibe la fosforilación mediada por Caseína Kinasa 2 (CK2) de la reivindicación 1 o del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 para la fabricación de un medicamento.
10. El uso según la reivindicación 9 donde el medicamento se emplea en el tratamiento de tumores sólidos o líquidos.

11. Un método de tratamiento de tumores sólidos o líquidos en un individuo que lo necesita que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 6.
12. El método de tratamiento de la reivindicación 11 donde el tumor sólido es de pulmón, cervix, laringe, páncreas, o vejiga.
13. El método de tratamiento de la reivindicación 11 donde el tumor líquido es leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda tipo T o leucemia mieloide aguda.

Figura 1

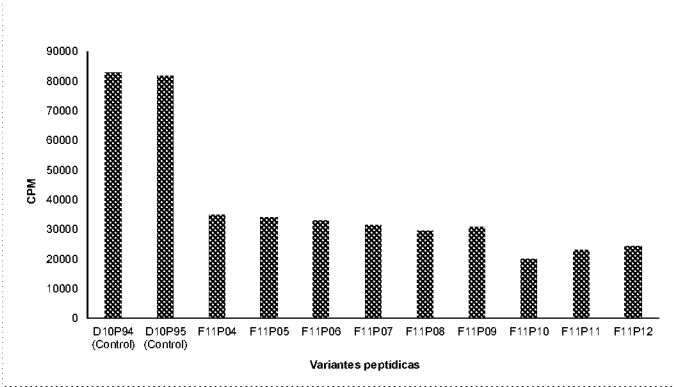


Figura 2

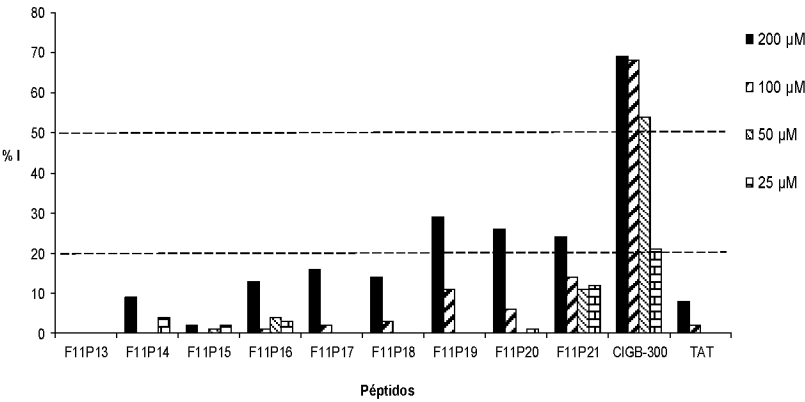
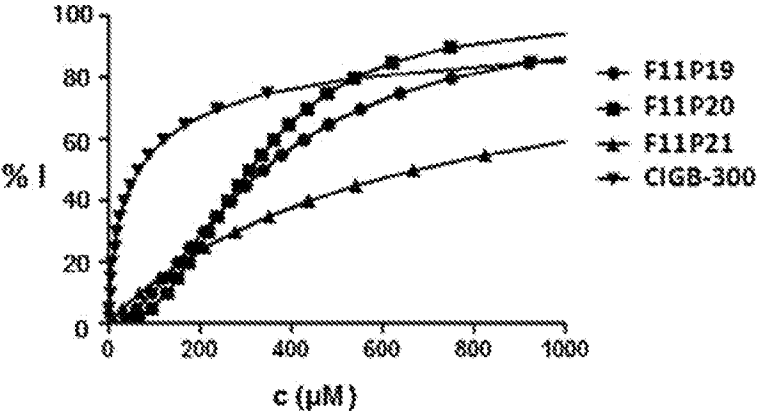


Figura 3



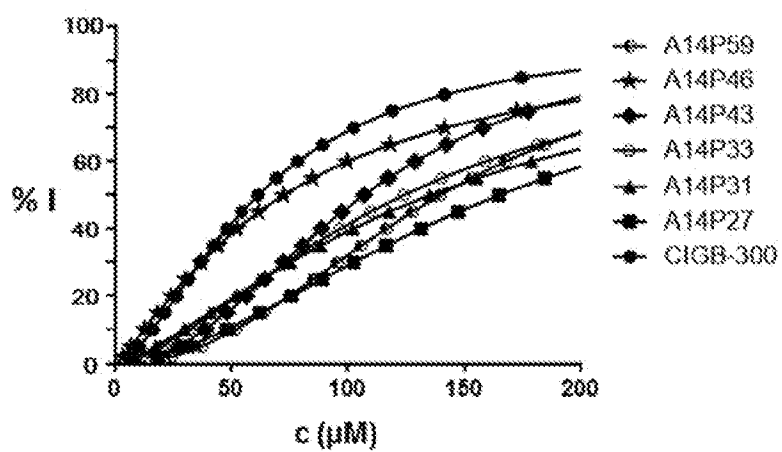


Figura 6

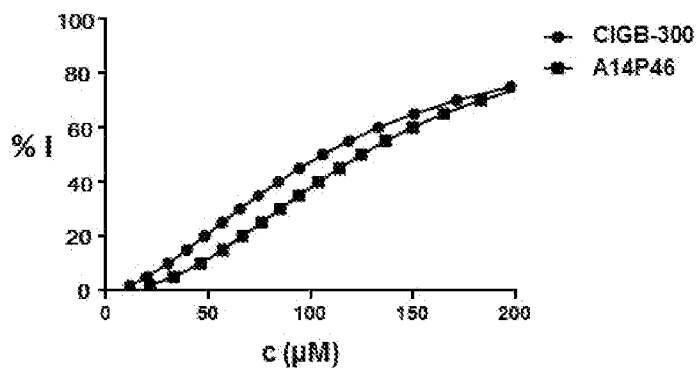


Figura 7

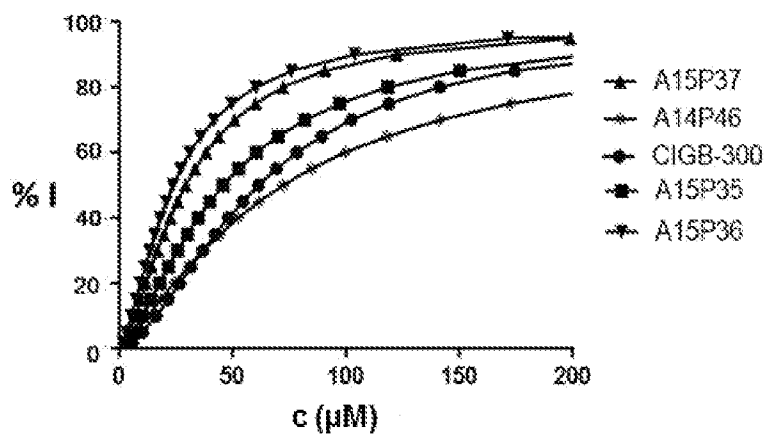


Figura 8

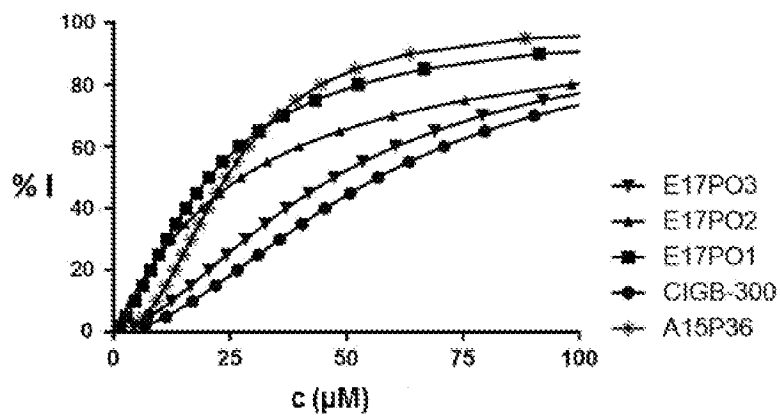


Figura 9

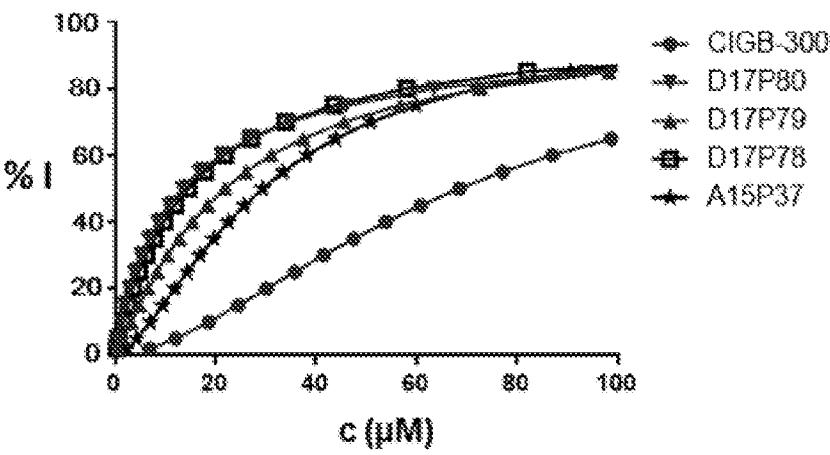
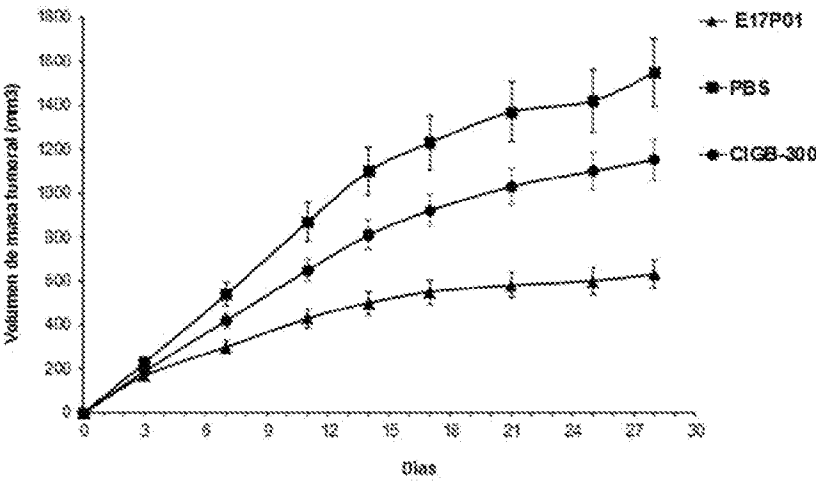


Figura 10



## Solicitud internacional N°

PCT/CU2022/050007

INV. C12N9/12 A61K38/00 A61P35/00 C07K7/06

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N    A61P    A61K    C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

### C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría*      | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevante para las reivindicaciones N° |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <p><b>A</b></p> | <p><b>ZANIN SOFIA ET AL: "Chimeric peptides as modulators of CK2-dependent signaling: Mechanism of action and off-target effects",</b><br/> <b>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS &amp; PROTEOMICS, ELSEVIER, NETHERLANDS,</b><br/> <b>vol. 1854, no. 10,</b><br/> <b>30 Abril 2015 (2015-04-30), páginas 1694-1707, XP029273198,</b><br/> <b>ISSN: 1570-9639, DOI:</b><br/> <b>10.1016/J.BBAPAP.2015.04.026</b><br/> <b>Todo el documento</b></p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: right;">-/--</p> | <p><b>1-13</b></p>                     |

|                                                                                                      |                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos | <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| *<br>“A”<br>“E”<br>“L”<br>“O”<br>“P” | <p>Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> | <p>“T”<br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/>“X”<br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/>“Y”<br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/><br/>“&amp;”</p> | <p>documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

23 Novembre 2022

|                                                           |
|-----------------------------------------------------------|
| Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional |
|-----------------------------------------------------------|

08/12/2022

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

|                        |
|------------------------|
| Funcionario autorizado |
|------------------------|

Nº de fax

Nº de teléfono

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2022/050007

C (continuación).

## DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| A          | <p><b>Yasser Perera ET AL: "Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization",</b><br/> <b>Journal of Peptide Science, vol. 18, n.4,</b><br/> <b>8 Marzo 2012 (2012-03-08), páginas 215-223,</b><br/> <b>XP055710440,</b><br/> <b>DOI: 10.1002/psc.1432</b><br/> <b>Tomado de Internet:</b><br/> <b>URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002%2Fpsc.1432</b><br/> <b>[Tomado en 2020-07-01]</b><br/> <b>Todo el documento</b><br/> <b>Resumen, reivindicaciones, Figura 1</b></p> <p>-----</p> | 1-13                                   |
| A          | <p><b>WO 03/054002 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU] ET AL.)</b><br/> <b>3 Julio 2003 (2003-07-03)</b><br/> <b>Todo el documento</b><br/> <b>[0025], reivindicaciones</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1-13                                   |
| A          | <p><b>WO 2006/020207 A2 (UNIV CINCINNATI [US]; BALASUBRAMANIAM AMBIKAIPAKAN [US])</b><br/> <b>23 Febrero 2006 (2006-02-23)</b><br/> <b>SEQ ID NO: 10, reivindicaciones 15</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1-13                                   |
| A          | <p><b>WO 2006/050611 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; HANCOCK ROBERT E W [CA]; HILPERT KAI [CA])</b><br/> <b>18 Mayo 2006 (2006-05-18)</b><br/> <b>SEQ ID NO: 1118, reivindicaciones</b><br/> <b>-&amp; DATABASE Geneseq [Online]</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1-13                                   |
| L          | <p><b>7 Septiembre 2006 (2006-09-07),</b><br/> <b>"Bactenecin derived antimicrobial peptide, Bac1288.",</b><br/> <b>XP002807909,</b><br/> <b>Tomado de EBI accession no.</b><br/> <b>GSP:AEI80435</b><br/> <b>Database accession no. AEI80435</b><br/> <b>L=Sequence information;</b><br/> <b>sequence</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                             |                                        |
| A          | <p><b>DATABASE ENA [Online]</b><br/> <b>EMBL;</b><br/> <b>28 Febrero 2021 (2021-02-28) ,</b><br/> <b>Lin, Y et al.: "Rhodospirillales bacterium (bioreactor metagenome)</b><br/> <b>carboxylesterase/lipase family protein",</b><br/> <b>XP002807910,</b><br/> <b>Tomado de ENA accession no.</b><br/> <b>MBL8834019</b><br/> <b>Database accession no. MBL8834019</b><br/> <b>sequence</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                            | 1-13                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

**PCT/CU2022/050007**

## Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
  - a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
    - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
    - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen.
  - b. ☐ presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13<sup>ter</sup>.1.a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
  - c. ☐ Presentada con posterioridad a la fecha de presentación exclusivamente a los fines de la búsqueda internacional:
    - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13<sup>ter</sup>.1.a)).
    - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13<sup>ter</sup>.1.b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente
3. Comentarios adicionales:

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2022/050007

|               |    |            |    |             |    |            |
|---------------|----|------------|----|-------------|----|------------|
| WO 03054002   | A1 | 03-07-2003 | AR | 037825      | A1 | 09-12-2004 |
|               |    |            | AT | 520704      | T  | 15-09-2011 |
|               |    |            | AU | 2002361922  | A1 | 09-07-2003 |
|               |    |            | BR | 0215213     | A  | 07-12-2004 |
|               |    |            | CA | 2471110     | A1 | 03-07-2003 |
|               |    |            | CN | 1620464     | A  | 25-05-2005 |
|               |    |            | CR | 7361        | A  | 18-02-2005 |
|               |    |            | CU | 23225       | A1 | 30-08-2007 |
|               |    |            | DK | 1491553     | T3 | 05-12-2011 |
|               |    |            | DO | P2002000548 | A  | 30-06-2003 |
|               |    |            | EP | 1491553     | A1 | 29-12-2004 |
|               |    |            | EP | 2383282     | A1 | 02-11-2011 |
|               |    |            | ES | 2371239     | T3 | 28-12-2011 |
|               |    |            | HK | 1068901     | A1 | 06-05-2005 |
|               |    |            | HN | 2002000377  | A  | 10-04-2003 |
|               |    |            | HR | P20040663   | A2 | 31-08-2005 |
|               |    |            | IL | 162633      | A  | 28-02-2011 |
|               |    |            | IS | 7320        | A  | 16-06-2004 |
|               |    |            | JP | 4056476     | B2 | 05-03-2008 |
|               |    |            | JP | 2005525090  | A  | 25-08-2005 |
|               |    |            | KR | 20050002811 | A  | 10-01-2005 |
|               |    |            | MA | 27868       | A1 | 02-05-2006 |
|               |    |            | MX | PA04005832  | A  | 13-09-2004 |
|               |    |            | MY | 133530      | A  | 30-11-2007 |
|               |    |            | NO | 333259      | B1 | 22-04-2013 |
|               |    |            | NZ | 534170      | A  | 31-08-2006 |
|               |    |            | PE | 20030861    | A1 | 02-12-2003 |
|               |    |            | PT | 1491553     | E  | 25-11-2011 |
|               |    |            | RU | 2290410     | C2 | 27-12-2006 |
|               |    |            | SI | 1491553     | T1 | 30-12-2011 |
|               |    |            | TN | SN04114     | A1 | 01-06-2006 |
|               |    |            | UA | 81403       | C2 | 10-01-2008 |
|               |    |            | US | 2006233742  | A1 | 19-10-2006 |
|               |    |            | US | 2009005294  | A1 | 01-01-2009 |
|               |    |            | UY | 27602       | A1 | 30-04-2003 |
|               |    |            | WO | 03054002    | A1 | 03-07-2003 |
|               |    |            | ZA | 200405514   | B  | 30-03-2005 |
| -----         |    |            |    |             |    |            |
| WO 2006020207 | A2 | 23-02-2006 | US | 2008221038  | A1 | 11-09-2008 |
|               |    |            | WO | 2006020207  | A2 | 23-02-2006 |
| -----         |    |            |    |             |    |            |
| WO 2006050611 | A1 | 18-05-2006 | CA | 2629751     | A1 | 18-05-2006 |
|               |    |            | EP | 1824976     | A1 | 29-08-2007 |
|               |    |            | EP | 2116603     | A2 | 11-11-2009 |
|               |    |            | US | 2008207522  | A1 | 28-08-2008 |
|               |    |            | WO | 2006050611  | A1 | 18-05-2006 |
| -----         |    |            |    |             |    |            |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/CU2022/050007

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>INV. C12N9/12 A61K38/00 A61P35/00 C07K7/06</b><br><b>ADD.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br><b>C12N A61P A61K C07K</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br><b>EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No.                              |
| <b>A</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>ZANIN SOFIA ET AL: "Chimeric peptides as modulators of CK2-dependent signaling: Mechanism of action and off-target effects",</b><br><b>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) -</b><br><b>PROTEINS &amp; PROTEOMICS, ELSEVIER,</b><br><b>NETHERLANDS,</b><br><b>vol. 1854, no. 10,</b><br><b>30 April 2015 (2015-04-30), pages</b><br><b>1694-1707, XP029273198,</b><br><b>ISSN: 1570-9639, DOI:</b><br><b>10.1016/J.BBAPAP.2015.04.026</b><br><b>the whole document</b><br><div style="text-align: center;">-----<br/>-/-</div> | <b>1-13</b>                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| * Special categories of cited documents :<br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Date of mailing of the international search report |
| <b>23 November 2022</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>08/12/2022</b>                                  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Authorized officer<br><br><b>Madruga, Jaime</b>    |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2022/050007

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
| A                                                    | <p>Yasser Perera ET AL: "Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization",<br/>Journal of Peptide Science, vol. 18, n.4,<br/>8 March 2012 (2012-03-08), pages 215-223,<br/>XP055710440,<br/>DOI: 10.1002/psc.1432<br/>Retrieved from the Internet:<br/>URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002%2Fpsc.1432<br/>[retrieved on 2020-07-01]<br/>the whole document<br/>Abstract, claims, Figure 1</p> <p>-----</p> | 1-13                  |
| A                                                    | <p>WO 03/054002 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU] ET AL.)<br/>3 July 2003 (2003-07-03)<br/>the whole document<br/>[0025], claims</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1-13                  |
| A                                                    | <p>WO 2006/020207 A2 (UNIV CINCINNATI [US]; BALASUBRAMANIAM AMBIKAIPAKAN [US])<br/>23 February 2006 (2006-02-23)<br/>SEQ ID NO: 10, claim 15</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1-13                  |
| A                                                    | <p>WO 2006/050611 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; HANCOCK ROBERT E W [CA]; HILPERT KAI [CA]) 18 May 2006 (2006-05-18)<br/>SEQ ID NO: 1118, claims</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1-13                  |
| L                                                    | <p>-&amp; DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>7 September 2006 (2006-09-07),<br/>"Bactenecin derived antimicrobial peptide, Bac1288.",<br/>XP002807909,<br/>retrieved from EBI accession no.<br/>GSP:AEI80435<br/>Database accession no. AEI80435<br/>L=Sequence information;<br/>sequence</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                   |                       |
| A                                                    | <p>DATABASE ENA [Online]<br/>EMBL;<br/>28 February 2021 (2021-02-28),<br/>Lin, Y et al.: "Rhodospirillales bacterium (bioreactor metagenome)<br/>carboxylesterase/lipase family protein",<br/>XP002807910,<br/>retrieved from ENA accession no.<br/>MBL8834019<br/>Database accession no. MBL8834019<br/>sequence</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                         | 1-13                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CU2022/050007

### Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a. ☒ forming part of the international application as filed.
  - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2022/050007

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date |               | Patent family<br>member(s) |            | Publication<br>date |               |  |            |
|-------------------------------------------|----|---------------------|---------------|----------------------------|------------|---------------------|---------------|--|------------|
| WO 03054002                               | A1 | 03-07-2003          | AR            | 037825 A1                  |            | 09-12-2004          |               |  |            |
|                                           |    |                     | AT            | 520704 T                   |            | 15-09-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | AU            | 2002361922 A1              |            | 09-07-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | BR            | 0215213 A                  |            | 07-12-2004          |               |  |            |
|                                           |    |                     | CA            | 2471110 A1                 |            | 03-07-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | CN            | 1620464 A                  |            | 25-05-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | CR            | 7361 A                     |            | 18-02-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | CU            | 23225 A1                   |            | 30-08-2007          |               |  |            |
|                                           |    |                     | DK            | 1491553 T3                 |            | 05-12-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | DO            | P2002000548 A              |            | 30-06-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | EP            | 1491553 A1                 |            | 29-12-2004          |               |  |            |
|                                           |    |                     | EP            | 2383282 A1                 |            | 02-11-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | ES            | 2371239 T3                 |            | 28-12-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | HK            | 1068901 A1                 |            | 06-05-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | HN            | 2002000377 A               |            | 10-04-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | HR            | P20040663 A2               |            | 31-08-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | IL            | 162633 A                   |            | 28-02-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | IS            | 7320 A                     |            | 16-06-2004          |               |  |            |
|                                           |    |                     | JP            | 4056476 B2                 |            | 05-03-2008          |               |  |            |
|                                           |    |                     | JP            | 2005525090 A               |            | 25-08-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | KR            | 20050002811 A              |            | 10-01-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | MA            | 27868 A1                   |            | 02-05-2006          |               |  |            |
|                                           |    |                     | MX            | PA04005832 A               |            | 13-09-2004          |               |  |            |
|                                           |    |                     | MY            | 133530 A                   |            | 30-11-2007          |               |  |            |
|                                           |    |                     | NO            | 333259 B1                  |            | 22-04-2013          |               |  |            |
|                                           |    |                     | NZ            | 534170 A                   |            | 31-08-2006          |               |  |            |
|                                           |    |                     | PE            | 20030861 A1                |            | 02-12-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | PT            | 1491553 E                  |            | 25-11-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | RU            | 2290410 C2                 |            | 27-12-2006          |               |  |            |
|                                           |    |                     | SI            | 1491553 T1                 |            | 30-12-2011          |               |  |            |
|                                           |    |                     | TN            | SN04114 A1                 |            | 01-06-2006          |               |  |            |
|                                           |    |                     | UA            | 81403 C2                   |            | 10-01-2008          |               |  |            |
|                                           |    |                     | US            | 2006233742 A1              |            | 19-10-2006          |               |  |            |
|                                           |    |                     | US            | 2009005294 A1              |            | 01-01-2009          |               |  |            |
|                                           |    |                     | UY            | 27602 A1                   |            | 30-04-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | WO            | 03054002 A1                |            | 03-07-2003          |               |  |            |
|                                           |    |                     | ZA            | 200405514 B                |            | 30-03-2005          |               |  |            |
|                                           |    |                     | -----         |                            |            |                     |               |  |            |
|                                           |    |                     | WO 2006020207 | A2                         | 23-02-2006 | US                  | 2008221038 A1 |  | 11-09-2008 |
|                                           |    |                     |               |                            |            | WO                  | 2006020207 A2 |  | 23-02-2006 |
| -----                                     |    |                     |               |                            |            |                     |               |  |            |
| WO 2006050611                             | A1 | 18-05-2006          | CA            | 2629751 A1                 |            | 18-05-2006          |               |  |            |
|                                           |    |                     | EP            | 1824976 A1                 |            | 29-08-2007          |               |  |            |
|                                           |    |                     | EP            | 2116603 A2                 |            | 11-11-2009          |               |  |            |
|                                           |    |                     | US            | 2008207522 A1              |            | 28-08-2008          |               |  |            |
|                                           |    |                     | WO            | 2006050611 A1              |            | 18-05-2006          |               |  |            |
| -----                                     |    |                     |               |                            |            |                     |               |  |            |