(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 981 111**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
A61K 47/64	(2007.01)
A61K 47/62	(2007.01)
A61K 31/337	(2006.01)
A61K 33/24	(2009.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C07K 14/72	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2020** **PCT/US2020/032638**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2020** **WO20232095**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2020** **E 20804866 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3969027**

(54) Título: **Polipéptidos para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

16.05.2019 US 201962848980 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2024

(73) Titular/es:

SAINT JOSEPH'S UNIVERSITY (100.0%)
5600 City Avenue
Philadelphia, PA 19131, US

(72) Inventor/es:

JASMIN, JEAN-FRANCOIS;
CHILEWSKI, SHANNON y
MERCIER, ISABELLE

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

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

ES 2 981 111 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos para el tratamiento del cáncer

Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad en virtud del 35 U.S.C. § 119(e) respecto de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 62/848.980, presentada el 16 de mayo de 2019.

Antecedentes de la invención

El cáncer se caracteriza por un crecimiento y una proliferación celular anormales e incontrolados, que pueden ir acompañados de metástasis celular. El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y la mayoría de las muertes por cáncer se deben a cánceres pulmonares, mamarios, colorrectales, de estómago, de cerebro y de hígado.

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en EE. UU., tanto entre hombres como entre mujeres. Los cánceres de pulmón se clasifican a grandes rasgos en dos tipos: cánceres de pulmón microcíticos (CPM) y cánceres de pulmón no microcíticos (CPNM).

El cáncer de mama (CM) abarca muchos subtipos distintos con patologías y ramificaciones clínicas únicas. El cáncer de mama triple negativo (CMTN), que representa entre el 15-20 % de todos los casos de cáncer de mama, se caracteriza por la ausencia de expresión del receptor de estrógenos (ER) o del receptor de progesterona (RP) y la ausencia de sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Este tipo de CM suele ser más agresivo y resistente a los tratamientos endocrinológicos, dando lugar a un peor pronóstico con mayores tasas de recidiva, metástasis y muerte. Actualmente no se dispone de tratamientos dirigidos para el CMTN.

Aunque se han logrado avances significativos en el tratamiento del cáncer, la quimioterapia y la radioterapia son las únicas opciones de tratamiento disponibles para las pacientes con CMTN. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de nuevas composiciones que puedan utilizarse para tratar el CMTN, así como otros tipos de cáncer como el de cerebro y el de pulmón. La presente invención aborda esta necesidad.

Breve sumario de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido que consiste esencialmente en, o que consiste en los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.3 del coactivador de la proteína activadora-1 y receptor de estrógeno (CAPER) (SEQ ID NO: 1) o los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.4 de CAPER (SEQ ID NO: 2) opcionalmente fusionado a un péptido penetrante celular, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente.

En un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos, así como composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de dichos polipéptidos, así como kits que comprenden al menos uno de dichos polipéptidos y/o composiciones farmacéuticas, y un material con instrucciones de uso. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende, consiste esencialmente en o consiste en los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.3 del coactivador de la proteína activadora-1 y receptor de estrógenos (CAPER) (SEQ ID NO: 1). En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende, consiste esencialmente en o consiste en los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.4 de CAPER (SEQ ID NO: 2). En determinadas realizaciones, el polipéptido está derivatizado en al menos un resto de aminoácido, en donde la derivatización comprende metilación, amidación o acetilación. En determinadas realizaciones, el polipéptido se fusiona a un péptido penetrante celular.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de realizaciones específicas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones específicas. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

Las FIG. 1A-1G muestran que los péptidos HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER se unen a c-Jun con afinidad nM y alteran la unión de CAPER recombinante de longitud completa. Las FIG. 1A-1E son un conjunto de gráficos que muestran curvas de unión probadas con péptidos de CAPER, CAPER de longitud completa y controles de péptidos. La FIG. 1F es un gráfico que muestra curvas de unión mediante BLI. Se conjugaron puntas reactivas con amina con un anticuerpo anti-marcador de HIS, y a continuación, se unió c-Jun marcado con his a las puntas. A continuación, las puntas se saturaron con los péptidos de CAPER o los controles. En la FIG. 1G se comparan las señales generadas con la unión de CAPER recombinante de longitud completa al receptor de c-Jun sin los péptidos presentes. n= 3, p <0,05.

Las FIG. 2A-2D muestran que los péptidos de CAPER entran en las células y en el núcleo. Las FIG. 2A-2C son

imágenes de células MDA-MB-231, BT549 y MCF10A tratadas con DMSO, péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER y péptido de CAPER desordenado durante 1 h. A continuación, las células se tiñeron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor para visualizar los péptidos biotinilados. Las células también se tiñeron con colorante DAPIDNA. Las células se visualizaron con un aumento de 10X utilizando cubos fluorescentes DAPI y GFP en un dispositivo para obtención de imágenes de células EVOS. En la FIG. 2D, se trataron las células MDA-MB-231, BT549 y MCF10A con DMSO, péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER y péptido de CAPER desordenado durante 1 h, a continuación se realizó el fraccionamiento para obtener proteínas de las fracciones citosólica y nuclear. A continuación, se realizó una transferencia de Western con estreptavidina para identificar los péptidos biotinilados. Los controles de carga utilizados fueron GAPDH (citosol) y lamina A (nuclear).

Las FIG. 3A-3B son imágenes que muestran que el tratamiento de líneas celulares de CMTN con péptidos de CAPER da como resultado un menor número de células. La FIG. 3A muestra gráficos de recuentos celulares de células MDA-MB-23 1 y BT549 tratadas durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER y péptido de CAPER desordenado 20 μM, en comparación con los controles de DMSO y de solo TAT. ****p <0,0001, Células MDA-MB-231 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER n=5, células BT549 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER, n=4, ambas líneas celulares tratadas con el péptido desordenado, n=3. La FIG. 3B muestra imágenes de células MDA-MB-231 y BT549 tratadas con DMSO, solo control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER y péptido HCC1.4 de CAPER 20 μM, aumento de 10X utilizando un generador de imágenes de células EVOS.

Las FIG. 4A-4B ilustran que el tratamiento de líneas celulares de CMTN con péptidos de CAPER produce un aumento de la apoptosis. La FIG. 4A muestra un conjunto de gráficos que ilustran los resultados del ensayo de caspasa 3/7 para células MDA-MB-231 y BT549 tratadas durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER, y péptido desordenado 20 μM en comparación con los controles de DMSO y solo de TAT. ****p <0,0001, ***p <0,001, **p <0,005, # p <0,05, Células MDA-MB-231 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER n=5, células BT549 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER, n=4, ambas líneas celulares tratadas con el péptido desordenado, n=3. La FIG. 4B muestra los resultados del ensayo de caspasa 3/7 mostrando poblaciones vivas, en apoptosis temprana, muertas por apoptosis y muertas después del tratamiento con DMSO, control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER y el péptido de CAPER desordenado.

Las FIG. 5A-5B ilustran que el tratamiento de líneas celulares de CMTN con péptidos de CAPER produce un aumento de la apoptosis. La FIG. 5A muestra un conjunto de gráficos que ilustran los resultados del ensayo de anexina V para células MDA-MB-231 y BT549 tratadas durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER, y péptido de CAPER desordenado 20 μM en comparación con los controles de DMSO y solo de TAT. ****p <0,0001, ***p <0,001, **p <0,005, *p <0,01, # p <0,05, Células MDA-MB-231 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER n=5, células BT549 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER, n=4, ambas líneas celulares tratadas con el péptido de CAPER desordenado n=3. La FIG. 5B muestra los resultados del ensayo de anexina V mostrando poblaciones vivas, en apoptosis temprana, muertas por apoptosis tardía y muertas después del tratamiento con DMSO, control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER y el péptido de CAPER desordenado.

Las FIG. 6A-6B ilustran que el tratamiento de células MDA-MB-231 y BT549 sincronizadas con nocodazol con péptidos de CAPER no muestra ningún efecto sobre el ciclo celular. La FIG. 6A muestra los gráficos de los resultados del ensayo de ciclo celular para las células MDA-MB-231 y BT-549 tratadas durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER, y péptido de CAPER desordenado 20 μM en comparación con los controles de DMSO y solo de TAT. p = no significativo, n=3-5 por grupo. La FIG. 6B muestra los resultados del ensayo del ciclo celular que muestra las poblaciones en G1, S y G2/M después del tratamiento con DMSO, control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER y péptido de CAPER desordenado.

La FIG. 7 muestra el análisis por transferencia de Western después del tratamiento de líneas celulares de CMTN con péptidos de CAPER. Células MDA-MB-231 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER durante 7 días. Cada proteína se dividió por el control de carga GAPDH y luego se normalizó con el control de TAT tratado, que se normalizó al 100 %. Los datos representan la media de tres transferencias de Western independientes. ****p <0,0001, ***p <0,001, **p <0,005, *p <0,01, #p <0,05.

La FIG. 8 muestra gráficos que ilustran que el tratamiento de la línea celular no tumorigénica MCF10A no muestra cambios en el recuento celular con el tratamiento con péptidos de CAPER. Recuentos de células MCF10A tratadas durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER y péptido HCC1.4 de CAPER 20 μM en comparación con los controles tratados con DMSO y TAT, p = no significativo, n=3.

Las FIG. 9A-9B ilustran que el tratamiento de la línea celular epitelial mamaria normal MCF10A con péptidos de CAPER no produce ningún cambio en la apoptosis. La FIG. 9A muestra los resultados del ensayo de anexina V para células MCF10A tratadas durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER y péptido HCC1.4 de CAPER 20 μM en comparación con los controles de DMSO y solo TAT, Células MDA-MB-231 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER n=5, células BT549 tratadas con el péptido HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER, n=4, ambas líneas celulares tratadas con el péptido de CAPER desordenado n=3. La FIG. 9B muestra los resultados del ensayo de anexina V mostrando poblaciones vivas, en apoptosis temprana, muertas por apoptosis tardía y muertas después del tratamiento

con DMSO, control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER y péptido HCC1.4 de CAPER.

Las FIG. 10A-10C muestran que los péptidos HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER se unen a ERα con afinidad nM y alteran la unión de CAPER recombinante de longitud completa. La FIG. 10A son gráficos que muestran curvas de unión probadas con péptidos de CAPER, CAPER de longitud completa y controles de péptidos. La FIG. 10B es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de CAPER recombinante de longitud completa a ERα. En la FIG. 10C se comparan las señales generadas con la unión de CAPER recombinante de longitud completa a ERα.

La FIG. 11 muestra gráficos de recuentos de células MCF7 tratadas con péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER 20 μM comparados con los controles de DMSO y TAT.

Las FIG. 12A-12B son gráficos que muestran los resultados del ensayo de caspasa 3/7. La FIG. 12A muestra los resultados de células MCF7 tratadas con péptido HCC1.3 de CAPER, péptido HCC1.4 de CAPER 20 μM comparados con los controles de DMSO y TAT. La FIG. 12B muestra los resultados del ensayo de caspasa 3/7 mostrando poblaciones vivas, en apoptosis temprana, muertas por apoptosis y muertas después del tratamiento con DMSO, control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER y péptido HCC1.4 de CAPER.

Las FIG. 13A-13B muestran los resultados del ensayo de anexina V. La FIG. 13A muestra los resultados de células MCF7 tratadas con péptido HCC1.3 de CAPER péptido HCC1.4 de CAPER 20 μM comparados con los controles de DMSO y solo de TAT. La FIG. 13B muestra los resultados de poblaciones vivas, en apoptosis temprana, muertas por apoptosis tardía y muertas después del tratamiento con DMSO, control de TAT, péptido HCC1.3 de CAPER y péptido HCC1.4 de CAPER.

La FIG. 14 muestra que el tratamiento de células de cáncer cerebral humano (U-87MG) con péptidos de CAPER 15 μM produjo una reducción de la supervivencia y un aumento de la apoptosis de las células.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento de que un polipéptido relacionado con el coactivador de la proteína activadora-1 y el receptor de estrógenos (CAPER) puede utilizarse como un agente terapéutico novedoso para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. CAPER, también conocida como proteína de unión al ARN-39 (Rbm39) y carcinoma hepatocelular-1.4 (HCC1.4), es un conocido regulador de la transcripción mediada por receptores de hormonas esteroideas y del corte y empalme alternativo. Por sus actividades coactivadoras, CAPER interactúa con los receptores de estrógenos ERα y ERβ, el receptor de progesterona (RP), y la proteína activadora-1 (AP-1), uniéndose al componente c-Jun específicamente del dímero AP-1.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los péptidos CAPER muestran al menos dos posibles modos de acción: 1) una disminución de c-Jun fosforilado, dando lugar a una modulación de las vías de ART y NF-κB con una disminución de la proteína pro-supervivencia Bcl-2; y/o 2) disminución de las proteínas asociadas a la reparación del ADN, lo que conduce a un deterioro de la función de reparación del ADN.

Definiciones

Como se usan en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen, en general, el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura y los procedimientos de laboratorio que se usan en el presente documento, en cultivo celular, genética molecular, oncología y química de péptidos son las bien conocidas y comúnmente empleadas en la técnica.

Como se usan en el presente documento, los artículos "un" y "uno/a" hacen referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Como se usa en el presente documento, un experto en la materia entiende el significado del término "aproximadamente" y varía hasta cierto punto según el contexto en el que se utilice. Como se usa en el presente documento, cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, el término "aproximadamente" pretende abarcar variaciones de ± 20 % o ± 10 %, más preferentemente ± 5 %, incluso más preferentemente ± 1 %, y aún más preferentemente ± 0,1 % del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se define como una enfermedad caracterizada por la proliferación rápida y no controlada de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del organismo. Algunos ejemplos de los diversos

cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. Un tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos pueden clasificarse en tres grandes tipos. Los tumores malignos que surgen de estructuras epiteliales se denominan carcinomas, los tumores malignos que se originan en tejidos conjuntivo como el músculo, cartílago, grasa o hueso se denominan sarcomas, y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de células sanguíneas), incluidos los componentes del sistema inmunitario, se denominan leucemias y linfomas. Otros tumores incluyen, entre otros, la neurofibromatosis.

Como se usa en el presente documento, un "trastorno" en un animal es un estado físico en el que el animal puede mantener la homeostasia, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de un compuesto se utilizan indistintamente para hacer referencia a la cantidad del compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso para el paciente al que se administra el compuesto.

Como se usa en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión, que puede utilizarse para comunicar la utilidad del compuesto y/o composición de la invención en el kit para tratar o prevenir las enfermedades o trastornos mencionados en el presente documento. Opcionalmente o como alternativa, el material de formación puede describir uno o más métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material de formación del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un contenedor, que contenga el compuesto químico y/o la composición de la invención o se envíe junto con un contenedor, que contiene la composición química y/o la composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado desde el recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto se utilicen cooperativamente por el receptor.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, tal como un vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye una sal farmacéuticamente aceptable, un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en portar o transportar uno o más compuestos de la presente invención dentro o al paciente, de modo que pueda realizar su función prevista. Típicamente, dichos compuestos son portados o transportados de un órgano o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada sal o vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; solución de tampón de fosfato; diluyente; agente de granulación; lubricante; aglutinante; agente disgregante; agente humectante; emulsionante; agente colorante; agente de liberación; agente de recubrimiento; agente edulcorante; agente aromatizante; agente perfumante; conservante; antioxidante; plastificante; agente gelificante; espesante; endurecedor; agente fijador; agente de suspensión; tensioactivo; humectante; vehículo; estabilizante; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas o cualquier combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye también cualquiera y todos los recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y agentes retardantes de la absorción y similares que son compatibles con la actividad del compuesto y que son fisiológicamente aceptables para el paciente. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de los compuestos administrados preparada a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluidos ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, solvatos, hidratos o clatratos de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil en la invención con otros componentes químicos, tales como vehículos, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. Las múltiples técnicas de administración de un compuesto

incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, oral, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar y tópica.

Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un paciente que no muestra signos de una enfermedad o que muestra únicamente signos tempranos de la enfermedad con el fin de reducir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

La expresión "reducción del crecimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier reducción del crecimiento, la tasa de replicación o la formación de colonias mostrada por una célula neoplásica, una célula cancerosa o un tumor en respuesta a algún agente terapéutico, tratamiento o intervención clínica, como la radiación. Por ejemplo, una célula neoplásica puede mostrar una reducción de la tasa de crecimiento de la célula o de su capacidad para replicarse y formar colonias *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, cuando se implanta como tumor en un animal) en respuesta a la radiación.

La expresión "reducción de la viabilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier reducción de la supervivencia mostrada por una célula neoplásica, una célula cancerosa o un tumor en respuesta a algún agente quimioterápico, tratamiento o intervención clínica, como la radiación. Una célula neoplásica, una célula cancerosa, o un tumor puede mostrar una viabilidad reducida en respuesta a cualquiera de dichas intervenciones mediante la inhibición de la progresión de la célula a lo largo del ciclo celular; ácidos nucleicos, proteínas u otras macromoléculas dañadas en una célula, diferenciación terminal inducida (senescencia), en la que la célula ya no se replica; inhibición de la reparación celular de los ácidos nucleicos; o el aumento de las tasas de muerte celular mediante la inducción de la apoptosis o la "catástrofe mitótica", una forma de necrosis, cuando los niveles de daño en el ADN son superiores a los que pueden repararse eficazmente.

Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un paciente que muestra signos de una patología con el fin de reducir o eliminar dichos signos.

"Tratar", como se usa en el presente documento, significa reducir la frecuencia con la que un paciente experimenta los síntomas, o administrar un agente o compuesto para reducir la intensidad con la que el sujeto o paciente experimenta los síntomas. Un experto habitual en la materia puede determinar una cantidad terapéutica apropiada en cualquier caso individual utilizando experimentación de rutina.

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de la invención pueden presentarse en formato de intervalo. Ha de entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese y, cuando sea apropiado, enteros parciales de los valores numéricos dentro de intervalos. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente divulgados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

En el presente documento se utilizan las siguientes abreviaturas: RE = receptor de estrógenos, HER2 = receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; RP = receptor de progesterona, CMTN = cáncer de mama triple negativo, CAPER = coactivador de la proteína activadora-1 y del receptor de estrógenos, AP-1 = proteína activadora-1, y HCC = carcinoma hepatocelular.

Composiciones

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido para tratar ciertos tipos de cáncer. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede usarse para tratar, prevenir y/o mejorar un cáncer, tal como, entre otros, el cáncer de pulmón, el cáncer cerebral y el cáncer de mama. En realizaciones adicionales, el cáncer de mama es un cáncer de mama triple negativo. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama positivo para estrógenos.

En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.3 de CAPER (SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, el polipéptido consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones más, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.4 de CAPER (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones, el polipéptido consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones más, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, al menos un aminoácido en el polipéptido y/o en el extremo carboxiloterminal y/o en el extremo aminoterminal está metilado, amidado, acetilado y/o sustituido con cualquier otro grupo químico, sin que

esto afecte negativamente a la actividad del polipéptido dentro de los métodos de la invención.

En determinadas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido de fusión, por ejemplo, en donde el polipéptido de la invención se fusiona a un péptido penetrante celular.

En determinadas realizaciones, el péptido penetrante celular es un péptido anfipático. En otras realizaciones, el péptido penetrante celular es un péptido catiónico. En otras realizaciones más, el péptido penetrante celular se proporciona en el presente documento (en donde la minúscula indica la estereoquímica D):

Antennapedia (43-58) SEQ ID NO: 10	RQIKIWFQNRRMKWKK
BAC715-24 SEQ ID NO: 11	PRPLPFPRPG
BMV Gag-(7-25) SEQ ID NO: 12	KMTRAQRRAAARRNRWTAR
BUFORINA II SEQ ID NO: 13	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
CADY SEQ ID NO: 14	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA
CCMV Gag-(7-25) SEQ ID NO: 15	KLRTRAQRRAAARKNKRNTR
Péptido ARF penetrante celular (26-44) SEQ ID NO: 16	H-D-Arg~D-Arg-D~Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-Lys-Phe-Val-Arg-Arg-Ser-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr-Ala-Ser-Cys-Ala-Leu-Ala-Phe-Val-Asn-OH
D-TAT SEQ ID NO: 17	rrrqrrkkr
FHV COAT-(35-49) SEQ ID NO: 18	RRRRNRTRRNRRRVR
hCT (9-32) SEQ ID NO: 19	LGTYTQDFNKFIITFPQTAIGVGAP
Rev del VIH-1 Rev (34-50) SEQ ID NO: 20	TRQARRNRRRRWRERQR
HN-1 SEQ ID NO: 21	TSPLNIHNGQKL
HTLV-II R.ex-(4-16) SEQ ID NO: 22	TRRQRTRRARRNR
K-FGF SEQ ID NO: 23	AAVALLPAVLLALLAP
Ku70 SEQ ID NO: 24	VPMLKPMLKE
MAP SEQ ID NO: 25	KLALKLALHALKAALKLAKLALKLALKALKAALKLA
MPG (Pa) SEQ ID NO: 26	GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRRV
MPG (Pb) SEQ ID NO: 27	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
P22 N-(14-30) SEQ ID NO: 28	NAKTRRHERRRKLAIER
Pen2W2F SEQ ID NO: 29	RQIKIFFQNRRMKFKK
Pep-1 SEQ ID NO: 30	KETWWETWWTEWSQPKKKRRV
Pep-7 SEQ ID NO: 31	SDLWEMMMVSLACQY
plsl-1 SEQ ID NO: 32	RVIRVWFQNKRCKDKK
pVEC SEQ ID NO: 33	LLIILRRRIRKQAHAHSK
R7W SEQ ID NO: 34	RRRRRRRW
RVG-9R	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRKRRRRR

(continuación)

SEQ ID NO: 35	
SAP SEQ ID NO: 36	VRLPPPVRLPPPVRLPPP
Señal de localización nuclear del antígeno T grande de SV-40 SEQ ID NO: 37	CGGGPKKKRKVED
SynB (1) SEQ ID NO: 38	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
TAT (péptido del VIH-I) SEQ ID NO: 39	YGRKKRRQRRR
TAT (VIH-I (48-61)) SEQ ID NO: 40	GRKKRRQRRRPPQQ
TAT (VIH-I (49-57)) SEQ ID NO: 41	RKKRRQRRR
Derivado de TAT: R9-Tat SEQ ID NO: 42	GRRRRRRRRRPPQ
TAT P59W SEQ ID NO: 43	GRKKRRQRRRPWQ
Transportano SEQ ID NO: 44	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
VP-22 SEQ ID NO: 45	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD
p-Antp SEQ ID NO: 46	RQIKIWFQNRRMKWKK
Arg9 SEQ ID NO: 47	R_9

o variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

En determinadas realizaciones, el péptido penetrante celular se fusiona al polipéptido mediante un enlazador.

En determinadas realizaciones, el enlazador comprende cadenas de polietilenglicol (PEG), péptidos y/o ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

En determinadas realizaciones, el enlazador está unido covalentemente al extremo aminoterminal del polipéptido. En otras realizaciones, el extremo carboxiloterminal del enlazador no es GTTG (SEQ ID NO: 48). En otras realizaciones más, el extremo carboxiloterminal del enlazador no es TTG. En otras realizaciones más, el extremo carboxiloterminal del enlazador no es TG. En otras realizaciones más, el extremo carboxiloterminal del enlazador no es G.

En determinadas realizaciones, el enlazador está unido covalentemente al extremo carboxiloterminal del polipéptido. En otras realizaciones, el extremo aminoterminal del enlazador no es TRLS (SEQ ID NO: 49). En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del enlazador no es TRL. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del enlazador no es TR. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del enlazador no es T.

En determinadas realizaciones, el enlazador está unido covalentemente al extremo carboxiloterminal del polipéptido. En otras realizaciones, el extremo aminoterminal del enlazador no es TEAS (SEQ ID NO: 50). En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del enlazador no es TEA. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del enlazador no es TE. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del enlazador no es T.

En determinadas realizaciones, el péptido penetrante celular está unido covalentemente al extremo aminoterminal del polipéptido. En otras realizaciones, el extremo carboxiloterminal del péptido penetrante celular no es GTTG (SEQ ID NO: 48). En otras realizaciones más, el extremo carboxiloterminal del péptido penetrante celular no es TTG. En otras realizaciones más, el extremo carboxiloterminal del péptido penetrante celular no es TG. En otras realizaciones más, el extremo carboxiloterminal del péptido penetrante celular no es G.

En determinadas realizaciones, el péptido penetrante celular está unido covalentemente al extremo carboxiloterminal del polipéptido. En otras realizaciones, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es TRLS (SEQ ID NO: 49). En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es TRL. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es TR. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es T.

En determinadas realizaciones, el péptido penetrante celular está unido covalentemente al extremo carboxiloterminal del polipéptido. En otras realizaciones, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es TEAS (SEQ ID

NO: 50). En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es TEA. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es TE. En otras realizaciones más, el extremo aminoterminal del péptido penetrante celular no es T.

En determinadas realizaciones, el enlazador peptídico comprende aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el enlazador comprende aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 unidades de etilenglicol ($-CH_2CH_2O-$ o $-OCH_2CH_2-$).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención.

Métodos

La divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesite. En determinadas realizaciones, el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención. En otras realizaciones (no reivindicadas), el cáncer incluye cáncer de pulmón, cáncer de mama y/o cáncer de cerebro. En otras realizaciones más, el cáncer de mama es un cáncer de mama triple negativo. En otras realizaciones más, el cáncer de mama es un cáncer de mama positivo para estrógenos.

En ciertas realizaciones de la divulgación (no reivindicadas), el polipéptido de la invención es como se describe en otra parte del presente documento. En otras realizaciones, el polipéptido se une al componente c-Jun de la proteína activadora-1 (AP-1) con una constante de disociación en equilibrio (K_D) en el intervalo de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM. En otras realizaciones más, la unión del polipéptido al componente c-Jun de AP-1 inhibe la unión de la proteína CAPER de longitud completa al componente c-Jun de AP-1. En otras realizaciones más, el polipéptido se une a ERα con una constante de disociación en equilibrio (K_D) en el intervalo de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM. En otras realizaciones más, la unión del polipéptido a ERα inhibe la unión de la proteína CAPER de longitud completa a ERα.

En ciertas realizaciones de la divulgación (no reivindicadas), la administración induce apoptosis preferencialmente en células cancerosas en comparación con células no cancerosas. En determinadas realizaciones, la administración induce daños en el ADN de las células cancerosas. En determinadas realizaciones, su administración no induce daños en el ADN de las células no cancerosas.

En ciertas realizaciones de la divulgación (no reivindicadas), las células cancerosas son células de cáncer de pulmón, células de cáncer de mama y/o células de cáncer de cerebro. En una realización ilustrativa, tras el tratamiento con el polipéptido de la invención, las líneas celulares de CMTN tanto MDA-MD-231 como BT549 muestran una reducción en el número y un aumento de las células apoptóticas sin un cambio significativo en la línea celular no tumorigénica MCF10A.

En ciertas realizaciones de la divulgación (no reivindicadas), el polipéptido se administra como parte de una composición farmacéutica.

En ciertas realizaciones (no reivindicadas), no se administra al paciente ningún agente quimioterápico y/o agente contra la proliferación celular adicional. En determinadas realizaciones, no se administra al paciente ningún agente quimioterápico o agente contra la proliferación celular adicional en una cantidad suficiente para tratar, prevenir y/o mejorar el cáncer en el paciente.

En ciertas realizaciones (no reivindicadas), el método comprende además administrar al paciente al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en radiación, un agente quimioterápico, un agente contra la proliferación celular, un agente de terapia génica y un agente de inmunoterapia. En determinadas realizaciones, el polipéptido y el al menos un compuesto adicional se coadministran al sujeto. En determinadas realizaciones, el polipéptido y el al menos un compuesto adicional están coformulados. En determinadas realizaciones, el al menos un compuesto adicional se selecciona del grupo que consiste en taxotere, ciclofosfamida, paclitaxel, fluorouracilo, doxorrubicina, cicloheximida, olaparib y temozolomida

En ciertas realizaciones (no reivindicadas), la composición se formula como parte de una formulación de liberación prolongada. En otras realizaciones, la composición se administra al sujeto mediante al menos una vía seleccionada del grupo que consiste en inhalación, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, transdérmica, pulmonar, intranasal, bucal, sublingual, oftálmica, intratecal, intravenosa e intragástrica.

En ciertas realizaciones (no reivindicadas), el paciente es un mamífero. En otras realizaciones, el paciente es un ser humano.

Kit

En otro aspecto más, la invención proporciona un kit que comprende una composición que comprende un polipéptido de la invención, y un material instructivo para su uso, en donde el material instructivo comprende instrucciones para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite.

En determinadas realizaciones, la composición es como se describe en otras partes del presente documento. En determinadas realizaciones, el polipéptido es como se describe en otras partes del presente documento.

Terapias de combinación

En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente invención son útiles en los métodos de la presente invención, en combinación con uno o más compuestos adicionales útiles para tratar las enfermedades o trastornos contemplados dentro de la invención. Estos compuestos adicionales pueden comprender compuestos de la presente invención o compuestos, por ejemplo, compuestos disponibles comercialmente, conocidos para tratar, prevenir o reducir los síntomas de las enfermedades o trastornos contemplados dentro de la invención.

Algunos ejemplos no limitantes de compuestos adicionales contemplados dentro de la invención incluyen agentes quimioterápicos, agentes contra la proliferación celular, agentes de terapia génica, agentes inmunoterápicos y radiación. En determinadas realizaciones, los compuestos contemplados dentro de la invención pueden utilizarse en combinación con uno o más compuestos seleccionados de, pero no necesariamente limitados a, el grupo que consiste en taxotere, ciclofosfamida, paclitaxel, fluorouracilo, doxorrubicina, cicloheximida, olaparib y temozolomida. En otras realizaciones, los compuestos contemplados dentro de la invención pueden usarse en combinación con cualquier agente quimioterápico, terapia génica o compuesto inmunoterápico o pauta terapéutica que se conozca en la técnica. En otras realizaciones más, los compuestos contemplados en la invención pueden utilizarse en combinación con compuestos quimioterápicos conocidos para tratar el cáncer y/o radioterapia.

Los compuestos contemplados en la invención pueden administrarse antes, durante, después o durante la administración de cualquier agente terapéutico utilizado en el tratamiento de la enfermedad o trastorno de un paciente.

Un efecto sinérgico se puede calcular, por ejemplo, utilizando métodos adecuados tales como, por ejemplo, la ecuación Sigmoidal-$E_{máx}$ (Holford y Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe y Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326) y la ecuación de la mediana de efecto (Chou y Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55). Cada ecuación mencionada anteriormente se puede aplicar a datos experimentales para generar un gráfico correspondiente para ayudar a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Los gráficos correspondientes asociados a las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, la curva del isobolograma y la curva del índice de combinación, respectivamente.

Administración/Dosificaciones/Formulaciones

La pauta terapéutica puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse al paciente antes o después del inicio de una enfermedad o trastorno. Además, pueden administrarse varias dosis divididas, así como dosis escalonadas, diariamente o secuencialmente, o la dosis puede infundirse continuamente, o puede ser una inyección en embolada. Además, las dosis de las formulaciones terapéuticas pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

La administración de las composiciones útiles dentro de la presente invención a un paciente, preferentemente a un mamífero, más preferentemente un ser humano, puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos, en dosificaciones y durante períodos de tiempo eficaces para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para lograr un efecto terapéutico puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad o trastorno en el paciente; la edad, el sexo y el peso del paciente; y la capacidad del compuesto terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Pueden ajustarse las pautas posológicas para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o se puede reducir proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Un ejemplo no limitante de un intervalo de dosis eficaz para un compuesto terapéutico de la presente invención es de aproximadamente 1 a 5.000 mg/kg de peso corporal/por día. Un experto habitual en la materia puede estudiar los factores relevantes y determinar la cantidad eficaz del compuesto terapéutico sin una experimentación innecesaria.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración concretos, sin ser tóxicos para el paciente.

En particular, el nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto concreto empleado, la hora de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del

tratamiento, otros fármacos, compuestos o materiales usados en combinación con el compuesto, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares, bien conocidos en las técnicas médicas.

Un doctor, por ejemplo, médico o veterinario, que sea un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los compuestos de la presente invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

En realizaciones particulares, es ventajoso formular el compuesto en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las formas farmacéuticas unitarias de la presente invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto terapéutico y del efecto terapéutico o profiláctico concreto que se vaya a lograr y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos/formular dicho compuesto terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente.

En determinadas realizaciones, las composiciones útiles dentro de la invención se formulan usando uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto útil dentro de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, es preferible añadir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico, o polialcoholes, tales como manitol y sorbitol, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede facilitarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

En determinadas realizaciones, las composiciones útiles dentro de la invención se administran al paciente en dosis que varían de una a cinco veces por día o más. En otras realizaciones, las composiciones útiles dentro de la invención se administran al paciente en un intervalo de dosificaciones que incluyen, pero sin limitación, una vez al día, cada dos días, cada tres días a una vez a la semana, y una vez cada dos semanas. Resulta evidente para un experto en la materia que la frecuencia de administración de las diversas composiciones de combinación útiles dentro de la invención varía de un individuo a otro dependiendo de muchos factores que incluyen, pero sin limitación, la edad, la enfermedad o el trastorno que se vaya a tratar, el sexo, la salud general y otros factores. Por tanto, la invención no debe interpretarse como limitada a ningún régimen de dosificación particular y la dosificación precisa y la composición que se administrará a cualquier paciente se determinan por el médico responsable teniendo en cuenta todos los demás factores sobre el paciente.

Los compuestos para la administración pueden encontrarse en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10.000 mg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 9500 mg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 9000 mg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 8500 mg, de aproximadamente 150 µg a aproximadamente 7500 mg, de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 7000 mg, de aproximadamente 3050 µg a aproximadamente 6000 mg, de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5000 mg, de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 4000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 2500 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 2000 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1500 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 75 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg, y cualquier incremento entero o parcial intermedio.

En algunas realizaciones, la dosis de un compuesto es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2500 mg. En algunas realizaciones, una dosis de un compuesto de la presente invención utilizada en composiciones descritas en el presente documento es menos de aproximadamente 10.000 mg, o menos de aproximadamente 8000 mg, o menos de aproximadamente 6000 mg, o menos de aproximadamente 5000 mg, o menos de aproximadamente 3000 mg, o menos de aproximadamente 2000 mg, o menos de aproximadamente 1000 mg, o menos de aproximadamente 500 mg, o menos de aproximadamente 200 mg, o menos de aproximadamente 50 mg. De modo similar, en algunas realizaciones, una dosis de un segundo compuesto (es decir, un fármaco utilizado para tratar una enfermedad o trastorno) como se describe en el presente documento es menos de aproximadamente 1000 mg, o menos de

aproximadamente 800 mg, o menos de aproximadamente 600 mg, o menos de aproximadamente 500 mg, o menos de aproximadamente 400 mg, o menos de aproximadamente 300 mg, o menos de aproximadamente 200 mg, o menos de aproximadamente 100 mg, o menos de aproximadamente 50 mg, o menos de aproximadamente 40 mg, o menos de aproximadamente 30 mg, o menos de aproximadamente 25 mg, o menos de aproximadamente 20 mg, o menos de aproximadamente 15 mg, o menos de aproximadamente 10 mg, o menos de aproximadamente 5 mg, o menos de aproximadamente 2 mg, o menos de aproximadamente 1 mg, o menos de aproximadamente 0,5 mg, y cualquiera y todos los incrementos totales o parciales entre ellos.

En determinadas realizaciones, el fármaco es terapéuticamente activo a una concentración circulante y/o tisular de aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 μM.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica envasada que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, solo o en combinación con un segundo agente farmacéutico; e instrucciones para usar el compuesto para tratar, prevenir o reducir uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un paciente.

Las formulaciones pueden emplearse en mezclas con excipientes convencionales, es decir, sustancias vehículo orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para administración oral, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea, enteral, o cualquier otro modo de administración adecuado, conocido en la técnica. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares. También se pueden combinar donde se desee con otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes antitumorales.

El término "recipiente" incluye cualquier receptáculo para contener la composición farmacéutica. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el recipiente es el envase que contiene la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el recipiente no es el envase que contiene la composición farmacéutica, es decir, el envase es un receptáculo, como una caja o vial que contiene la composición farmacéutica envasada o la composición farmacéutica no envasada y las instrucciones para el uso de la composición farmacéutica. Además, las técnicas de envasado son bien conocidas en la técnica. Debe entenderse que las instrucciones para el uso de la composición farmacéutica pueden estar contenidas en el envase que contiene la composición farmacéutica y, como tal, las instrucciones forman una relación funcional incrementada con el producto envasado. Sin embargo, debe entenderse que las instrucciones pueden contener información relacionada con la capacidad del compuesto para realizar su función prevista, por ejemplo, tratar, prevenir o reducir una enfermedad o trastorno en un paciente.

Las vías de administración de cualquiera de las composiciones de la presente invención incluyen la vía oral, nasal, rectal, intravaginal, parenteral, bucal, sublingual o tópica. Los compuestos para su uso en la invención pueden formularse para la administración por cualquier vía adecuada, tal como administración oral o parenteral, por ejemplo, transdérmica, transmucosal (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, trans- y perivaginal), (intra)nasal y (trans)rectal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intrabronquial, por inhalación, y tópica.

Las composiciones adecuadas y las formas farmacéuticas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos encapsulados, píldoras, cápsulas de gel, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, jarabes, gránulos, perlas, parches transdérmicos, geles, polvos, microgránulos, magmas, pastillas para chupar, cremas, pastas, apósitos, lociones, discos, supositorios, aerosoles líquidos para administración nasal u oral, polvo seco o formulaciones en aerosol para inhalación, composiciones y formulaciones para administración intravesical y similares. Debe entenderse que las formulaciones y composiciones que serían útiles en la presente invención no están limitadas a las formulaciones y composiciones particulares que se describen en el presente documento.

Administración oral

Para la administración oral, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas, líquidos, gotas o cápsulas, comprimidos ovalados y cápsulas de gelatina. Las composiciones previstas para uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en excipientes inertes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para la fabricación de comprimidos. Dichos excipientes incluyen, por ejemplo un diluyente inerte, tal como lactosa; agentes de granulación y disgregantes, tal como almidón de maíz; agentes aglutinantes, tales como almidón; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas por su idoneidad o para retrasar la liberación de los principios activos. Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina en donde el principio activo se mezcla con un diluyente inerte.

Para la administración oral, los compuestos pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, almidón de maíz, lactosa,

celulosa microcristalina o fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir usando métodos adecuados y materiales de recubrimiento, tales como los sistemas de recubrimiento pelicular OPADRY™ disponibles en Colorcon, West Point, Pa. (por ejemplo, OPADRY™ OY Type, OYC Type, Organic Enteric OY-P Type, Aqueous Enteric OY-A Type, OY-PM Type y OPADRY™ White, 32K18400). Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de soluciones, jarabes o suspensiones. Las preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agente emulsionante (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o alcohol etílico); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).

Administración parenteral

Para su administración parenteral, los compuestos se pueden formular para inyección o infusión, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o inyección o infusión subcutánea, o para administración en una dosis en embolada y/o infusión continua. Las suspensiones, soluciones o emulsiones en un vehículo oleoso o acuoso, que contienen opcionalmente otros agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Formas de administración adicionales

Las formas farmacéuticas adicionales de esta invención incluyen formas farmacéuticas como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 6.340.475, 6.488.962, 6.451.808, 5.972.389, 5.582.837 y 5.007.790. Las formas farmacéuticas adicionales de la presente invención también incluyen formas farmacéuticas como las descritas en las solicitudes de patente de EE. UU. n.º 20030147952, 20030104062, 20030104053, 20030044466, 20030039688 y 20020051820. Las formas farmacéuticas adicionales de esta invención incluyen también formas farmacéuticas como se describe en las solicitudes PCT n.º WO 03/35041, WO 03/35040, WO 03/35029, WO 03/35177, WO 03/35039, WO 02/96404, WO 02/32416, WO 01/97783, WO 01/56544, WO 01/32217, WO 98/55107, WO 98/11879, WO 97/47285, WO 93/18755 y WO 90/11757.

Formulaciones de liberación controlada y sistemas de administración de fármacos

En determinadas realizaciones, las formulaciones de la presente invención pueden ser, pero sin limitación, formulaciones de liberación a corto plazo, de compensación rápida, así como de liberación controlada, por ejemplo, liberación sostenida, de liberación retardada y de liberación pulsátil.

La expresión liberación sostenida se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un período prolongado de tiempo y que, aunque no necesariamente, puede dar como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período prolongado de tiempo. El período de tiempo puede ser de hasta un mes o más y debe ser una liberación que sea más larga que la misma cantidad de agente administrado en forma de bolo.

Para la liberación sostenida, los compuestos pueden formularse con un polímero adecuado o material hidrófobo que proporcione propiedades de liberación sostenida a los compuestos. Como tal, los compuestos para su uso en el método de la presente invención pueden administrarse en forma de micropartículas, por ejemplo, por inyección o en forma de obleas o discos por implantación.

En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente invención se administran a un paciente, solos o en combinación con otro agente farmacéutico, usando una formulación de liberación sostenida.

La expresión liberación retardada se utiliza en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona una liberación inicial del fármaco después de cierto retraso tras la administración del fármaco y que puede, aunque no necesariamente, incluir un retraso de aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 12 horas.

La expresión liberación pulsátil se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco de tal manera que produce perfiles plasmáticos pulsátiles del fármaco después de la administración del fármaco.

La expresión liberación inmediata se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco inmediatamente después de la administración del fármaco.

Como se usa en el presente documento, a corto plazo se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos o aproximadamente 10 minutos y todos y cada uno de

los incrementos parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

Como se usa en el presente documento, de compensación rápida se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos y todos y cada uno de los incrementos completos o parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

Dosificación

La cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto depende de la edad, el sexo y el peso del paciente, el estado médico actual del paciente y la progresión de la enfermedad o el trastorno en el paciente que se esté tratando. El experto en la materia puede determinar las dosis adecuadas en estos y otros factores.

Una dosis adecuada de un compuesto de la presente invención puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 5000 mg al día, tal como desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 1000 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 mg, tal como desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 250 mg al día. La dosis se puede administrar en una dosificación única o en múltiples dosificaciones, por ejemplo, desde 1 hasta 4 o más veces al día. Cuando se utilizan múltiples dosificaciones, la cantidad de cada dosificación puede ser igual o diferente. Por ejemplo, una dosis de 1 mg al día se puede administrar como dos dosis de 0,5 mg, con aproximadamente un intervalo de 12 horas entre dosis.

Se entiende que la cantidad del compuesto administrado al día se puede administrar, en ejemplos no limitativos, cada día, en días alternos, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días o cada 5 días. Por ejemplo, con la administración en días alternos, se puede iniciar una dosis de 5 mg al día el lunes con una primera dosis posterior de 5 mg al día administrada el miércoles, una segunda dosis posterior de 5 mg al día se puede administrar el viernes, etc.

Los compuestos para usar en el método de la presente invención pueden estar formulados en formas farmacéuticas unitarias. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los individuos sometidos a tratamiento, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, opcionalmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente adecuado. La forma farmacéutica unitaria puede ser una única dosis diaria o una de múltiples dosis diarias (por ejemplo, aproximadamente 1 a 4 o más veces al día). Cuando se utilizan múltiples dosis diarias, la forma farmacéutica unitaria puede ser la misma o diferente para cada dosis.

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de discernir no utilizando más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos, realizaciones, reivindicaciones, y ejemplos descritos en el presente documento. Por ejemplo, debe entenderse que, las modificaciones en las condiciones de reacción con alternativas reconocidas en la técnica y utilizando no más que experimentación rutinaria, están dentro del alcance de la presente solicitud.

Debe entenderse que el método y las composiciones que serían útiles en la presente invención no se limitan a las formulaciones particulares expuestas en los ejemplos. Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar la composición y los métodos terapéuticos de la invención y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Los siguientes ejemplos ilustran más aspectos de la presente invención. Sin embargo, de ninguna manera son una limitación de las enseñanzas o la divulgación de la presente invención como se establece en el presente documento.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes, salvo que se indique lo contrario. Por tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que, debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

Sin más descripción, se cree que un experto en la materia puede, utilizando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, producir y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la divulgación.

Materiales

Las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231, BT549 y MCF10A se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Los siguientes anticuerpos primarios se adquirieron de Cell Signaling Technology

(Danvers, MA) Bcl-2, fosfo-c-Jun Serina 73, fosfo-c-Jun Serina 63, c-Jun, RAD51, NF-KB, Fosfo-NF-KB, AKT, Fosfo-AKT, Ciclina D1, c-abl. El anticuerpo anti-GAPDH se adquirió de Fitzgerald.

Métodos

Cultivo celular

Las células MCF7 se cultivaron rutinariamente en medio esencial mínimo (MEM, n.º de cat. 11095-080, Life Technologies) con un 10 % de suero fetal bovino (FBS, n.º de cat. 16140, Life Technologies), penicilina/estreptomicina al 1 % (n.º de cat.15140, Life Technologies), piruvato sódico al 1 % (n.º de cat. 11360-070, Life Technologies) y 0,01 mg/ml de insulina (n.º de cat. I0516, Sigma-Aldrich). Las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) (n.º de cat. 11965, Life Technologies, Carlsbad, CA), con un 10 % de suero fetal bovino (FBS, n.º de cat. 16140, Life Technologies), penicilina/estreptomicina al 1 % (n.º de cat.15140, Life Technologies) y piruvato sódico al 1 % (n.º de cat. I 1360-070, Life Technologies). Las células BT549 se cultivaron en RPMI 1640 (n.º de cat. A10491, Life Technologies), suplementado con 10 % de FBS, 0,023 UI/ml de insulina (n.º de cat. I0516, Sigma-Aldrich) y 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células MCF10A se cultivaron en medio DMEM/F12 (n.º de cat. Life Technologies) suplementado con un 5 % de suero de caballo (n.º de cat.), 20 µg/ml de EGF (n.º de cat. AF-100-12, Peprotech, Rocky Hill, NJ), 0,5 mg/ml de hidrocortisona (n.º de cat. H0888, Sigma-Aldrich), 10 µg/ml de insulina, 100 ng/ml de toxina del cólera (n.º de cat. c8052, Sigma-Aldrich) y 1 % de penicilina/estreptomicina.

Péptidos

Los péptidos se sintetizaron bajo pedido por LifeTein (Somerset, NJ) como pureza en bruto con una única biotina en el extremo aminoterminal. Los péptidos se almacenaron liofilizados a -70 °C hasta su reconstitución en agua estéril con un 2 % de DMSO (Fisher). La concentración de los péptidos reconstituidos se verificó por absorbancia utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA) a A280.

Secuencias utilizadas:

SEQ ID NO: 1: péptido HCC1.3 de CAPER (restos de aminoácidos 356-400)

RLQLMARLAEGTGLQIPPAAQQALQMSGSLAFGAVADLQTRLSQQ

SEQ ID NO: 2: péptido HCC1.4 de CAPER (restos de aminoácidos 356-400)

RLQLMARLAEGTGLQIPPAAQQALQMSGSLAFGAVAEFSFVIDLQ

SEQ ID NO: 3: péptido de CAPER desordenado

VGDALQGLRLFSTQASIGAQMEQLAAQPLRAGQMLQLAQASPLRT

SEQ ID NO: 4: péptido de control de TAT:

YGRKKRRQRRR

SEQ ID NO: 5: péptido HCC1.3 TAT de CAPER

YGRKKRRQRRRRLQLMARLAEGTGLQIPPAAQQALQMSGSLAFGAVADLQTRLSQQ

SEQ ID NO: 6: péptido HCC1.4 TAT de CAPER:

YGRKKRRQRRRRLQLMARLAEGTGLQIPPAAQQALQMSGSLAFGAVAEFSFVIDLQ

SEQ ID NO: 7: péptido de CAPER TAT desordenado

YGRKKRRQRRRVGDALQGLRLFSTQASIGAQMEQLAAQPLRAGQMLQLAQASPLRT

SEQ ID NO: 8: isoforma HCC1.3 de CAPER

```
        10         20         30         40         50
MADDIDIEAM LEAPYKKDEN KLSSANGHEE RSKKRKKSKS RSRSHERKRS
        60         70         80         90        100
KSKERKRSRD RERKKSKSRE RKRSRSKERR RSRSRSRDRR FRGRYRSPYS
       110        120        130        140        150
GPKFNSAIRG KIGLPHSIKL SRRRSRSKSP FRKDKSPVRE PIDNLTPEER
       160        170        180        190        200
DARTVFCMQL AARIRPRDLE EFFSTVGKVR DVRMISDRNS RRSKGIAYVE
       210        220        230        240        250
FVDVSSVPLA IGLTGQRVLG VPIIVQASQA EKNRAAAMAN NLQKGSAGPM
       260        270        280        290        300
RLYVGSLHFN ITEDMLRGIF EPFGRIESIQ LMMDSETGRS KGYGFITFSD
       310        320        330        340        350
SECAKKALEQ LNGFELAGRP MKVGHVTERT DASSASSFLD SDELERTGID
       360        370        380        390        400
LGTTGRLQLM ARLAEGTGLQ IPPAAQQALQ MSGSLAFGAV ADLQTRLSQQ
       410        420        430        440        450
TEASALAAAA SVQPLATQCF QLSNMFNPQT EEEVGWDTEI KDDVIEECNK
       460        470        480        490        500
HGGVIHIYVD KNSAQGNVYV KCPSIAAAIA AVNALHGRWF AGKMITAAYV
       510        520
PLPTYHNLFP DSMTATQLLV PSRR
```

SEQ ID NO: 9: isoforma HCC1.4 de CAPER

```
        10         20         30         40         50
MADDIDIEAM LEAPYKKDEN KLSSANGHEE RSKKRKKSKS RSRSHERKRS
        60         70         80         90        100
KSKERKRSRD RERKKSKSRE RKRSRSKERR RSRSRSRDRR FRGRYRSPYS
       110        120        130        140        150
GPKFNSAIRG KIGLPHSIKL SRRRSRSKSP FRKDKSPVRE PIDNLTPEER
       160        170        180        190        200
DARTVFCMQL AARIRPRDLE EFFSTVGKVR DVRMISDRNS RRSKGIAYVE
       210        220        230        240        250
FVDVSSVPLA IGLTGQRVLG VPIIVQASQA EKNRAAAMAN NLQKGSAGPM
       260        270        280        290        300
RLYVGSLHFN ITEDMLRGIF EPFGRIESIQ LMMDSETGRS KGYGFITFSD
       310        320        330        340        350
SECAKKALEQ LNGFELAGRP MKVGHVTERT DASSASSFLD SDELERTGID
       360        370        380        390        400
LGTTGRLQLM ARLAEGTGLQ IPPAAQQALQ MSGSLAFGAV AEFSFVIDLQ
       410        420        430        440        450
TRLSQQTEAS ALAAAASVQP LATQCFQLSN MFNPQTEEEV GWDTEIKDDV
       460        470        480        490        500
IEECNKHGGV IHIYVDKNSA QGNVYVKCPS IAAAIAAVNA LHGRWFAGKM
       510        520        530
ITAAYVPLPT YHNLFPDSMT ATQLLVPSRR
```

Cinética de unión

La cinética de unión de los péptidos y de CAPER recombinante de longitud completa (R&D Systems, Minneapolis,

MN) con el c-Jun (Abeam, Cambridge, MA) se determinaron mediante interferometría de biocapas (BLI) en el sistema Octet HTX (Pall ForteBio, Fremont, CA).

Los biosensores amino-reactivos de 2.ª generación (n.º de cat. I 8-5092, Pall ForteBio) se activaron con clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida y N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/NHS) (Amine Coupling Kit II, n.º de cat. ACK-001-025, Sierra Sensors, Billerica, MA) y se conjugaron con un anticuerpo anti-marcador de his. A continuación, se inactivó la reacción con etanolamina 1 M (AMine Coupling Kit II, n.º de cat. ACK-001-025, Sierra Sensors). A continuación, se unió a las puntas el c-Jun recombinante marcado con His. Los péptidos se analizaron en una serie de diluciones dobles, incluido un blanco de tampón. También se comprobó la unión de CAPER recombinante de longitud completa. Los pasos de asociación y disociación se realizaron durante 900s cada uno en tampón IX HBS-EP+ (n.º de cat. BR100669, GE Healthcare Lifesciences, Pittsburgh, PA) suplementado con NaCl 450 mM (Sigma). Se restó el fondo de cada serie y se analizaron los datos cinéticos con el software de análisis de datos ForteBio versión 10.0.3.1 utilizando un modelo 1:1.

Ensayos de competición

Los ensayos de competición se determinaron mediante BLI en el sistema Octet HTX (Pall ForteBio, Fremont, CA). Los biosensores amino-reactivos de 2.ª generación (n.º de cat. I8-5092, Pall ForteBio) se activaron con clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida y N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/NHS) (Amine Coupling Kit II, n.º de cat. ACK-001-025, Sierra Sensors, Billerica, MA) y se conjugaron con un anticuerpo anti-marcador de his. A continuación, se inactivó la reacción con etanolamina 1 M (AMine Coupling Kit II, n.º de cat. ACK-001-025, Sierra Sensors). A continuación, se unió a las puntas c-Jun recombinante que contenía una etiqueta his. Se dejó que los péptidos saturaran el receptor a una concentración 10X superior a la KD de cada péptido. Tras la saturación del receptor, se midió la unión de CAPER de longitud completa al receptor y se comparó la señal con la unión de CAPER de longitud completa al receptor en ausencia del péptido. Los pasos de unión se realizaron durante 900s cada uno en tampón 1X HBS-EP+ (n.º de cat. BR100669, GE Healthcare Lifesciences, Pittsburgh, PA) suplementado con NaCl 450 mM (Sigma). Se restó el fondo de cada serie y la señal se representó como un % de inhibición en comparación con la unión de CAPER de longitud completa en ausencia del péptido.

Inmunofluorescencia

Se colocaron preparaciones en el fondo de una placa de 6 pocillos y se añadieron 150.000 células/pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C con un 5 % de CO_2 para permitir que las células se adhirieran. Al día siguiente, se trataron con los péptidos a 10 µM durante 1 hora. Después del tiempo indicado, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células tres veces con PBS y se fijaron con MeOH al 70 % helado a -20 °C durante 10 minutos. Las células se lavaron 3 veces con PBS y luego se incubaron con estreptavidina, conjugada con Alexa-fluor 488 (n.º de cat. S32354, Life Technologies) durante 1 h a 37 °C. A continuación, las células se montaron con Prolong Gold Antifade Mounant con DAPI (n.º de cat. P36941, Life Technologies). Las preparaciones se visualizaron utilizando el sistema de obtención de imágenes celulares EVOS (Thermo Fisher) con un cubo de luz fluorescente DAPI, cubo de luz fluorescente GFP y se tomaron imágenes en un dispositivo de obtención de imágenes celulares EVOS con un aumento de 10X.

Fraccionamiento

Las células MDA-MB-231, BT549 y MCF10A se añadieron a placas de 10 cm y se dejaron adherir durante la noche en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO_2. Al día siguiente, se trataron con los péptidos a 20 µM durante 1 hora. Después del tiempo indicado, se retiró el medio y las células se enjuagaron con PBS y se tripsinizaron con tripsina al 0,05 %. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS y un tampón de lisis hipotónico compuesto por HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las células se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos y, a continuación, se pasaron por una aguja y se dejaron reposar en hielo otros 10 minutos. A continuación, se centrifugó el lisado durante 10 minutos a 13.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se añadió a un tubo nuevo (fracción citosólica). A continuación, el precipitado se enjuagó dos veces con PBS, después del enjuagado final, se eliminó el PBS y el precipitado se introdujo en un tampón hipertónico que contenía HEPES 20 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol al 20 % a pH 7,9 con la adición de inhibidores de proteasa y fosfatasa. A continuación, el lisado se trató con ultrasonidos a 30 amperios y se homogeneizó. A continuación, se dejó reposar el lisado en hielo durante 30 minutos, con mezclado en vórtex periódico. A continuación, el lisado se centrifugó durante 10 minutos y el sobrenadante se añadió a un tubo nuevo (fracción nuclear). A continuación, se almacenaron todos los lisados a -70 °C hasta su uso.

Tratamiento de líneas celulares con péptidos de CAPER y recuento celular

Las células MCF7 se cambiaron a DMEM sin fenol (n.º de cat., 11054-020, Life Technologies), con FBS purificado con carbón vegetal al 10 % (n.º de cat. A33821-01, Life Technologies), 24 horas antes del emplacado. Después del periodo de privación de nutrientes, las células se sembraron en placas de mm a razón de células/placa y se dejaron adherir durante una noche. Al día siguiente, se administraron a las células los péptidos de CAPER a 20 µM, junto con controles de DMSO y solo de TAT con y sin estradiol (E2) (n.º de cat., Sigma). Las células se pretrataron con el péptido 4 horas

antes de añadir E2. Las células se dosificaron diariamente durante 7 días. Al final del periodo de administración de 7 días, se recogieron las células flotantes y se tripsinizaron las células adherentes y se contaron con un hemocitómetro.

Las células MDA-MB-231, BT549 y MCF10A se sembraron en placas de 10 cm a 50.000 células por placa, 100.000 células por placa y 25.000 células, respectivamente. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche, al día siguiente, se administraron péptidos de CAPER 20 µM a las células, junto con los controles de DMSO y solo de TAT. Las células se dosificaron diariamente durante 7 días. Al final del periodo de administración de 7 días, se recogieron las células flotantes y las adherentes se tripsinizaron y se contaron con un hemocitómetro.

Ensayos de apoptosis

La apoptosis se evaluó utilizando un kit Muse Caspase 3/7 (n.º de cat. MCH100108, EMD Millipore) y Muse Annexin V kit (Millipore, n.º de cat.). Las células se trataron durante 7 días como se describe en el presente documento, al final del periodo de administración de 7 días, se recogieron las células flotantes y las células adheridas se lavaron 1X con PBS y luego se tripsinizaron con tripsina al 0,05 %. Se recogieron las células y se combinaron con las células flotantes. A continuación se contaron las células y se diluyeron a 20.000 células/ml. Para el ensayo de caspasa, a continuación, se incubaron 50 µl de células con el reactivo Muse Caspase 3/7 a 37 °C durante 30 min. Tras la incubación, se añadieron 5 µl de colorante 7-ADD y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se analizaron en el Muse Cell Analyzer (Millipore). Para el ensayo de anexina V, a continuación, se añadieron 100 µl de células a 100 µl de reactivo de anexina V durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se analizaron en el Muse Cell Analyzer (Millipore).

Ensayo del ciclo celular

Las células MDA-MB-231 y BT549 se sincronizaron utilizando nocodazol (n.º de cat. Sigma-Aldrich) durante 24 horas. A continuación, se aspiraron las células flotantes y se enjuagó la placa con medio para recoger las células poco adheridas (fracción G2/M). A continuación, las células se sembraron como se ha descrito anteriormente. Una fracción de las células tratadas se procesó para el ciclo celular para confirmar la sincronización. A continuación, las células se trataron durante 7 días como se ha descrito anteriormente, al final del periodo de administración de 7 días, se recogieron las células flotantes y las células adheridas se lavaron 1X con PBS y luego se tripsinizaron con tripsina al 0,05 %. Se recogieron las células y se combinaron con las células flotantes. Se contaron y diluyeron las células según las instrucciones del Muse Cell Cycle Kit (n.º de cat. MCH100106, EMD Millipore) y, a continuación, se leyeron las muestras en el Muse Cell Analyzer.

Análisis de transferencia de Western

Después del periodo de tratamiento de 7 días, se recogieron las células y se lavaron con PBS frío. A continuación, las células se lisaron en un tampón RIPA completo que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche) e inhibidores de fosfatasa. Las muestras se colocaron en hielo y se trataron con ultrasonidos durante 30 s y, a continuación, se centrifugaron 10 min a 10.000 X g a 4 °C. Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Se determinó la concentración total de proteínas mediante un ensayo BCA y se añadieron cantidades iguales de proteínas a los pocillos de un gel de SDS-PAGE, transfiriéndose después a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con un 5 % de BSA o un 5 % de leche descremada en tampón TBST IX. Después de la incubación, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3X durante 10 minutos cada una con TBST y luego se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada una con TBST y luego se leyeron utilizando el Licor Odyssey Imager. Se utilizó Licor Image Studio Version para cuantificar las bandas. A continuación, la proteína de interés se normalizó con respecto al control de carga de la proteína GAPDH. Cada sonda se repitió durante un mínimo de tres ejecuciones independientes.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media más/menos E.E.M. y las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de la *t* de Student unilateral o ANOVA unilateral. La significación estadística se marca como ****p <0,0001, ***p <0,001, **p <0,005, *p <0,01, #p <0,05.

Ejemplo 1: Los péptidos de CAPER se unen a c-Jun con afinidad nM y alteran la unión de CAPER recombinante de longitud completa a c-Jun

Se determinó la cinética de unión de los péptidos y se calcularon las constantes de asociación y de disociación de cada uno de ellos. Se determinó que la K_D del péptido HCC1.4 de CAPER y del péptido HCC1.3 de CAPER era de 25,56 y 8,89 nM, respectivamente, mientras que no se pudo determinar la K_D del péptido de CAPER desordenado y del control de solo TAT (FIG. 1A-1E y tabla 1).

Para comprobar si los péptidos de CAPER podrían impedir la unión de CAPER recombinante de longitud completa a c-Jun, se realizó un ensayo de competición. Los resultados muestran que cuando el receptor c-Jun se satura con los

péptidos HCC1.3 y HCC1.4 de CAPER, la unión de CAPER recombinante de longitud completa se inhibe en un 50,7 % y un 42,2 %, respectivamente. El péptido revuelto y el anticuerpo anti-c-Jun no muestran cambios significativos en la unión de CAPER a c-Jun (FIG. 1F).

Tabla 1
Unión a c-Jun

	KD (nM)	K on (1/Ms)	K off (1/s)	X^2	R^2
Péptido HCC1.4 de CAPER	25,56	3,83E+04	9,80E-04	0,1791	0,9555
Péptido HCCX3 de CAPER	8,89	3,79E+04	3,37E-04	0,0928	0,9823
HCC1.3 de CAPER recombinante de longitud completa	0,18	3,12E+05	5,66E-05	0,0652	0,9968
Péptido de CAPER desordenado	N.D.				
Péptido de control de TAT	N.D.				

Ejemplo 2: Los péptidos penetran eficazmente en células de CMTN y en células MCF10A

Las células MDA-MB-231, BT549 y MCF10A se trataron con el péptido HCC1.3 de CAPER, el péptido HCC1.4 de CAPER y el péptido de CAPER desordenado, a 10 µM durante 1 hora. La tinción inmunofluorescente de las células muestra que los péptidos penetran eficazmente en las células y se dirigen al núcleo tras 1 hora de tratamiento (FIG. 2A-2C). Para confirmar los resultados observados con inmunofluorescencia, se realizó el fraccionamiento de las líneas celulares tras el tratamiento con los péptidos para obtener proteínas citosólicas y nucleares. El análisis de estos lisados mediante transferencia de Western muestra resultados similares a los de la tinción de inmunofluorescencia, lo que confirma que los péptidos están entrando en las células y viajando hasta el núcleo (FIG. 2D).

Ejemplo 3: El tratamiento de líneas celulares de CMTN con péptidos inhibidores de CAPER muestra una disminución del número de células y un aumento de células apoptóticas sin efecto sobre el ciclo celular

Tras 7 días de tratamiento con el péptido HCC1.3 de CAPER o el péptido HCC1.4 de CAPER, tanto las células MDA-MB-231 como BT549 muestran una disminución significativa del número de células (FIG. 3A-3B). Además, cuando se investigaron las células apoptóticas, ambas líneas de células de CMTN tratadas con los péptidos muestran una disminución significativa de células vivas y un aumento significativo de células apoptóticas tempranas y apoptóticas muertas que se observa tanto en el ensayo de caspasa 3/7 (FIG.4A-4B) como en el ensayo de anexina V (FIG. 5A-5B). Las células de CMTN tratadas con los péptidos de CAPER no muestran ningún efecto sobre el ciclo celular (FIG. 6A-6B).

Ejemplo 4: El tratamiento de la línea celular de CMTN MDA-MB-231 con péptidos de CAPER disminuye la fosforilación de c-Jun y la proteína pro-supervivencia Bcl-2 a la vez que modula las vías de AKT y NF-KB sin efecto sobre el regulador del ciclo celular ciclina D1

Puesto que ambos péptidos de CAPER se unen a c-Jun, y puesto que se ha demostrado que la activación de c-Jun aumenta con la fosforilación, los niveles de c-Jun total y de dos eventos de fosforilación de c-Jun (Ser 73 y Ser 63) se investigaron mediante transferencia de Western. Los resultados mostrados en la FIG. 7A ilustran que el tratamiento con cualquiera de los péptidos no altera el nivel de c-Jun total pero sí disminuye los niveles de ambos eventos de fosforilación de c-Jun. A continuación, se investigaron los niveles de la conocida proteína pro-supervivencia AKT, que es un activador ascendente de c-Jun. Los resultados muestran que el tratamiento con péptidos provoca una disminución tanto de los niveles de AKT total como de AKT fosforilada (FIG. 7A). Dado que se produce una interrelación entre c-Jun y NF-κB que puede conducir a la supervivencia celular a través de una inhibición de la apoptosis inducida por TNFα, se determinaron los niveles de NF-κB total y fosforilado. De forma interesante, los resultados muestran un aumento significativo de NF-κB fosforilado con una disminución de NF-κB total (FIG. 7B), ambos observados durante la apoptosis inducida por TNFα. Además, se investigaron los niveles de la proteína pro-supervivencia Bcl-2, que puede regularse por AKT, c-Jun, y NF-κB y los resultados muestran una disminución significativa después del tratamiento con péptidos (FIG. 7A), lo que indica un cambio hacia el estado proapoptótico. Dado que c-Jun puede afectar a la progresión del ciclo celular principalmente a través de la regulación de la ciclina D1, los presentes inventores investigaron estos niveles, que no muestran cambios significativos, lo que confirma los resultados observados en el ensayo del ciclo celular (FIG. 7A).

Ejemplo 5: El tratamiento de la línea celular de CMTN MDA-MB-231 con péptidos de CAPER induce la fosforilación de la histona H2AX al tiempo que disminuye las proteínas implicadas en la reparación del ADN

La supresión de CAPER provoca la activación de marcadores de daño en el ADN y una disminución de las proteínas de reparación del ADN. Para ver si los péptidos de CAPER tenían un efecto similar, se investigaron los niveles de fosfo-H2AX (γ-H2AX), RAD51 y c-abl. Los resultados mostrados en la FIG. 7C muestran un aumento de fosfo-H2AX (γ-H2AX) que indica daño en el ADN, y una disminución de proteínas implicadas en la reparación del ADN (RAD51, c-abl). Todos estos datos implican a CAPER como un importante regulador de las vías de reparación del ADN.

Ejemplo 6: El tratamiento de la línea celular no tumorigénica MCF10A con péptidos inhibidores de CAPER no tiene ningún efecto sobre el número de células o la apoptosis

La línea celular epitelial mamaria MCF10A normal no tumorigénica se trató con el péptido HCC1.3 de CAPER o con el péptido HCC1.4 de CAPER durante 7 días. Después del periodo de tratamiento de 7 días, la línea celular MCF10A no mostró cambios significativos en el recuento celular (FIG. 8) ni en las células apoptóticas en comparación con los controles DMSO y TAT (FIG. 9A-9B).

Ejemplo 7: Los péptidos de CAPER se unen a ERα con afinidad nM y alteran la unión de CAPER recombinante de longitud completa con ERα (tabla 2)

Tabla 2
Unión al receptor de estrógenos α

	KD (nM)	K on (1/Ms)	K off (1/s)	X^2	R^2
Péptido HCC1.4 de CAPER	30,18	5,71E+04	1,72E-03	0,064	0,9297
Péptido HCC1.3 de CAPER	4,50	2,54E+04	1,15E-04	0,0892	0,9237
HCC1.3 de CAPER recombinante de longitud completa	0,02	9,37E+05	2,34e-05	0,0843	0,9917
Péptido de CAPER desordenado	N.D.				
Péptido de control de TAT	N.D.				

Ejemplo 8: Las células MCF7 tratadas con péptidos CAPER presentan un menor número de células y un aumento de la apoptosis en presencia de estrógeno

Se privó de suero a células MCF7 y a continuación, se trataron durante 7 días con péptido HCC1.3 de CAPER o con péptido HCC1.4 de CAPER, con y sin estrógenos. Los resultados muestran una disminución significativa del número de células en presencia de estrógenos cuando las células son tratadas con los péptidos de CAPER (FIG. 11). Además, cuando se investigaron las células apoptóticas, Las células MCF7 tratadas con los péptidos en presencia de estrógenos muestran una disminución significativa de células vivas y un aumento significativo de células apoptóticas tempranas y apoptóticas muertas que se observa tanto en el ensayo de caspasa 3/7 (FIG. 12A-12B), como en el ensayo de anexina V (FIG. 13A-13B).

Ejemplo 9: Efecto de los péptidos permeables a células derivados de CAPER en el cáncer cerebral

Cuando las células cancerosas cerebrales (U-87MG) se tratan con péptidos derivados de CAPER a 15 μM, se observó una reducción de la supervivencia y un aumento de la apoptosis (FIG. 14).

Ejemplo 10:

Las terapias disponibles actualmente para pacientes con CMTN son limitadas, por lo que se necesitan urgentemente opciones terapéuticas adicionales. Dirigirse a la actividad de CAPER con péptidos derivados de CAPER puede proporcionar beneficios terapéuticos a las pacientes que padecen CMTN. Los datos presentados en el presente documento demuestran por primera vez el efecto *in vitro* al tratar líneas celulares de CMTN con péptidos de CAPER.

Los datos expuestos en el presente documento muestran una buena afinidad de unión de los péptidos de CAPER a c-Jun en el intervalo nM. Además, el tratamiento de las líneas celulares de CMTN MDA-MB-231 y BT549 con cualquiera de los péptidos de CAPER produce una disminución del número de células y un aumento de las células apoptóticas. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, los experimentos de competición demuestran que un posible mecanismo de acción de estos péptidos puede deberse a la inhibición de las actividades coactivadoras endógenas de CAPER. En determinadas realizaciones, los péptidos son responsables de estos efectos proapoptóticos. En otras realizaciones, los péptidos de CAPER se unen a c-Jun e inhiben o alteran la unión de CAPER endógeno, modificando así su actividad coactivadora y/o la función de corte y empalme del pre-ARNm. Los datos de los experimentos de competición apoyan esta hipótesis. En otras realizaciones más, los péptidos inhiben la unión de otros coactivadores, alterando así sus efectos de manera similar. En otras realizaciones más, los péptidos se unen a c-Jun e inducen un cambio conformacional que inhibe la fosforilación o recluta correpresores, alterando así la función de c-Jun.

Los resultados de la transferencia de Western muestran dos modos de acción *in vitro* tras el tratamiento de células de CMTN con los péptidos de CAPER. La primera se produce a través de la disminución de la activación de c-Jun, lo que se demuestra por la disminución de ambos eventos de fosforilación de c-Jun. En determinadas realizaciones, esta disminución de la actividad de c-Jun observada puede dar lugar a una disminución de ART y, posteriormente, de fosfo-ART, ya que ART puede controlarse a nivel transcripcional por el heterodímero AP-1 compuesto por c-Jun y b-Jun. La ART es una conocida proteína pro-supervivencia que ejerce su actividad a través de diversos mecanismos, que incluyen niveles más bajos de FASL, fosforilación de BAD, y la fosforilación de la caspasa 9, todas ellas acciones que tienen un efecto favorable a la supervivencia. Además, los marcadores de apoptosis, como la disminución del nivel de

Bcl-2 pro-supervivencia, muestran que las células cambian a un estado proapoptótico. c-Jun y NF-κB interactúan para suprimir la apoptosis inducida por el TNFα. En efecto, los péptidos de CAPER aumentan el NF-κB fosforilado con una disminución del NF-κB total, que se observan durante la apoptosis inducida por TNFα. Por lo tanto, estos resultados indican que los péptidos de CAPER pueden aumentar la apoptosis inducida por TNFα a través de la alteración de la función de c-Jun.

Los péptidos de CAPER no han mostrado ningún efecto sobre el ciclo celular de las células de CMTN ni en el ensayo de ciclo celular ni por cambios en los niveles de ciclina D1. c-Jun afecta a la progresión del ciclo celular principalmente a través de la ciclina D1, aunque los efectos antiapoptóticos y sobre el ciclo celular de c-Jun se producen a través de mecanismos diferentes y que el efecto sobre el ciclo celular no requiere la fosforilación de c-Jun para producirse. Por lo tanto, en ciertas realizaciones no limitantes, los péptidos pueden alterar un aspecto de la función de c-Jun sin afectar al otro.

El segundo modo de acción está relacionado con el papel de CAPER en la reparación del ADN. Cuando las células de CMTN se tratan con péptidos de CAPER, las mismas proteínas de reparación del ADN disminuyen (RAD51 y c-ab1) con un aumento de un sello distintivo del daño del ADN fosfo-H2AX (γ-H2AX). En determinadas realizaciones no limitantes, estas proteínas pueden formar un complejo con CAPER, y así alterar la actividad de CAPER e impedir a estas proteínas realizar su papel vital en la reparación del ADN. En otras realizaciones no limitantes, este resultado se debe a la función de corte y empalme alternativo de CAPER, causando por tanto la disminución de estas proteínas a través de defectos de corte y empalme alternativo.

Estos hallazgos demuestran que los péptidos de CAPER son útiles para el tratamiento del CMTN. Resumiendo, los datos presentados en el presente documento muestran por primera vez el uso de péptidos de CAPER como mecanismo para el tratamiento de pacientes con CMTN. Esta población necesita urgentemente más opciones de tratamiento, el trabajo presentado en el presente documento allana el camino hacia una terapia dirigida para el tratamiento de esta enfermedad mortal.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of the Sciences
Jasmin, Jean-Francois
Chilewski, Shannon
Mercier, Isabelle

<120> Polipéptidos para el tratamiento del cáncer

<130> 368763-7011WO1(00039)

<150> US 62/848980
<151> 16/05/2019

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 1

```
Arg Leu Gln Leu Met Ala Arg Leu Ala Glu Gly Thr Gly Leu Gln Ile
1               5                   10                  15

Pro Pro Ala Ala Gln Gln Ala Leu Gln Met Ser Gly Ser Leu Ala Phe
            20                  25                  30

Gly Ala Val Ala Asp Leu Gln Thr Arg Leu Ser Gln Gln
        35                  40                  45
```

<210> 2
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 2

```
Arg Leu Gln Leu Met Ala Arg Leu Ala Glu Gly Thr Gly Leu Gln Ile
1               5                   10                  15

Pro Pro Ala Ala Gln Gln Ala Leu Gln Met Ser Gly Ser Leu Ala Phe
            20                  25                  30

Gly Ala Val Ala Glu Phe Ser Phe Val Ile Asp Leu Gln
        35                  40                  45
```

<210> 3
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 3

```
Val Gly Asp Ala Leu Gln Gly Leu Arg Leu Phe Ser Thr Gln Ala Ser
1               5                   10                  15

Ile Gly Ala Gln Met Glu Gln Leu Ala Ala Gln Pro Leu Arg Ala Gly
            20                  25                  30

Gln Met Leu Gln Leu Ala Gln Ala Ser Pro Leu Arg Thr
        35                  40                  45
```

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 4

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

<210> 5
<211> 56
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 5

```
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Leu Gln Leu Met
1               5                   10                  15

Ala Arg Leu Ala Glu Gly Thr Gly Leu Gln Ile Pro Pro Ala Ala Gln
            20                  25                  30

Gln Ala Leu Gln Met Ser Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Val Ala Asp
        35                  40                  45

Leu Gln Thr Arg Leu Ser Gln Gln
    50                  55
```

<210> 6
<211> 56
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 6

```
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Leu Gln Leu Met
1               5                   10                  15

Ala Arg Leu Ala Glu Gly Thr Gly Leu Gln Ile Pro Pro Ala Ala Gln
            20                  25                  30

Gln Ala Leu Gln Met Ser Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Val Ala Glu
        35                  40                  45

Phe Ser Phe Val Ile Asp Leu Gln
    50                  55
```

<210> 7
<211> 56
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Val Gly Asp Ala Leu
1 5 10 15

Gln Gly Leu Arg Leu Phe Ser Thr Gln Ala Ser Ile Gly Ala Gln Met
20 25 30

Glu Gln Leu Ala Ala Gln Pro Leu Arg Ala Gly Gln Met Leu Gln Leu
35 40 45

Ala Gln Ala Ser Pro Leu Arg Thr
50 55

<210> 8
<211> 524
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 8

Met Ala Asp Asp Ile Asp Ile Glu Ala Met Leu Glu Ala Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Lys Asp Glu Asn Lys Leu Ser Ser Ala Asn Gly His Glu Glu Arg Ser
20 25 30

Lys Lys Arg Lys Lys Ser Lys Ser Arg Ser Arg Ser His Glu Arg Lys
35 40 45

Arg Ser Lys Ser Lys Glu Arg Lys Arg Ser Arg Asp Arg Glu Arg Lys
50 55 60

Lys Ser Lys Ser Arg Glu Arg Lys Arg Ser Arg Ser Lys Glu Arg Arg
65 70 75 80

Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Asp Arg Arg Phe Arg Gly Arg Tyr Arg
85 90 95

Ser Pro Tyr Ser Gly Pro Lys Phe Asn Ser Ala Ile Arg Gly Lys Ile
100 105 110

Gly Leu Pro His Ser Ile Lys Leu Ser Arg Arg Arg Ser Arg Ser Lys
115 120 125

Ser Pro Phe Arg Lys Asp Lys Ser Pro Val Arg Glu Pro Ile Asp Asn
130 135 140

Leu Thr Pro Glu Glu Arg Asp Ala Arg Thr Val Phe Cys Met Gln Leu
145 150 155 160

Ala Ala Arg Ile Arg Pro Arg Asp Leu Glu Glu Phe Phe Ser Thr Val
165 170 175

Gly Lys Val Arg Asp Val Arg Met Ile Ser Asp Arg Asn Ser Arg Arg
180 185 190

Ser Lys Gly Ile Ala Tyr Val Glu Phe Val Asp Val Ser Ser Val Pro
195 200 205

Leu Ala Ile Gly Leu Thr Gly Gln Arg Val Leu Gly Val Pro Ile Ile
210 215 220

Val Gln Ala Ser Gln Ala Glu Lys Asn Arg Ala Ala Ala Met Ala Asn
225 230 235 240

Asn Leu Gln Lys Gly Ser Ala Gly Pro Met Arg Leu Tyr Val Gly Ser
245 250 255

Leu His Phe Asn Ile Thr Glu Asp Met Leu Arg Gly Ile Phe Glu Pro
260 265 270

Phe Gly Arg Ile Glu Ser Ile Gln Leu Met Met Asp Ser Glu Thr Gly
275 280 285

Arg Ser Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Thr Phe Ser Asp Ser Glu Cys Ala
290 295 300

Lys Lys Ala Leu Glu Gln Leu Asn Gly Phe Glu Leu Ala Gly Arg Pro
305 310 315 320

Met Lys Val Gly His Val Thr Glu Arg Thr Asp Ala Ser Ser Ala Ser
325 330 335

Ser Phe Leu Asp Ser Asp Glu Leu Glu Arg Thr Gly Ile Asp Leu Gly
340 345 350

Thr Thr Gly Arg Leu Gln Leu Met Ala Arg Leu Ala Glu Gly Thr Gly
355 360 365

Leu Gln Ile Pro Pro Ala Ala Gln Gln Ala Leu Gln Met Ser Gly Ser
370 375 380

Leu Ala Phe Gly Ala Val Ala Asp Leu Gln Thr Arg Leu Ser Gln Gln
385 390 395 400

Thr Glu Ala Ser Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ser Val Gln Pro Leu Ala
405 410 415

Thr Gln Cys Phe Gln Leu Ser Asn Met Phe Asn Pro Gln Thr Glu Glu
420 425 430

Glu Val Gly Trp Asp Thr Glu Ile Lys Asp Asp Val Ile Glu Glu Cys
435 440 445

Asn Lys His Gly Gly Val Ile His Ile Tyr Val Asp Lys Asn Ser Ala
450 455 460

Gln Gly Asn Val Tyr Val Lys Cys Pro Ser Ile Ala Ala Ala Ile Ala
465 470 475 480

Ala Val Asn Ala Leu His Gly Arg Trp Phe Ala Gly Lys Met Ile Thr
485 490 495

Ala Ala Tyr Val Pro Leu Pro Thr Tyr His Asn Leu Phe Pro Asp Ser
500 505 510

Met Thr Ala Thr Gln Leu Leu Val Pro Ser Arg Arg

<210> 9
<211> 530
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 9

```
Met Ala Asp Asp Ile Asp Ile Glu Ala Met Leu Glu Ala Pro Tyr Lys
1               5                   10                  15

Lys Asp Glu Asn Lys Leu Ser Ser Ala Asn Gly His Glu Glu Arg Ser
            20                  25                  30

Lys Lys Arg Lys Lys Ser Lys Ser Arg Ser Arg Ser His Glu Arg Lys
        35                  40                  45

Arg Ser Lys Ser Lys Glu Arg Lys Arg Ser Arg Asp Arg Glu Arg Lys
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ser Arg Glu Arg Lys Arg Ser Arg Ser Lys Glu Arg Arg
65                  70                  75                  80

Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Asp Arg Arg Phe Arg Gly Arg Tyr Arg
                85                  90                  95

Ser Pro Tyr Ser Gly Pro Lys Phe Asn Ser Ala Ile Arg Gly Lys Ile
            100                 105                 110

Gly Leu Pro His Ser Ile Lys Leu Ser Arg Arg Arg Ser Arg Ser Lys
        115                 120                 125

Ser Pro Phe Arg Lys Asp Lys Ser Pro Val Arg Glu Pro Ile Asp Asn
    130                 135                 140

Leu Thr Pro Glu Glu Arg Asp Ala Arg Thr Val Phe Cys Met Gln Leu
145                 150                 155                 160

Ala Ala Arg Ile Arg Pro Arg Asp Leu Glu Glu Phe Phe Ser Thr Val
                165                 170                 175

Gly Lys Val Arg Asp Val Arg Met Ile Ser Asp Arg Asn Ser Arg Arg
            180                 185                 190

Ser Lys Gly Ile Ala Tyr Val Glu Phe Val Asp Val Ser Ser Val Pro
        195                 200                 205
```

Leu Ala Ile Gly Leu Thr Gly Gln Arg Val Leu Gly Val Pro Ile Ile
210 215 220

Val Gln Ala Ser Gln Ala Glu Lys Asn Arg Ala Ala Ala Met Ala Asn
225 230 235 240

Asn Leu Gln Lys Gly Ser Ala Gly Pro Met Arg Leu Tyr Val Gly Ser
245 250 255

Leu His Phe Asn Ile Thr Glu Asp Met Leu Arg Gly Ile Phe Glu Pro
260 265 270

Phe Gly Arg Ile Glu Ser Ile Gln Leu Met Met Asp Ser Glu Thr Gly
275 280 285

Arg Ser Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Thr Phe Ser Asp Ser Glu Cys Ala
290 295 300

Lys Lys Ala Leu Glu Gln Leu Asn Gly Phe Glu Leu Ala Gly Arg Pro
305 310 315 320

Met Lys Val Gly His Val Thr Glu Arg Thr Asp Ala Ser Ser Ala Ser
325 330 335

Ser Phe Leu Asp Ser Asp Glu Leu Glu Arg Thr Gly Ile Asp Leu Gly
340 345 350

Thr Thr Gly Arg Leu Gln Leu Met Ala Arg Leu Ala Glu Gly Thr Gly
355 360 365

Leu Gln Ile Pro Pro Ala Ala Gln Gln Ala Leu Gln Met Ser Gly Ser
370 375 380

Leu Ala Phe Gly Ala Val Ala Glu Phe Ser Phe Val Ile Asp Leu Gln
385 390 395 400

Thr Arg Leu Ser Gln Gln Thr Glu Ala Ser Ala Leu Ala Ala Ala Ala
405 410 415

Ser Val Gln Pro Leu Ala Thr Gln Cys Phe Gln Leu Ser Asn Met Phe
420 425 430

Asn Pro Gln Thr Glu Glu Glu Val Gly Trp Asp Thr Glu Ile Lys Asp
435 440 445

Asp Val Ile Glu Glu Cys Asn Lys His Gly Gly Val Ile His Ile Tyr

450 455 460

Val Asp Lys Asn Ser Ala Gln Gly Asn Val Tyr Val Lys Cys Pro Ser
465 470 475 480

Ile Ala Ala Ala Ile Ala Ala Val Asn Ala Leu His Gly Arg Trp Phe
485 490 495

Ala Gly Lys Met Ile Thr Ala Ala Tyr Val Pro Leu Pro Thr Tyr His
500 505 510

Asn Leu Phe Pro Asp Ser Met Thr Ala Thr Gln Leu Leu Val Pro Ser
515 520 525

Arg Arg
530

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 10

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

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 11

Pro Arg Pro Leu Pro Phe Pro Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 12

Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 13

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 14

Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15

Leu Trp Arg Ala
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 15

Lys Leu Arg Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Lys Asn Lys
1 5 10 15

Arg Asn Thr Arg
20

<210> 16
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) . . (9)
<223> Enantiómeros D

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Phe Val Arg Arg Ser Arg
1 5 10 15

Arg Pro Arg Thr Ala Ser Cys Ala Leu Ala Phe Val Asn
20 25

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1). . (9)
<223> Enantiómeros D

<400> 17

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
1 5 10 15

<210> 19
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 19

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 20

Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln
1 5 10 15

Arg

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 21

Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 22

Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
1 5 10

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 23

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 24

Val Pro Met Leu Lys Pro Met Leu Lys Glu
1 5 10

<210> 25
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 25

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu His Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala
20 25 30

Leu Lys Leu Ala
35

<210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 26

Gly Ala Leu Phe Leu Ala Phe Leu Ala Ala Ala Leu Ser Leu Met Gly
1 5 10 15

Leu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val
20 25

<210> 27
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 27

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 28

Asn Ala Lys Thr Arg Arg His Glu Arg Arg Arg Lys Leu Ala Ile Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 29

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

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 30

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Arg Val

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 31

Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 32

Arg Val Ile Arg Val Trp Phe Gln Asn Lys Arg Cys Lys Asp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 33
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 33

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 34

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Trp
1 5

<210> 35
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 35

Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Pro Gly Thr Pro Cys Asp
1 5 10 15

Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Asn Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40

<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 36

Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro
1 5 10 15

Pro Pro

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 37

Cys Gly Gly Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp
1 5 10

<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 38

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 39

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

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 40

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gln
1 5 10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 41

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 42

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 43

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Trp Gln
1 5 10

<210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 44

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 45
<211> 34

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 45

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
20 25 30

Val Asp

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 46

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

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 47

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 48

Gly Thr Thr Gly
1

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 49

Thr Arg Leu Ser
1

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 50

Thr Glu Ala Ser
1

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que consiste esencialmente en:

(a) los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.3 del coactivador de la proteína activadora-1 y receptor de estrógenos (CAPER) (SEQ ID NO: 1) o

(b) los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.4 de CAPER (SEQ ID NO: 2),

opcionalmente fusionado a un péptido penetrante celular, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente.

2. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer comprende al menos un cáncer de mama, cáncer cerebral y cáncer de pulmón, preferentemente el cáncer comprende cáncer de mama triple negativo (CMTN) y/o cáncer de mama positivo para estrógenos.

3. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido se derivatiza en al menos un resto de aminoácido, en donde la derivatización comprende metilación, amidación y/o acetilación.

4. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido se fusiona al péptido penetrante celular y el péptido penetrante celular es cualquiera de las SEQ ID NO: 10-47.

5. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polipéptido se fusiona al péptido penetrante celular mediante un enlazador, preferentemente el enlazador comprende una cadena de polietilenglicol (PEG), un péptido o un ácido nucleico peptídico (PNA) y en donde el péptido enlazador comprende menos de aproximadamente 50 aminoácidos.

6. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido se une al componente c-Jun de la proteína activadora-1 (AP-1) con una constante de disociación en equilibrio (KD) en el intervalo de aproximadamente 5nM a aproximadamente 50nM, preferentemente la unión del polipéptido al componente c-Jun de la proteína activadora-1 (AP-1) inhibe al menos parcialmente la unión de la proteína CAPER de longitud completa al componente c-Jun de AP-1.

7. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido se une al receptor de estrógenos (ER)α con una constante de disociación en equilibrio (KD) en el intervalo de aproximadamente

5 nM a aproximadamente 50 nM, preferentemente, la unión del polipéptido al ERα inhibe al menos parcialmente la unión de la proteína CAPER de longitud completa al ERα.

8. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración del polipéptido al sujeto induce daños en el ADN de células cancerosas o causa apoptosis en células cancerosas o no causa ninguna apoptosis, o causa una apoptosis insignificante y/o daños en el ADN de células no cancerosas.

9. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al sujeto no se le administra ningún agente quimioterápico o agente antiproliferación celular adicional, o no se le administra ningún agente quimioterápico o agente antiproliferación celular adicional en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el cáncer en el sujeto.

10. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende administrar al paciente al menos un agente adicional seleccionado entre radiación, un agente quimioterápico, un agente contra la proliferación celular, un agente de terapia génica y un agente de inmunoterapia, preferentemente, el polipéptido y el al menos un agente adicional se van a coadministrar al sujeto y/o el polipéptido y el al menos un agente adicional están coformulados.

11. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el al menos un agente adicional se selecciona entre taxotere, ciclofosfamida, paclitaxel, fluorouracilo, doxorrubicina, cicloheximida, olaparib y temozolomida.

12. El polipéptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un mamífero, preferentemente el sujeto es un ser humano.

13. Un polipéptido que consiste esencialmente en:

(a) los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.3 del coactivador de la proteína activadora-1 y receptor de estrógenos (CAPER) (correspondiente a la SEQ ID NO: 1) o

(b) los restos de aminoácidos 356-400 de la isoforma HCC1.4 de CAPER (correspondiente a la SEQ ID NO: 2),

en donde el polipéptido está opcionalmente:

(i) derivatizado en al menos un resto de aminoácido, en donde la derivatización comprende metilación, amidación o acetilación; o

(ii) fusionado a un péptido penetrante celular,

preferentemente el péptido penetrante celular es una cualquiera de las SEQ ID NO: 10-47.

14. El polipéptido de la reivindicación 13, en donde el polipéptido se fusiona al péptido penetrante celular mediante un enlazador que comprende una cadena de polietilenglicol (PEG), un péptido o un ácido nucleico peptídico (PNA), en donde el péptido enlazador comprende menos de aproximadamente 50 aminoácidos.

15. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 13 o 14 o un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 13 o 14 y un material instructivo para el uso del mismo, en donde el material instructivo comprende instrucciones para tratar el cáncer utilizando la composición farmacéutica.

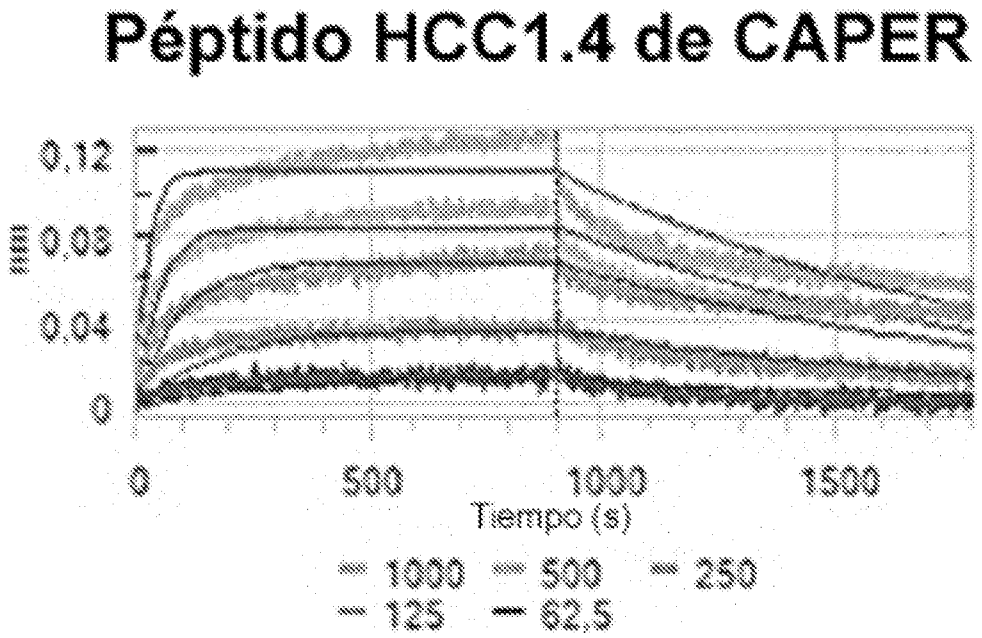

Péptido HCC1.4 de CAPER
0,12
0,08
0,04
0
0
500
1000
1500
Tiempo (s)
1000
500
250
125
62,5

FIG. 1A

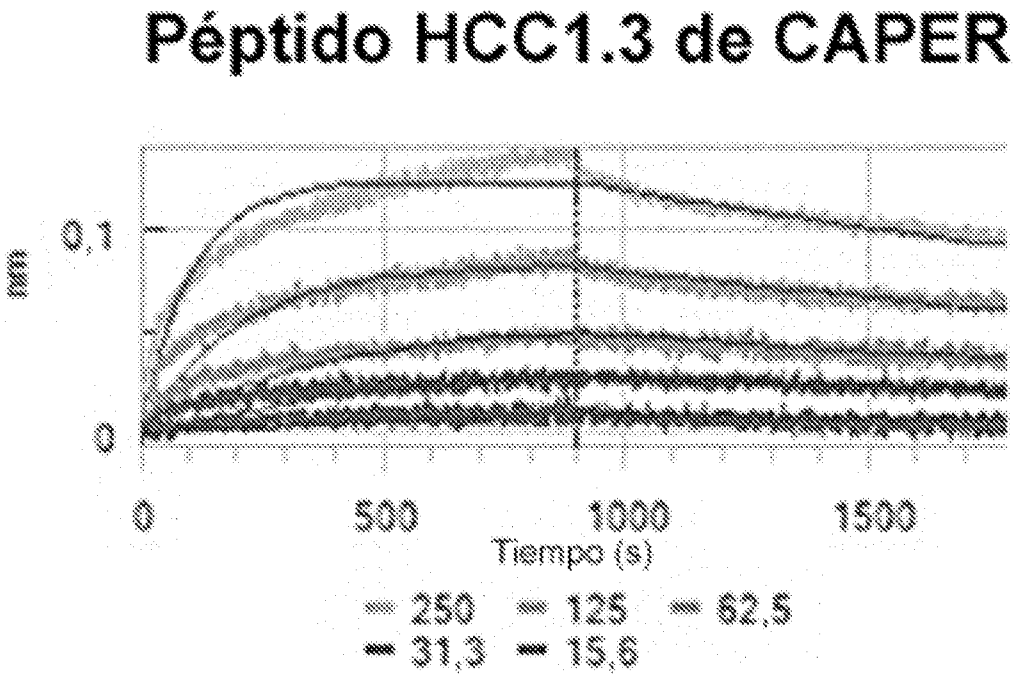

Péptido HCC1.3 de CAPER
0,1
0
0
500
1000
1500
Tiempo (s)
250
125
62,5
31,3
15,6

FIG. 1B

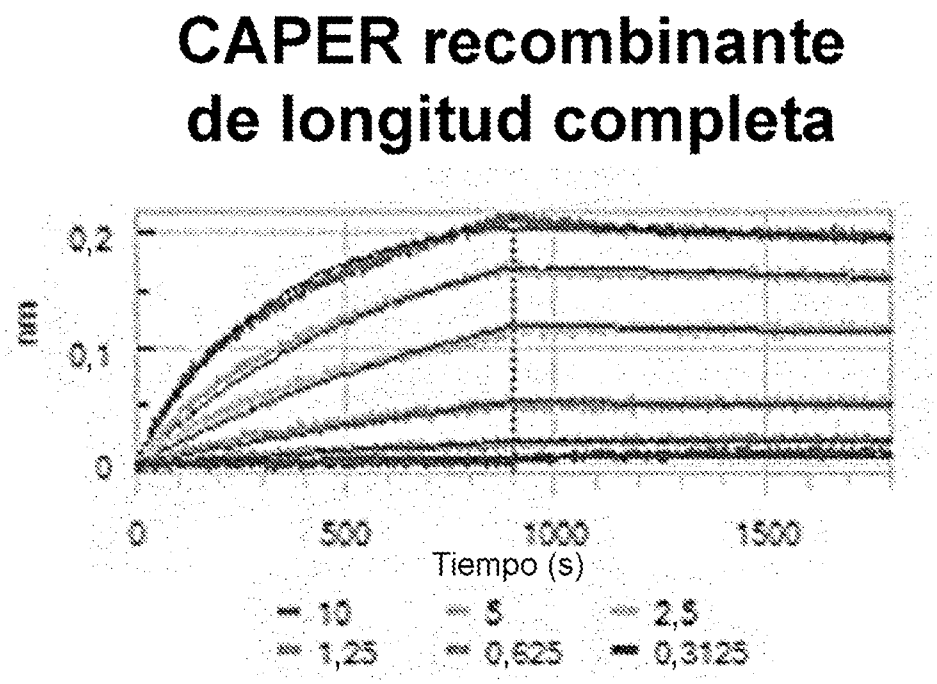

CAPER recombinante
de longitud completa
0,2
0,1
0
nm
0
500
1000
1500
Tiempo (s)
10
5
2,5
1,25
0,625
0,3125

FIG. 1C

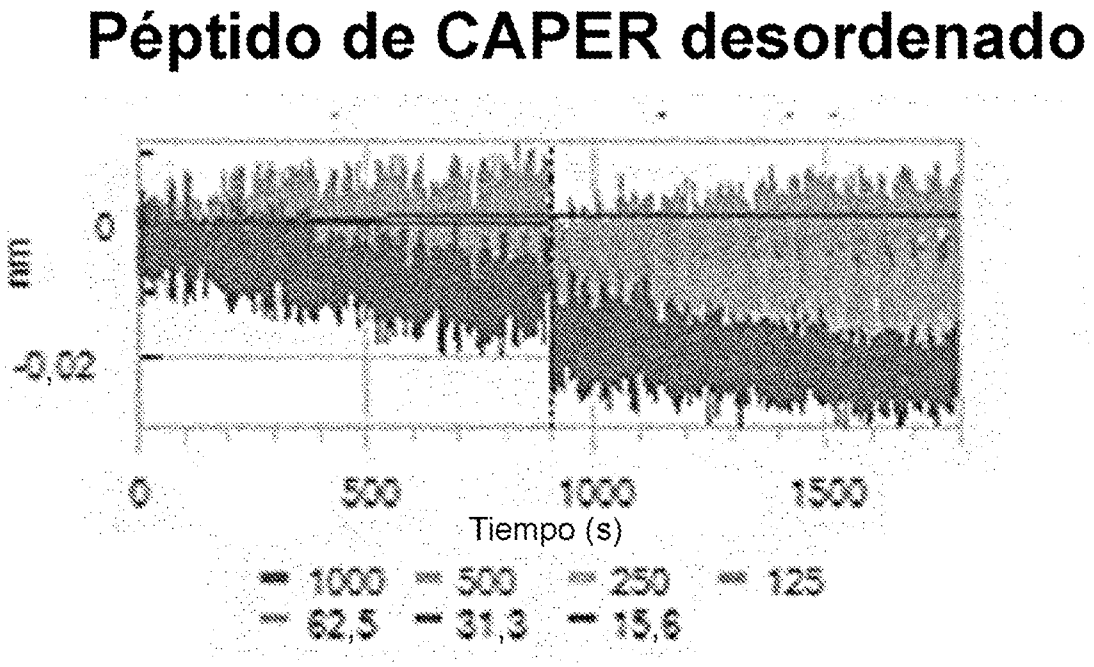

Péptido de CAPER desordenado
0
-0,02
nm
0
500
1000
1500
Tiempo (s)
1000
500
250
125
62,5
31,3
15,6

FIG. 1D

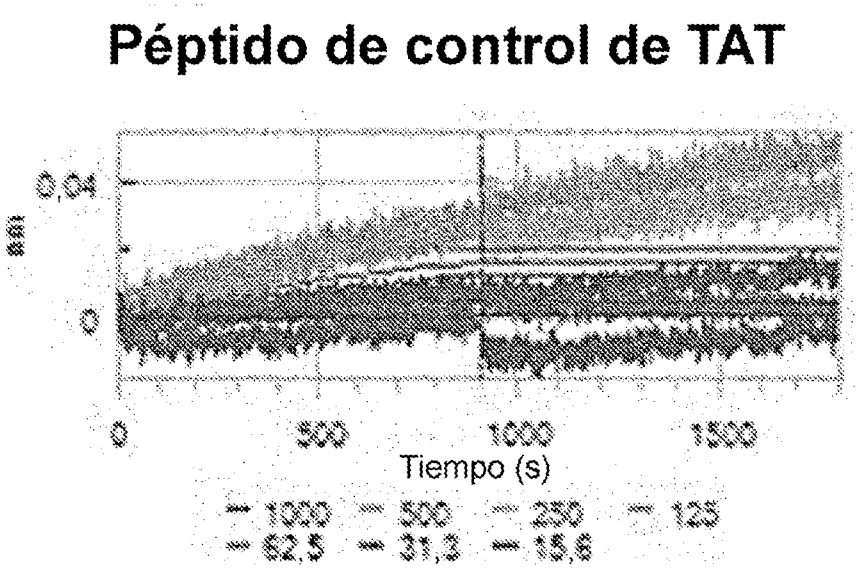

Péptido de control de TAT
0,04
0
0
500
1000
1500
Tiempo (s)
1000
500
250
125
62,5
31,3
15,6

FIG. 1E

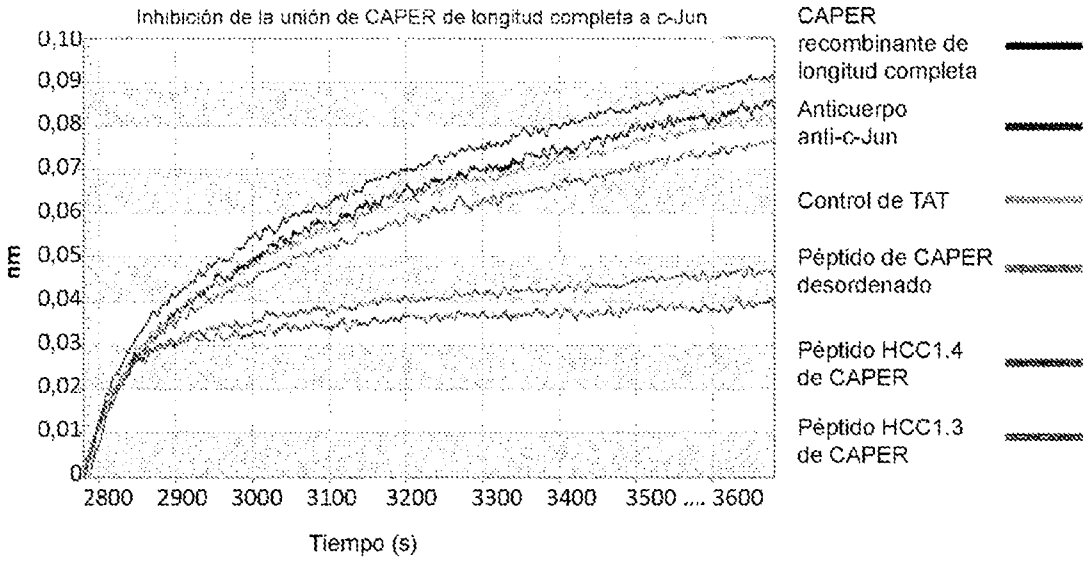

Inhibición de la unión de CAPER de longitud completa a c-Jun
0,10
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
nm
2800
2900
3000
3100
3200
3300
3400
3500 3600
Tiempo (s)
CAPER recombinante de longitud completa
Anticuerpo anti-c-Jun
Control de TAT
Péptido de CAPER desordenado
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido HCC1.3 de CAPER

FIG. 1F

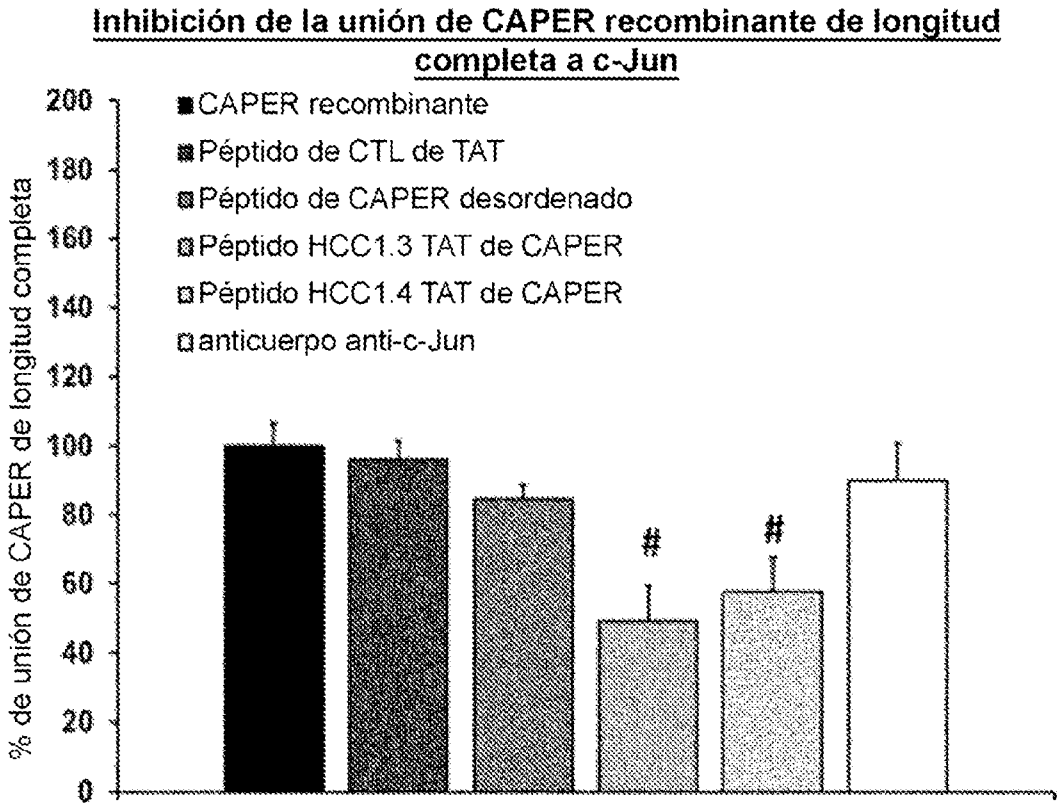

Inhibición de la unión de CAPER recombinante de longitud completa a c-Jun
% de unión de CAPER de longitud completa
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CAPER recombinante
Péptido de CTL de TAT
Péptido de CAPER desordenado
Péptido HCC1.3 TAT de CAPER
Péptido HCC1.4 TAT de CAPER
anticuerpo anti-c-Jun
#
#

FIG. 1G

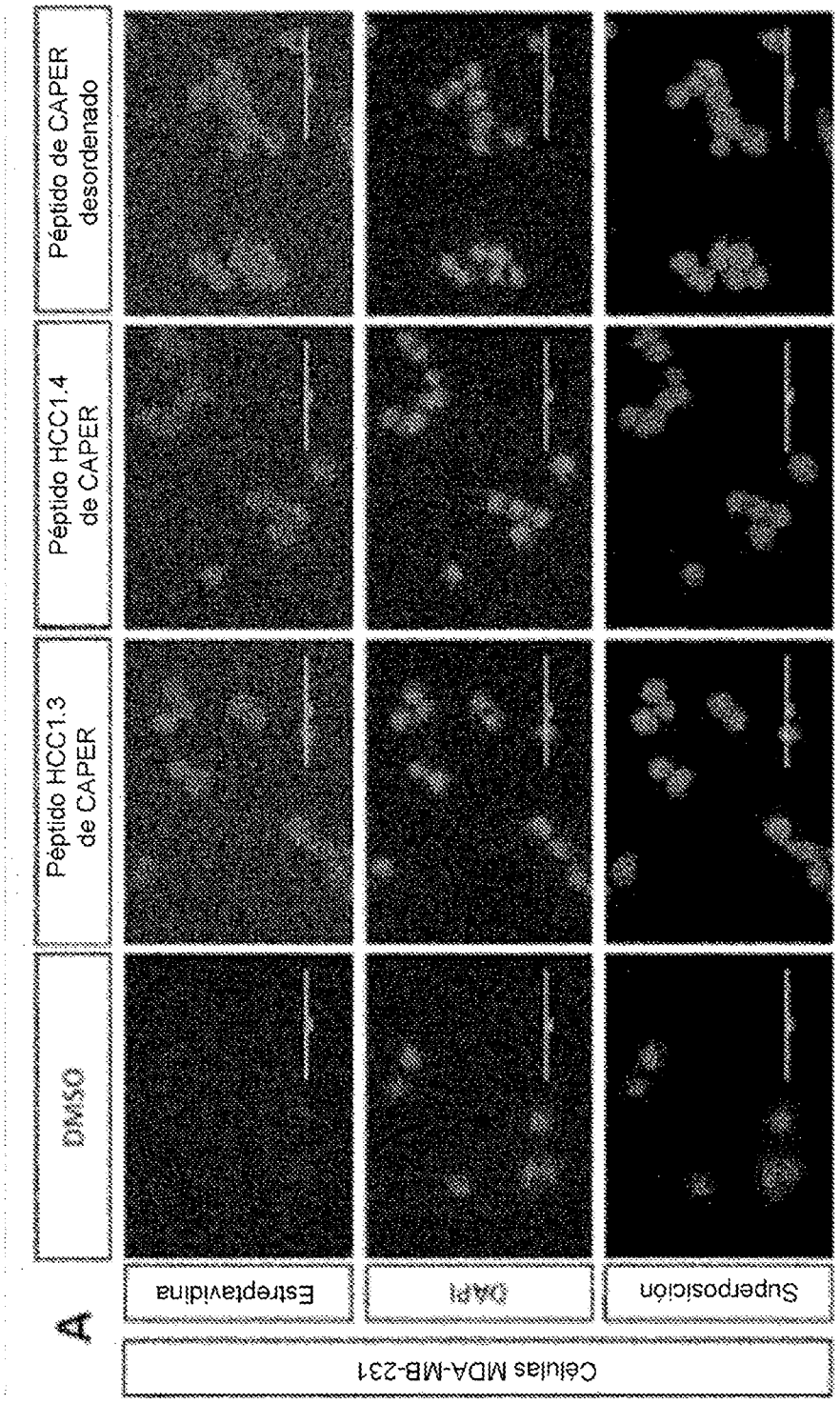

A
DMSO
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Estreptavidina
DAPI
Superposición
Células MDA-MB-231

FIG. 2A

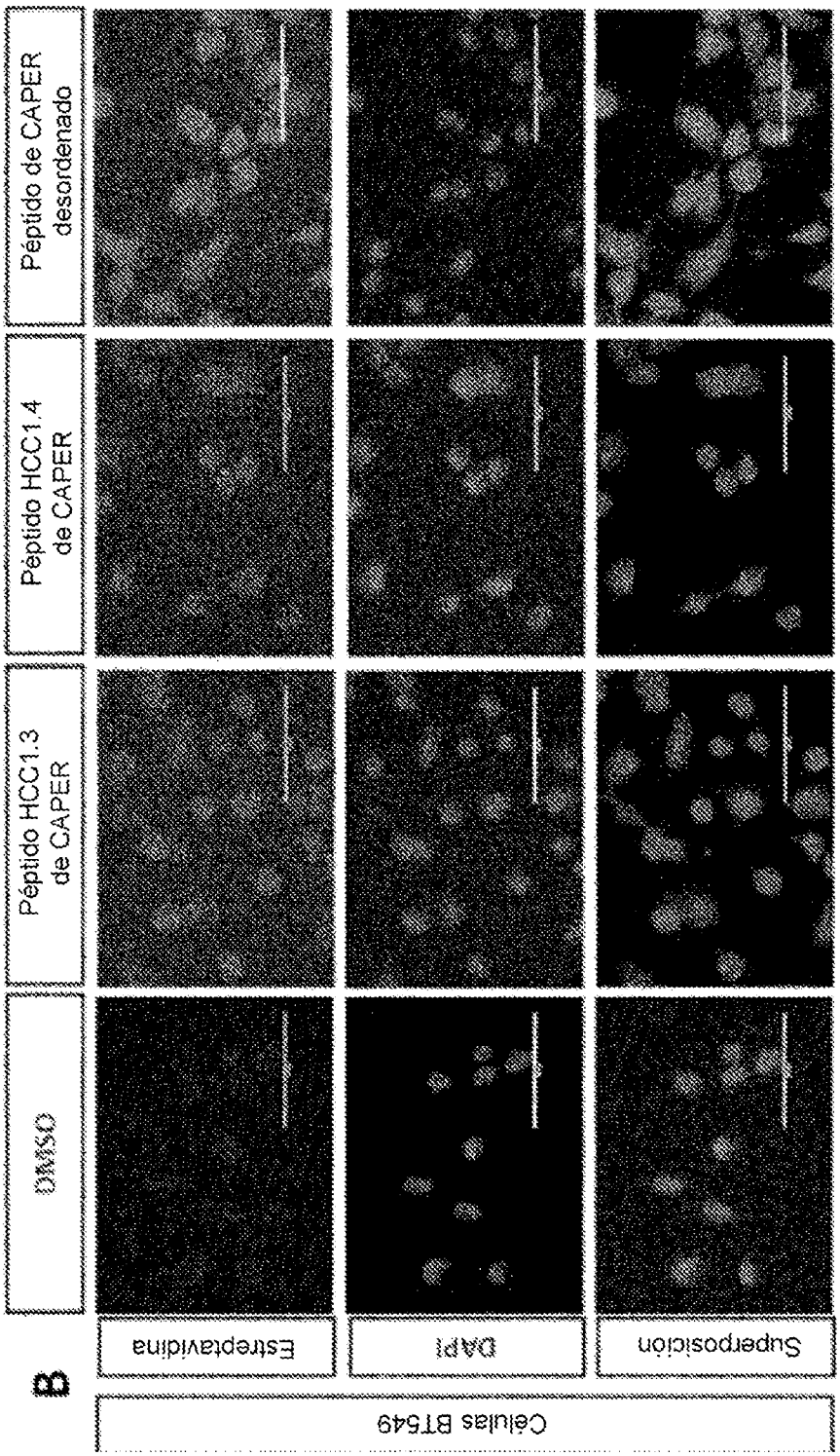

B
DMSO
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Estreptavidina
DAPI
Superposición
Células BT549

FIG. 2B

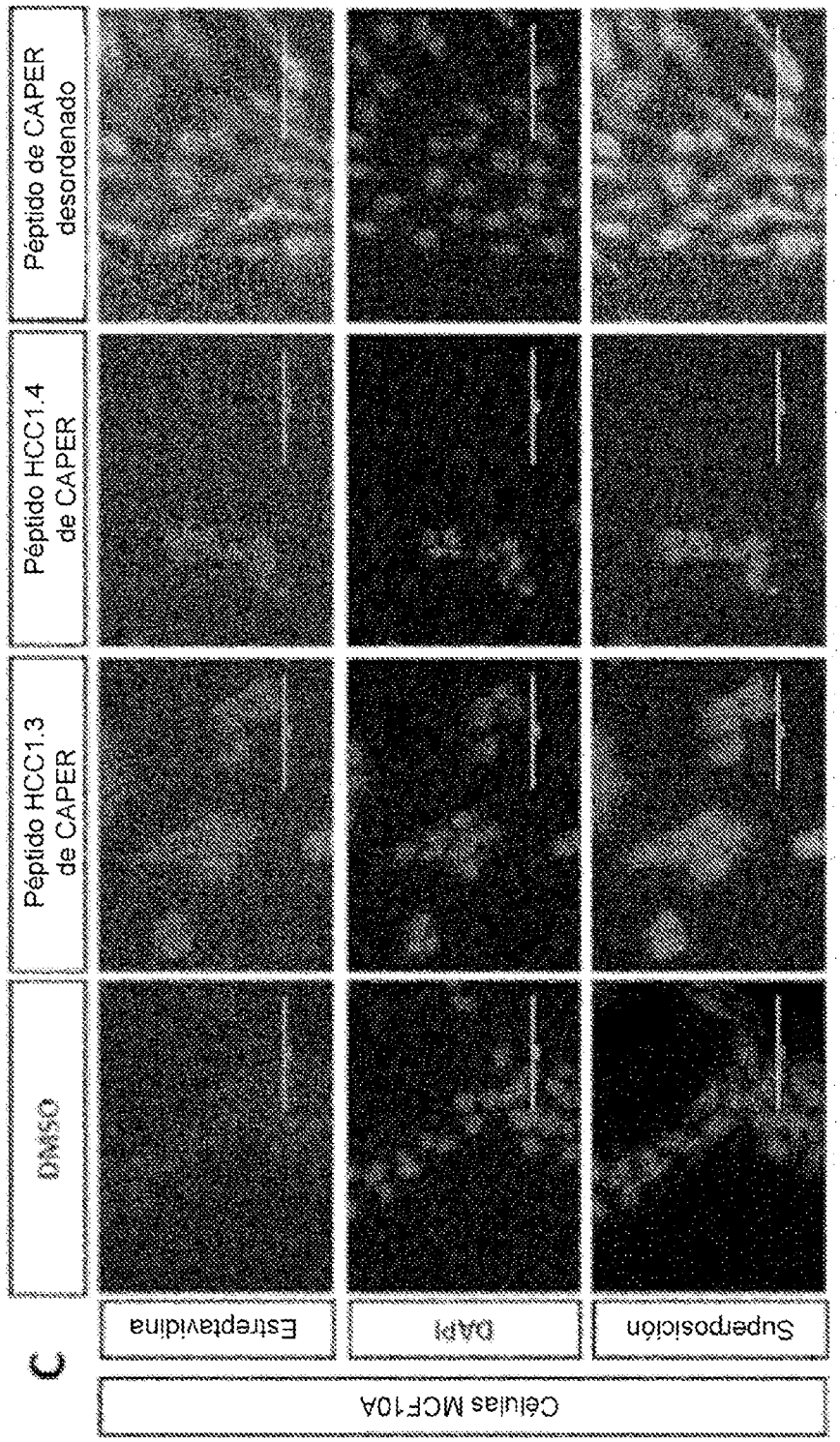

C
DMSO
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Estreptavidina
DAPI
Superposición
Células MCF10A

FIG. 2C

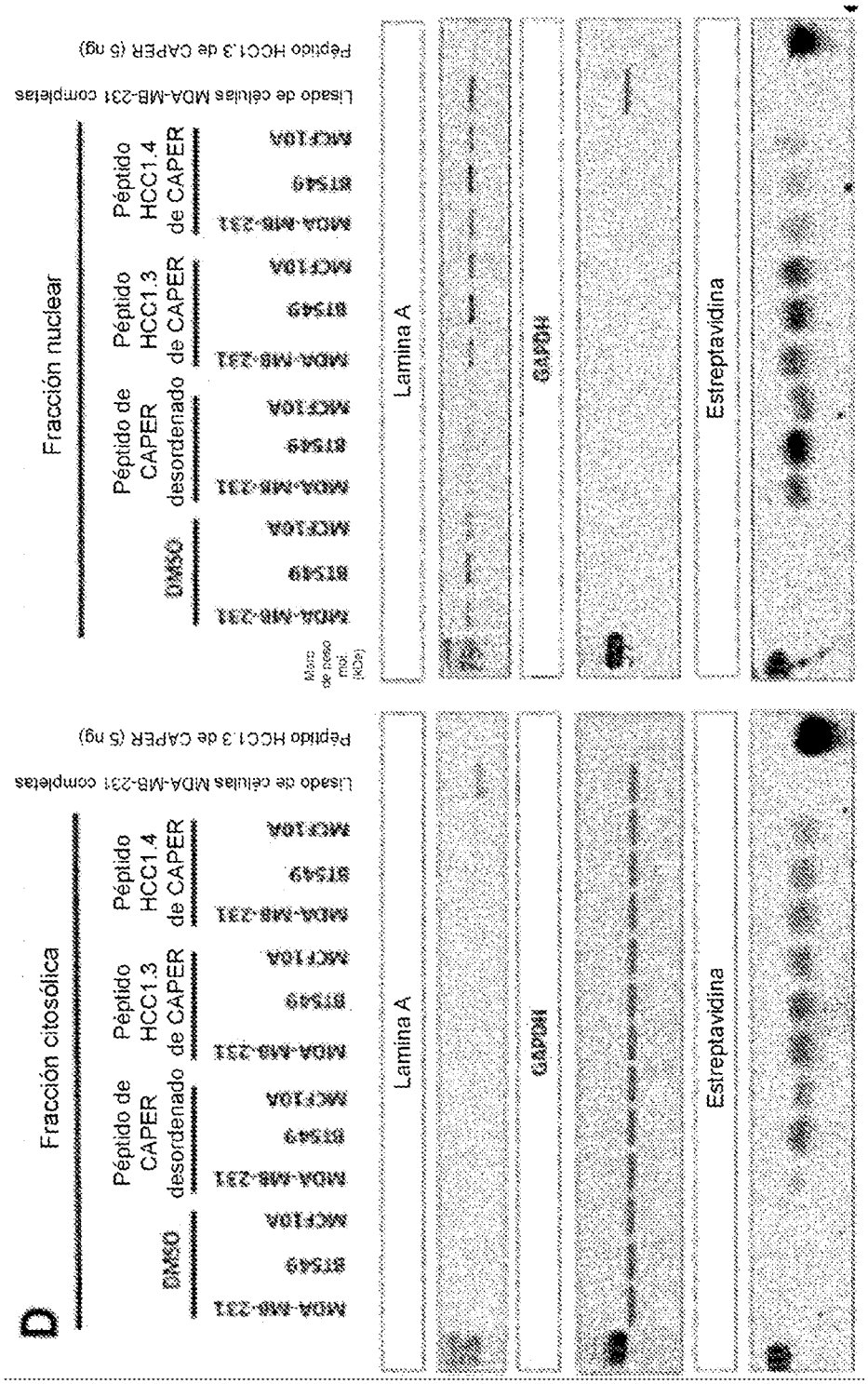
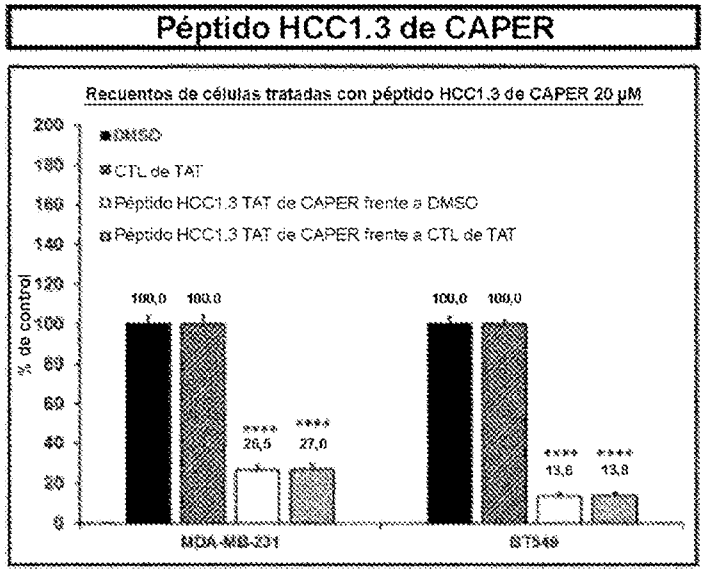
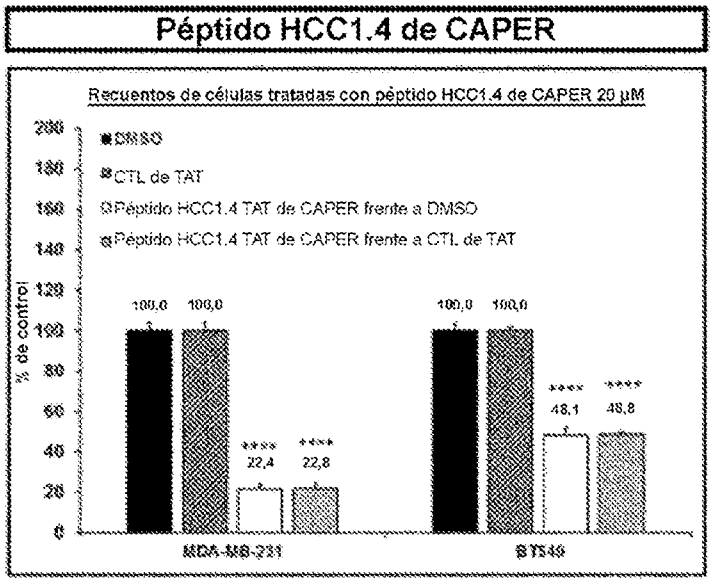

D
Fracción citosólica
DMSO
Péptido de CAPER desordenado
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
MDA-MB-231
BT549
MCF10A
Lisado de células MDA-MB-231 completas
Péptido HCC1.3 de CAPER (5 ng)
Lamina A
GAPDH
Estreptavidina
Fracción nuclear
Masa de peso mol. (kDa)
Lisado de células MDA-MB-231 completas
Péptido HCC1.3 de CAPER (5 ng)

FIG. 2D


Péptido HCC1.3 de CAPER
Recuentos de células tratadas con péptido HCC1.3 de CAPER 20 µM
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 TAT de CAPER frente a DMSO
Péptido HCC1.3 TAT de CAPER frente a CTL de TAT
% de control
100,0
100,0
26,5
27,0
100,0
100,0
13,6
13,8
MDA-MB-231
ST549


Péptido HCC1.4 de CAPER
Recuentos de células tratadas con péptido HCC1.4 de CAPER 20 µM
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.4 TAT de CAPER frente a DMSO
Péptido HCC1.4 TAT de CAPER frente a CTL de TAT
% de control
100,0
100,0
22,4
22,8
100,0
100,0
48,1
48,8
MDA-MB-231
ST549

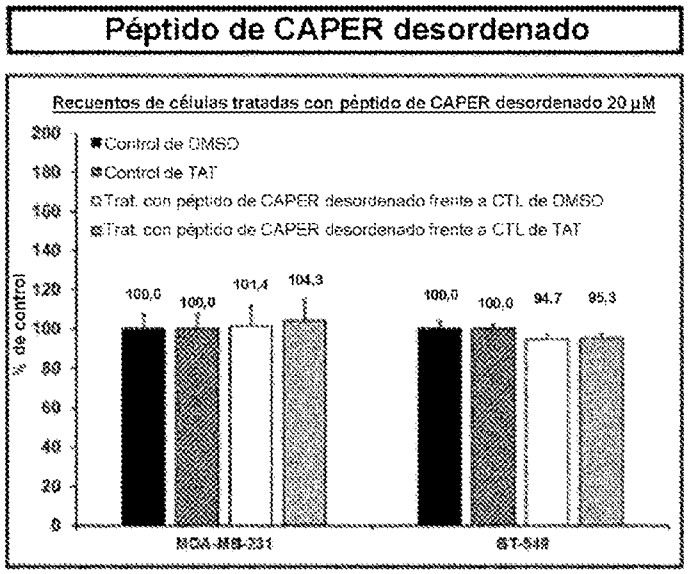

Péptido de CAPER desordenado
Recuentos de células tratadas con péptido de CAPER desordenado 20 µM
Control de DMSO
Control de TAT
Trat. con péptido de CAPER desordenado frente a CTL de DMSO
Trat. con péptido de CAPER desordenado frente a CTL de TAT
% de control
100,0
100,0
101,4
104,3
100,0
100,0
94,7
95,3
MDA-MB-231
ST549

FIG. 3A

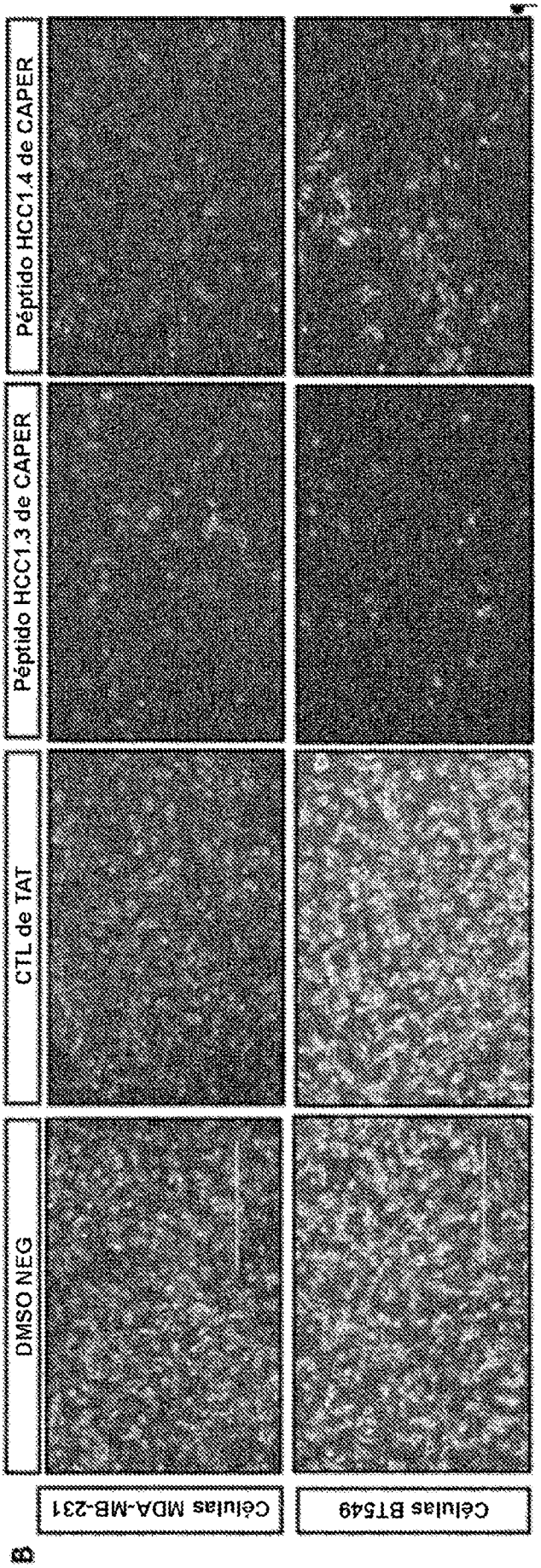

B
Células MDA-MB-231
Células BT549
DMSO NEG
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER

FIG. 3B

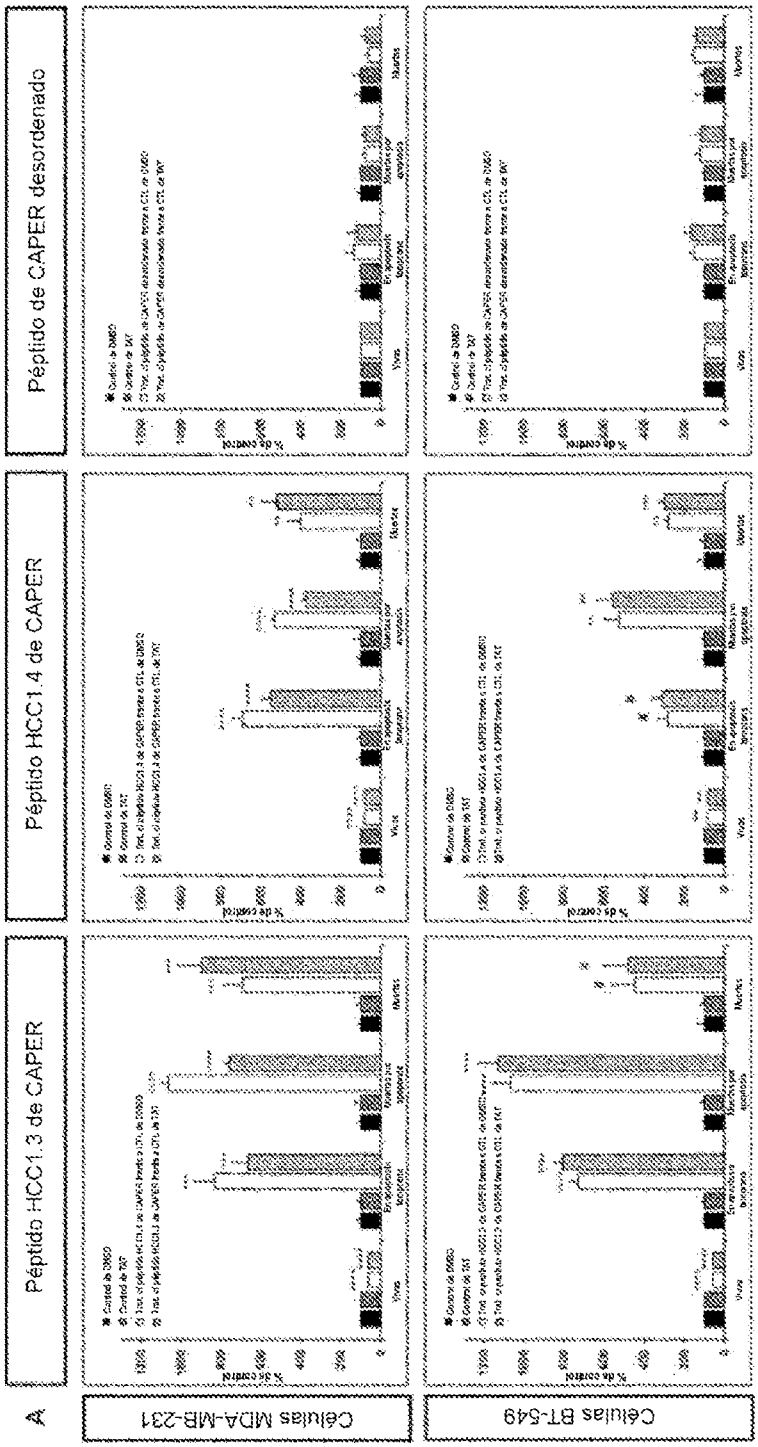

A
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Células MDA-MB-231
Células BT-549

FIG. 4A

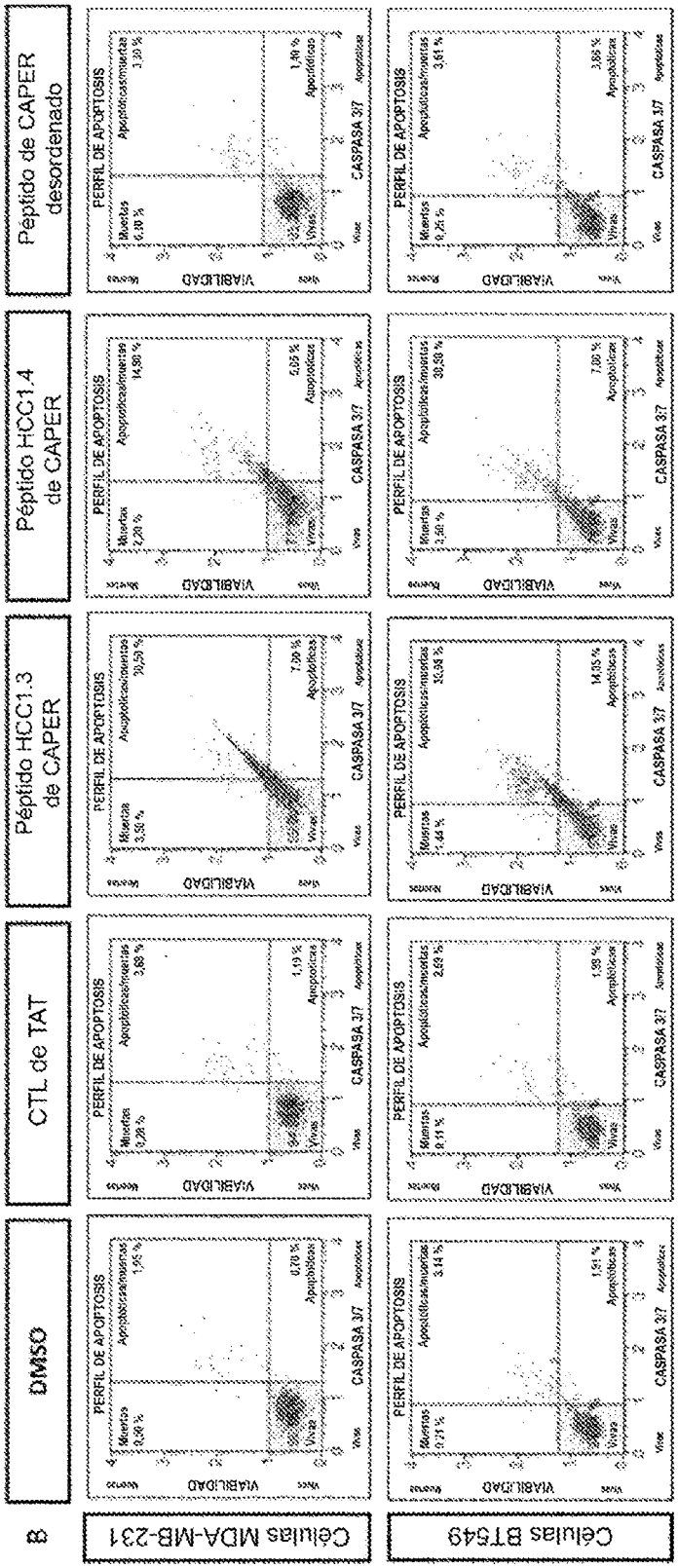

B
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Células MDA-MB-231
Células BT549
PERFIL DE APOPTOSIS
VIABILIDAD
CASPASA 3/7
Vivas
Muertas
Apoptóticas
Apoptóticas/muertas

FIG. 4B

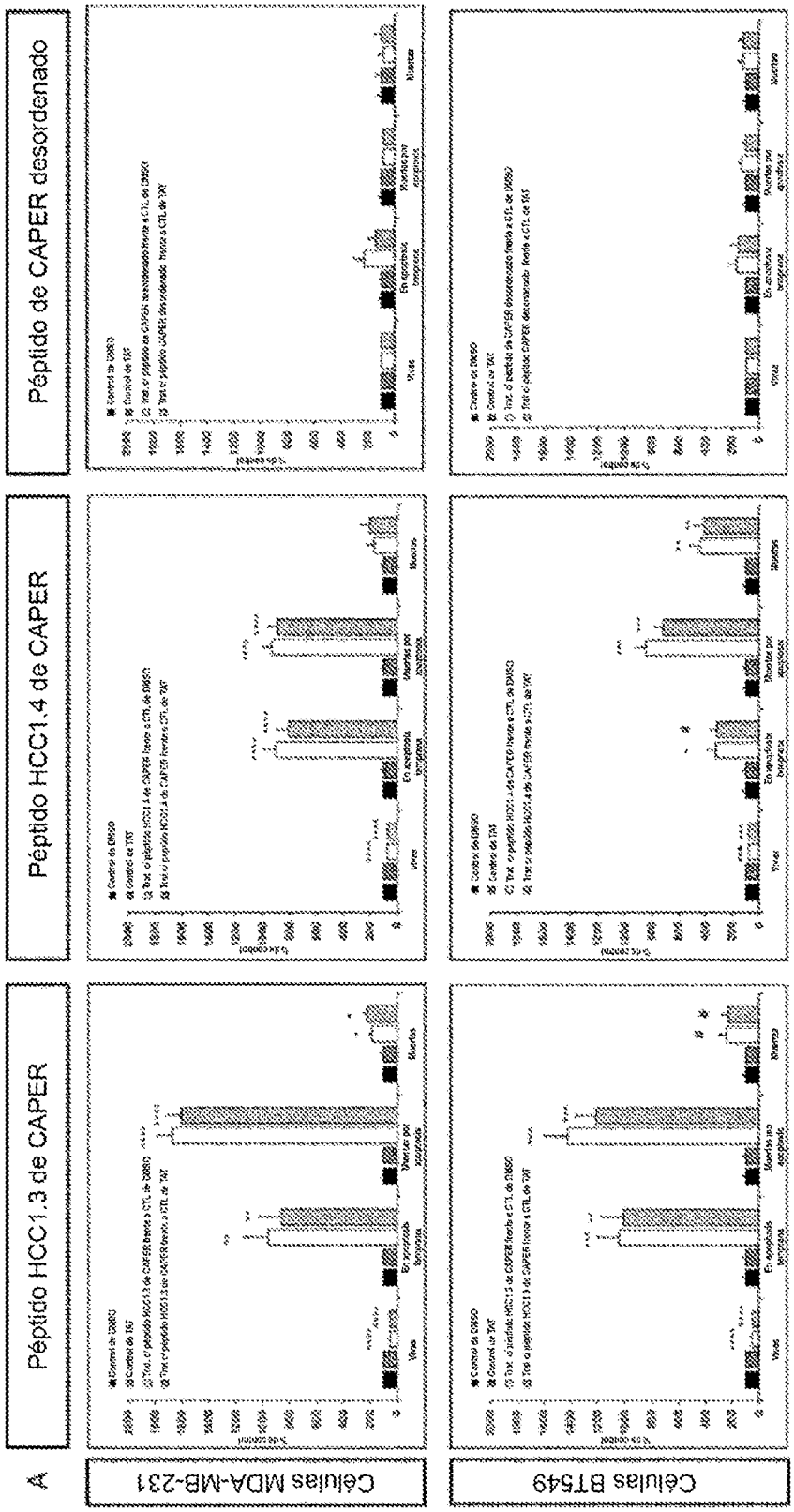

A
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Células MDA-MB-231
Células BT549

FIG. 5A

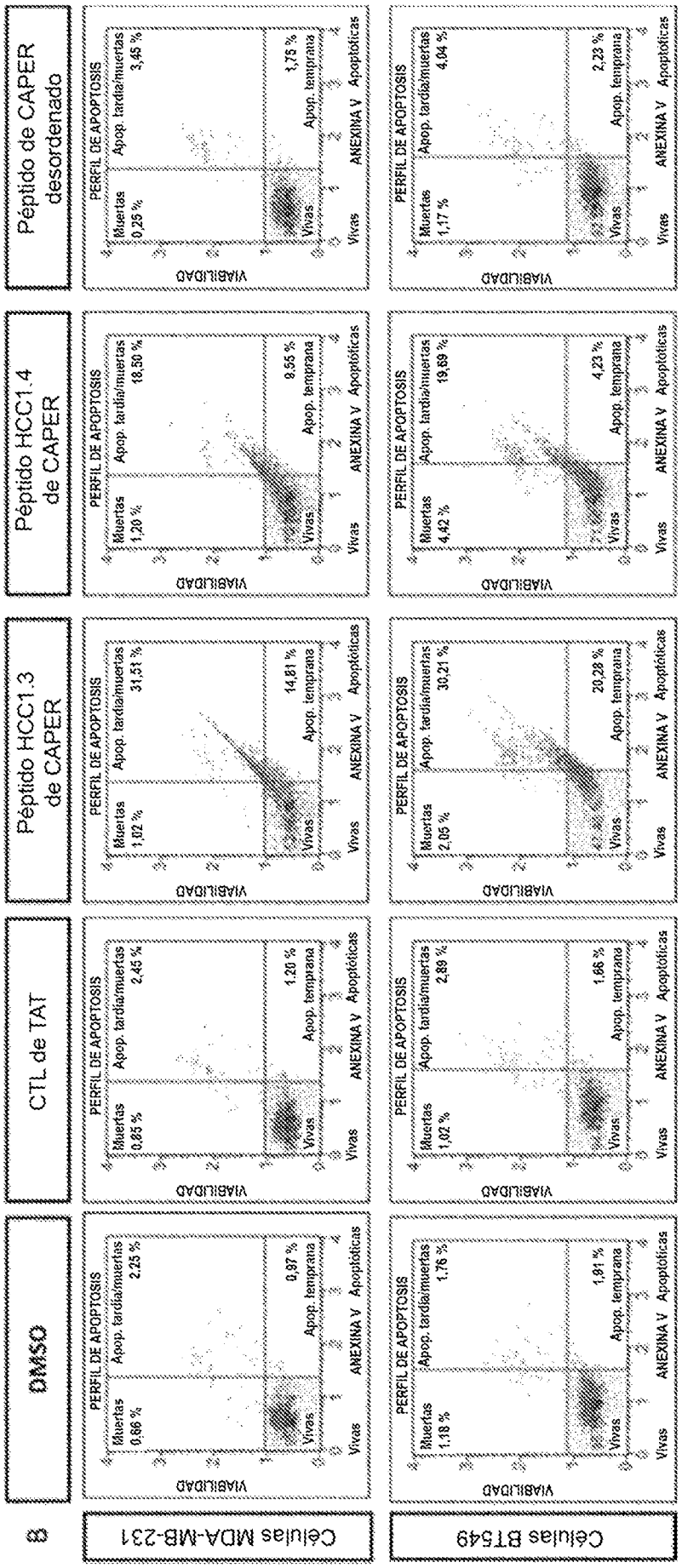

B
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Células MDA-MB-231
Células BT549
PERFIL DE APOPTOSIS
VIABILIDAD
Muertas
Vivas
Apop. tardía/muertas
Apop. temprana
ANEXINA V
Apoptóticas
0,86 %
2,25 %
0,97 %
0,85 %
2,45 %
1,20 %
1,02 %
31,51 %
14,81 %
2,05 %
30,21 %
20,28 %
1,20 %
18,50 %
8,55 %
4,42 %
19,59 %
4,23 %
0,29 %
3,45 %
1,75 %
1,17 %
4,04 %
2,23 %
1,18 %
1,76 %
1,91 %
1,02 %
2,89 %
1,66 %

FIG. 5B

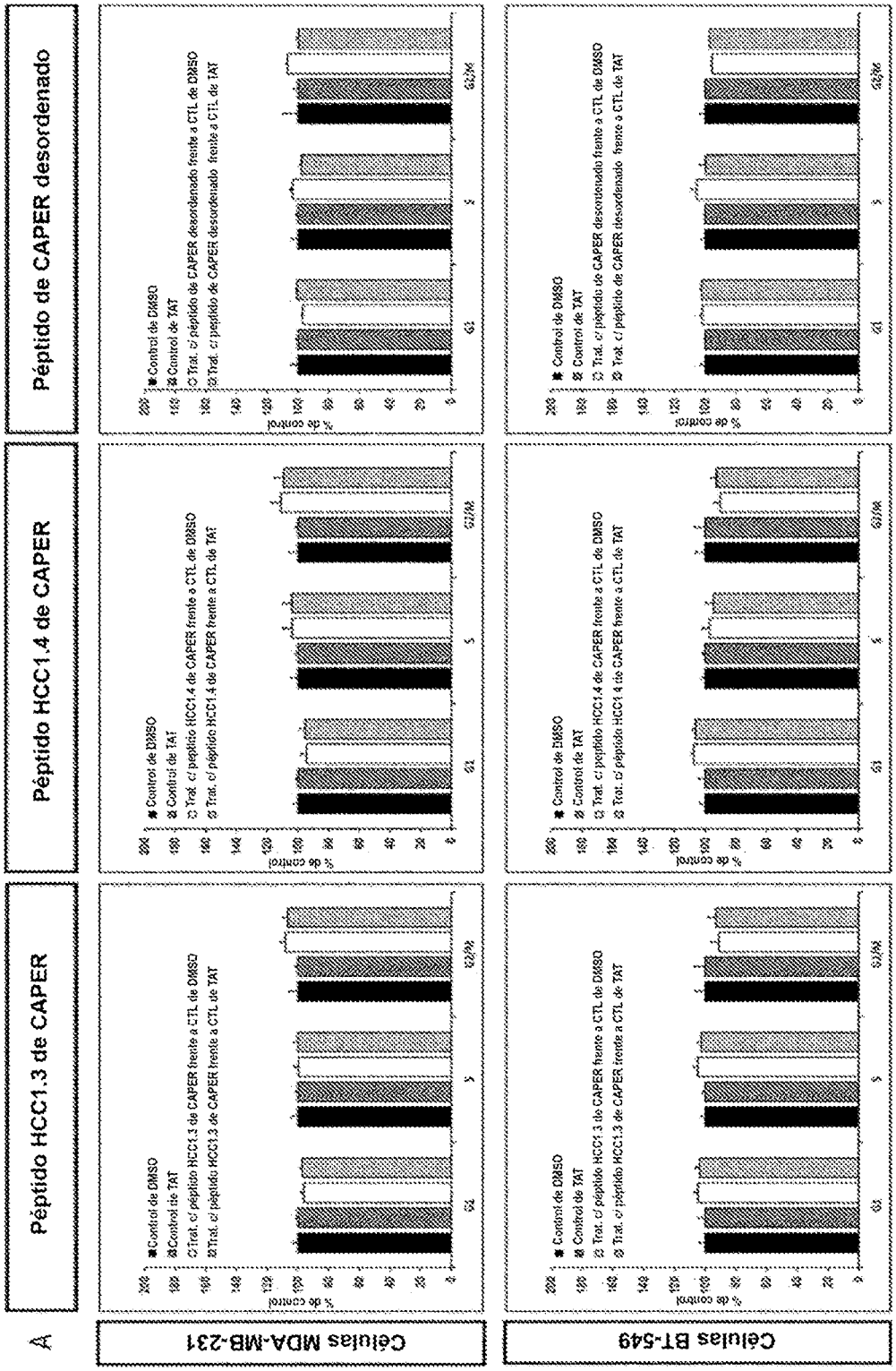

A
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Células MDA-MB-231
Células BT-549
Control de DMSO
Control de TAT
Trat. c/ péptido HCC1.3 de CAPER frente a CTL de DMSO
Trat. c/ péptido HCC1.3 de CAPER frente a CTL de TAT
Trat. c/ péptido HCC1.4 de CAPER frente a CTL de DMSO
Trat. c/ péptido HCC1.4 de CAPER frente a CTL de TAT
Trat. c/ péptido de CAPER desordenado frente a CTL de DMSO
Trat. c/ péptido de CAPER desordenado frente a CTL de TAT
% de control
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
G1
S
G2/M

FIG. 6A

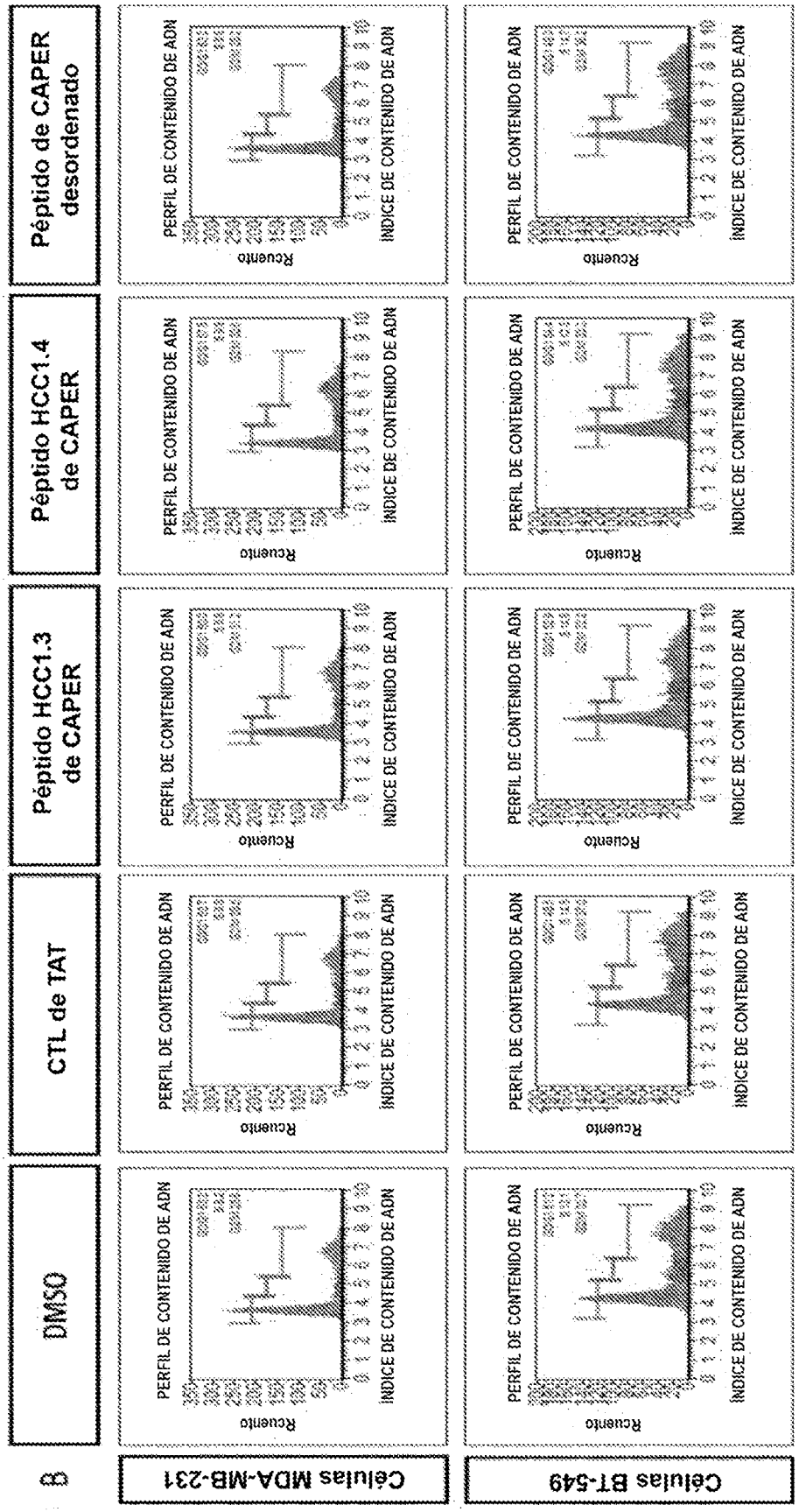

B
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido de CAPER desordenado
Células MDA-MB-231
Células BT-549
PERFIL DE CONTENIDO DE ADN
Recuento
ÍNDICE DE CONTENIDO DE ADN

FIG. 6B

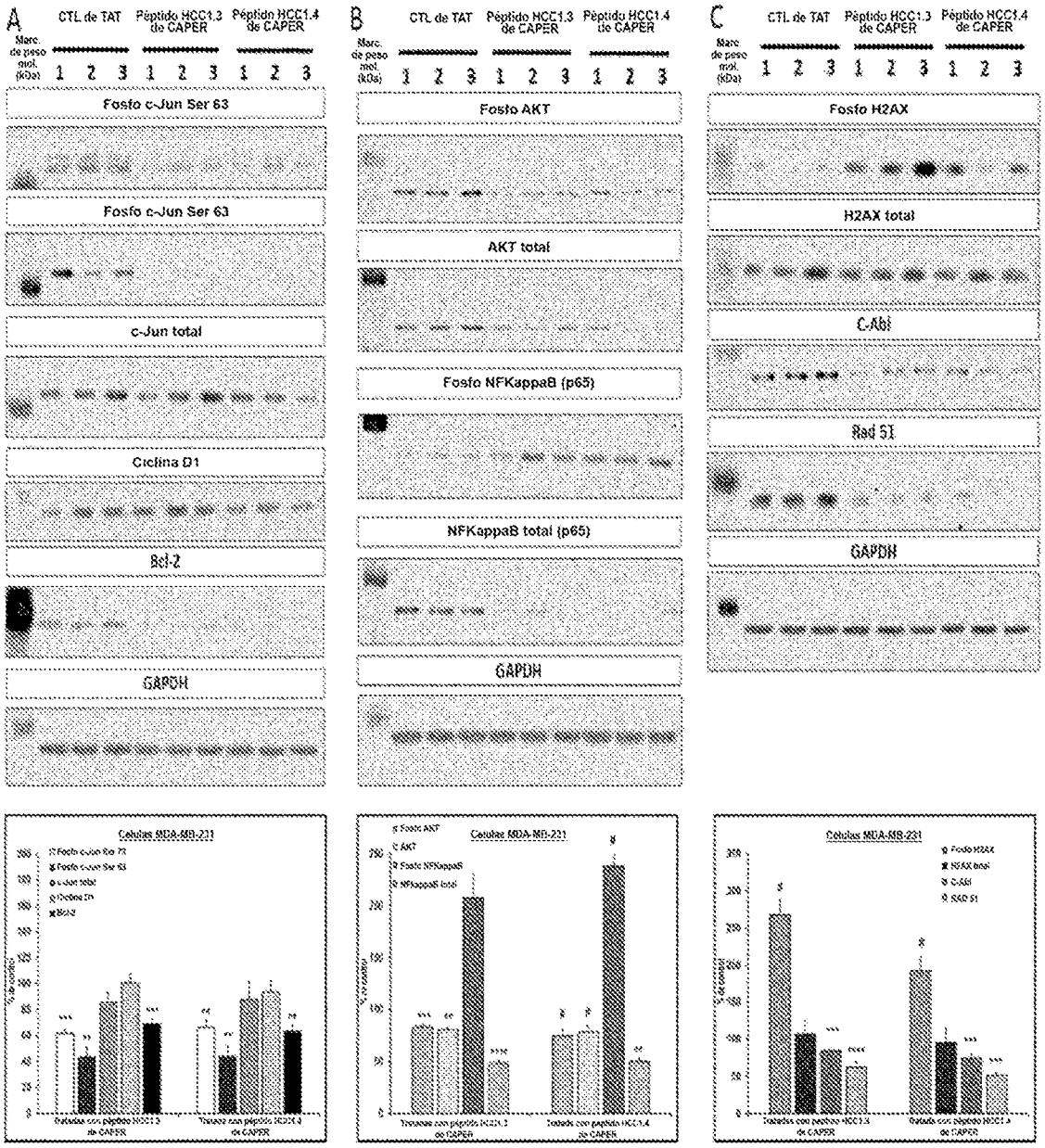

A
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Marc. de peso mol. (kDa)
1 2 3 1 2 3 1 2 3
Fosfo c-Jun Ser 63
Fosfo c-Jun Ser 63
c-Jun total
Ciclina D1
Bcl-2
GAPDH
B
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Marc. de peso mol. (kDa)
1 2 3 1 2 3 1 2 3
Fosfo AKT
AKT total
Fosfo NFKappaB (p65)
NFKappaB total (p65)
GAPDH
C
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Marc. de peso mol. (kDa)
1 2 3 1 2 3 1 2 3
Fosfo H2AX
H2AX total
C-Abl
Rad 51
GAPDH
Células MDA-MB-231
Fosfo c-Jun Ser 73
Fosfo c-Jun Ser 63
c-Jun total
Ciclina D1
Bcl-2
% de control
Tratadas con péptido HCC1.3 de CAPER
Tratadas con péptido HCC1.4 de CAPER
Fosfo AKT
AKT
Fosfo NFKappaB
NFKappaB total
Fosfo H2AX
H2AX total
C-Abl
RAD 51

FIG. 7

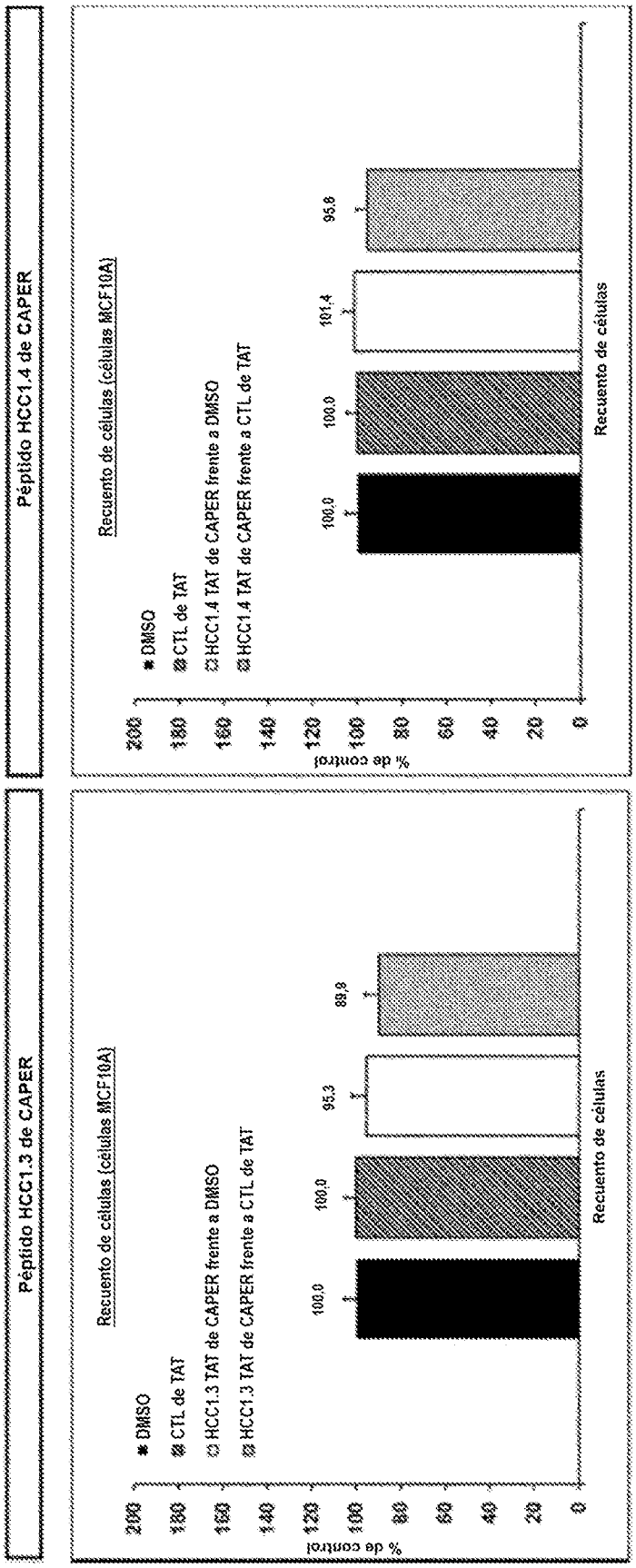

Péptido HCC1.3 de CAPER
Recuento de células (células MCF10A)
DMSO
CTL de TAT
HCC1.3 TAT de CAPER frente a DMSO
HCC1.3 TAT de CAPER frente a CTL de TAT
% de control
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
100,0
100,0
95,3
89,9
Recuento de células
Péptido HCC1.4 de CAPER
Recuento de células (células MCF10A)
DMSO
CTL de TAT
HCC1.4 TAT de CAPER frente a DMSO
HCC1.4 TAT de CAPER frente a CTL de TAT
% de control
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
100,0
100,0
101,4
95,8
Recuento de células

FIG. 8

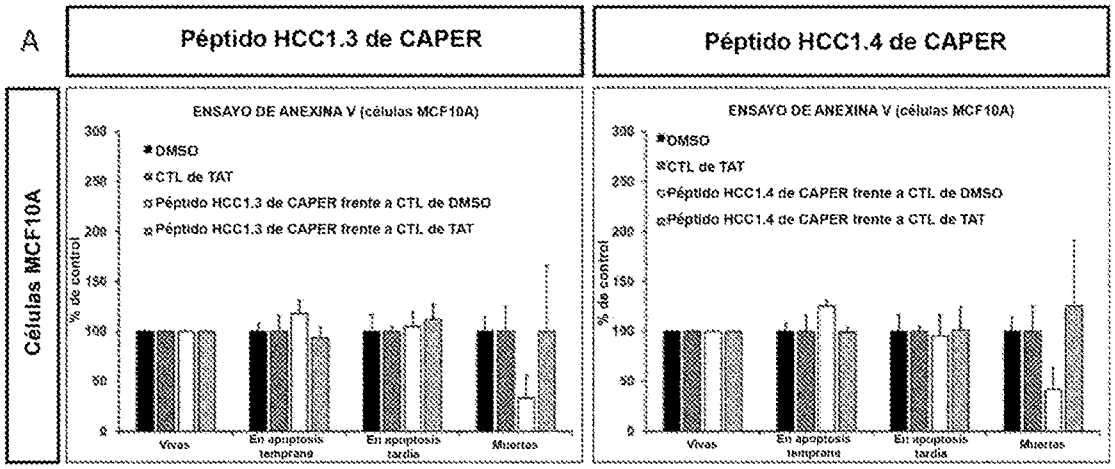

A
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Células MCF10A
ENSAYO DE ANEXINA V (células MCF10A)
% de control
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER frente a CTL de DMSO
Péptido HCC1.3 de CAPER frente a CTL de TAT
Péptido HCC1.4 de CAPER frente a CTL de DMSO
Péptido HCC1.4 de CAPER frente a CTL de TAT
Vivas
En apoptosis temprana
En apoptosis tardía
Muertas

FIG. 9A

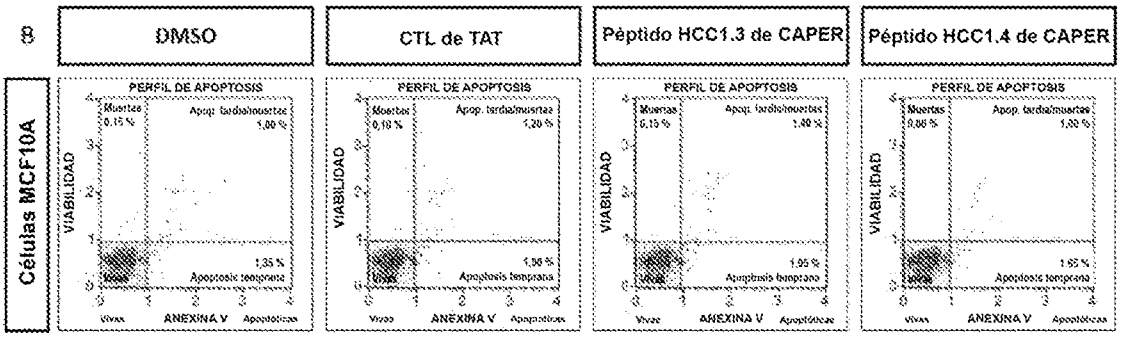

B
DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Células MCF10A
PERFIL DE APOPTOSIS
VIABILIDAD
ANEXINA V
Muertas
Apop. tardía/muertas
Apoptosis temprana
Vivas
Apoptóticas

FIG. 9B

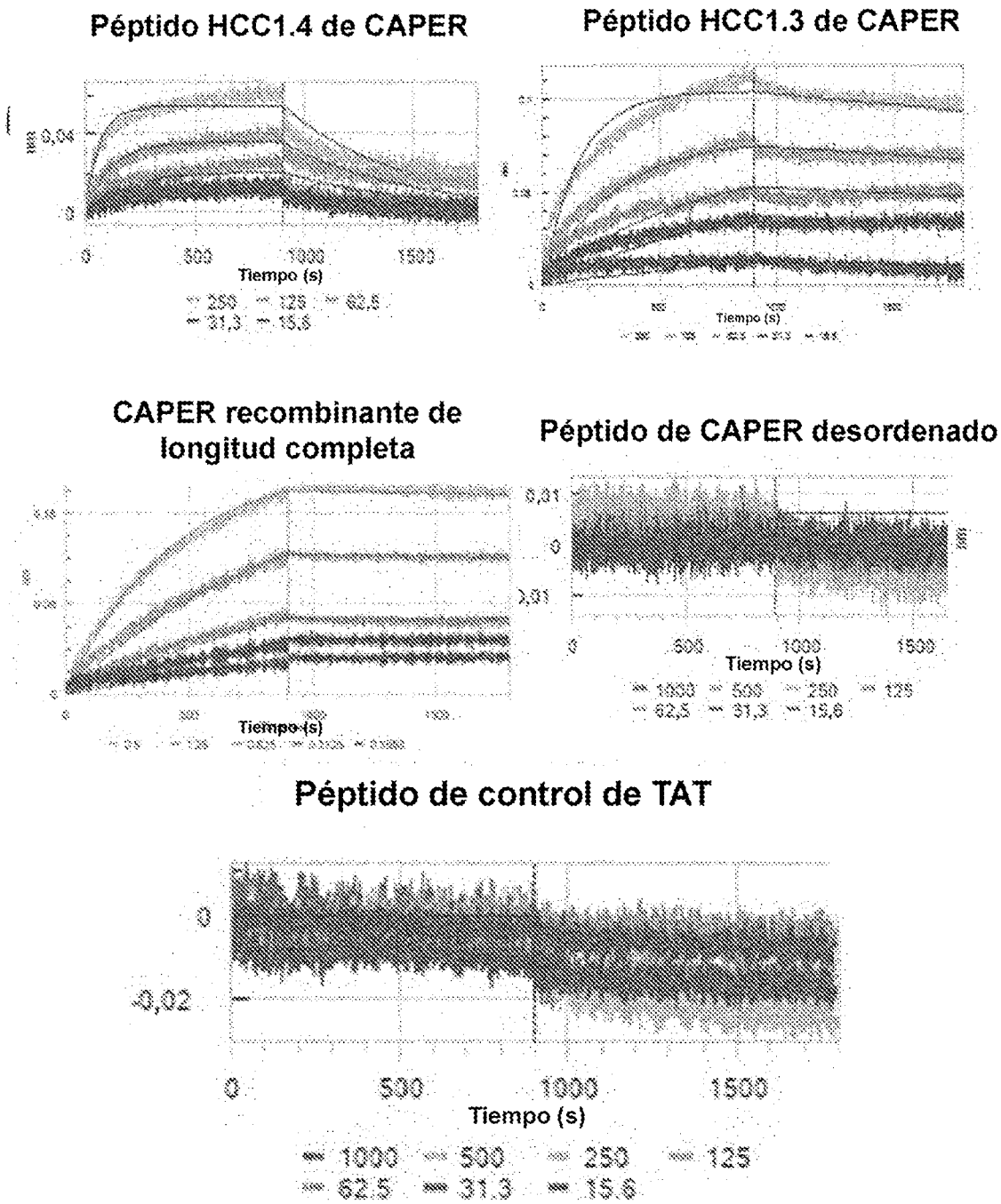

Péptido HCC1.4 de CAPER
Péptido HCC1.3 de CAPER
CAPER recombinante de longitud completa
Péptido de CAPER desordenado
Péptido de control de TAT
0,04
0
-0,02
0
500
1000
1500
Tiempo (s)
1000
500
250
125
62,5
31,3
15,6

FIG. 10A

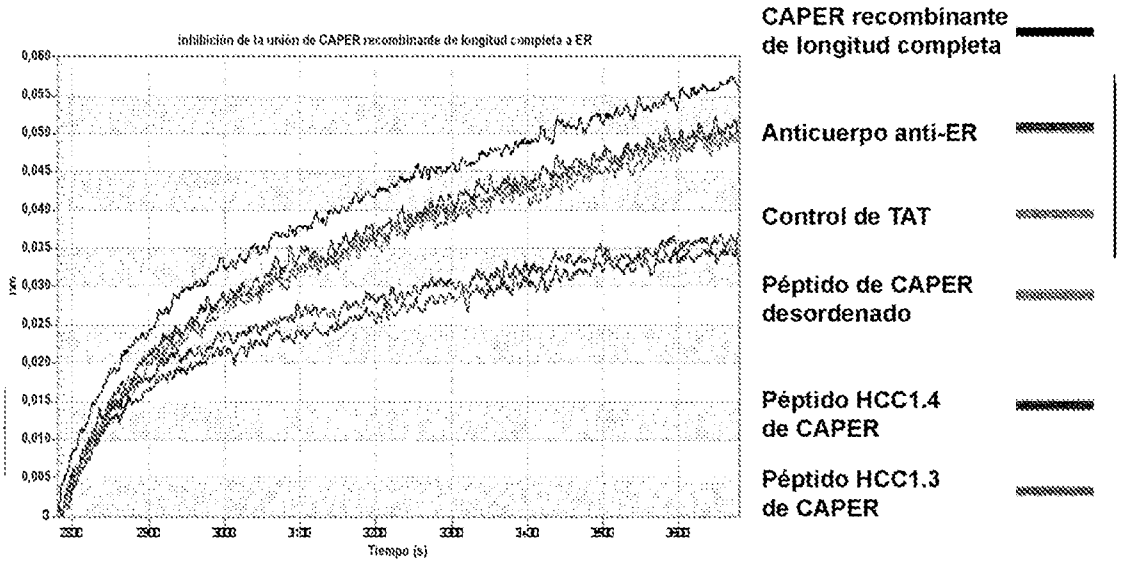


FIG. 10B

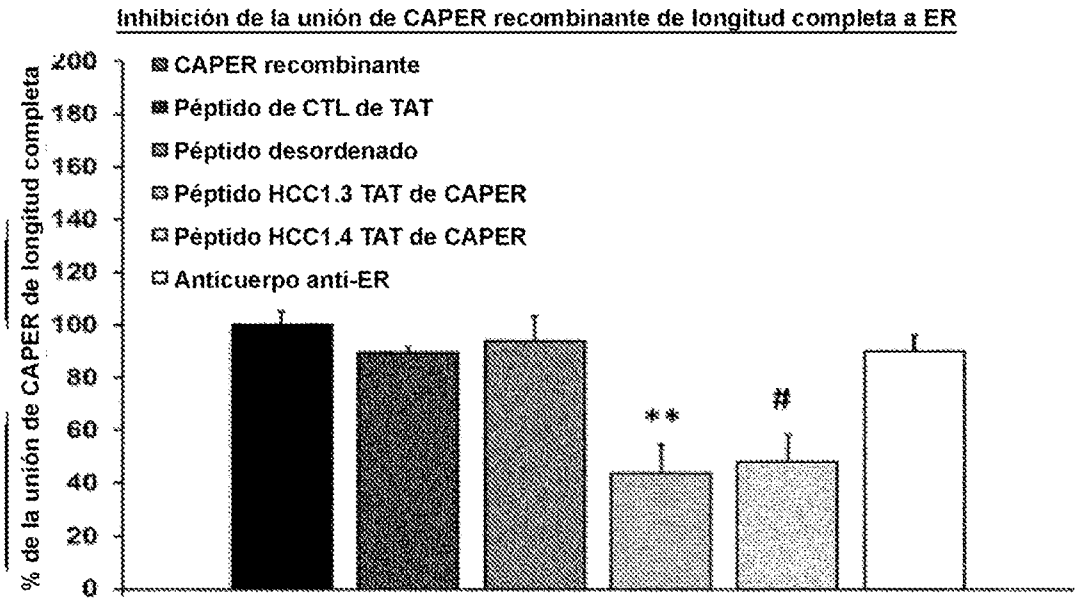
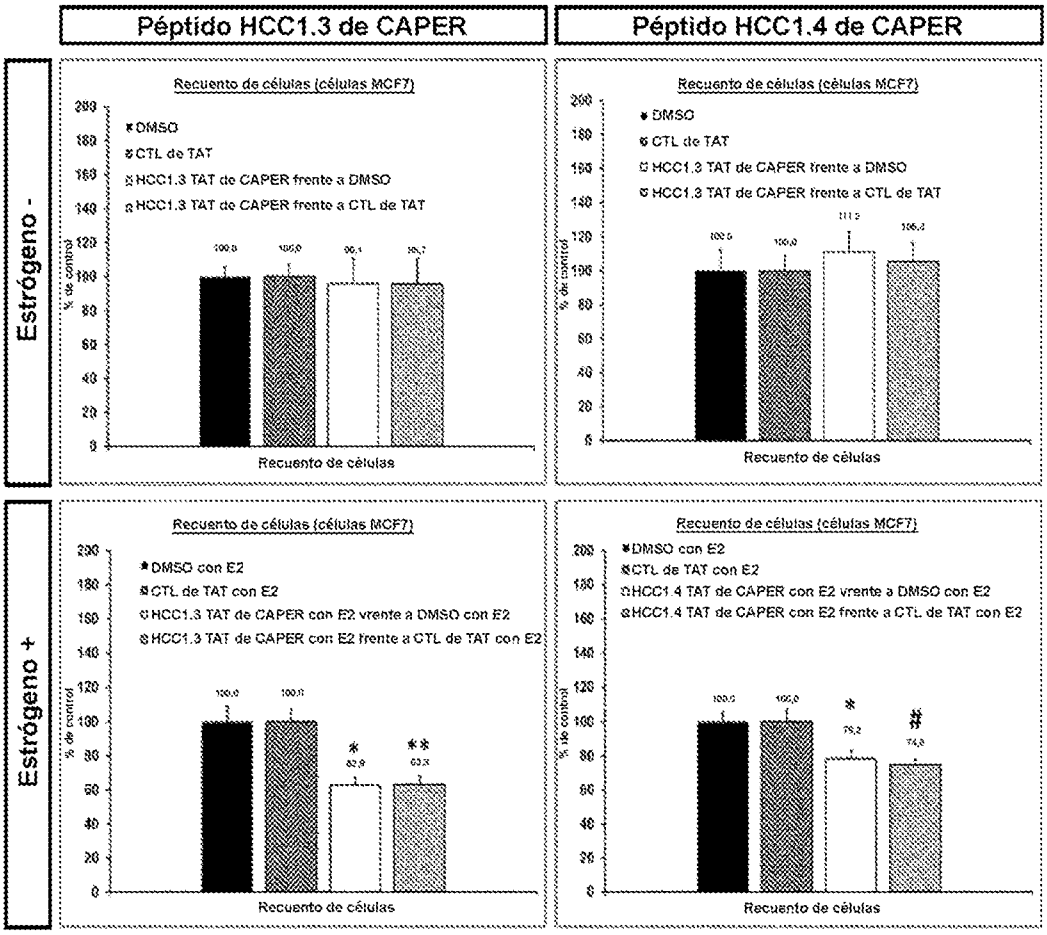


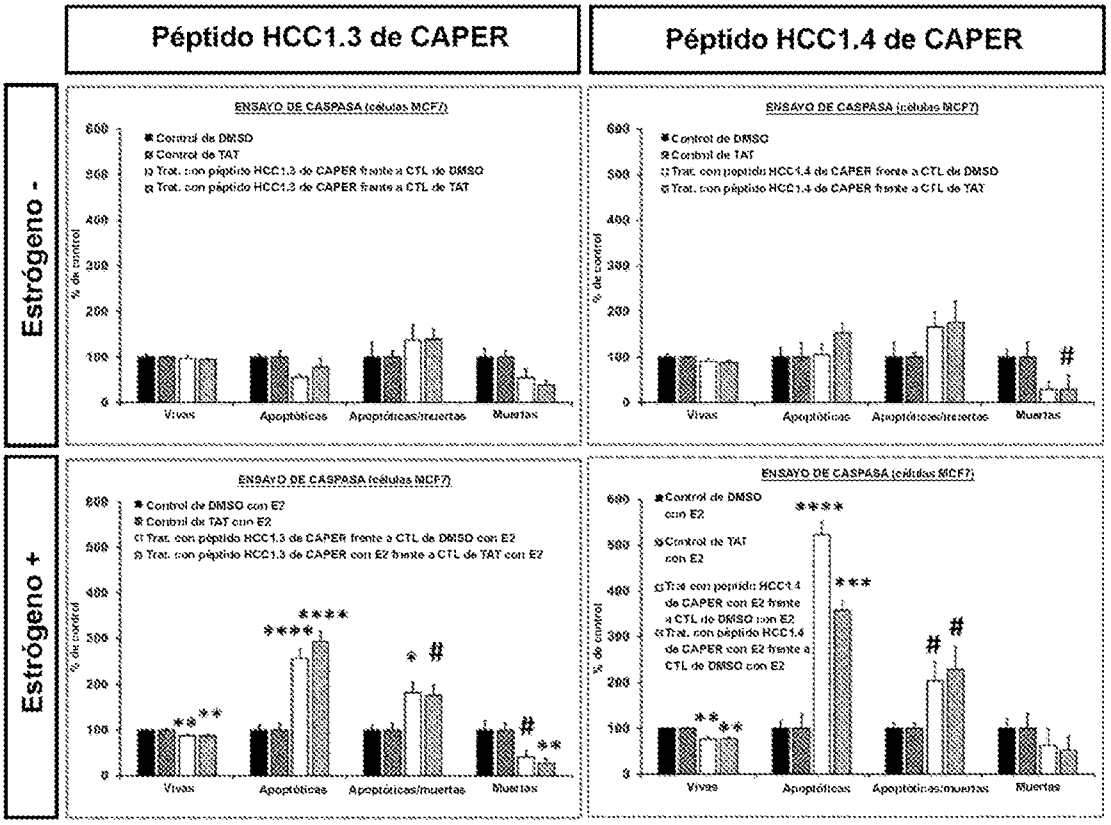
FIG. 10C



n = 5 n = 5

****p<0,0001 ***p<0,001**p<0,005, * p<0,01, # p<0,05

FIG. 11



n = 6 n = 5

****p<0,0001 ***p<0,001**p<0,005, * p<0,01, # p<0,05

FIG. 12A

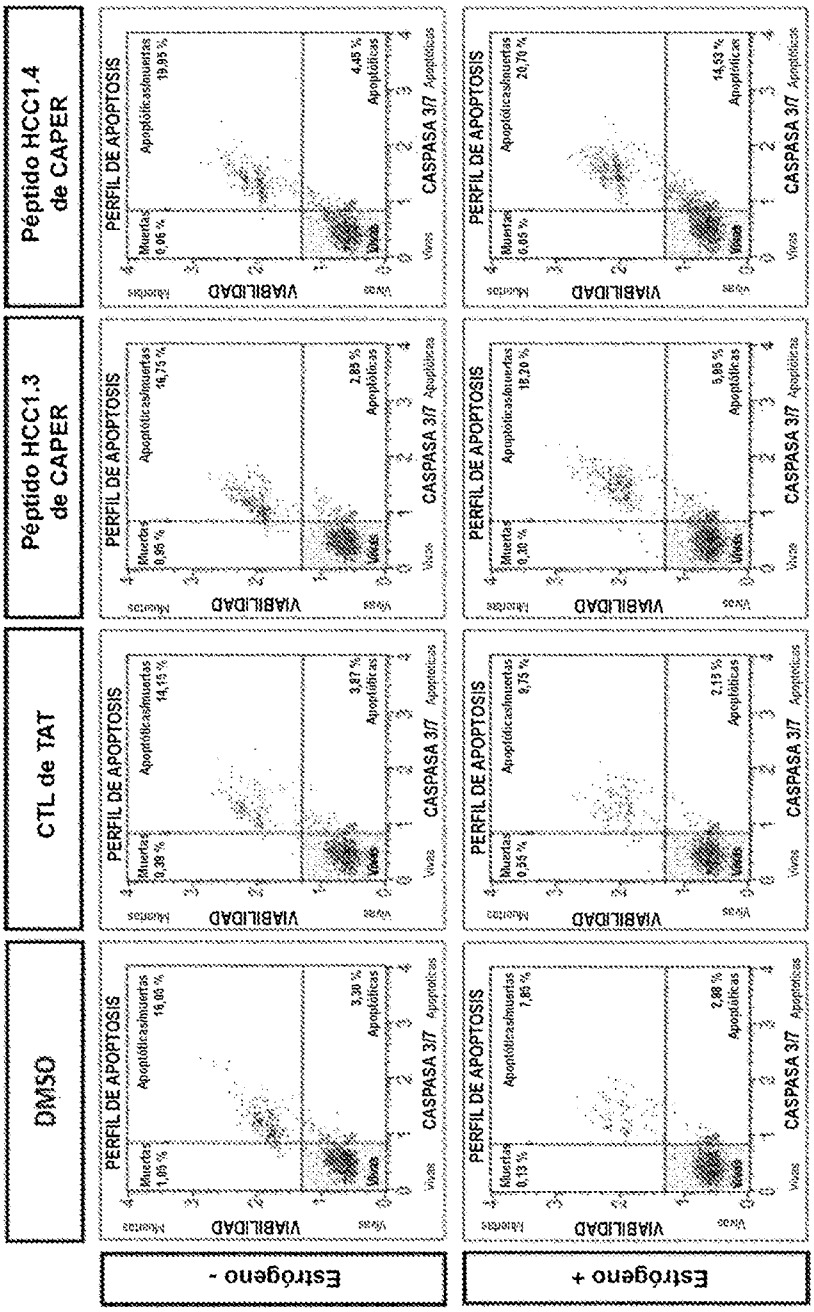
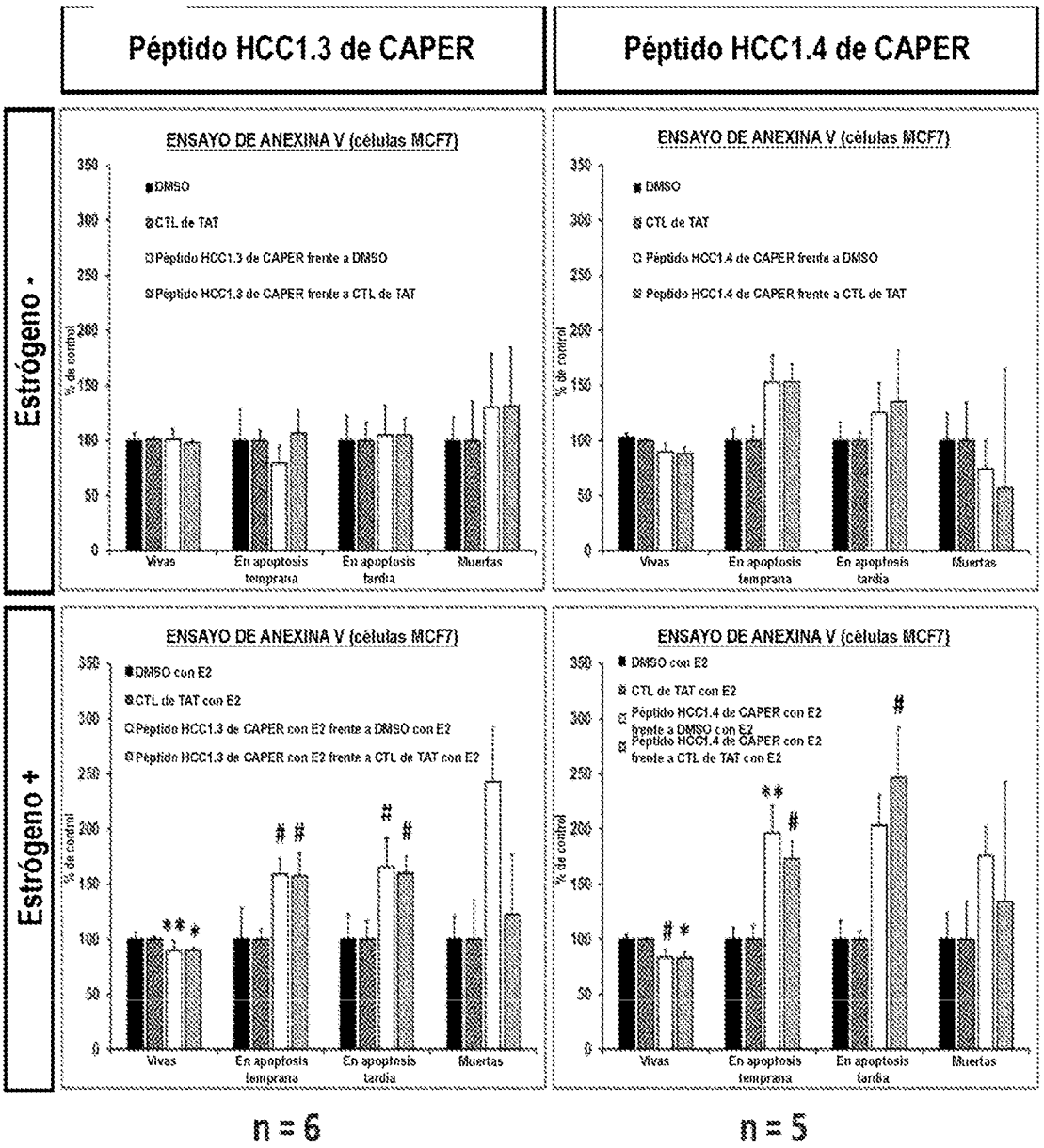

DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Estrógeno -
Estrógeno +
PERFIL DE APOPTOSIS
VIABILIDAD
CASPASA 3/7
Muertas
Vivas
Apoptóticas
Apoptóticas/muertas

FIG. 12B



****p<0,0001 ***p<0,001**p<0,005, * p<0,01, # p<0,05

FIG. 13A

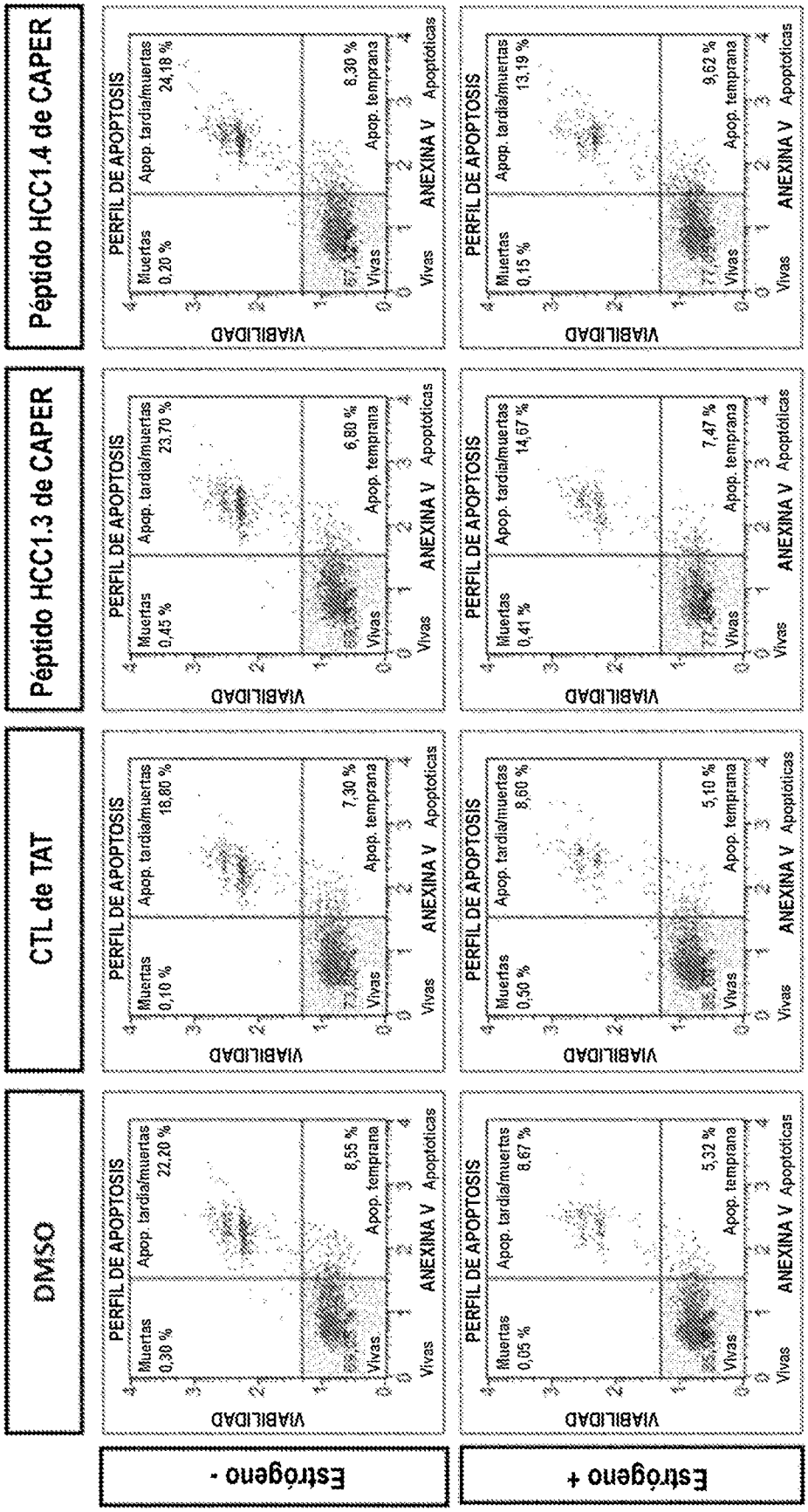
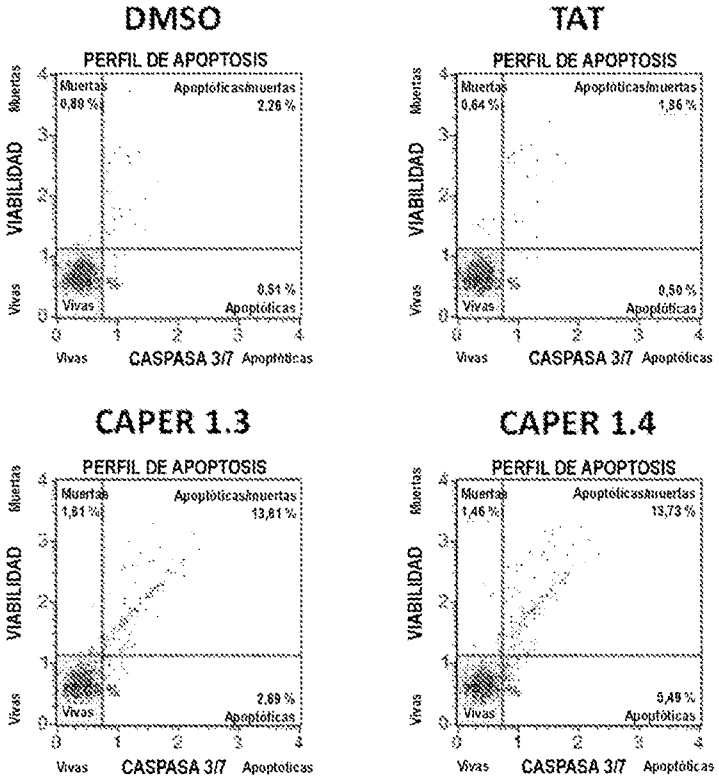

DMSO
CTL de TAT
Péptido HCC1.3 de CAPER
Péptido HCC1.4 de CAPER
Estrógeno -
Estrógeno +
PERFIL DE APOPTOSIS
VIABILIDAD
ANEXINA V
Muertas
Vivas
Apop. tardía/muertas
Apop. temprana
Apoptóticas
0,30 %
22,20 %
8,55 %
0,05 %
8,67 %
5,32 %
0,10 %
18,80 %
7,30 %
0,50 %
8,60 %
5,10 %
0,45 %
23,70 %
6,80 %
0,41 %
14,67 %
7,47 %
0,20 %
24,18 %
8,30 %
0,15 %
13,19 %
9,62 %

FIG. 13B


DMSO
PERFIL DE APOPTOSIS
Muertas
0,89 %
Apoptóticas/muertas
2,26 %
0,51 %
Apoptóticas
Vivas
VIABILIDAD
Muertas
Vivas
CASPASA 3/7
Apoptóticas
TAT
PERFIL DE APOPTOSIS
Muertas
0,64 %
Apoptóticas/muertas
1,36 %
0,50 %
Apoptóticas
Vivas
VIABILIDAD
Muertas
Vivas
CASPASA 3/7
Apoptóticas
CAPER 1.3
PERFIL DE APOPTOSIS
Muertas
1,51 %
Apoptóticas/muertas
13,81 %
2,69 %
Apoptóticas
Vivas
VIABILIDAD
Muertas
Vivas
CASPASA 3/7
Apoptóticas
CAPER 1.4
PERFIL DE APOPTOSIS
Muertas
1,46 %
Apoptóticas/muertas
13,73 %
5,49 %
Apoptóticas
Vivas
VIABILIDAD
Muertas
Vivas
CASPASA 3/7
Apoptóticas

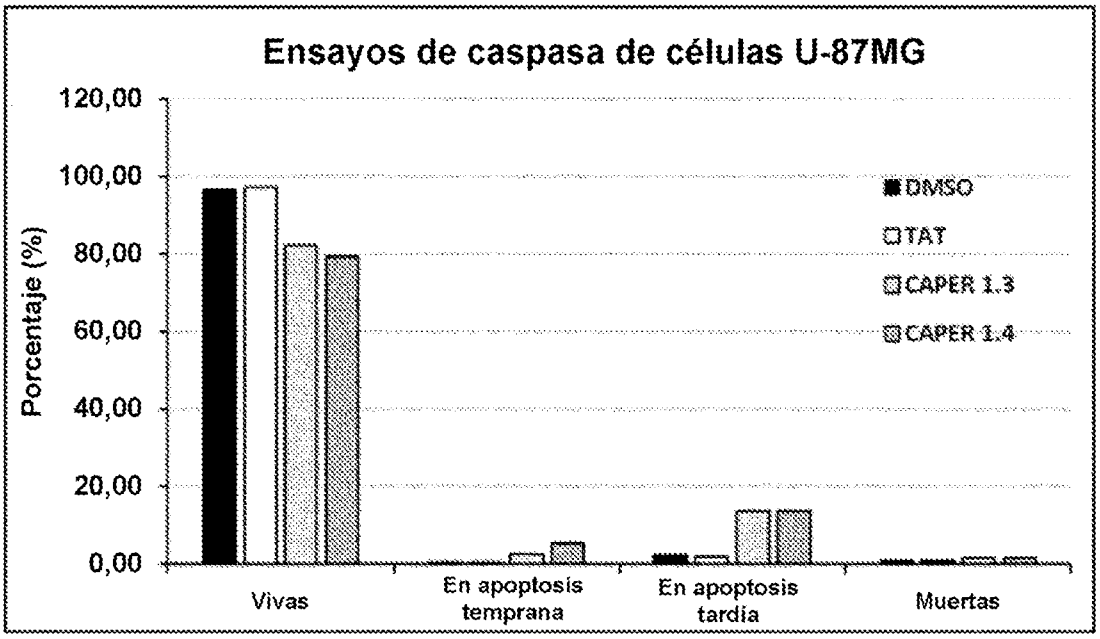

Ensayos de caspasa de células U-87MG
Porcentaje (%)
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
DMSO
TAT
CAPER 1.3
CAPER 1.4
Vivas
En apoptosis temprana
En apoptosis tardía
Muertas

FIG. 14