



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 200**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743834 .6**  
96 Fecha de presentación : **30.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1641820**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Péptido derivado de RasGAP para destruir selectivamente células cancerosas.**

30 Prioridad: **30.06.2003 US 483691 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2008**

73 Titular/es: **Université de Lausanne**  
**rue de Bugnon, 21**  
**1005 Lausanne, CH**

72 Inventor/es: **Widmann, Christian;**  
**Yang, Jiang-Yang y**  
**Michod, David**

74 Agente: **Isern Jara, Jaime**

ES 2 308 200 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

Péptido derivado de RasGAP para destruir selectivamente células cancerosas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación de al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP y una genotoxina, en la que dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 potencia la capacidad de dicha genotoxina para destruir selectivamente células cancerosas.

10 **Antecedentes de la invención**

Los tumores son diversos y heterogéneos, pero todos comparten la capacidad de proliferación sin control. La proliferación celular no regulada junto con la sensibilidad apoptótica deprimida constituye un requisito mínimo sobre el que se produce la evolución tumoral.

La apoptosis es el proceso por el que las células entran en la muerte celular programada, un fenómeno vital que tiene lugar durante el desarrollo, y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis. El acontecimiento bioquímico que se cree que somete de manera irreversible a una célula a apoptosis es la activación de caspasas (cisteína proteasas que escinden tras residuos aspárticos). Las células que experimentan la apoptosis presentan cambios morfológicos y bioquímicos característicos, que incluyen la formación de ampollas en la membrana, el redondeo celular, la condensación de cromatina, la escisión de ADN, la expresión de marcadores apoptóticos en la superficie celular y la inhibición de rutas de señalización anti-apoptóticas. Todos estos acontecimientos pueden bloquearse mediante inhibidores de caspasas específicos. Por tanto, la escisión del sustrato de caspasa es la responsable de muchos, si no de todos, los cambios característicos observados durante la apoptosis. La fase de ejecución de la apoptosis se desencadena cuando se escinden los sustratos de caspasa en una célula. Se han identificado docenas de sustratos de caspasa y la lista está aumentando continuamente (Earnshaw W.C. *et al.*, "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis" *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383, 1999). Una vez escindidos, los sustratos de caspasa median en los acontecimientos morfológicos y bioquímicos observados durante la apoptosis tales como la amplificación de la activación de caspasas, la fragmentación de ADN, la degradación nuclear, etc.

Además, se ha demostrado que las rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) regulan la apoptosis de una manera positiva o negativa (Jarpe M.B. *et al.*, "Antiapoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death" *Oncogene*, 17, 1475, 1998; Widmann C. *et al.*, "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human" *Physiol. Rev.* 79, 143, 1999). Esto podría explicar porqué las caspasas apoptóticas seleccionan como diana algunas de las proteínas de señalización que regulan MAPK y/o son componentes de las rutas de MAPK (Widmann C. *et al.*, "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for antiapoptotic signals" *J. Biol. Chem.*, 273, 7141, 1998). Estas proteínas incluyen MEKK1, PAK2, Mst1 y RasGAP.

Recientemente, Yang y Widmann, (Yang J.-Y. y Widmann C., "Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP" *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5346, 2001; "A subset of caspase substrates functions as the Jekyll and Hyde of apoptosis" *Eur. Cytokine Netw.*, 13, 387, 2002a; "The RasGAP N-terminal fragment generated by caspase cleavage protects cells in a Ras/PI3K/Akt-dependent manner that does not rely on NFkappa B" *J. Biol. Chem.*, 277, 14641, 2002b), han demostrado que RasGAP, un regulador de proteínas de unión a GTP Ras y Rho, es un sustrato de caspasa no convencional porque puede inducir tanto señales anti-apoptóticas como pro-apoptóticas, dependiendo del grado de su escisión mediante caspasas. Han demostrado que a niveles bajos de actividad caspasa, RasGAP se escinde en la posición 455, generando una secuencia N-terminal (secuencia N) y una secuencia C-terminal (secuencia C).

La secuencia C, pero no RasGAP de longitud completa, indujo una fuerte respuesta apoptótica en células HeLa tal como se valoró por su capacidad para inducir la aparición de núcleos picnóticos, la activación de la caspasa-3 y la escisión de PARP.

En el mismo estudio, los autores también han demostrado que la secuencia N, más que promover la muerte celular, parece ser un agente de bloqueo general de la apoptosis posteriormente a la activación de la caspasa. A niveles superiores de actividad caspasa, la capacidad de la secuencia N para contrarrestar la apoptosis se suprime cuando se escinde en la posición 157. Este acontecimiento de escisión posterior genera dos secuencias, N1 y N2, que al contrario que la secuencia N, se ha demostrado que sensibilizan las células que pueden desarrollar altas actividades caspasa hacia la apoptosis inducida por cisplatino, un fármaco usado en la quimioterapia para tratar cánceres.

Sin embargo, se ha demostrado en Leblanc *et al* (Leblanc V. *et al.*, "Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells" *Oncogene*, 18, 4884, 1999) que la inyección de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio SH3 de la secuencia N2 de RasGAP para inhibir esta proteína específicamente induce la apoptosis en células cancerosas. También se conoce a partir de la solicitud de patente WO99/65947 (Parker *et al.*) que anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína de unión al dominio SH3 de RasGAP, G3BP, inducen la apoptosis en células cancerosas en las que G3BP está específicamente sobreexpresada.

Estos resultados parecen indicar que la ruta de RasGAP que regula el crecimiento, a través del dominio SH3 de RasGAP, es esencial para que algunas células cancerosas sobrevivan. Estos hallazgos parecen ser lo contrario de los resultados obtenidos por Yang y Widmann, llevando por tanto a la conclusión de que el dominio SH3 de RasGAP tiene una función bastante ambivalente en la inducción y regulación de la apoptosis en células.

5

También se conocen a partir de solicitud de patente internacional WO94/03597 (Duchesne *et al.*) y a partir de Duchesne *et al.*, (Duchesne *et al.*, Identification of the SH13 domain of GAP as an essential sequence for RasGAP-mediated signalling” en Science, 259, 525-528, 1993) péptidos que pueden inhibir al menos parcialmente la actividad de transformación de proteínas p21 activadas. Uno de estos péptidos es un péptido derivado de RasGAP y que tiene la secuencia de aminoácidos WMWVTNLRD. No hay, sin embargo, ninguna indicación de que dichos péptidos aumenten la capacidad para potenciar la apoptosis o destruir selectivamente células tumorales tratadas con genotoxinas.

10

De manera similar, la solicitud de patente internacional WO03/018630 (French *et al.*) da a conocer un péptido de 61 aminoácidos (SEQ ID N°6) que comprende el polipéptido WMWVTNLRD y el uso del mismo para el tratamiento del cáncer de mama. De nuevo, no hay ninguna indicación de que dicho péptido aumente la capacidad para potenciar la apoptosis o destruir selectivamente células tumorales tratadas con genotoxinas.

15

La quimioterapia, sola o en combinación con otros tratamientos (por ejemplo, la radioterapia) es actualmente una de las herramientas terapéuticas más comunes y eficaces para tratar cánceres. La eficacia de los fármacos usados en la quimioterapia para tratar cánceres depende de su capacidad para destruir células cancerosas. Sin embargo, hay una limitación en el uso de estos fármacos que proviene del hecho de que también pueden afectar de manera adversa las células normales, células no cancerosas, ya que no sólo inducen una fuerte estimulación de caspasa en células cancerosas sino también células normales, células no cancerosas, especialmente aquellas células que se dividen rápidamente.

20

Por tanto, el reto para los médicos es elegir las dosis de los fármacos que sean lo suficientemente altas como para eliminar los tumores pero no tan altas como para inducir efectos secundarios graves en los pacientes tales como la pérdida de cabello, náuseas y vómitos, toxicidad cardíaca y cánceres secundarios.

25

La mejora de la selectividad de fármacos hacia células cancerosas obviamente aumentaría la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos, permitiendo así dosis inferiores de fármacos. Esto daría como resultado también la reducción, tanto como fuera posible, de los efectos secundarios graves enumerados anteriormente.

30

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un enfoque mejorado, en combinación con un fármaco, para el tratamiento o la prevención de cánceres, que no tiene los inconvenientes mencionados anteriormente.

35

### Sumario de la invención

Se ha conseguido este objetivo proporcionando una composición farmacéutica que comprende una combinación de al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP y una genotoxina, en la que dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 potencia la capacidad de dicha genotoxina para destruir selectivamente células cancerosas.

40

Además, la invención proporciona un kit para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que comprende la composición farmacéutica según la invención.

45

### Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el porcentaje de inducción de apoptosis mediante diversos fármacos en células HeLa transfectadas o bien con fragmento N2 o bien con un plásmido pcDNA vacío.

50

Se sembraron en placa células HeLa ( $2 \times 10^6$ ) en placas Petri de 10 cm de diámetro, se transfectaron con  $1 \mu\text{g}$  de plásmido que expresa GFP (para marcar las células transfectadas) junto con  $2 \mu\text{g}$  de un plásmido pcDNA3 vacío o  $2 \mu\text{g}$  de un vector pcDNA3 que codifica para el fragmento N2. Un día tras la transfección, las células se incubaron durante 24 horas con las concentraciones indicadas de cisplatino, adriamicina o mitoxantrona. Entonces se anotó el número de células GFP-positivas que mostraban un núcleo picnótico.

55

Los resultados correspondían a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre células control y células tratadas con cisplatino (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

60

La figura 2A es una representación esquemática de los distintos constructos usados en este estudio. SH representa el dominio de homología Src.

La figura 2B muestra el porcentaje de inducción de apoptosis mediante cisplatino en células transfectadas con plásmidos que codifican para los constructos descritos en la figura 2.

65

Se transfectaron células HeLa tal como se describe en la figura 1 con plásmidos que codifican para los constructos descritos en la figura 2A. Entonces se trataron o no células HeLa con cisplatino  $0,15 \mu\text{M}$  y se determinó el grado de

## ES 2 308 200 T3

apoptosis 20 horas después. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las células tratadas con cisplatino 0,15  $\mu\text{M}$  y las células sin tratamiento (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

5 La figura 3 muestra el contraste de fase e imágenes de epifluorescencia de células vivas incubadas con péptido RasGAP<sub>317-326</sub> marcado con FITC.

Se incubaron las siguientes líneas celulares (HeLa, U2OS, H-Mesol, MCF-7, HaCat y HUV-EC-C) durante 3 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% en medio de cultivo con péptido RasGAP<sub>317-326</sub> marcado con FITC 20  $\mu\text{M}$  y entonces se lavaron tres veces con medio de cultivo.

10 La figura 4A muestra el porcentaje de inducción de apoptosis mediante diversos fármacos en dos células no cancerosas tratadas o no con TAT-RASGAP<sub>317-326</sub>.

15 Se incubaron dos líneas celulares no cancerosas (HaCat y HUV-EC-C) con concentraciones crecientes de cisplatino, adriamicina y mitoxantrona en ausencia o en presencia de TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> 20  $\mu\text{M}$ . El grado de apoptosis se anotó 20 horas después.

20 La figura 4B muestra el porcentaje de inducción de apoptosis mediante diversos fármacos en cuatro líneas celulares cancerosas tratadas o no con TAT-RASGAP<sub>317-326</sub>.

25 Se sembraron cuatro líneas celulares cancerosas (HeLa, U2OS, MCF-7 Y H-Mesol) en placas de 6 pocillos y se trataron con las concentraciones indicadas de cisplatino, adriamicina y mitoxantrona en ausencia o en presencia de péptidos o bien HIV-TAT<sub>48-57</sub> o bien TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> 20  $\mu\text{M}$  durante 20 horas. Entonces se anotó el número de células que presentaban un núcleo picnótico. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las células tratadas con genotoxina incubadas con TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> y aquellas que se dejaron sin tratar o incubadas con el péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub> (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

30 La figura 5A muestra la actividad NF $\kappa$ B en células U2OS tratadas con cisplatino y en presencia de péptidos HIV-TAT<sub>48-57</sub> o TAT-RasGAP<sub>317-326</sub>.

35 Se sembraron en placa células U2OS ( $1 \times 10^5$ ) en placas de 6 pocillos y se transfectaron con 1  $\mu\text{g}$  de un plásmido indicador de luciferasa para actividad NF $\kappa$ B y 0,1  $\mu\text{g}$  de un plásmido que codifica para la luciferasa de Renilla. Las células se trataron un día después con las concentraciones indicadas de cisplatino en ausencia o en presencia de péptidos HIV-TAT<sub>48-57</sub> o TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> 20  $\mu\text{M}$  durante 20 horas. Los datos representan la actividad luciferasa de luciérnaga normalizada a actividad luciferasa de Renilla y expresada como las veces en que aumenta la actividad NF $\kappa$ B basal obtenida en células control no tratadas. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las condiciones indicadas (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

40 La figura 5B muestra la actividad NF $\kappa$ B en células U2OS tratadas con cisplatino y en presencia de péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub> y I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N2 o péptido TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> y I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N2.

45 Se transfectaron células U2OS con 1  $\mu\text{g}$  de un plásmido indicador de luciferasa de luciérnaga para actividad NF $\kappa$ B, 0,1  $\mu\text{g}$  de un plásmido que codifica para la luciferasa de Renilla, 0,5  $\mu\text{g}$  de un plásmido que expresa GFP (para marcar las células transfectadas), 1  $\mu\text{g}$  de un plásmido que codifica I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N2 que inhibe la ruta de NF $\kappa$ B o con 1  $\mu\text{g}$  de un vector pcDNA3 vacío. Se incubaron las células un día después con concentraciones crecientes de cisplatino en presencia de HIV-TAT<sub>48-57</sub> o TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> 20  $\mu\text{M}$  durante un periodo adicional de 20 horas. Entonces, se lisaron las células y se valoró la actividad NF $\kappa$ B tal como se describió en el panel A, excepto que los resultados se expresaron como las veces en que aumenta la actividad NF $\kappa$ B detectada en las células incubadas con el péptido control HIV-TAT<sub>48-57</sub>.

La figura 5C muestra el porcentaje de apoptosis de células transfectadas de la figura 5A y B.

55 Alternativamente, se determinó el número de células GFP-positivas que muestra un núcleo picnótico. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones independientes.

La figura 6 representa inmunotransferencias de tipo Western y el porcentaje de fosforilaciones de JNK de células U2OS transfectadas con péptidos o bien HIV-TAT<sub>48-57</sub> o bien TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> y tratadas con cisplatino.

60 Se sembraron en placa células U2OS ( $2 \times 10^5$ ) en placas de 6 pocillos y se trataron durante los periodos de tiempo indicados con las combinaciones indicadas de los péptidos HIV-TAT<sub>48-57</sub> o TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> (a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ ) y cisplatino (a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ ). Los controles positivos para JNK y activación de p38 se obtuvieron siguiendo la estimulación de las células con anisomicina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 3 horas y con sorbitol 0,5 M durante 30 minutos, respectivamente. Las cuantificaciones representadas bajo las inmunotransferencias de tipo Western se realizaron sobre las bandas de 12 horas y se normalizaron con respecto a los controles positivos. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

**Descripción detallada de la invención**

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación de al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRTX, en la que X representa un aminoácido, y una genotoxina, caracterizada porque dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 potencia la capacidad de dicha genotoxina para destruir selectivamente células cancerosas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “péptido”, “proteína”, “polipéptido”, “polipeptídico” y “peptídico” se usan de manera intercambiable para designar una serie de residuos de aminoácido conectados entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de residuos adyacentes.

RasGAP, un regulador de las proteínas de unión a GTP Ras y Rho, es un sustrato de caspasa no convencional porque induce tanto señales anti-apoptóticas como pro-apoptóticas, dependiendo del grado de su escisión mediante caspasas. A niveles bajos de caspasas, RasGAP se escinde en la posición 455, generando un fragmento N-terminal (fragmento N, de aproximadamente 56 kD) y un fragmento C-terminal (fragmento C, de aproximadamente 64 kD). El fragmento N parece ser un agente de bloqueo general de la apoptosis posteriormente a la activación de la caspasa (Yang J.-Y. y Widmann C., Mol. Cell. Biol., 21, 5346, 2001 y J. Biol. Chem., 277, 14641, 2002b). A niveles altos de actividad caspasa, el fragmento se escinde adicionalmente en la posición 157, generando así dos fragmentos, N1 (aminoácidos 1 a 157) y N2 (aminoácidos 158 a 455).

“Célula cancerosa” significa una célula que surge en un animal *in vivo* que puede realizar un crecimiento celular no regulado e indeseado o una persistencia anómala o invasión anómala de tejidos. *In vitro*, este término también se refiere a una línea celular que es un cultivo celular establecido permanentemente inmortalizado que proliferará indefinidamente y de manera no regulada cuando se le proporcione medio nuevo y espacio apropiados.

El término “fármaco” se refiere a fármacos que pueden destruir células de mamífero, preferiblemente células humanas. Hay varias clases de fármacos de diferente origen y con distintos modos de acción.

Los fármacos de la presente invención se refieren a agentes que se derivan de, o que modulan de manera beneficiosa procesos biológicos de huésped. Interferones, factores de crecimiento tumoral, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento tales como GM-CSF y G-CSF e interleucinas tales como interleucina-2, interleucina-6, interleucina-7 e interleucina-12 son ejemplos de tales fármacos biológicos usados en la terapéutica del cáncer.

Un fármaco de la presente invención también puede referirse a agentes que dañan el ADN y/o que evitan que las células se multipliquen, tales como genotoxinas. Las genotoxinas pueden seleccionarse del grupo que comprende agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes de corte de ADN, agentes de unión de ADN, venenos de la topoisomerasa y venenos del huso.

Ejemplos de agentes alquilantes son lomustina, carmustina, estreptozocina, mecloretamina, melfalán, mostaza nitrogenada de uracilo, clorambucilo, ciclofamidina, ifosfamida, cisplatino, carboplatino, mitomicina, tiotepa, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, trietilenmelamina, busulfano, pipobromán, mitotano y otros derivados de platino. Un ejemplo de cortadores de ADN es la bleomicina.

Los venenos de las topoisomerasas pueden seleccionarse del grupo que comprende topotecan, irinotecan, sal sódica de camptotecina, daorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitoxantrona tenipósido, adriamicina y etopósido.

Ejemplos de agentes de unión de ADN son la dactinomomicina y mitramicina mientras que los venenos del huso pueden seleccionarse del grupo que comprende vinblastina, vincristina, navelbina, paclitaxel y docetaxel.

Como fármaco también pueden usarse antimetabolitos que pueden seleccionarse de los siguientes compuestos: metotrexato, trimetrexato, pentostatina, citarabina, ara-CMP, fludarabina fosfato, hidroxurea, fluorouracilo, floxuridina, clorodesoxiadenosina, gemcitabina, tioguanina y 6-mercaptopurina.

Preferiblemente una genotoxina, más preferiblemente cisplatino, mitoxantrona y adriamicina se usan como fármaco en la presente invención.

Las genotoxinas pueden usarse solas o en combinación entre sí. En el caso en que se utilice más de una genotoxina en la determinación de una combinación útil de genotoxinas está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, y dependerá, por ejemplo, de las células cancerosas que han de destruirse.

El término “potenciar”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un péptido de la invención para aumentar el efecto de una genotoxina para destruir células. Esta capacidad puede medirse *in vitro*, por ejemplo, midiendo el porcentaje de apoptosis de células que contienen un péptido de la invención y tratadas con al menos un fármaco anotando el número de células que muestran núcleos picnóticos (un marcador de células apoptóticas). Normalmente, se comparan los resultados con aquéllos de células tratadas con fármaco que no contiene dicho péptido de la invención. Se considerará que un péptido que da lugar a un aumento de dos veces o más de la apoptosis en células a una concentración dada o que disminuye en al menos dos veces la dosis de un fármaco para inducir una respuesta apoptótica potencia la capacidad de un fármaco para destruir células.

## ES 2 308 200 T3

Tal como se usa en el presente documento, el término “selectivamente” significa que el péptido de la invención que esencialmente consiste en un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP potencia la capacidad de genotoxina para destruir células a una concentración dada, específicamente células cancerosas pero sorprendentemente no en células no cancerosas.

Los intervalos de concentración de la genotoxina *in vitro* en los que el péptido de la invención potencia la capacidad de una genotoxina para destruir selectivamente células en células cancerosas dependen habitualmente de la genotoxina usada. Por ejemplo, habitualmente la concentración de la genotoxina *in vitro* está entre 0,1 y 100  $\mu\text{M}$ , preferiblemente entre 0,15 y 30  $\mu\text{M}$ .

La secuencia N2 de la proteína RasGAP se deriva preferiblemente del ser humano y se refiere a una proteína de 36 kD que consisten en 297 aminoácidos que abarca dos dominios SH2 y un dominio SH3 tal como se muestra en la figura 2A.

En general, los dominios Src de homología 2 (SH2) están implicados en el reconocimiento de tirosina fosforilada mientras que los dominios Src de homología 3 (SH3) a menudo son indicativos de una proteína implicada en la transducción de señales relacionada con la organización citoesquelética.

“Fragmento” se refiere a una secuencia que contiene menos aminoácidos en longitud que la secuencia N2 de la proteína RasGAP. Esta secuencia puede usarse siempre y cuando exhiba las mismas propiedades que la secuencia nativa de la que se deriva. Preferiblemente, esta secuencia contiene menos del 90%, preferiblemente menos del 60%, en particular menos del 30% de aminoácidos en longitud que la secuencia N2 respectiva de la proteína RasGAP.

La secuencia N2, así como un fragmento de la misma, puede prepararse mediante una variedad de métodos y técnicas conocidos en la técnica tales como por ejemplo técnicas de síntesis química o recombinantes tal como se describe en Maniatis *et al.* 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

Preferiblemente, el fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP comprende la secuencia de aminoácidos del dominio SH3 de la secuencia N2.

Sorprendentemente, los solicitantes han caracterizado un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que todavía potencia la capacidad de una genotoxina para destruir selectivamente células cancerosas y que también tiene la ventaja de que se sintetiza más fácilmente. Los solicitantes han generado una serie de versiones truncadas del fragmento N, tal como se muestra en la figura 2A y han determinado su capacidad para potenciar la apoptosis inducida por genotoxinas en una línea celular cancerosa (Figura 2B). Estos fragmentos de la secuencia N2 se han clonado en un vector y se han transfectado en una línea celular cancerosa (Hela).

Los solicitantes han demostrado que las células HeLa transfectadas con un constructo vacío o con un constructo que solamente codifica para el dominio SH2 de N2 no intensifican la destrucción inducida por cisplatino. En contraposición, las células que expresan los constructos que contienen el dominio SH3 tuvieron una potenciación aumentada de la apoptosis inducida por cisplatino, tal como se muestra en la figura 2B.

Entonces, los solicitantes han generado truncamientos progresivos en el dominio SH3 para intentar identificar una secuencia de intensificación mínima. Todos estos constructos o fragmentos de la secuencia N2 (figura 2A), incluyendo el más corto (317-326) que codifica para un péptido con una longitud de 10 aminoácidos, potenciaron la capacidad del cisplatino para destruir células HeLa (figura 2B). Estos resultados demuestran que la propiedad de intensificar la muerte celular del fragmento N2 no requiere un dominio SH3 completo pero está mediada por una parte del dominio SH3 tal como una secuencia peptídica corta.

El fragmento del dominio SH3 contiene preferiblemente menos de o igual a 70, más preferiblemente menos de o igual a 30, lo más preferiblemente menos de o igual a 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del dominio SH3.

En particular, la presente invención abarca una composición farmacéutica que comprende un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que consiste en las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN de la tabla 1:

ES 2 308 200 T3

TABLA 1

Secuencias	Nombre	Secuencias de ADN	Secuencias de aminoácidos
5 SEQ ID N°1	RasGAP <sub>284-361</sub>	gaagatagaaggcgtgtacgagctattctacctta caca <del>aa</del> agta <del>cc</del> gacactgatgaataagtttct taa <del>agg</del> gatatg <del>tt</del> cattg <del>tt</del> cataatgaatta gaagatggatggatgtgggttaca <del>aa</del> tttaagaac agatgaacaaggccttatg <del>tt</del> gaagacctagtag aagaggtggg <del>cc</del> gggaagaagatccacatgaagga aaaataggttccatgggaagatttcaa <del>ac</del> agga agct	EDRRRVRAILPYTKV PDTDEISFLKGMFI VHNELEDGMMWVTNL RTDEQGLIVEDLVEE VGREEDPHEGKIWFH GKISKQEA
10 SEQ ID N°2	RasGAP <sub>284-341</sub>	gtacgagctattctaccttacacaaaagtaccaga cactgatgaaataagtttcttaa <del>agg</del> gatatgt tcatg <del>tt</del> cataatgaattagaagatggatggatg tgggttaca <del>aa</del> tttaagaacagatgaacaaggcct tattg <del>tt</del> gaagacctagtagaagaggtggg <del>cc</del> ggg aagaagatccacatgaagga <del>aa</del> aatatgg	RVRAILPYTKVPD EISFLKGMFIVHNE LEDGMMWVTNLRTDE QGLIVEDLVEEVGRE EDPHEGKIW
15 SEQ ID N°3	RasGAP <sub>284-336</sub>	gtacgagctattctaccttacacaaaagtaccaga cactgatgaaataagtttcttaa <del>agg</del> gatatgt tcatg <del>tt</del> cataatgaattagaagatggatggatg tgggttaca <del>aa</del> tttaagaacagatgaacaaggcct tattg <del>tt</del> gaagacctagtagaagaggtggg <del>cc</del> ggg	RVRAILPYTKVPD EISFLKGMFIVHNE LEDGMMWVTNLRTDE QGLIVEDLVEEVGR
20 SEQ ID N°4	RasGAP <sub>317-326</sub>	tgga <del>gt</del> gggttaca <del>aa</del> tttaagaacagat	WMWVTNLRTD

En el caso de que el fragmento del dominio SH3 de la secuencia N2 sea SEQ ID N°4 (RasGAP<sub>317-326</sub>), entonces la secuencia de aminoácidos resultante codificada por dicha SEQ ID N°4 en el ser humano es WMWVTNLRTD. Una comparación entre las distintas especies reveló que hay distintos aminoácidos, que se conservan entre las especies tal como se muestra en la tabla 2.

TABLA 2

Especie	Secuencias de aminoácidos de RasGAP <sub>317-326</sub>
Ser humano	WMWVTNLRTD
<i>Bos taurus</i>	WMWVTNLRTD
Ratón	WMWVTNLRTD
<i>Rattus norvegicus</i>	WMWVTNLRTD
<i>Anopheles</i>	WLWVTAHRTG
<i>Drosophila</i>	WLWVTAHRTG
Alineación	<b><u>W</u><u>x</u><u>W</u><u>V</u><u>T</u><u>x</u><u>x</u><u>R</u><u>T</u><u>x</u></b>

Los aminoácidos conservados entre las especies se representan como residuos en caracteres subrayados en negrita mientras que las X corresponden a residuos de aminoácido que pueden cambiarse mediante sustituciones de aminoácido conservativas o no conservativas, sin afectar las propiedades inventivas de esas partes de 10 aminoácidos del dominio SH3 de N2.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas se definen en el presente documento como intercambios entre de uno de los siguientes cinco grupos:

- I. Residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- II. Residuos polares, cargados positivamente: His, Arg, Lys
- III. Residuos polares, cargados negativamente: y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
- IV. Residuos grandes, aromáticos: Phe, Tyr, Trp
- V. Residuos grandes, alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys.

## ES 2 308 200 T3

Estas variantes peptídicas de esta parte de 10 aminoácidos del dominio SH3 de N2 humano, y en particular la secuencia de alineación WXWVTXXRXTX, también están englobadas dentro de la presente invención y se refieren a péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en cierto grado del péptido de la secuencia nativa, es decir, la secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia nativa WMWVTNLRTD por sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, por lo que se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos por otro de las mismas características y funciones conformacionales. Preferiblemente, el fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP comprende la secuencia de aminoácidos WMWVTNLRTD.

Habitualmente, el péptido que consiste esencialmente en un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX tal como se da a conocer en la presente invención está conjugado con un agente que aumenta la acumulación del péptido en una célula.

Un agente de este tipo puede ser un compuesto que induce la endocitosis mediada por receptor tal como por ejemplo la endocitosis mediada por receptor de transferrina de membrana de transferrina conjugada a fármacos terapéuticos (Qian Z. M. *et al.*, "Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway" *Pharmacological Reviews*, 54, 561, 2002) o portador permeable a través de la membrana celular que puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo de ácidos grasos tales como ácido decanoico, ácido mirístico y ácido esteárico, que ya se han usado para el suministro intracelular de inhibidores de péptidos de la proteína quinasa C (Ioannides C.G. *et al.*, "Inhibition of IL-2 receptor induction and IL-2 production in the human leukemic cell line Jurkat by a novel ppeptide inhibitor of protein kinase C" *Cell Immunol.*, 131, 242, 1990) y la proteína tirosina fosfatasa (Kole H.K. *et al.*, "A peptide-based protein-tyrosine phosphatase inhibitor specifically enhances insulin receptor function in intact cells" *J. Biol. Chem.* 271, 14302, 1996) o de péptidos. Preferiblemente, se usan portadores permeables a través de la membrana celular, más preferiblemente se usa un péptido portador permeable a través de membrana celular.

En el caso de que el portador permeable a través de la membrana celular sea un péptido, entonces preferiblemente será un péptido rico en arginina. Se ha demostrado recientemente en Futaki *et al.* (Futaki S. *et al.*, "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrana permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery" *J. Biol. Chem.*, 276, 5836, 2001), que el número de residuos de arginina en un péptido portador permeable a través de la membrana celular tiene una influencia significativa en el método de internalización y que parece que hay un número óptimo de residuos de arginina para la internalización, preferiblemente contienen más de 6 argininas.

El péptido de la invención habitualmente está conjugado con el portador permeable a través de la membrana celular mediante un espaciador. En este caso, el portador permeable a través de la membrana celular es preferiblemente un péptido.

Habitualmente, los péptidos ricos en arginina se seleccionan del grupo que comprende el péptido HIV-TAT<sub>98-57</sub>, el péptido FHV-coat<sub>35-49</sub>, el péptido HTLV-II Rex<sub>4-16</sub> y el péptido BMV gag<sub>7-25</sub>. Preferiblemente, el péptido rico en arginina es el péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub>.

En el caso de que el péptido HIV-TAT<sub>98-57</sub> esté conjugado con una secuencia de RasGAP, tal como por ejemplo RasGAP<sub>317-326</sub>, entonces se insertan dos residuos de glicina entre las secuencias de TAT y RasGAP como un espaciador para permitir flexibilidad.

Puesto que un problema inherente a péptidos nativos (en la forma L) es la degradación mediante proteasas naturales, el péptido de la invención puede prepararse para incluir formas D y/o "isómeros retro-inversos" del péptido.

En este caso, se preparan isómeros retro-inversos de fragmentos del péptido de la invención.

La protección del péptido frente a la proteólisis natural debe por tanto aumentar la eficacia del compuesto heterobivalente o heteromultivalente. Se prevé una actividad biológica más alta para el péptido que contiene el retro-inverso en comparación con el análogo que no contiene el retro-inverso debido a la protección frente a la degradación por proteasas nativas. Además, se ha demostrado que exhiben una estabilidad aumentada y una inmunogenicidad inferior (Seta M. y Zisman E., "Different roles of D-amino acids in immune phenomena" *FASEB J.* 11, 449, 1997).

Los péptidos retro-inversos se preparan para péptidos de secuencia conocida tal como se describe, por ejemplo, en Sela y Zisman (1997).

"Isómero retro-inverso" significa un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo de aminoácido está invertida: por tanto, no puede haber ninguna complementariedad de grupo terminal.

La presente invención también abarca modificaciones del péptido (que normalmente no alteran la secuencia primaria), que incluyen la derivatización química de péptidos *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, aquéllos realizados modificando los patrones de glicosilación de un péptido durante su síntesis y tratamiento o en etapas de tratamiento adiciones, por ejemplo, exponiendo el péptido a enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo, enzimas de glicosilación o desglicosilación de mamífero. También se incluyen secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

## ES 2 308 200 T3

La invención también incluye análogos en los que se han sustituido uno o más enlaces peptídicos con un tipo de enlace covalente (un "péptido mimético") que no es susceptible de escisión por peptidasas. Cuando la degradación proteolítica de los péptidos tras la inyección el sujeto es un problema, la sustitución de un enlace peptídico particularmente sensible con un péptido mimético no escindible hará el péptido resultante más estable y así más útil como principio activo. Tales miméticos, y métodos para incorporarlos en péptidos se conocen bien en la técnica.

También son útiles grupos de bloqueo amino terminal tales como t-butiloxicarbonilo, acetilo, teilo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo, adipilo, azelaílo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, metoxiazelaílo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4-dinitrofenilo. El bloqueo de los extremos amino y carboxilo terminales de los péptidos tendría el beneficio adicional de potenciar el paso del péptido a través de la membrana celular hidrófoba y hacia el interior de la célula.

Cuando se emplean técnicas recombinantes para preparar un péptido que consiste esencialmente en un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX, según la presente invención, se usan preferiblemente secuencias de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos. En cuanto al método para poner en práctica técnicas recombinantes, véase por ejemplo Maniatis *et al.* 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory y métodos comercialmente disponibles.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico purificada y aislada que codifica para un péptido que consiste esencialmente en un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX tal como se describió anteriormente.

Habitualmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX es un híbrido de ADN/ARN, ADN o ARN.

El ADN que puede usarse en el presente documento es cualquier secuencia de polidesoxinucleótidos que incluye, por ejemplo, ADN bicatenario, ADN monocatenario, ADN bicaternario en el que una o ambas hebras están constituidas por dos o más fragmentos, ADN bicatenario en el que una o ambas hebras tiene una estructura principal de fosfodiéster no interrumpido, ADN que contiene una o más porción(es) monocatenaria(s) y una o más porción(es) bicatenaria(s), ADN bicatenario en el que las hebras de ADN son totalmente complementarias, ADN bicatenario en el que las hebras de ADN solamente son parcialmente complementarias, ADN circular, ADN cerrado covalentemente, ADN lineal, ADN entrecruzado covalentemente, ADNc, ADN sintetizado químicamente, ADN semisintético, ADN biosintético, ADN aislado de manera natural, ADN digerido por enzimas, ADN fragmentado, ADN marcado, tal como ADN radiomarcado y ADN marcado con fluorocromo, ADN que contiene una o más especies de ácido nucleicos que no se producen de manera natural.

Las secuencias de ADN que codifican para un péptido que consiste esencialmente en un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX pueden sintetizarse mediante técnicas químicas convencionales, por ejemplo, el método de fosofotriéster o a través de métodos de síntesis automatizados y métodos de PCR.

La secuencia de ADN que codifica para un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX, según la invención también puede producirse mediante técnicas enzimáticas. Así, pueden usarse enzimas de restricción, que escinden moléculas de ácido nucleico en secuencias de reconocimiento predefinidas, para aislar secuencias de ácido nucleico de moléculas de ácido nucleico más grandes que contienen la secuencia de ácido nucleico, tales como ADN (o ARN) que codifica para un péptido que consiste esencialmente en un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRXTX.

La presente invención también abarca un ácido nucleico en forma de un polirribonucleótido (ARN), que incluye por ejemplo, ARN monocatenario, ARNc, ARN bicatenario, ARN bicatenario en el que una o ambas hebras están constituidas por dos o más fragmentos, ARN bicatenario en el que una o ambas hebras tienen una estructura principal de fosfodiéster no interrumpido, ARN que contiene una o más porción(es) monocatenaria(s) y una o más porción(es) bicatenaria(s), ARN bicatenario en el que las hebras de ARN son totalmente complementarias, ARN bicatenario en el que las hebras de ARN solamente son parcialmente complementarias, ARN entrecruzado covalentemente, ARN digerido por enzimas, ARN cortado, ARNm, ARN sintetizado químicamente, ARN semisintético, ARN biosintético, ARN aislado de manera natural, ARN marcado, tal como ARN radiomarcado y ARN marcado con fluorocromo, ARN que contiene una o más especies de ácido nucleico que no se producen de manera natural.

Preferiblemente se usa como ácido nucleico una secuencia de ADN purificada y aislada seleccionada del grupo que comprende SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 o SEQ ID N°4.

La presente invención también incluye variantes de las secuencias mencionadas anteriormente, es decir, secuencias de nucleótidos que varían de la secuencia de referencia por sustituciones de nucleótidos conservativas, por lo que se sustituyen uno o más nucleótidos por otro de las mismas características.

## ES 2 308 200 T3

La invención también abarca variantes alélicas de la secuencia nucleica purificada y aislada descrita; es decir, las formas alternativas que se producen de manera natural del ácido nucleico aislado y purificado que también codifican para péptidos que son idénticos, homólogos o que están relacionados con el codificado por las secuencias nucleicas purificadas y aisladas. De manera alternativa, también pueden producirse variantes que no se producen de manera natural mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

La secuencia de ácido nucleico mencionada anteriormente que codifica para un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRTX, puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido portador permeable a través de la membrana celular.

El fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRTX, opcionalmente conjugada con un agente que aumenta la acumulación del péptido en una célula tal como se describe en el presente documento se producen preferiblemente, de manera recombinante, en un sistema de expresión celular.

Una amplia variedad de células huésped unicelulares son útiles en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, pseudomonas, bacilos, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células de animales tales como células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, RI. 1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano, (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insectos (por ejemplo, Sf9), y células humanas y células vegetales en el cultivo de tejidos. Preferiblemente, la célula huésped es una célula bacteriana, más preferiblemente una célula de *E. coli*.

Preferiblemente, además de al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRTX y una genotoxina, la composición farmacéutica puede contener uno o más vehículos, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Los vehículos, diluyentes y adyuvantes aceptables que facilitan el tratamiento de los compuestos activos en una preparación que puede usarse farmacéuticamente no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro debencetonio; fenol, alcohol butílico o benfílico; alquil-parabenos tales como metil o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

La forma de administración de la composición farmacéutica puede ser sistémica o tópica. Por ejemplo, la administración de una composición de este tipo puede ser diversas vías parenterales tales como vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, bucal o a través de un dispositivo implantado, y también puede administrarse por medios peristálticos.

La composición farmacéutica que comprende el al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP y la genotoxina, tal como se describe en el presente documento, como agentes activos también puede incorporarse o impregnarse en una matriz bioabsorbible, administrándose la matriz en forma de una suspensión de matriz, un gel o un soporte sólido. Además, la matriz puede estar constituida por un biopolímero.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente estadounidense número 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y [gamma] L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT(TM) (microesferas inyectables constituidas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por ejemplo mediante membranas de filtración estéril.

Se entiende que la dosificación adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la naturaleza del efecto deseado.

La forma farmacéutica apropiada dependerá de la enfermedad, el péptido de la invención, la genotoxina y el modo de administración; las posibilidades incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, pastas dentífricas, supositorios, inhaladores, disoluciones, pomadas y depósitos parenterales de liberación prolongada.

## ES 2 308 200 T3

Puesto que las modificaciones de aminoácidos de los aminoácidos del péptido también están englobadas dentro de la presente invención, esto puede ser útil para entrecruzar el péptido de la invención a una matriz insoluble en agua o los otros portadores macromoleculares, o para mejorar la solubilidad, adsorción y permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica y pueden alternativamente eliminar o atenuar cualquier posible efecto secundario indeseable del péptido y similares.

Aunque una composición farmacéutica preferida de la presente invención comprende al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP y la genotoxina como agentes activos, una composición farmacéutica alternativa puede contener una secuencia de ácido nucleico purificada y aislada que codifica para el fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP, tal como se describe en el presente documento, como un agente activo. Esta composición farmacéutica puede incluir o bien la secuencia de ADN purificada y aislada sola, un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ADN purificada y aislada o bien una célula huésped previamente transfectada o transformada con un vector de expresión descrito en el presente documento. En este último ejemplo, la célula huésped preferiblemente se aislará del paciente que va a tratarse para evitar cualquier problema de antigenicidad. Estos enfoques de terapia génica y celular son especialmente bien adecuados para pacientes que requieren una administración repetida de la composición farmacéutica, ya que la dicha secuencia de ADN purificada y aislada, el vector de expresión o la célula huésped previamente transfectada o transformada con un vector de expresión puede incorporarse en la célula del paciente que entonces producirá la proteína de manera endógena.

Habitualmente, la composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento se usa para el tratamiento o la prevención del cáncer.

La presente invención también abarca el uso de la composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

El término “cáncer” se refiere a o describe el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por el crecimiento celular no regulado.

Habitualmente, el cáncer que va a tratarse o prevenirse se seleccionará del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, liposarcoma, tumor neuroendocrino, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, leucemia, tumor linfóide maligno, cáncer de células escamosas, cáncer de células epiteliales escamosas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándula salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, un tumor de las vías biliares y cáncer de cabeza y cuello.

Preferiblemente el cáncer es mesotelioma, cáncer de testículo o cáncer pancreático.

La composición farmacéutica de la invención generalmente se usará en una cantidad para lograr el fin pretendido. Para el uso para tratar o prevenir un cáncer, la composición farmacéutica se administra o aplica en una cantidad terapéuticamente eficaz que es una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluye la  $CI_{50}$  tal como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos con más precisión. También pueden estimarse dosis iniciales a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en datos de animales y dependerá, por supuesto, del sujeto que está tratándose, del peso del sujeto, la gravedad del trastorno, la forma de administración y el criterio del médico que la prescribe.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un kit para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho kit la composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso. Generalmente, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para tratar el cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar el cáncer de elección.

## ES 2 308 200 T3

Opcionalmente, el kit comprende además una forma farmacéutica de dosificación separada que comprende un agente anticancerígeno adicional seleccionado del grupo que consiste en fármacos tal como se describió anteriormente, anticuerpos anti-receptores del factor de crecimiento epidérmico, agentes radioinmunoterapéuticos y combinaciones de los mismos.

5

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### 10 Células y transfección

Se mantuvieron células HeLa y MCF-7 en RPMI 1640 (Sigma; n° de cat. 8758) que contenía suero de bovino recién nacido al 10% (Sigma; n° de cat. N4637) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se mantuvieron células U2OS en DMEM (Sigma; n° de cat. 5796) que contenía suero bovino fetal al 15% (Sigma; n° de cat. F7524) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se mantuvieron células H-Meso-1 en RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10% a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se mantuvieron células HUV-EC-C en medio SFM endotelial humano (Gibco; n° de cat. 11111-044) complementado con suero bovino fetal al 10%, 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Gibco; n° de cat. 13256-029), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Gibco; n° de cat. 13247-051), 10 µg/ml de fibronectina (Gibco; n° de cat.33016-015) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se mantuvieron células HaCat en medio SFM para queratinocitos que contenía el factor de crecimiento epidérmico 1-53 y extracto de glándula pituitaria bovina (Gibco; n° de cat. 17005-075) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se transfectaron las células HeLa tal como se describió anteriormente (Yang J.-Y. y Widmann C., Mol. Cell. Biol., 21, 5346, 2001). Se realizó el tratamiento con genotoxinas en placas de 6 pocillos. Las células se dividieron el día antes del tratamiento a una concentración de 2,5x10<sup>5</sup> células/pocillo. Se transfectaron las células U2OS en placas de 6 pocillos usando el procedimiento de precipitación con calcio/fosfato (Jordan M. *et al.*, "Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation" Nucleic Acids Res., 24, 596, 1996). Brevemente, se diluyeron los plásmidos en 90 µl de H<sub>2</sub>O mezclada con 10 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M y se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente. A continuación, se mezclaron rápidamente 100 µl de disolución HEP (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, D-glucosa 12 mM, HEPES 50 mM) con la disolución de ADN, se incubaron a temperatura durante 1 minuto exactamente, y finalmente se transfirieron al medio de cultivo celular. Tras 8 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, se sustituyó el medio con medio de cultivo fresco y las células se incubaron adicionalmente durante 16-24 horas antes de ser analizadas.

30

#### Productos Químicos

Se obtuvieron cisplatino y mitoxantrona de Sigma (n° de cat. P4394 y n° M6545, respectivamente). Se diluyó cisplatino en DMSO a una concentración final de 100 mM y se almacenó a -20°C. Se diluyó mitoxantrona en etanol al 100% a una concentración final de 10 mM y se almacenó a -80°C. Se obtuvo adriamicina de Calbiochem (n° de cat. 324380). Se diluyó en agua a una concentración final de 10 mM y se almacenó a -20°C. Se obtuvo Hoechst 33342 de Roche (n° de cat. H-1399). Se diluyó en agua a una concentración final de 10 mg/ml y se almacenó a 4°C en la oscuridad.

40

#### Síntesis de péptidos y marcaje

Se sintetizaron los péptidos HIV-TAT<sub>48-57</sub> (GRKKRRQRRR) y TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> (GRKKRRQRRRGGWMWV TNLRTD) en el Institute of Biochemistry, Universidad de Lausanne, Suiza usando tecnología FMOC, se purificaron mediante HPLC y se sometieron a prueba mediante espectroscopia de masas. Se realizó el marcaje con isotiocianato de fluoresceína (FITC) sobre la secuencia β-alanina-GRKKRRQRRRGGWMWVTNLRTD, cuyos aminoácidos protegidos con Fmoc de la cadena lateral eran Arg(bpf), Lys(Boc), Gln(Trt), Trp(Boc), Thr(tBu), Asn(Trt) y Asp(OtBu). Se sintetizó el péptido progresivamente en una resina AM de amida Rink Q,2 mmol usando química Fmoc. Se monitorizó la síntesis mediante la prueba de ninhidrina. Tras el acoplamiento de β-alanina, se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF). En este punto, se conjugó un grupo de fluoresceína al extremo N-terminal del péptido con FITC (un exceso de 5 veces sobre la sustitución de la resina en 4 ml de DMF y 1 ml de N-etildisopropilamina) para formar el péptido derivado de fluoresceína. Se disolvieron los péptidos en agua desionizada a una concentración final de 1 mM y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

55

#### Plásmidos

La extensión dn3 en el nombre de un plásmido indica que el plásmido de estructura principal es el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen). Se etiquetaron todos los constructos con la secuencia HA (MGYPYDVPDYAS) en el extremo N amino-terminal. El plásmido N2.dn3 codifica para el fragmento N2 de RasGAP humano, los plásmidos SH2-SH3.dn3 codifican para los aminoácidos 158-361 de RasGAP humano, los plásmidos SH2.dn3 codifican para los aminoácidos 158-277 de RasGAP humano, los plásmidos SH3.dn3 codifican para los aminoácidos 279-361 de RasGAP humano. Los plásmidos IκBαΔN2 codifican para una forma de IκBα que bloquea la activación de NFκB (Yang y Widmann, 2002b). El plásmido pEGFP-Cl, que codifica para la proteína GFP, era de Clontech. pRL-TK, un vector que codifica para la luciferasa de *Renilla reniformis*, era de Promega. prLUC es un plásmido indicador que porta el ADNc de luciferasa de luciérnaga bajo el control de elementos que responden a NFκB (Yang J.-Y. y Widmann C., Mol. Cell. Biol., 21, 5346, 2001).

65

## ES 2 308 200 T3

### *Mediciones de apoptosis*

Se determinó la apoptosis puntuando el número de células que muestran núcleos picnóticos. Se marcaron los núcleos de células vivas con Hoechst 33342 (concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante aproximadamente 5 minutos y entonces se analizaron las células (al menos 400 células por condición) usando un microscopio invertido Leica DMIRB equipado con óptica de luz transmitida y fluorescencia. La evaluación de la apoptosis se realizó un día después de la transfección o el tratamiento de las células. En un experimento que implicaba células transfectadas, se incluyó pEGFP-C I en la solución de transfección para marcar las células transfectadas con GFP. En este caso, solamente se evaluó el grado de apoptosis en las células transfectadas.

### *Ensayo indicador de luciferasa*

Se realizó un ensayo de luciferasa usando el ensayo indicador Dual-Luciferase<sup>®</sup> de Promega (nº de cat. E1910). Se lisaron las células de una placa de 6 pocillos usando 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis PLB proporcionado por el kit de Promega y se incubaron durante treinta minutos sobre hielo. Entonces, se clarificó el lisado mediante centrifugación a 16.000 g durante 15 min. Se registró la actividad luciferasa de luciérnaga mezclando 20  $\mu\text{l}$  del lisado con 25  $\mu\text{l}$  del reactivo LARII y se registró la actividad luciferasa de *Renilla* añadiendo 25  $\mu\text{l}$  del reactivo Stop & Glo Reagent a la mezcla anterior. Para cada medición, se cuantificó la emisión de luz durante 12 segundos usando un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold Technologies, Zurich, Suiza).

### *Análisis de inmunotransferencia de tipo Western*

Se lisaron células en tampón de lisis (Hepes 25 mM, NaCl 300 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, EDTA 0,2 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0,1 mM, Triton X100 al 1%, comprimidos de cocktail de inhibidores de proteasa libre de EDTA completos (Roche; nº de cat. 1873580). Se separaron las proteínas en SDS-PAGE y se inmunotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad; nº de cat. 162-0115). A continuación, se bloquearon las membranas con TBS (HCl 18 mM, NaCl 130 mM, Tris 20 mM), leche desecada desnatada al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario adecuado. Se detectaron estos anticuerpos mediante anticuerpos secundarios conjugados Alexa Fluor 680 (Molecular Probes; nº de cat. A21109) diluidos 1:2500 en TBS, leche desecada desnatada al 5% y posteriormente, se visualizaron con el sistema de obtención de imágenes en infrarrojo de Odyssey (Licor, Hamburgo, Alemania). Se diluyó el anticuerpo primario frente a fosfo-p38 (Cell Signaling Technology; nº de cat. 9211 L) 1:500 en BSA al 5% en TBS. Se diluyó el anticuerpo primario frente a fosfo-JNK (Cell Signaling Technology; nº de cat. 9551 L) 1:1000 en TBS, BSA al 5%. Se realizó la cuantificación usando software de obtención de imágenes en infrarrojo de Odyssey.

### *Análisis estadístico*

Se realizaron todos los análisis estadísticos con Microsoft Excel (edición XP) usando la prueba de la t de Student.

### Ejemplo 2

#### *El fragmento N2 de RasGAP potencia la respuesta apoptótica inducida por una variedad de genotoxinas*

Recientemente, los solicitantes han demostrado que el fragmento N2 potencia la capacidad de cisplatino para destruir la línea de células tumorales HeLa (Yang J.-Y. y Widmann C., Mol. Cell. Biol., 21, 5346, 2001). Para evaluar si el fragmento N2 podría potenciar la respuesta apoptótica inducida por otras genotoxinas, se sometieron células HeLa, que expresan o no el fragmento N2, a concentraciones crecientes de adriamicina y mitoxantrona (y cisplatino como control). La figura 1 muestra que la presencia del fragmento N2 hizo que las células HeLa fueran al menos 10 veces más sensibles que las células control hacia los diversos fármacos. Este resultado indica que el fragmento N2 es un sensor de genotoxinas de amplio espectro.

#### *Identificación de una secuencia mínima dentro del fragmento N que potencia la capacidad de un fármaco para destruir células cancerosas*

El fragmento N2 es una proteína de 36 kDa, que puede hacer difícil sintetizarlo químicamente. La caracterización de una secuencia más corta que todavía portaría la capacidad de sensibilización a genotoxinas es una etapa crítica en el procedimiento de desarrollo de una herramienta terapéutica a partir del fragmento N2. Con el fin de evaluar si podría aislarse una secuencia corta de este tipo, se generó una serie de versión truncada del fragmento N2 (figura 2A) y se determinó su capacidad para potenciar la apoptosis inducida por cisplatino en células HeLa (figura 2B). El fragmento N2 contiene dos dominios SH2 y un dominio SH3 (figura 2A). En primer lugar se determinó cuál de estos dominios contenía la actividad pro-apoptótica del fragmento N2. Se transfectaron células HeLa con los plásmidos que codifican para los diversos dominios SH, en presencia o en ausencia de cisplatino 0,15  $\mu\text{M}$ , una concentración a la que la diferencia en sensibilidad hacia el fármaco entre células que expresan o no el fragmento N2 es máxima (véase la figura 1). Un constructo vacío o un constructo que codifica para el dominio SH2 no potenció la capacidad de cisplatino para destruir células HeLa transfectadas con estos constructos. En contraposición, los constructos que contienen el dominio SH3 potencian la capacidad de cisplatino para destruir células a través de apoptosis (figura 2B). La incapacidad del dominio SH2 por sí solo para potenciar la muerte celular en células HeLa no era una consecuencia de la expresión de proteínas reducida porque el análisis de inmunotransferencia de tipo Western reveló que el dominio

SH2 se expresaba tan eficazmente como los demás constructos (datos no mostrados). A continuación, los solicitantes generaron truncamientos progresivos en el dominio SH3 para intentar identificar una secuencia de sensibilización a genotoxinas mínima. Todos estos constructos (véase la figura 2A), incluyendo el más corto (317-326) que codifica para un péptido con una longitud de 10 aminoácidos, potenciaron la capacidad de cisplatino para destruir células HeLa (figura 2B). Estos resultados sugieren que la propiedad de sensibilización de la muerte celular del fragmento N2 no requiere un dominio SH completo pero está mediada por una secuencia peptídica muy corta.

*El péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub> conjugado con la secuencia de RasGAP 317-326 actúa como un péptido de sensibilización a genotoxinas permeable a través de las células*

Si un plásmido que codifica para los aminoácidos 317-326 de RasGAP tiene la capacidad de potenciar la capacidad de un fármaco para destruir células cancerosas, un péptido sintético que corresponde a los 316-326 también debería mostrar esta actividad siempre y cuando pueda penetrar a través de las células. Se ha demostrado que la adición de una secuencia corta derivada de la proteína TAT del VIH (HIV-TAT<sub>48-57</sub>) permite que los polipéptidos se acumulen de manera eficaz en las células (Schwarze S.R. *et al.*, "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the Mouse" *Science*, 285, 1569, 1999). Por tanto, los solicitantes sintetizaron un péptido que contenía los aminoácidos 317-326 de RasGAP unidos covalentemente al péptido portador de aminoácidos HIV-TAT<sub>48-57</sub>. Se insertaron dos residuos de glicina entre las secuencias TAT y RasGAP como un espaciador para permitir flexibilidad. Como medio para evaluar la captación celular de este péptido (denominado péptido TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> a continuación en el presente documento), se marcó con el fluoróforo FITC. Se incubó el péptido marcado con cuatro líneas de células tumorales distintas: un adenocarcinoma humano de cuello uterino (células HeLa), un osteosarcoma humano (células U2OS), una línea celular de cáncer de mama (células MCF-7) y un mesotelioma maligno humano (células H-Meso-1) y dos líneas celulares no cancerosas (línea celular de queratinocitos de piel humana HaCat y las células endoteliales umbilicales humanas HUV-EC-C). Tal como se muestra en la figura 3, el péptido TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> entró eficazmente en todas estas líneas celulares. No se observó ninguna diferencia en la translocación de péptido entre las células no cancerosas y las células cancerosas. En primer lugar, se evaluó la sensibilidad de las líneas celulares cancerosas hacia concentraciones crecientes de las tres genotoxinas (datos no mostrados). Esto permitió determinar las concentraciones subletales de las genotoxinas para cada línea celular sometida a ensayo. Sorprendentemente, los solicitantes han demostrado que el péptido TAT-RasGAP<sub>317-326</sub>, pero no el péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub> control que carece de las secuencias de RasGAP, potenciaba la capacidad de cisplatino, adriamicina y mitoxantrona para destruir las líneas celulares cancerosas sometidas a ensayo y que no, o solo marginalmente, inducía apoptosis en condiciones control. En contraposición, la presencia de los péptidos no afectó a la respuesta apoptótica inducida por cisplatino, adriamicina y mitoxantrona en las dos líneas celulares no cancerosas (figura 4B). Por tanto, se ha identificado un péptido sintético mínimo que puede entrar específicamente y potenciar la capacidad de los fármacos para destruir células cancerosas.

*Las rutas de NFκB y SAPK no están implicadas en las propiedades de TA T-RasGAP<sub>317-326</sub>*

Como modulador de Ras, RasGAP podría afectar algunas de las rutas dependientes de Ras que controlan la muerte celular, tales como la ruta de Ras-PI3K-Akt-NFκB (Datta S.R. *et al.*, "Cellular survival: a play in three Akts" *Genes Dev.*, 13, 2905, 1999). Por tanto, se evaluó si la modulación de la actividad de NFκB participa en la capacidad de potenciación mediada por TAT-RasGAP<sub>317-326</sub>. Tal como se muestra en la figura 5A, se activó NFκB en células U2OS tras un tratamiento con cisplatino o con TAT-RasGAP<sub>317-326</sub>, pero no al estimular con el péptido control HIV-TAT<sub>48-57</sub>. La incubación de las células con tanto cisplatino como TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> dio como resultado la activación aditiva de NFκB (figura 5A). La ruta de NFκB participa en la inducción de respuestas de supervivencia celular en muchos tipos de células (Van Antwerp D.J. *et al.*, "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB" *Science*, 274, 787, 1996; Beg A.A. y Baltimore D., "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death" *Science*, 274, 782, 1996) pero también puede requerirse para la inducción de respuestas apoptóticas en algunas situaciones (Ryan K.M. *et al.*, "Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death" *Nature*, 404, 892, 2000). Para determinar si se requería la activación de NFκB por TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> para la función de capacidad de potenciación, se expresó una forma no degradable de IκB (IκBαΔN2) en las células. Tal como se esperaba, este constructo impidió eficazmente la activación de NFκB por cisplatino y TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> (figura 5B). IκBαΔN2 aumentó ligeramente la respuesta apoptótica mediada por cisplatino (figura 5C). Sin embargo, el inhibidor NFκB no afectó a la potencia de TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> para potenciar la capacidad de cisplatino para destruir células U2OS a través de apoptosis (figura 5C). Estos resultados indican que la activación de la ruta de NFκB no está implicada en el efecto de la capacidad de potenciación de la muerte celular mediada por TAT-RasGAP<sub>317-326</sub>.

Las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) -las JNK y las p38 MAPK- han estado implicadas en la respuesta apoptótica inducida por diversos estímulos (Jarpe M.B. *et al.*, *Oncogene*, 17, 1475, 1998). La figura 6 muestra que ni el péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub> control ni el péptido TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> activaron estas rutas de MAPK. Estos péptidos tampoco pudieron aumentar la capacidad de cisplatino para estimular la JNK o las p38 MAPK (figura 6). Estos resultados indican que las rutas de MAPK activadas por estrés no están implicadas en la capacidad de TAT-RasGAP<sub>317-326</sub> para potenciar la capacidad de genotoxinas para destruir células cancerosas.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una combinación de

- 5 i) al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP que comprende la secuencia de aminoácidos general WXWVTXXRTX, en la que X representa un aminoácido,
- ii) y una genotoxina,

10 **caracterizada** porque dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 potencia la capacidad de dicha genotoxina para destruir selectivamente células cancerosas.

15 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP comprende al menos una secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de ADN SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 4.

3. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 1-2, **caracterizada** porque dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP comprende la secuencia de aminoácidos WMWVTNLRTD.

20 4. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 1-3, **caracterizada** porque dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP está en forma D y/o en forma de isómero retro-inverso.

25 5. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho al menos un fragmento de la secuencia N2 de la proteína RasGAP está conjugado con un agente que aumenta la acumulación celular de dicho al menos un fragmento de la secuencia N2.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, **caracterizada** porque el agente es un portador permeable a través de la membrana celular.

30 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, **caracterizada** porque el portador permeable a través de la membrana celular es un péptido.

35 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, **caracterizada** porque el péptido portador permeable a través de la membrana celular está en forma D y/o en forma de isómero retro-inverso.

9. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 7-8, **caracterizada** porque el péptido portador permeable a través de la membrana celular es un péptido rico en arginina que se selecciona del grupo que comprende el péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub>, el péptido FHV-coat<sub>35-49</sub>, el péptido HTLV-II Rex<sub>4-16</sub> y el péptido BMV gag<sub>7-25</sub>.

40 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, **caracterizada** porque el péptido rico en arginina es el péptido HIV-TAT<sub>48-57</sub>.

45 11. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada** porque la genotoxina se selecciona del grupo que comprende agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes de corte de ADN, agentes de unión de ADN, venenos de la topoisomerasa y venenos del huso.

50 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque los agentes alquilantes se seleccionan del grupo que comprende lomustina, carmustina, estreptozocina, mecloretamina, melfalán, mostaza nitrogenada de uracilo, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatino, carboplatino, mitomicina, tiotepa, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, trietilenmelamina, busulfano, pipobromán, mitotano y otros derivados de platino.

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, **caracterizada** porque los agentes alquilantes se seleccionan del grupo que comprende cisplatino y otros derivados de platino.

55 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque el agente de corte de ADN es bleomicina.

60 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque los venenos de la topoisomerasa se seleccionan del grupo que comprende topotecan, irinotecan, sal sódica de camptotecina, daorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitoxantrona, tenipósido, adriamicina y etopósido.

16. Composición farmacéutica según la reivindicación 15, **caracterizada** porque los venenos de la topoisomerasa se seleccionan del grupo que comprende mitoxantrona y adriamicina.

65 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque los agentes de unión de ADN se seleccionan del grupo que comprende dactinomicina y mitramicina.

## ES 2 308 200 T3

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque los venenos del huso se seleccionan del grupo que comprende vinblastina, vincristina, navelbina, paclitaxel y docetaxel.

5 19. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque los antimetabolitos se seleccionan del grupo que comprende metotrexato, trimetrexato, pentostatina, citarabina, ara-CMP, fludarabina fosfato, hidroxio-rea, fluorouracilo, floxuridina, clorodesoxiadenosina, gemcitabina, tioguanina y 6-mercaptopurina.

10 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque la genotoxina se selecciona del grupo que comprende cisplatino, mitoxantrona y adriamicina.

21. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 20 para el tratamiento o la prevención del cáncer.

15 22. Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 20, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

20 23. Uso según la reivindicación 22, **caracterizado** porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, liposarcoma, tumor neuroendocrino, mesotelioma, schwanoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, leucemia, tumor linfoide maligno, cáncer de células escamosas, cáncer de células epiteliales escamosas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándula salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, un tumor de las vías biliares y cáncer de cabeza y cuello.

25 24. Uso según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el cáncer es mesotelioma, cáncer de testículo o cáncer pancreático.

30 25. Kit para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 20 opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

35 26. Kit según la reivindicación 25, que comprende además una forma farmacéutica de dosificación separada que incluye un agente anticancerígeno adicional seleccionado del grupo que consiste en fármacos, anticuerpos anti-receptores del factor de crecimiento epidérmico, agentes radioinmunoterapéuticos y combinaciones de los mismos.

40

45

50

55

60

65

FIG.1

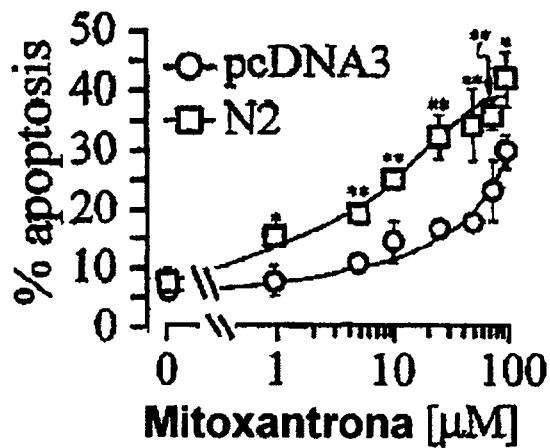
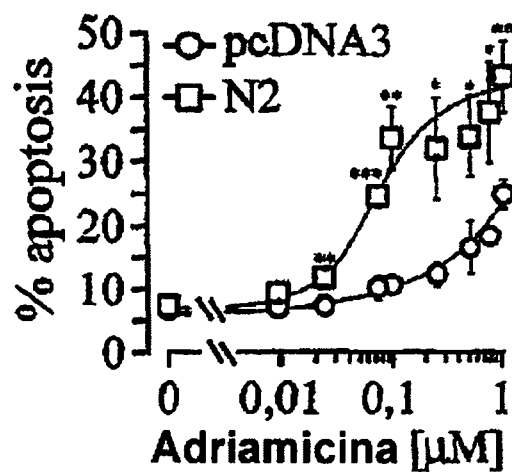
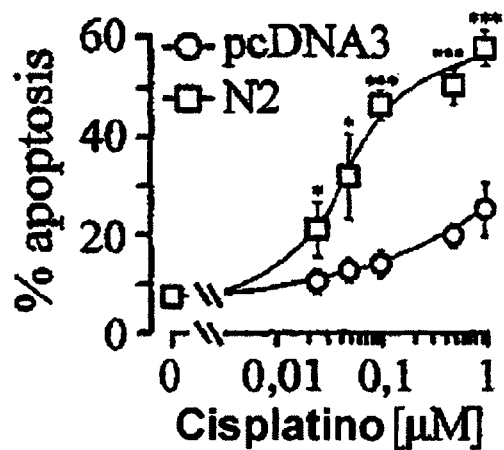
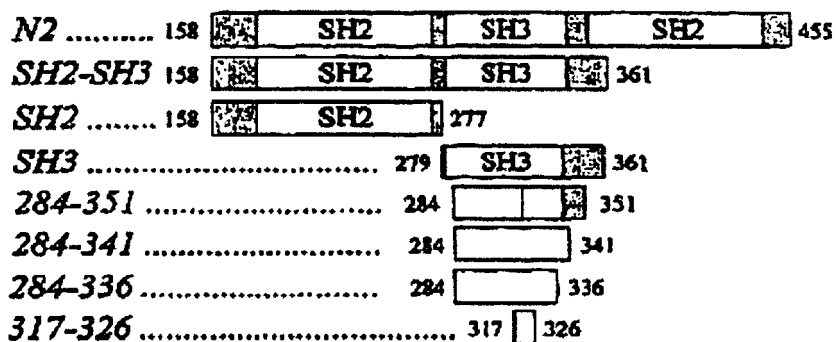
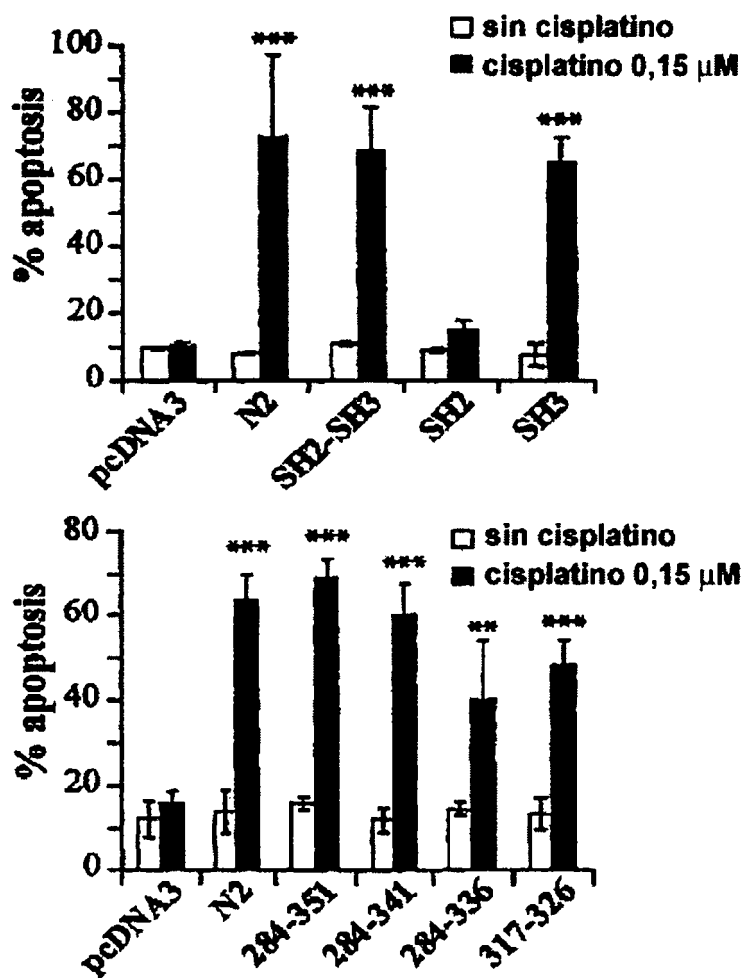


FIG.2

A



B



**FIG.3**

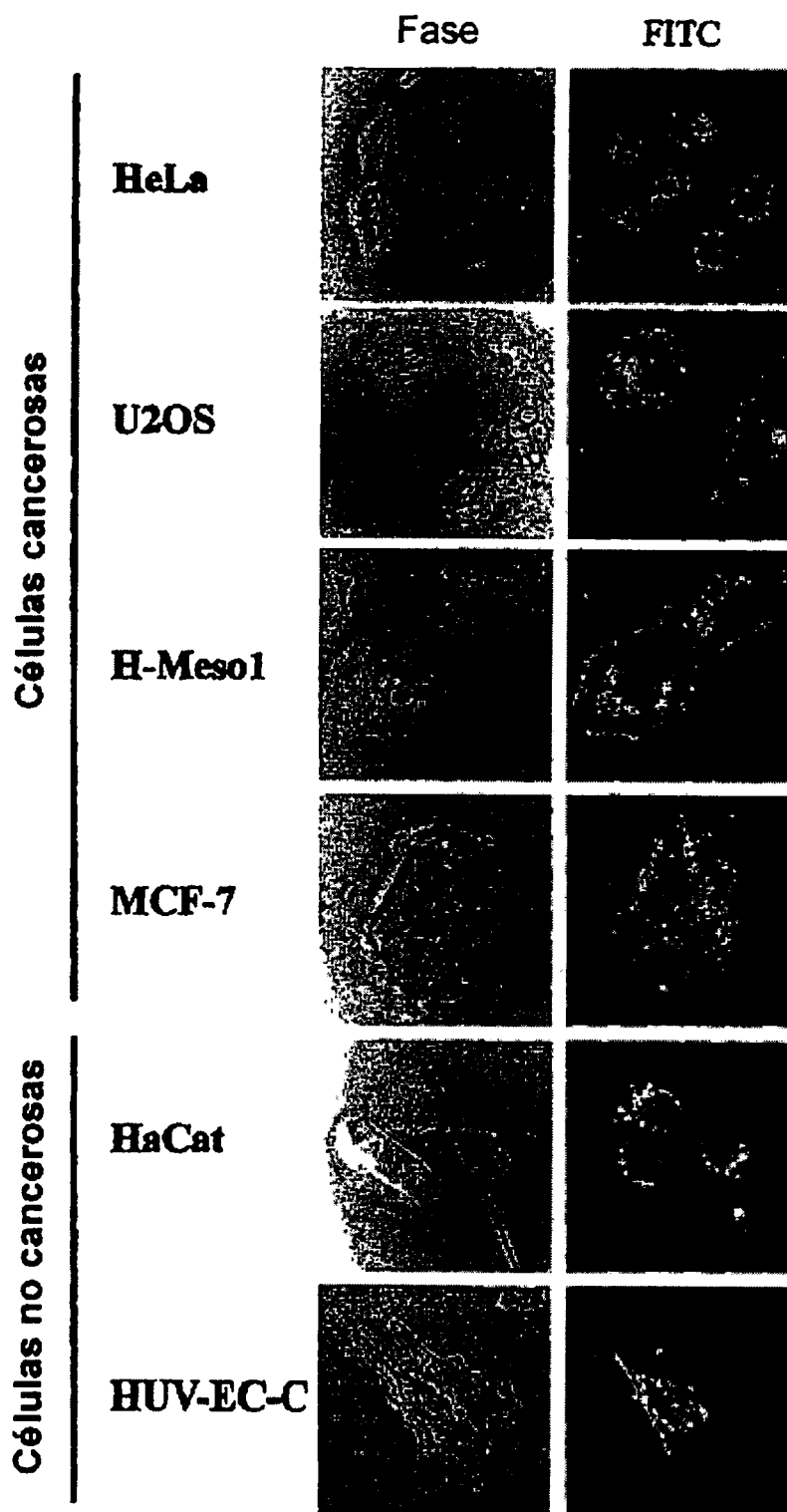


FIG.4 A

A

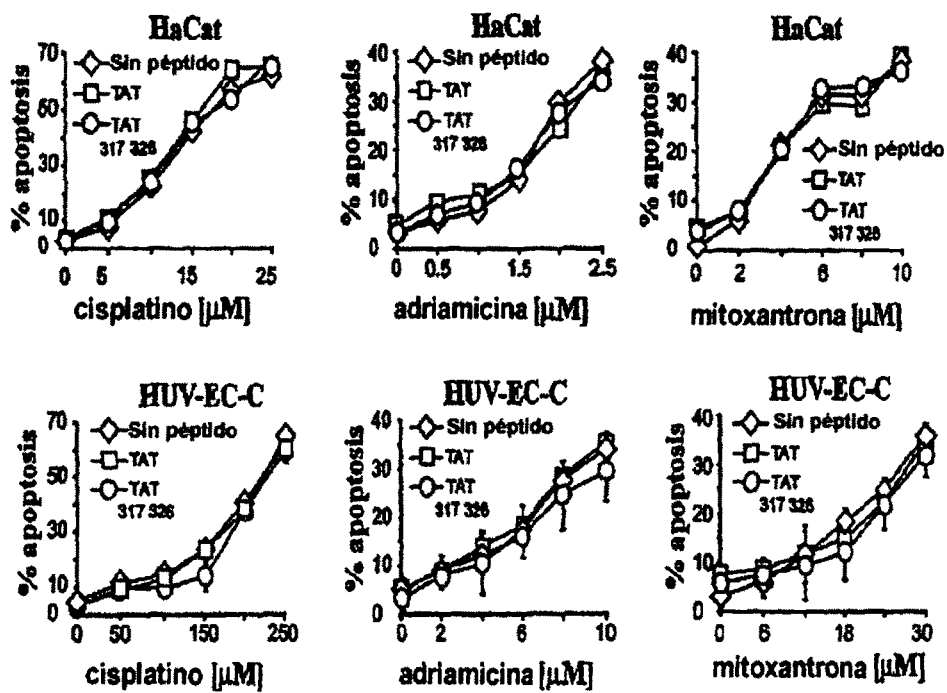
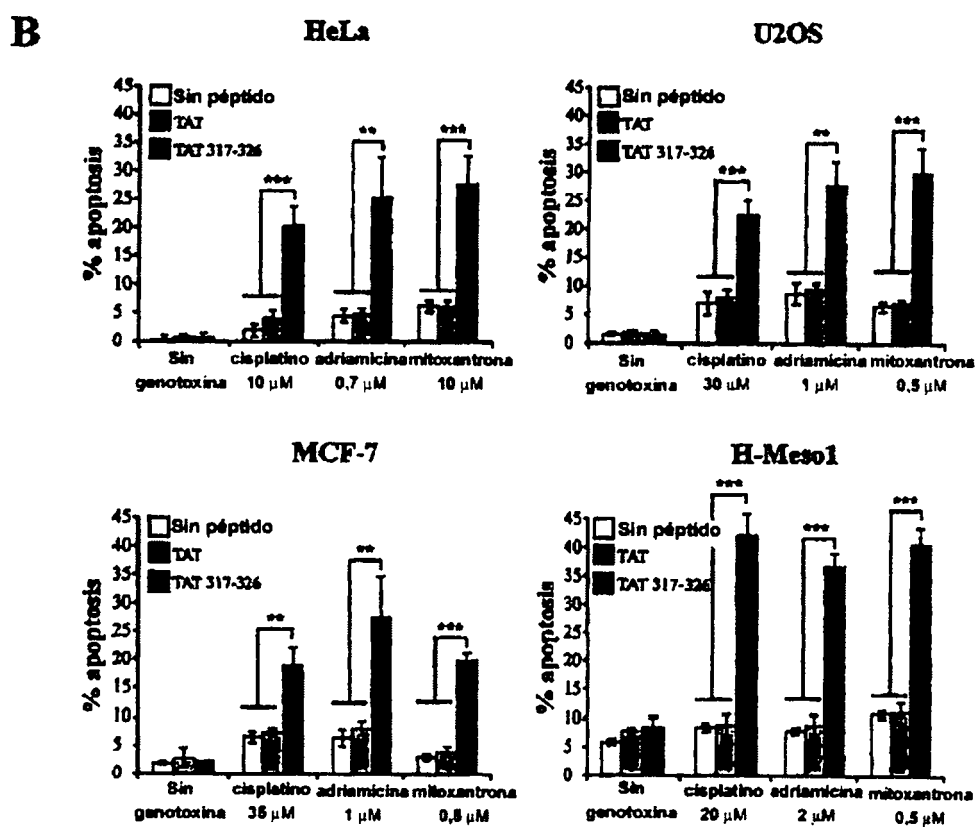
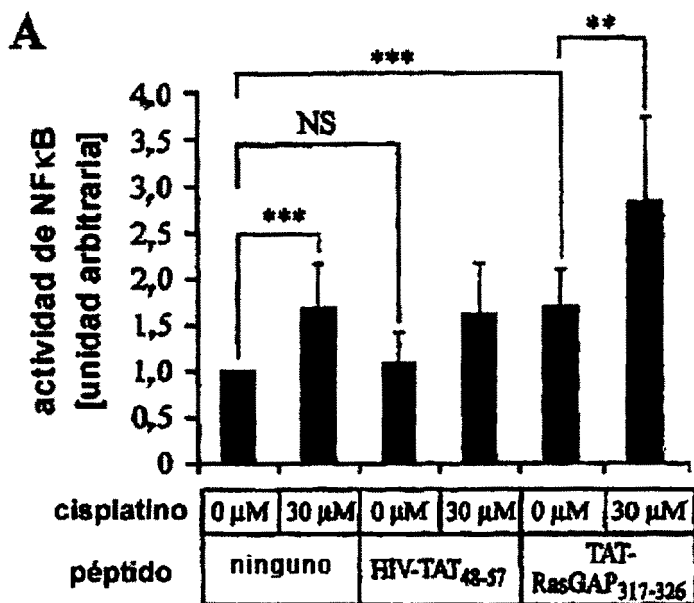


FIG.4 B



**FIG.5 A**



**FIG.5 B**

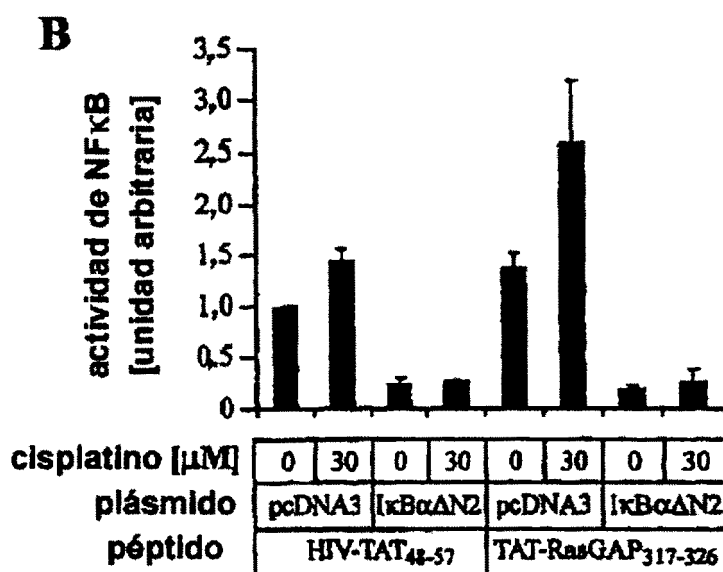


FIG.5 C

C

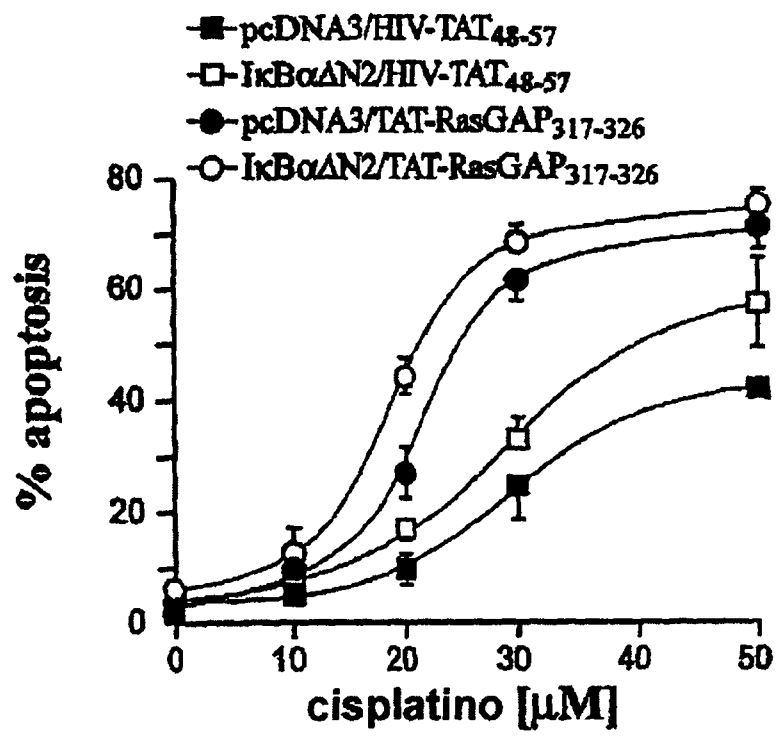
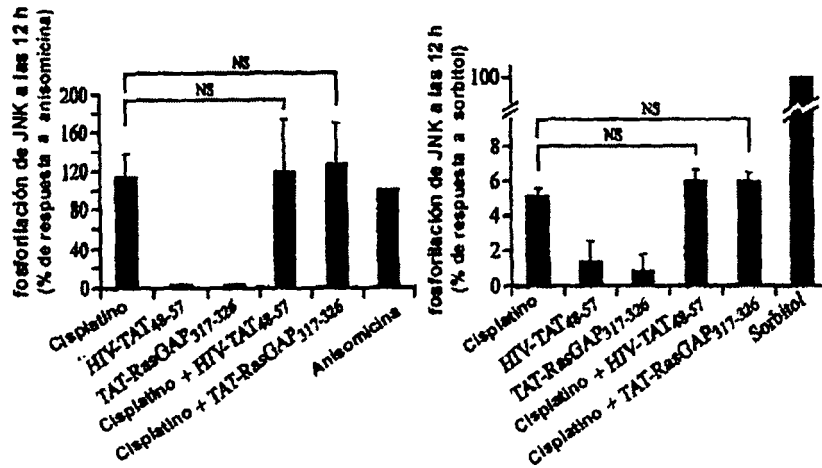
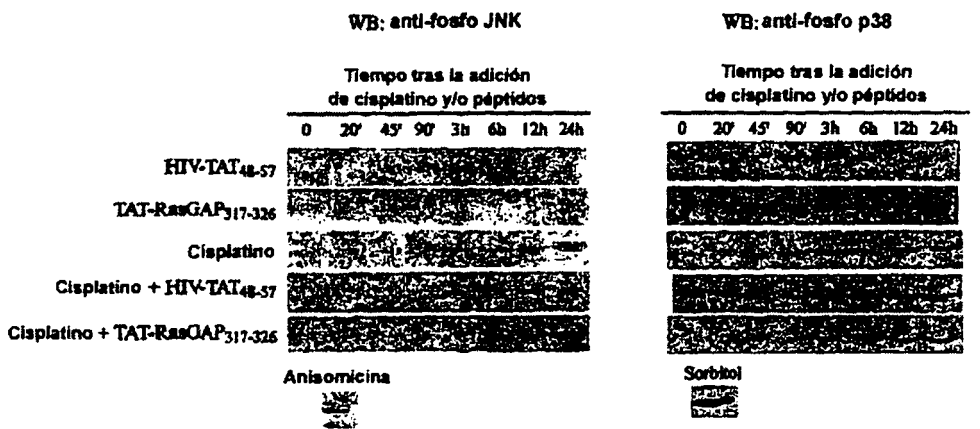


FIG.6



# ES 2 308 200 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Lausanne

5 <120> Péptido derivado de RasGAp para destruir selectivamente células cancerosas

<130> 14673/PCT

10 <140> PCT/IB04/-

<141> 30-06-2004

<150> US 60/483.691

15 <151> 30-06-2003

<160> 4

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 249

25 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

30

<b>gaagatagaa ggcgtgtacg agctattcta ccttacacaa aagtaccaga cactgatgaa</b>	<b>60</b>
<b>ataagtttct taaaaggaga tatgttcatt gttcataatg aattagaaga tggatggatg</b>	<b>120</b>
<b>tgggttacia atttaagaac agatgaacaa ggccttattg ttgaagacct agtagaagag</b>	<b>180</b>
<b>gtgggccggg aagaagatcc acatgaagga aaaatatggt tccatgggaa gatttccaaa</b>	<b>240</b>
<b>caggaagct</b>	<b>249</b>

40

<210> 2

<211> 204

45 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

50

<b>gtacgagcta ttctacctta cacaaaagta ccagacactg atgaaataag tttcttaaaa</b>	<b>60</b>
<b>ggagatatgt tcattgttca taatgaatta gaagatggat ggatgtgggt taciaattta</b>	<b>120</b>
<b>agaacagatg aacaaggcct tattgttgaa gacctagtag aagaggtggg ccgggaagaa</b>	<b>180</b>
<b>gatccacatg aaggaaaaat atgg</b>	<b>204</b>

55

60 <210> 3

<211> 174

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

## ES 2 308 200 T3

<400> 3  
gtacgagcta ttctacctta cacaaaagta ccagacactg atgaaataag tttcttaaaa 60  
5 ggagatatgt tcattgttca taatgaatta gaagatggat ggatgtgggt tacaaattta 120  
agaacagatg aacaaggcct tarrgttgaa gacctagtag aagaggtggg ccgg 174

<210> 4  
10 <211> 30  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 4  
tggatgtggg ttacaaattt aagaacagat 30

20

### LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Universidad de Lausanne  
<120> Péptido derivado de RasGAp para destruir selectivamente células cancerosas

30 <130> 14673/PCT

<140> PCT/IB04/  
<141> 29-06-2004

35 <150> US 60/483.691  
<151> 30-06-2003

40 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.1

45 <210> 1  
<211> 249  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 1

gaagatagaa ggcgtgtacg agctatttcta ccttacacaa aagtaccaga cactgatgaa 60  
55 ataagtttct taaaaggaga tatgttcatt gttcataatg aattagaaga tggatggatg 120  
tgggttacia atttaagaac agatgaacaa ggccttattg ttgaagacct agtagaagag 180  
gtgggccggg aagaagatcc acatgaagga aaaatatggt tccatgggaa gatttccaaa 240  
60 caggaagct 249

<210> 2  
<211> 204  
65 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 200 T3

<400> 2

gtacgagcta ttctacctta cacaaaagta ccagacactg atgaaataag tttcttaaaa 60  
 5 ggagatatgt tcattgttca taatgaatta gaagatggat ggatgtgggt tacaaattta 120  
 agaacagatg aacaaggcct tattgttgaa gacctagtag aagaggtggg ccgggaagaa 180  
 gatccacatg aaggaaaaat atgg 204

10 <210> 3

<211> 174

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

gtacgagcta ttctacctta cacaaaagta ccagacactg atgaaataag tttcttaaaa 60  
 20 ggagatatgt tcattgttca taatgaatta gaagatggat ggatgtgggt tacaaattta 120  
 agaacagatg aacaaggcct tattgttgaa gacctagtag aagaggtggg ccgg 174

25 <210> 4

<211> 30

<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

tgatgtggg ttacaaattt aagaacagat 30

35 <210> 5

<211> 83

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

45 Glu Asp Arg Arg Arg Val Arg Ala Ile Leu Pro Tyr Thr Lys Val Pro  
 1 5 10 15

50 Asp Thr Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys Gly Asp Met Phe Ile Val His  
 20 25 30

55 Asn Glu Leu Glu Asp Gly Trp Met Trp Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp  
 35 40 45

60 Glu Gln Gly Leu Ile Val Glu Asp Leu Val Glu Glu Val Gly Arg Glu  
 50 55 60

65 Glu Asp Pro His Glu Gly Lys Ile Trp Phe His Gly Lys Ile Ser Lys  
 65 70 75 80

65 Gln Glu Ala

ES 2 308 200 T3

<210> 6

<211> 69

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

10 Arg Val Arg Ala Ile Leu Pro Tyr Thr Lys Val Pro Asp Thr Asp Glu  
1 5 10 15  
15 Ile Ser Phe Leu Lys Gly Asp Met Phe Ile Val His Asn Glu Leu Glu  
20 25 30  
20 Asp Gly Trp Met Trp Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp Glu Gln Gly Leu  
35 40 45  
25 Ile Val Glu Asp Leu Val Glu Glu Val Gly Arg Glu Glu Asp Pro His  
50 55 60  
Glu Gly Lys Ile Trp  
65

30 <210> 7

<211> 59

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

40 Arg Val Arg Ala Ile Leu Pro Tyr Thr Lys Val Pro Asp Thr Asp Glu  
1 5 10 15  
45 Ile Ser Phe Leu Lys Gly Asp Met Phe Ile Val His Asn Glu Leu Glu  
20 25 30  
50 Asp Gly Trp Met Trp Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp Glu Gln Gly Leu  
35 40 45  
Ile Val Glu Asp Leu Val Glu Glu Val Gly Arg  
50 55

55 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

65 Trp Met Trp Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp  
1 5 10



