

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 290**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2018** **E 20208669 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 3811967**

54 Título: **Preparación de complejos biológicamente activos**

30 Prioridad:

14.05.2017 GB 201707715

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.06.2024

73 Titular/es:

HAMLET PHARMA AB (100.0%)
BMC D10 Klinikgatan 32
222 42 Lund, SE

72 Inventor/es:

SVANBORG, CATHARINA;
NADEEM, AFTAB y
HO, CHIN SHING

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 973 290 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

Preparación de complejos biológicamente activos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para preparar complejos biológicamente activos que tienen actividad terapéutica, en especial en el tratamiento de tumores o como agentes antibacterianos o antivirales. La presente invención se refiere además a procedimientos de tratamiento de tumores y tipos de cáncer, en especial a procedimientos para atacar selectivamente células tumorales con preferencia a las células sanas, así como a nuevos complejos y composiciones para su uso en estos procedimientos.

Antecedentes

- 10 Ha habido mucho interés en la producción de complejos que incluyan proteínas parcialmente desplegadas y lípidos. Estas proteínas pueden tener propiedades drásticamente diferentes y, en concreto, propiedades biológicas que las proteínas correspondientes en el estado completamente plegado. La obtención de una función nueva y beneficiosa tras el desplegamiento parcial de la proteína y la unión de ácidos grasos es un fenómeno notable, y puede reflejar una importante vía genérica de diversificación funcional de las proteínas mediante la variación de sus estados
- 15 conformacionales y ligandos asociados. Así, además del corte y empalme alternativo de los transcritos de ARNm, las modificaciones postraduccionales y los cambios en la estructura terciaria de dominios específicos, el desplegamiento parcial de una proteína previamente nativa se está considerando como un mecanismo para generar diversidad funcional. Esto puede deberse a una respuesta celular a las proteínas desplegadas y al cofactor lipídico, que define sus propiedades alteradas. Sin embargo, esta respuesta puede ser diferente, por ejemplo, en las células tumorales,
- 20 lo que significa que puede dar lugar a un potencial terapéutico. Para formar moléculas estables, las proteínas desplegadas suelen modificarse de algún modo y, en concreto, pueden unirse a cofactores, tales como cofactores de ácidos grasos. Los complejos así formados pueden ser estables y dar lugar a opciones terapéuticas.

- 25 HAMLET ("human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells", alfa-lactoalbúmina humana que se ha transformado en letal para las células tumorales) es un ejemplo de una nueva familia de moléculas tumorocidas con propiedades notables. Formado a partir de α -lactoalbúmina parcialmente desplegada y con ácido oleico como constituyente integral, HAMLET se descubrió por casualidad al estudiar la capacidad de la leche humana para impedir que las bacterias se adhieran a las células. Los primeros experimentos *in vitro* demostraron que HAMLET presenta una amplia actividad antitumoral con un alto grado de selectividad tumoral, y estudios terapéuticos posteriores han confirmado la actividad tumorocida de HAMLET y su relativa selectividad para el tejido tumoral *in vivo*. En un estudio clínico controlado con placebo, la administración tópica de HAMLET eliminó o redujo el tamaño de papilomas cutáneos y, en
- 30 pacientes con cáncer de vejiga, las instilaciones locales de HAMLET causaron la muerte rápida de las células tumorales, pero no del tejido sano que rodeaba al tumor. La eficacia terapéutica de HAMLET en el cáncer de vejiga se demostró recientemente en un modelo murino de cáncer de vejiga y el tratamiento con HAMLET retrasó la progresión tumoral y condujo a una mayor supervivencia en un modelo de xenoinjerto de glioblastoma de rata sin indicios de muerte celular en el tejido cerebral sano. De este modo, HAMLET parece identificar vías de muerte que se conservan en las células tumorales, distinguiéndolas así de las células sanas diferenciadas.

- También se ha observado que otros complejos que utilizan la lisozima equina y el ácido oleico producen la muerte celular (Vukojevic *et al.*, Langmuir, 2010, 26(18) 14782-14787), lo que sugiere que diferentes proteínas no plegadas pueden convertirse en citotóxicas cuando se acoplan a un cofactor adecuado.

- 40 Otras investigaciones se centran en el uso de fragmentos peptídicos de estas proteínas que también pueden utilizarse (véase, por ejemplo, el documento EP-B-2643010 y la solicitud de patente británica n.º 1621752.3, en tramitación junto con la presente).

- Habitualmente, estos tipos de complejos se preparaban según lo descrito por Svensson *et al.* (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 4221-4226. La α -lactoalbúmina nativa se purificaba a partir de leche humana mediante cromatografía de interacción hidrófoba. La proteína se desplegaba con EDTA, se sometía a cromatografía de intercambio iónico en una matriz preacondicionada con ácido oleico y se eluía con sal en alta concentración, concretamente NaCl 1 M, para obtener complejos biológicamente activos. Se han utilizado procedimientos de este tipo para producir otros complejos biológicamente activos, incluido BAMLET, a partir de alfa-lactoalbúmina bovina, y complejos formados a partir de formas recombinantes de alfa-lactoalbúmina, en especial aquellas sin residuos de cisteína como se describe en el
- 50 documento WO 2010/079362.

- En el documento WO2010/131237 se describe una preparación alternativa de dichos complejos biológicamente activos. En esta referencia, BAMLET se prepara en un sistema monofásico, en el que la α -lactoalbúmina se reconstituye en solución salina tamponada con fosfato ("phosphate buffered saline", PBS) y se añade oleato de sodio. A continuación, la mezcla se calienta a temperaturas iguales o superiores a 60 °C y se obtiene el complejo activo. Este procedimiento tiene la ventaja de ser sencillo de realizar, e incluso puede llevarse a cabo *in situ* en una situación clínica con la ayuda de kits.
- 55

En otras referencias, el complejo biológicamente activo se prepara por disolución del complejo previamente liofilizado en PBS para su uso (véase, por ejemplo, el documento WO2010/079362).

Así pues, es evidente que los complejos de este tipo dependen de la presencia de sales en su producción. La solución salina tamponada con fosfato (PBS), tal como se ha utilizado anteriormente, comprende una mezcla de al menos tres y, a veces, cuatro sales. Se trata de cloruro de sodio, fosfato disódico y fosfato monopotásico, así como, en algunos casos, también cloruro de potasio.

Los solicitantes investigaron el impacto de la mezcla de sales utilizada en la preparación del compuesto y sorprendentemente descubrieron que la naturaleza concreta de las sales utilizadas en la producción puede tener un impacto en la actividad del producto. Esto sugiere que los productos pueden distinguirse y, por tanto, aquellos con un equilibrio salino específico son productos diferenciados.

El documento WO2012/069836 se refiere a un complejo biológicamente activo y a su preparación. El documento WO2014/023976 se refiere a la terapia profiláctica y nutracéutica. Ambos documentos describen la formación de un complejo activo en condiciones de intercambio iónico, tales como las que se dan en una columna de intercambio iónico.

Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Las referencias a procedimientos de tratamiento mediante terapia en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en dichos procedimientos.

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un complejo biológicamente activo, que comprende disolver una mezcla de un elemento polipeptídico como se define a continuación en forma de polvo y ácido oleico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo también en forma sólida, en un disolvente acuoso que comprende al menos dos sales, la primera de las cuales es cloruro de sodio o de potasio, y la segunda es fosfato disódico o fosfato monopotásico, en el que, en concreto, el procedimiento se lleva a cabo a temperatura moderada.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "temperatura moderada" se refiere a temperaturas de hasta 50 °C, por ejemplo, de 0-50 °C, por ejemplo, de 10-40 °C, y más concretamente de 15-25 °C, tal como a temperatura ambiente. Estas temperaturas suelen ser inferiores a la "temperatura de fusión" a la que los polipéptidos se despliegan o desnaturalizan. Sin embargo, los solicitantes han descubierto que siguen siendo capaces de formar complejos biológicamente activos en estas condiciones salinas.

Los solicitantes han descubierto que puede prepararse un complejo activo que muestre una respuesta claramente dependiente de la dosis, mediante el procedimiento de disolución simple de la invención. Aunque la mezcla puede calentarse, por ejemplo, hasta temperaturas de hasta 50 °C, tal como hasta 40 °C, para lograr una disolución rápida, no es necesario calentar la solución exhaustivamente, tal como se describe en la ebullición, con la única condición de que haya un equilibrio adecuado de sales en el disolvente acuoso. Así, en una realización concreta, el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente.

La disolución puede facilitarse por agitación, por ejemplo, mediante agitación vorticial. Si es necesario, la solución puede filtrarse a través de un filtro estéril en esta fase. Entre los filtros adecuados se encuentran las membranas de polietersulfona (PES) o las membranas de acetato de celulosa Minisart® NML.

Cualquiera de estos procesos de agitación se llevará a cabo durante un período de tiempo suficiente para garantizar la disolución de los elementos en la solución salina. Aunque los tiempos precisos pueden variar en función de factores, tales como la naturaleza concreta del polipéptido utilizado y la temperatura a la que se mantiene la mezcla, los tiempos serán normalmente bastante cortos, por ejemplo, no más de 10 minutos, por ejemplo, de 1 a 5 minutos, tal como aproximadamente 2 minutos.

En una realización concreta, el disolvente comprende además una tercera sal que es fosfato monosódico o monopotásico y, en concreto, es fosfato monopotásico. Estas mezclas se encuentran en las soluciones convencionales de PBS.

Por lo tanto, este procedimiento es fácil de preparar en una diversidad de entornos de fabricación y no fabricación.

El término "polipéptido" utilizado en el presente documento incluye proteínas y péptidos, incluidos péptidos largos.

Los "elementos polipeptídicos" utilizados en el procedimiento de la invención son la alfa-lactoalbúmina, la lisozima u otras proteínas que tengan una actividad perturbadora de la membrana, proteínas recombinantes y, en concreto, variantes de dichas proteínas naturales que carezcan de enlaces intramoleculares, por ejemplo, como resultado de la mutación de residuos de cisteína, o, en concreto, fragmentos de cualquiera de estas proteínas, en concreto péptidos de hasta 50 aminoácidos.

La expresión "variante" se refiere a proteínas o polipéptidos que tienen una función biológica similar, pero en los que la secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia base de la que deriva en que uno o más aminoácidos dentro de la secuencia son sustituidos por otros aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden considerarse "conservadoras" cuando un aminoácido se sustituye por otro aminoácido diferente con propiedades muy similares. Las sustituciones no conservadoras son aquellas en las que los aminoácidos se sustituyen por aminoácidos de un tipo diferente.

Por "sustitución conservadora" se entiende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, en la que las clases se definen como sigue:

Clase	Ejemplos de aminoácidos
No polar:	A, V, L, I, P, M, F, W
Polar sin carga:	G, S, T, C, Y, N, Q
Ácido:	D, E
Básico:	K, R, H.

10 Como es bien sabido por los expertos en la materia, la alteración de la estructura primaria de un péptido mediante una sustitución conservadora puede no alterar significativamente la actividad de ese péptido, porque la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y establecer contactos similares a los de la cadena lateral del aminoácido que se ha sustituido. Esto es así incluso cuando la sustitución se produce en una región crucial para determinar la conformación del péptido.

15 Las sustituciones no conservadoras son posibles siempre que no interrumpan la función del dominio de unión al ADN de los polipéptidos.

En términos generales, serán posibles menos sustituciones no conservadoras sin alterar la actividad biológica de los polipéptidos.

20 La determinación del efecto de cualquier sustitución (y, de hecho, de cualquier delección o inserción de aminoácidos) está totalmente dentro de las capacidades ordinarias del experto, que puede determinar con facilidad si un polipéptido variante conserva las propiedades fundamentales y la actividad de la proteína básica. Por ejemplo, al determinar si una variante del polipéptido entra en el alcance de la invención, el experto determinará si los complejos que comprenden la variante conservan la actividad biológica (por ejemplo, la muerte de células tumorales) de los complejos formados con formas desplegadas de la proteína nativa, y el polipéptido tiene al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de la proteína nativa.

25 Las variantes del polipéptido pueden comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad, por ejemplo, al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con una secuencia de proteína nativa, tal como una secuencia de alfa-lactoalbúmina o lisozima.

30 El nivel de identidad de secuencia se determina adecuadamente utilizando el programa informático BLASTP con las secuencias de la proteína nativa como secuencia base. Esto significa que las secuencias de la proteína nativa constituyen la secuencia con respecto a la cual se determina el porcentaje de identidad. El programa informático BLAST es de acceso público en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accesible el 10 de mayo de 2017).

35 En una realización concreta, el elemento polipeptídico es un péptido que no tiene más de 50 aminoácidos, y, en concreto, puede tener de 10 a 45 aminoácidos. Estos complejos son más fáciles de preparar y los materiales de partida son menos costosos. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse utilizando procedimientos convencionales para la producción de péptidos. Los complejos formados pueden ser más fáciles de manipular y formular para su administración, debido a su menor peso molecular.

40 Se derivan de una proteína natural seleccionada de la alfa-lactoalbúmina, la lisozima u otras proteínas que tienen una actividad perturbadora de la membrana o una variante de las mismas que carecen de enlaces intramoleculares, o en concreto, fragmentos de cualquiera de estas proteínas. Las proteínas adecuadas son las identificadas como activas en dichos complejos, tales como la alfa-lactoalbúmina, la beta-lactoglobulina o la lisozima, pero pueden derivarse de cualquier proteína perturbadora de la membrana.

Las proteínas perturbadoras de la membrana son proteínas que tienen la capacidad de interactuar con la interfaz de las membranas celulares, en concreto causando alteraciones, tales como la tubulación de la membrana celular. Normalmente, la proteína estará inmersa en la membrana celular. Algunos ejemplos de tales proteínas incluyen complejos de cubierta, tales como COPI, COPII (tal como SAR 1), HOPS/CORVET, SEA (asociado a Seh1), y complejos de clatrina, proteínas de dominio BAR, tales como endofilinas, y el complejo ESCRT, incluidas las subunidades de dominio Snf7.

En concreto, el péptido se deriva del dominio alfa-helicoidal de una proteína natural como se ha descrito anteriormente. El dominio alfa-helicoidal de dichas proteínas se conoce bien en la técnica o puede determinarse utilizando procedimientos convencionales.

Cuando el dominio alfa-helicoidal contiene un residuo de cisteína, éste puede, en algunas realizaciones, modificarse a un residuo de aminoácido diferente, tal como un residuo de alanina, para evitar enlaces disulfuro intermoleculares.

En una realización concreta, el péptido es un fragmento de alfa-lactoalbúmina y específicamente un fragmento del dominio alfa de la alfa-lactoalbúmina. En una realización concreta, el péptido comprende aminoácidos de alfa 1 (residuos 1-40) o alfa 2 (residuos 81-123) de la alfa-lactoalbúmina humana, o regiones análogas de otras alfa-lactoalbúminas, tales como la alfa-lactoalbúmina bovina.

Es conveniente que el péptido no contenga elementos que den lugar al plegamiento y, por lo tanto, que carezca de aminoácidos que den lugar a enlaces intramoleculares, tales como residuos de cisteína. En concreto, cuando el péptido procede de una proteína natural, los residuos de cisteína se sustituyen por otros aminoácidos, tales como la alanina.

Así, en una realización concreta, el complejo comprende aminoácidos de alfa 1 (residuos 1-40) o alfa 2 (residuos 81-123) de la alfa-lactoalbúmina humana, en los que las cisteínas se sustituyen por otros aminoácidos, tales como la alanina, para evitar cualquier enlace intramolecular.

Así, el péptido puede ser SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2:

KQFTKXELSQLLKIDIDYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO:1)

LDDITDDIMXAKKILDIKGIDYWLAKALXTEKLEQWLXEKL (SEQ ID NO:2)

en las que X es un residuo de aminoácido distinto de la cisteína.

Un ejemplo concreto de tales secuencias son SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4:

KQFTKAELSQLLKIDIDYGGIALPELIATMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO:3)

LDDITDDIMAAKKILDIKGIDYWLAKALATEKLEQWLAEKL (SEQ ID NO:4).

En algunos casos, los péptidos de SEQ ID NO:1 pueden estar truncados, por ejemplo, omitiendo el residuo terminal de alanina, dando lugar a un péptido de SEQ ID NO:6, del que SEQ ID NO:7 es un ejemplo específico;

KQFTKXELSQLLKIDIDYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQ (SEQ ID NO:6)

KQFTKAELSQLLKIDIDYGGIALPELIATMFHTSGYDTQ (SEQ ID NO:7)

Tales péptidos son novedosos y constituyen otro aspecto de la invención, junto con los complejos biológicamente activos que los comprenden.

También pueden utilizarse otros péptidos en el complejo y su idoneidad puede comprobarse determinando si los complejos con una sal de ácido graso son activos, por ejemplo, para matar células utilizando procedimientos como los descritos a continuación.

En otra realización, el péptido se deriva de una proteína de la familia COPII, tal como SAR1. Un ejemplo concreto de dicho péptido es el péptido de SEQ ID NO:5 MAGWDIFGWF RDVLASLGLW NKH (SEQ ID NO:5).

En otra realización, el elemento polipeptídico es una proteína natural o una forma sintética de la misma, en concreto una alfa-lactoalbúmina, tal como la alfa-lactoalbúmina humana, bovina, ovina, de camello o de cabra. En concreto, la proteína es la lactoalbúmina bovina.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "biológicamente activo" significa que el complejo tiene una actividad biológica, que es diferente (o más fuerte) de la de los componentes individuales. En concreto, el complejo es capaz de inducir la muerte celular, en especial selectivamente en células tumorales y/o tiene un efecto bactericida o antiviral que no se observa con la proteína nativa, incluidas, por ejemplo, las formas monoméricas de α -lactoalbúmina, aunque puede haber otros efectos terapéuticos.

En concreto, el ácido oleico utilizado en el procedimiento de la invención es el ácido oleico C18:1 de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ o $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$.

En una realización concreta, se utiliza en el proceso una sal farmacéuticamente aceptable del ácido oleico. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se conocen en la técnica.

- 5 El uso de una sal y, en concreto, de una sal hidrosoluble del ácido oleico, del ácido graso o del lípido facilita el procedimiento de preparación, ya que pueden formarse soluciones acuosas, por ejemplo, para su aplicación en columnas de intercambio iónico y similares. Las sales hidrosolubles adecuadas son sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como las sales de sodio o de potasio.

- 10 Además, se ha descubierto que las sales y, en concreto, las sales oleato, tal como el oleato de sodio, parecen tener cierto efecto tumoricida inherente. Por lo tanto, su inclusión en el complejo puede dar lugar a aumentos de actividad.

En una realización concreta, la primera sal utilizada en el procedimiento de la invención es cloruro de sodio.

En otra realización concreta, la segunda sal utilizada en el procedimiento de la invención es fosfato disódico.

En otra realización concreta, la tercera sal utilizada en el procedimiento de la invención es fosfato monopotásico.

- 15 La proporción de primera sal:segunda sal utilizada en el procedimiento de la invención es convenientemente de 8:1 a 1:1, por ejemplo, de 5:1 a 2:1 y en concreto de 4:1 a 3,5:1. En su caso, la proporción de primera sal:tercera sal es de 20:1 a 5:1, por ejemplo, de 15:1 a 10:1, tal como de 12,5:1 a 11,5:1.

En una realización concreta, la proporción de la primera a la segunda y a la tercera sal es de 13-12:4-3:1.

- 20 La proporción de ácido oleico u oleato:péptido mezclado en el procedimiento de la invención está convenientemente en el intervalo de 20:1 a 1 a 1, pero preferentemente está presente un exceso de oleato, por ejemplo, en una proporción de oleato:péptido de aproximadamente 5:1. La mezcla puede realizarse a una temperatura de 0-50 °C, convenientemente a temperatura y presión ambientales.

- 25 Si es necesario, el producto del proceso de la invención puede solidificarse, por ejemplo, mediante liofilización, para su almacenamiento o con fines de formulación. Posteriormente, puede reconstituirse utilizando, en concreto, agua estéril, para su uso. Estos procedimientos pueden ser especialmente adecuados cuando el polipéptido es un péptido en lugar de una proteína. Los solicitantes han descubierto que las proteínas pueden volver a su estado de plegamiento natural cuando se someten a procedimientos, tales como la liofilización.

El problema puede aliviarse estabilizando el polipéptido en el estado desplegado, por ejemplo, bajando el pH de la solución, por ejemplo, hasta un valor de 4 o menos, o añadiendo quelantes de calcio, tales como EDTA, al disolvente durante el procedimiento de preparación.

- 30 Así, los complejos pueden formularse en composiciones farmacéuticas útiles combinándolos con vehículos farmacéuticamente aceptables de la manera convencional.

Las composiciones son, de modo conveniente, composiciones farmacéuticas en una forma adecuada para un uso tópico, por ejemplo, en forma de cremas, ungüentos, geles, o soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas. Estos pueden incluir los vehículos, cargas y/o expedientes habitualmente conocidos, que son farmacéuticamente aceptables.

- 35 Las soluciones o cremas tópicas contienen convenientemente un agente emulsionante para el complejo de proteínas junto con un diluyente o una base de crema.

La dosis diaria del complejo varía y depende del paciente, de la naturaleza de la afección tratada, etc., de acuerdo con la práctica clínica habitual. Por regla general, se utilizan de 2 a 200 mg/dosis del complejo biológicamente activo en cada administración. En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite un complejo biológicamente activo como el descrito anteriormente.

- 40 En concreto, el complejo puede utilizarse para tratar tipos de cáncer, tales como los papilomas cutáneos humanos, el cáncer de vejiga humano y los glioblastomas. En este último caso, la administración puede ser por infusión, como es conocido en la técnica.

- 45 La invención proporciona además el complejo biológicamente activo definido anteriormente para su uso en terapia, en concreto en el tratamiento del cáncer.

El complejo también puede ser de utilidad en la prevención del cáncer, en concreto del cáncer gastrointestinal, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2014/023976. En este caso, el complejo puede combinarse con un producto alimentario, por ejemplo, un producto lácteo, tal como yogur, para su uso como nutracéutico. Las composiciones de este tipo constituyen otro aspecto de la invención.

50

A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprende" y "contiene" y variaciones de las mismas, por ejemplo "comprendiendo", significan "incluido, pero no limitado a", y no excluyen otros componentes, números enteros o etapas. Además, el singular abarca el plural a menos que el contexto exija lo contrario: en concreto, cuando se utiliza el artículo indefinido, debe entenderse que la memoria descriptiva contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto exija lo contrario.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser las descritas en relación con cualquiera de los otros aspectos. Dentro del alcance de la presente solicitud, se pretende expresamente que los diversos aspectos, realizaciones, ejemplos y alternativas expuestos en los párrafos anteriores, en las reivindicaciones y/o en la siguiente descripción y dibujos, y, en concreto, las características individuales de los mismos, puedan tomarse independientemente o en cualquier combinación. Es decir, todas las realizaciones y/o características de cualquier realización pueden combinarse de cualquier manera y/o en cualquier combinación, a menos que dichas características sean incompatibles.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora más concretamente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

la figura 1 muestra los resultados de los estudios ATP Lite, PrestoBlue y azul tripano obtenidos utilizando una gama de complejos biológicamente activos en células tumorales, tal como se describe a continuación;

la figura 2 muestra una comparación de resultados similares obtenidos con y sin filtración de las soluciones;

la figura 3 muestra (A) un esquema y una fotografía de la preparación de un complejo que comprende alfa-lactoalbúmina bovina, y (B) los resultados de los estudios ATP Lite, PrestoBlue y azul tripano de células tumorales a las que se administró la solución resultante.

Ejemplo 1

Producción de complejos biológicamente aceptables

Se preparó una gama de complejos biológicamente activos utilizando un péptido de SEQ ID NO:7:

Ac-KQFTKAELSQLLKDIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQ-OH (SEQ ID NO:7)

que es una variante de un fragmento de α -lactoalbúmina humana.

El péptido (700 μ M), en forma liofilizada, se añadió a un tubo junto con copos de oleato de sodio (3,5 mM). A continuación, cada tubo se reconstituyó con el volumen necesario de:

1) Solución salina tamponada con fosfato (NaCl 6,8 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (4,8 g/l); y KH_2PO_4 (1,3 g/l) (pH 7,2)

2) Solución de NaCl (116 mM) (pH 7,01)

3) Solución de Na_2HPO_4 (31 mM) (pH 8,6)

4) Solución de KH_2PO_4 (9,56 mM) (pH 4,6)

5) Una mezcla de (2) y (4) (pH 4,63)

6) Una mezcla de (2) y (3) (pH 8,37)

7) Una mezcla de (3) y (4) (pH 7,29)

Cada mezcla se sometió a agitación vorticial hasta que la solución quedó transparente.

A continuación, los complejos obtenidos se liofilizaron. Las condiciones de liofilización fueron una presión inferior a 1,2 mbares y una temperatura inferior a -55 °C.

Cada tubo se almacenó a -20 °C o menos y se reconstituyó añadiendo 30 ml de agua estéril poco antes de su uso.

Ejemplo 2

Ensayo de muerte celular

Se cultivaron células de carcinoma de pulmón humano (A549, ATCC) en RPMI-1640 con aminoácidos no esenciales (1:100), piruvato de sodio 1 mM, gentamicina 50 μ g/ml y suero fetal de ternera (FCS) al 5-10 % a 37 °C, 5 % de CO_2 . Para el experimento de muerte celular, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos (2×10^4 /pocillo, Tecan Group

Ltd) durante toda la noche. Las células se incubaron con complejos biológicamente activos obtenidos en el ejemplo 1 en dosis equivalentes a 7, 21 o 35 μM de péptido en RPMI-1640 sin suero a 37 °C. Se añadió FCS al cabo de 1 hora. La muerte celular se cuantificó 3 horas después del tratamiento con péptido-oleato mediante tres procedimientos bioquímicos que incluían 1) estimación de los niveles de ATP celular utilizando el kit ATPlite™ basado en la luminiscencia (Perkin Elmer), 2) tinción fluorescente Presto Blue (Invitrogen, A13262), y 3) ensayo de exclusión con azul tripano. La fluorescencia y la luminiscencia se midieron con un lector de microplacas (Infinite F200, Tecan).

Los resultados se muestran en la figura 1. Los complejos preparados en PBS fueron muy activos y desencadenaron la muerte celular de una manera dependiente de la dosis (figura 1A). Los preparados con una sola sal del PBS (figura 1B) mostraron una pérdida significativa de actividad. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 1C, la mezcla (6) anterior, mantuvo un nivel razonable de actividad de muerte de células tumorales de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 3

Efecto de la filtración en el procedimiento

El procedimiento del ejemplo 1 se repitió dos veces utilizando la solución de PBS (1), pero, en este caso, cada solución se hizo pasar a través de un filtro químicamente diferente, membranas de polietersulfona (12846445, VWR) o filtros de acetato de celulosa Minisart® NML (60810103, Sartorius). La eficacia biológica del producto se comprobó como se describe en el ejemplo 2 en una comparación por pares con el producto que no había sido filtrado. Los resultados se muestran en la figura 2.

No se observaron diferencias significativas en la actividad biológica del complejo cuantificada mediante la medición de los niveles totales de ATP celular, la tinción con PrestoBlue y el ensayo de exclusión con azul tripano.

Ejemplo 4

Producción de BAMLET

Se añadió alfa-lactoalbúmina bovina (700 μM), en forma liofilizada, a un tubo junto con copos de oleato de sodio (3,5 mM). A continuación, se añadió solución salina tamponada con fosfato (1 ml) al tubo, que se sometió a agitación vorticial vórtex a temperatura ambiente durante 1-2 minutos. Se formó una solución transparente (figura 3A).

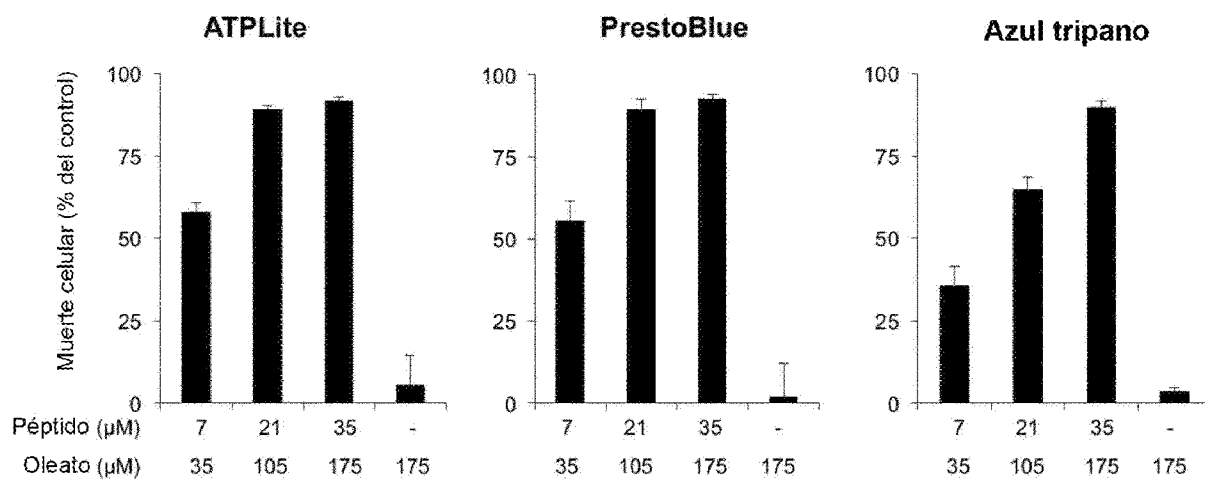
La solución resultante se ensayó utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en la figura 3B. Es evidente que la solución era biológicamente activa y que destruía a las células de carcinoma pulmonar A549 de forma dependiente de la dosis. Sin embargo, este efecto fue transitorio, ya que la liofilización del complejo eliminó la actividad.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un complejo biológicamente activo, comprendiendo dicho procedimiento disolver una mezcla de un elemento polipeptídico en forma de polvo y ácido oleico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo también en forma sólida, en un disolvente acuoso que comprende al menos dos sales, la primera de las cuales es cloruro de sodio o de potasio y la segunda es fosfato disódico o fosfato monopotásico, en el que el proceso se lleva a cabo a una temperatura moderada de hasta 50 °C, en el que el elemento polipeptídico es una proteína natural seleccionada entre alfa-lactoalbúmina, lisozima u otras proteínas que tengan una actividad perturbadora de la membrana, o variantes de las mismas que carezcan de enlaces intramoleculares, o en concreto, fragmentos de cualquiera de estas proteínas.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el disolvente acuoso comprende además una tercera sal que es fosfato monosódico o monopotásico.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la temperatura moderada es de 10-40 °C, preferentemente que se lleva a cabo a temperatura ambiente.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además filtrar una solución formada.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además eliminar el disolvente y obtener el complejo en forma sólida, preferentemente en el que el disolvente se elimina por liofilización.
6. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el elemento polipeptídico es un fragmento peptídico de hasta 50 aminoácidos, preferentemente en el que el fragmento peptídico comprende un dominio alfa-helicoidal de una proteína natural según se define en la reivindicación 7 o una variante de la misma, más preferentemente en el que el péptido es SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6, aún más preferentemente en el que el péptido es SEQ ID NO:7.
7. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que el polipéptido es una alfa-lactoalbúmina, preferentemente en el que el polipéptido es alfa-lactoalbúmina bovina.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera sal es cloruro de sodio y/o en el que la segunda sal es monofosfato disódico.
9. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que la tercera sal es fosfato monopotásico.
10. Un procedimiento según la reivindicación 5 en el que el complejo se reconstituye utilizando agua estéril justo antes de su uso.

Figura 1

Figura 1A



PBS = NaCl (116mM), Na₂HPO₄ (31mM) y KH₂PO₄ (9,56mM)
pH 7,2

Figura 1B

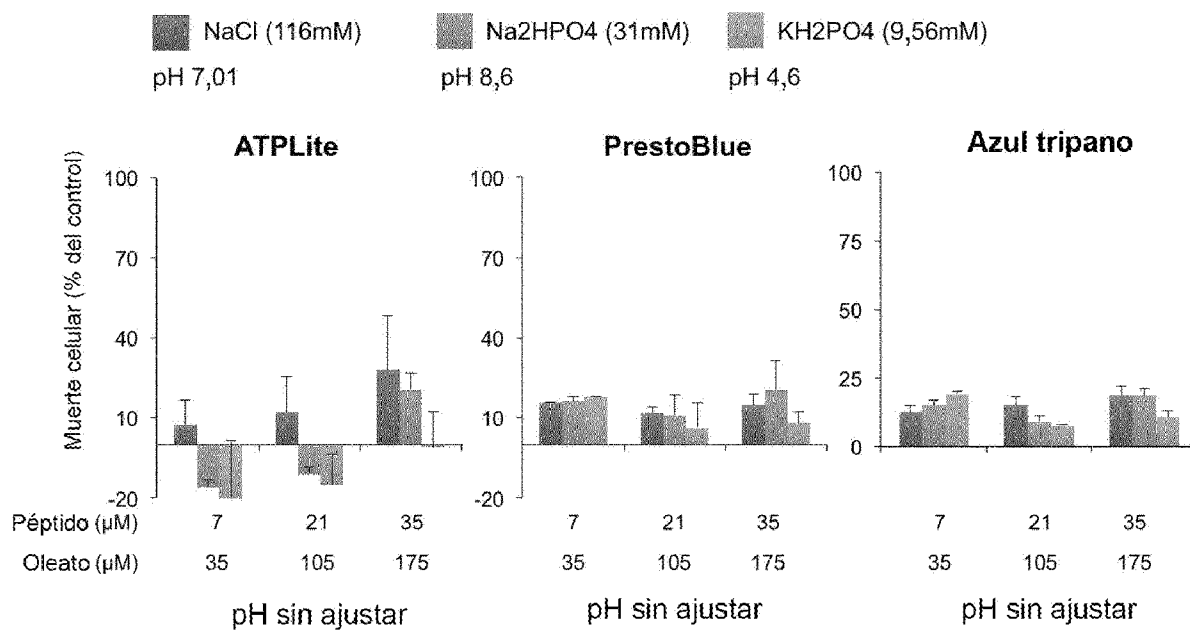


Figura 1C

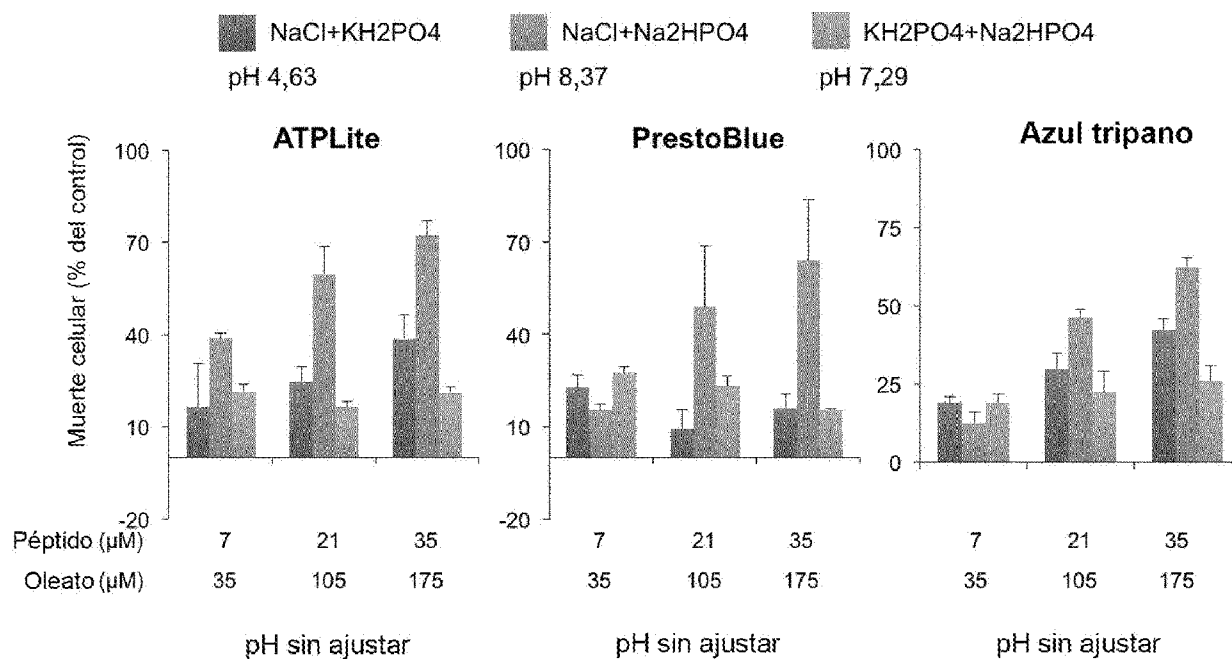


Figura 2

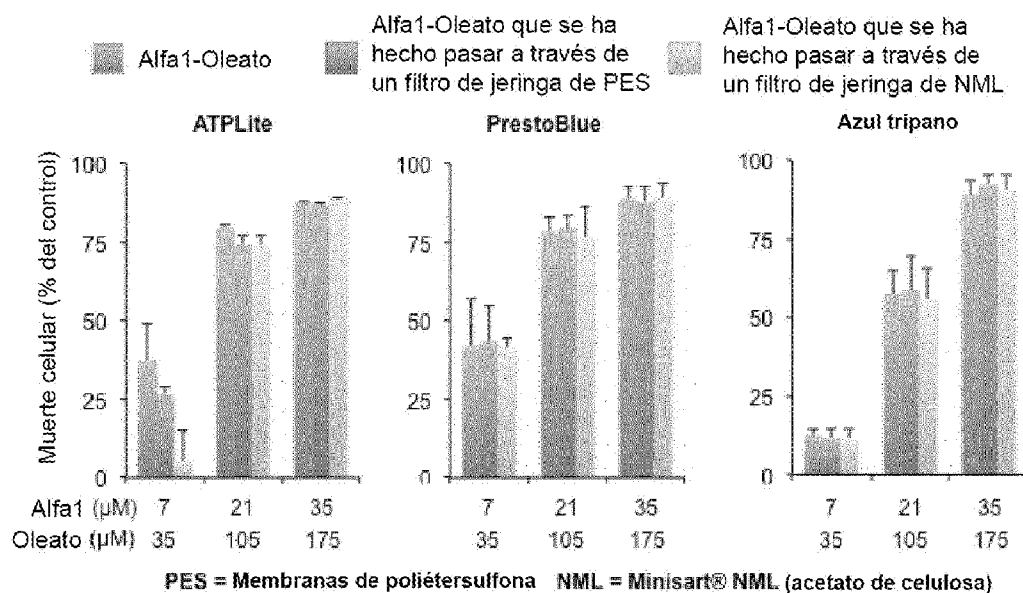


Figura 3A

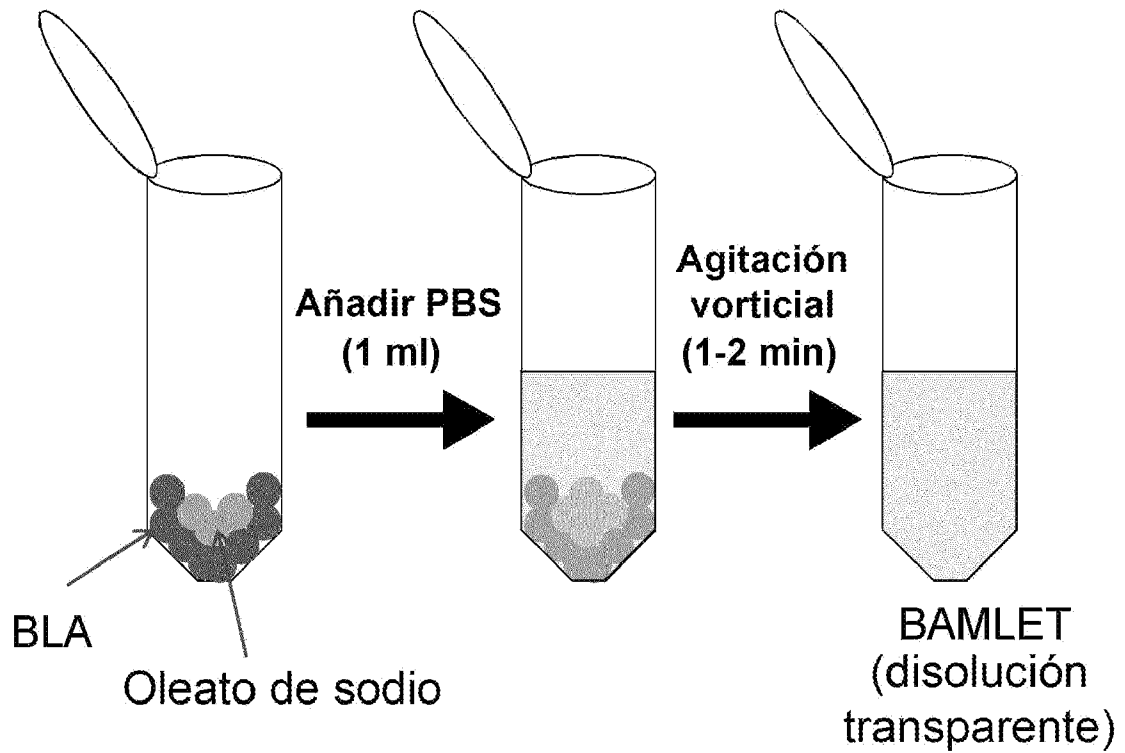


Figura 3B

Oleato de sodio **BAMLET**

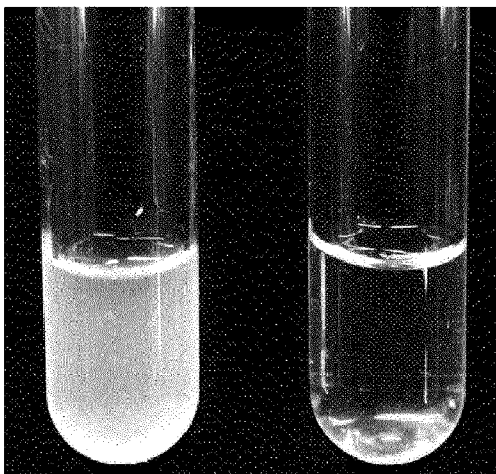


Figura 4

