



MD/EP 3484913 T2 2024.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3484913 (13) T2

(51) Int. Cl: C07K 14/82 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0609 (22) Data de depozit: 2017.07.17 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17746413.8, 2017.07.17 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3484913, 2019.05.22 (31) Numărul cererii prioritare: 16382339 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.07.15 (33) Țara cererii prioritare: EP	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2024, 2024.10.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 27/2024, 2024.07.03 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 07/2019, 2019.07.31
(71) Solicitanți: FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ ONCOLÒGICA DE VALL HEBRON, ES; INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS, ES (72) Inventatori: SOUCEK Laura, ES; JAUSET GONZÁLEZ Toni, ES; BEAULIEU Marie-Eve, ES (73) Titulari: FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ ONCOLÒGICA DE VALL HEBRON, ES; INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS, ES (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Metode și compoziții pentru tratamentul cancerului

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o polipeptidă cuprinzând sau constând din polipeptida din SECV ID NR: 1 în care restul X din poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină sau o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate în care restul X din poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină și utilizarea lor în medicină, în special în prevenirea și/sau tratamentul cancerului.

Revendicări: 15

Figuri: 2

MD/EP 3484913 T2 2024.10.31

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****DOMENIUL INVENȚIEI**

- 5 Invenția se referă la domeniul cancerului și, în mod deosebit, la polipeptide, compoziții și utilizarea lor în medicină, în special, pentru prevenirea și/sau tratamentul cancerului.

CONTEXTUL INVENȚIEI

- 10 Medicamentul ideal pentru cancer ar trebui să țină o funcție, care nu este redundantă, necesară în mod continuu pentru întreținerea tumorii, dar care este neesențială pentru întreținerea și funcția oricăror țesuturi normale. Prin urmare, logica cea mai obișnuită este de a ținti produsele genetice care sunt mutate în mod specific în cancer, pe baza faptului că aceste molecule mutante ar fi „motoarele” probabile ale cancerului și, poate, mai puțin critice pentru țesuturi normale. Din aceste motive, multă atenție s-a concentrat pe catalogarea leziunilor recurente în anumite tipuri de cancer. Din păcate, există
15 mai multe probleme în această abordare. În primul rând, majoritatea cancerelor solide umane trec prin episoade de instabilitate genomică și prezintă un zgomot mutațional care poate ascunde mutațiile „motoare” și căile efectoare aferente acestora. În al doilea rând, cancerul este rezultatul final al unui proces care implică tranziții prin mai multe blocaje evolutive. Fiecare blocaj poate necesita un tip specific de mutație a cărei funcție este ulterior neesențială pentru întreținerea tumorii și, în consecință, nu este o țintă terapeutică bună după acel moment al evoluției tumorii.

- 20 Myc este o proteină de bază helix-bucă-helix cu fermoar de leucină (b-HLH-LZ) implicată în controlul creșterii și în cancer, care funcționează într-o rețea cu proteinele înrudite structural Max, Mad și Mnt. Dimeri Myc/Max activează transcripția genelor și induc proliferare celulară sau apoptoză. Complexele Mad/Max și Mnt/Max acționează ca represori și provoacă oprirea creșterii și diferențierii
25 celulare. Toți dimerii recunosc același situs consens de ADN, caseta E CACGTG.

- Myc este strict reglementată în celulele normale, în care nivelurile sale sunt mai mari în celule care proliferază și mai scăzute în celulele care nu proliferază. Activitatea Myc aberant de mare și/sau dereglată este implicată cauzal în majoritatea cancerelor și adesea este asociată cu tumori agresive, slab diferențiate și angiogene. Dereglarea expresiei Myc este provocată de supraexpresie prin amplificări ale
30 genelor, pierderea controlului transcripțional, degradare afectată sau stabilizare crescută. Acest lucru are ca rezultat o proliferare aberantă, supraviețuire crescută, modificări ale metabolismului, angiogeneză și inflamație, toate acestea fiind semne distinctive majore ale cancerului. Mai multe studii au fundamentat rolul crucial al Myc în guvernarea aspectelor intracelulare și extracelulare ale tumorigenezei, sugerând că țintirea funcției sale ar fi valoroasă din punct de vedere terapeutic.

- 35 Este cunoscut faptul că reglarea în sensul scăderii Myc cu un inhibitor de bromodomeniu BET are ca rezultat regresia mai multor tipuri de tumori. Deși această abordare prezintă un potențial bun, ea prezintă unele limitări, cum ar fi toxicitate și numeroase efecte în afara țintei. Multe molecule mici care perturbă interacțiunea Myc/Max au prezentat o specificitate scăzută *in cellulo*.

- 40 Cu toate acestea, un inhibitor de Myc nu a devenit încă disponibil clinic și conceperea sa prezintă diverse avertismente: în primul rând, Myc este un factor de transcripție nuclear, care este, în consecință, mai greu de atins decât moleculele membranare sau citoplasmice; în al doilea rând, Myc nu are un „situs activ” enzimatic care să poată fi țintit; în al treilea rând, familia Myc cuprinde 3 proteine diferite, c-, N și L- Myc, care, în anumite condiții sunt redundante funcțional, astfel încât toate necesită inhibare simultană. Mai mult, au existat îngrijorări că inhibarea lui Myc ar induce efecte secundare
45 grave prin inhibarea proliferării țesuturilor normale. Din toate aceste motive, fabricarea unui medicament inhibitor de Myc este o provocare.

- Omomyc este un mutant MYC dominant-negativ care cuprinde domeniul b-HLH-LZ al lui Myc și adăpostește patru substituții de aminoacizi în fermoarul de leucină al lui Myc (Soucek, L. și colab., 1998, Oncogene 17, 2463-2472; Soucek, L. și colab. (2002), Cancer Res 62: 3507-3510). Substituțiile de aminoacizi E61T, E68I, R74Q și R75N conferă proteinei o specificitate de dimerizare
50 modificată, ceea ce păstrează capacitatea de a lega partenerul său natural Max și de a forma homodimeri cu ea însăși, precum și heterodimeri cu tipul sălbatic c-, N- și L- Myc.

- Datorită acestor proprietăți, Omomyc este capabil să împiedice funcțiile de transactivare a genelor dependente de Myc atât în *in vitro* cât și *in vivo* prin anularea capacității lui Myc de a se lega la
55 situsul său de legare de recunoaștere a ADN-ului, caseta E. În același timp, Omomyc potențează puternic apoptoza indusă de Myc într-o manieră dependentă de nivelul de expresie a Myc și, prin urmare, întărește activitatea de transrepresie a Myc. Omomyc împiedică astfel legarea Myc la casetele E ale promotorului și transactivarea genelor țintă, păstrând în același timp legarea dependentă de Miz-1 la

promotori și transreprezia. În prezența lui Omomyc, interactomul Myc este canalizat spre represiune și activitatea sa trece de la una prooncogenă la una supresoare tumorală.

În EP2801370 A1 și WO 2014/180889 A1 a fost demonstrat că peptida Omomyc în sine este capabilă să transducă eficient prin membrana celulară și să se transloce în nucleu, în care își exercită efectul de supresie tumorală.

Cu toate acestea, există încă o nevoie în stadiul tehnicii de a dezvolta noi abordări terapeutice îmbunătățite pentru tratamentul cancerului.

EXPUNERE PE SCURT A INVENȚIEI

Într-un prim aspect, invenția se referă la o polipeptidă care cuprinde polipeptida din SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate având un grad de identitate în raport cu SECV ID NR: 1, mai mare de 90% și având o treonină în poziția corespondentă poziției 61 din SECV ID NR: 1, o izoleucină în poziția corespondentă poziției 68 din SECV ID NR: 1, o glutamină în poziția corespondentă poziției 74 din SECV ID NR: 1 și o asparagină în poziția corespondentă poziției 75 din SECV ID NR: 1, și în care reziduul X de la poziția corespondentă poziției 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, în care varianta echivalentă funcțional menționată păstrează activitatea supresoare de tumoră a SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină.

Într-un al doilea aspect, invenția se referă la un conjugat care cuprinde:

- a. polipeptida sau varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției și
- b. un fragment chimic care facilitează absorbția celulară a polipeptidei conform invenției sau a variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate conform invenției.

Într-un al treilea aspect, invenția se referă la o polinucleotidă care codifică o polipeptidă conform invenției sau un conjugat conform invenției.

Într-un al patrulea aspect, invenția se referă la un vector care cuprinde o polinucleotidă conform invenției.

Într-un al cincilea aspect, invenția se referă la o celulă gazdă care cuprinde o polipeptidă conform invenției, un conjugat conform invenției, o polinucleotidă conform invenției sau un vector conform invenției.

Într-un al șaselea aspect, invenția se referă la o compoziție farmaceutică care cuprinde o cantitate eficientă farmaceutic de o polipeptidă sau de o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției, de un conjugat conform invenției, de o polinucleotidă conform invenției, de un vector conform invenției, sau de o celulă gazdă conform invenției, și un excipient acceptabil farmaceutic.

Într-un al șaptelea aspect, invenția se referă la o polipeptidă sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției, la un conjugat conform invenției, la o polinucleotidă conform invenției, la un vector conform invenției, la o celulă gazdă conform invenției, sau la o compoziție farmaceutică conform invenției, pentru utilizare în medicină.

Într-un al optulea aspect, invenția se referă la o polipeptidă sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției, la un conjugat conform invenției, la o polinucleotidă conform invenției, la un vector conform invenției, la o celulă gazdă conform invenției, sau la o compoziție farmaceutică conform invenției, pentru utilizare în prevenirea și/sau tratamentul cancerului.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1. Testul de viabilitate celulară arată că OmoCS (care adăpostește modificarea C89S) inhibă creșterea celulelor de gliom malign U87 (panoul A) și a celulelor de adenocarcinom pulmonar A549 (panoul B) mai eficient decât Omomyc (la concentrație mai mică). Lipofectamina (Lipo) nu produce niciun efect. Testul T a fost utilizat pentru a calcula semnificația statistică. ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$

Figura 2. Testul de densitate celulară arată că OmoCA (care adăpostește modificarea C98A) inhibă creșterea celulelor de adenocarcinom pulmonar A549 la fel de eficient ca OmoCS (care adăpostește modificarea C98S) la concentrație mai mică. Lipofectamina (Lipo) nu produce niciun efect.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Autorii prezentei invenții au descoperit că o polipeptidă cu SECV ID NR: 1, în care cisteina de la poziția 89 este înlocuită cu o serină, denumită OmoCS, este capabilă să-și exercite efectul de supresie tumorală mai eficient decât Omomyc (Exemplul 1). Acest efect de supresie tumorală este

menținut atunci când cisteina de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este înlocuită cu alți aminoacizi. Exemplul 2 arată că o polipeptidă cu SECV ID NR: 1, în care cisteina de la poziția 89 este înlocuită cu o alanină, denumită OmoCA, are același efect de supresie tumorală ca și OmoCS.

5 **Polipectidă conform invenției**

Prin urmare, într-un prim aspect, invenția se referă la o polipeptidă care cuprinde polipeptida din SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate având un grad de identitate, în raport cu SECV ID NR: 1, mai mare de 90% și având o treonină în poziția corespondentă poziției 61 din SECV ID NR: 1, o izoleucină în poziția corespondentă poziției 68 din SECV ID NR: 1, o glutamină în poziția corespondentă poziției 74 din SECV ID NR: 1 și o asparagină în poziția corespondentă poziției 75 din SECV ID NR: 1, și în care reziduul X de la poziția corespondentă poziției 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, în care varianta echivalentă funcțional menționată păstrează activitatea supresoare de tumoră din SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină.

SECV ID NR: 1 îi corespunde

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATA
YILSVQASTQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SECV ID NR: 1)

Polipeptida din secvenței SECV ID NR: 1 corespunde secvenței de proteină Omomyc, dar reziduul X de la poziția 89 nu este o cisteină. Termenul "Omomyc", așa cum este utilizat aici, se referă la o polipeptidă care constă dintr-o versiune mutantă a domeniului bHLHZip al proteinei Myc care poartă mutațiile E61T, E68I, R74Q și R75N (în care numerotarea pozițiilor mutante este dată în ceea ce privește secvența regiunii Myc corespunzătoare aminoacizilor 365-454 ai polipeptidei, așa cum este definit la numărul de acces NP_002458 în baza de date NCBI, eliberat în 15 martie 2015). Secvența de c-Myc furnizată în baza de date NCBI sub numărul de acces NP_002458 este arătată mai jos (SECV ID NR: 5), în care regiunea din care provine Omomyc este arătată subliniat:

1 MEFKVVVERQ QPQATMPLIV SFTHNTELD YDSVQPTFYC DEENFTYQQQ QQSELQPPAP
61 SEDENKRFEL LPTFELSPER EAGLCRSTY AVTFELRGD NDEGGSSPT AQLEMYTEL
121 LSGMNVNQS ICHFDSTFI RNLIQDQMS SPSAAAKIV SYKLASYQAA RRGSGSPNA
181 RGRVCSSTES LTIQLSAAA SECIDPSWVF FYPLNDSSP KSCAQSSA FSPSSDELLS
241 STRSELQSSP KPAVLHEPTF PTTSRDRER QPQESLIVV SVKPDQAPGK RGRSGSPGAG
301 GSDHPTHEPL YLKRCHVETH QINTAAPTOT RRTFAAKRY ELGSVNVLRQ ISNRKCTEP
361 ESSVTEENVK RETHNVLEPQ RNELEKRSFF ALRDQIFELE NNEKAPKVI LKATAYILE
421 VQAEQKLI SEIDLLKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SECV ID NR: 5)

Termenul "Myc", așa cum este utilizat aici, se referă la o familie de factori de transcripție care include c-Myc, N-Myc și L-Myc. Proteina Myc activează expresia multor gene prin legarea la secvența consens CACGTG (secvențe casete amplificatoare sau casete E) și prin recrutarea histonelor acetil-transferază sau HAT. Cu toate acestea, Myc poate acționa și ca un represor transcripțional. Prin legarea factorului de transcripție Miz-1 și înlocuirea coactivatorului p300, acesta inhibă expresia genelor țintă Miz-1. Myc are, de asemenea, un rol direct în controlul replicării ADN-ului.

Domeniul b-HLH-LZ al lui Myc sau domeniul lui Myc de regiune de bază helix-bucă-helix cu fermoar de leucină se referă la o regiune care determină dimerizarea Myc cu proteina Max și legarea la gene Myc-țintă. Această regiune corespunde aminoacizilor 365-454 ai Myc uman și este caracterizată prin două helix-uri alfa conectate printr-o buclă (Nair, S. K. și Burley, S. K., 2003, Cell, 112: 193-205).

Într-o variantă de realizare preferată, polipeptida care cuprinde polipeptida din SECV ID NR: 1 cuprinde, constă din sau constă, în principal, din SECV ID NR: 3 arătată mai jos.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKAT
AYILSVQASTQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SECV ID NR: 3)

În acest context, „constând, în principal, din” înseamnă că molecula specificată nu va conține nicio secvență suplimentară care ar modifica activitatea SECV ID NR: 3.

Invenția se referă la o polipeptidă care cuprinde, constă din, sau constă, în principal, din SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină. Polipeptida menționată poate să provină din domeniul bHLHZip al oricărei proteine Myc cunoscute în domeniu, cu

condiția să fie păstrate mutațiile care au ca rezultat efectul supresor tumoral. Astfel, polipeptida care poate fi utilizată în prezenta invenție poate să provină de la orice specie de mamifer, incluzând, dar fără limitare la animale domestice și de fermă (vacă, cai, porci, oi, capre, câini, pisici sau rozătoare), primate și oameni. De preferință, polipeptida din invenție provine din proteină Myc umană (număr de acces NP_002458, eliberat în 15 martie 2015).

Într-o variantă de realizare preferată, invenția se referă la o polipeptidă constând din polipeptida din SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate având un grad de identitate, în raport cu SECV ID NR: 1, mai mare de 90% și având o treonină în poziția corespondentă poziției 61 din SECV ID NR: 1, o izoleucină în poziția corespondentă poziției 68 din SECV ID NR: 1, o glutamină în poziția corespondentă poziției 74 din SECV ID NR: 1 și o asparagină în poziția corespondentă poziției 75 din SECV ID NR: 1, și în care reziduul X de la poziția corespondentă poziției 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, în care varianta echivalentă funcțional menționată păstrează activitatea supresoare de tumoră a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină.

Conform prezentei invenții, reziduul de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 poate fi orice aminoacid cu excepția cisteinei.

"Cisteină", așa cum este utilizat aici, se referă la un aminoacid cu formula $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$. Acesta este codificat de codonii UGU și UGC. Termenul include, de asemenea, cisteină nenaturală

Cisteina poate forma legături disulfurice în forma homodimerică a Omomyc, prin urmare mutația sa pentru orice alt aminoacid va avea ca rezultat incapacitatea formării legăturilor disulfurice și ar trebui să conducă la aceleași proprietăți de eficacitate ca cele obținute cu Omomyc. Prin urmare, reziduul de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 poate fi orice aminoacid natural, nenatural sau sintetic, cu excepția cisteinei, și, în special, orice aminoacid care nu ar putea fi reticulat cu alt monomer al polipeptidei din invenție pentru a forma un homodimer.

Termenul "aminoacid" sau "reziduu" se referă la aminoacizi existenți în mod natural și sintetici, precum și la analogi de aminoacizi și mimetici de aminoacizi care funcționează într-un mod similar cu aminoacizii existenți în mod natural. Aminoacizii pot fi denumiți aici, fie prin simbolurile lor de trei litere cunoscute în mod obișnuit, fie prin simbolurile cu o literă recomandate de Comisia de Nomenclatură Biochimică IUPAC-IUB.

Termenul aminoacid include aminoacizi existenți în mod natural (Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), mai puțin obișnuiți aminoacizi naturali și aminoacizi nenaturali (sintetici). Aminoacizii sunt, de preferință, în configurația L, dar sunt incluși în vedere, de asemenea, cei în configurație D, sau amestecuri de aminoacizi în configurațiile D și L.

Termenul "aminoacizi naturali" cuprinde aminoacizi alifatici (glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină), aminoacizi hidroxilați (serină și treonină), aminoacizi sulfurați (metionină), aminoacizi dicarboxilici și amidele acestora (acid aspartic, asparagină, acid glutamic și glutamină), aminoacizi care au două grupări bazice (lizină, arginină și histidină), aminoacizi aromatici (fenilalanină, tirozină și triptofan) și aminoacizi ciclici (prolină). Într-o variantă de realizare, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid alifatic. Într-o altă variantă de realizare, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid sulfurat. Într-o altă variantă de realizare, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid dicarboxilic sau amidele acestuia. Într-o altă variantă de realizare, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid care are două grupări bazice. Într-o altă variantă de realizare, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid aromatic. Într-o altă variantă de realizare, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid ciclic. Într-o variantă de realizare preferată, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid hidroxilat, de preferință, serină. Într-o variantă de realizare preferată, reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este un aminoacid selectat dintre serină, treonină și alanină, de preferință, este selectat dintre serină și alanină.

Așa cum este utilizat aici, termenul "aminoacid nenatural" se referă la un acid carboxilic, sau un derivat al acestuia, substituit cu o grupare amină și care este înrudit structural cu un aminoacid natural. Exemple ilustrative, nelimitative de aminoacizi modificați sau mai puțin obișnuiți includ acid 2-aminoadipic, acid 3-aminoadipic, beta-alanină, acid 2-aminobutiric, acid 4-aminobutiric, acid 6-aminocaproic, acid 2-aminoheptanoic, acid 2-aminoizobutiric, acid 3-aminoizobutiric, acid 2-aminopimelic, acid 2,4-diaminobutiric, desmozină, acid 2,2'-diaminopimelic, acid 2,3-diaminopropionic, N-etilglicină, N-etilasparagină, hidroxilizină, aliohidroxilizină, 3-hidroxiprolină, 4-hidroxiprolină, izodesmozină, aloizoleucină, N-metilglicină, N-metilizoleucină, 6-N-metil-lizină, N-metilvalină, norvalină, norleucină, ornitină, etc.

Exemple ilustrative, nelimitative de aminoacizi mai puțin obișnuiți sunt hidroxilizină și hidroxiprolină, tiroxină, N-metilarginină și n-acetilizină

Într-o variantă de realizare preferată, reziduul X de la poziția 89 este orice alt aminoacid care nu ar putea fi reticulat cu celălalt monomer al polipeptidei din invenție pentru a forma o pereche homodimerică.

Într-o variantă de realizare mai preferată a polipeptidei din invenție, reziduul de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este aminoacidul serină.

"Serină", așa cum este utilizată aici, se referă la acid 2-amino-3-hidroxiopropanoic codificat la om de codonii UCU, UCC, UCA, UCG, AGU și AGC. Termenul include, de asemenea, serine modificate, cum ar fi serine fosforilate sau sulfonate, cu titlu de exemplu ilustrativ nelimitativ, N-benzoil-(2R,3S)-3-fenilzoserină, D-cicloserină, L-izoserină, fenilserină,

Într-o variantă de realizare preferată, polipeptida din invenție cuprinde secvența arătată în SECV ID NR: 2.

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATA
YILSVQAEQTOKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSA (SECV ID NR: 2)

Într-o altă variantă de realizare preferată, polipeptida din invenție constă sau constă, în principal, din SECV ID NR: 4.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKAT
AYILSVQAEQTOKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSA (SECV ID NR: 4)

Într-o variantă de realizare mai preferată a polipeptidei din invenție, reziduul de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 este aminoacidul alanină.

"Alanină", așa cum este utilizat aici, se referă la acid 2-aminopropanoic codificat la om de codonii GCU, GCC, GCA și GCG. Termenul include, de asemenea, alanine modificate, cum ar fi N-acetil-L-alanină.

Într-o variantă de realizare preferată, polipeptida din invenție cuprinde secvența arătată în SECV ID NR: 63.

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATA
YILSVQAEQTOKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA (SECV ID NR: 63)

Într-o altă variantă de realizare preferată, polipeptida din invenție constă sau constă, în principal, din SECV ID NR: 64.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKAT
AYILSVQAEQTOKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA (SECV ID NR: 64)

Termenul "variantă echivalentă funcțional", atunci când se referă la SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, se referă la orice polipeptidă care rezultă din eliminarea, inserarea sau adăugarea unui sau mai multor aminoacizi în raport cu polipeptida din SECV ID NR: 1, sau care rezultă din modificarea chimică a polipeptidei din SECV ID NR: 1 și care păstrează activitatea supresoare tumorală a SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, de preferință, care păstrează activitatea de supresor tumoral a OmoCS. Persoana de specialitate va înțelege că păstrarea activității supresoare tumorale necesită ca varianta să se poată dimeriza cu Myc și/sau partenerul său obligatoriu p21/p22Max și să inhibe activitatea Myc odată găsită în nucleu, că este capabilă să se transloce prin membrana celulară, și că este capabilă să se transloce peste învelișul nuclear. În unele variante de realizare, varianta echivalentă funcțional a polipeptidei din invenție homodimerizează mai puțin decât Omomyc sau nu este forțată în homodimeri prin formarea punții disulfurice. În particular, formarea punții disulfurice în forma homodimer a polipeptidei din invenție este mai mică decât în polipeptida OmoMyc.

"Mai puțină homodimerizare", așa cum este utilizat aici, se referă la capacitatea mai scăzută de a forma obligatoriu homodimeri ai polipeptidei din invenție chiar și în condiții de reducere. Într-o variantă de realizare preferată, capacitatea este cu cel puțin 5%, cel puțin 10%, cel puțin 15%, cel puțin 20%, cel puțin 25%, cel puțin 30%, cel puțin 35%, cel puțin 40%, cel puțin 45%, cel puțin 50%, cel puțin 55%, cel puțin 60%, cel puțin 65%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95% mai mică decât capacitatea de a forma homodimeri ai Omomyc. Condiții de reducere, așa cum este utilizat aici, se referă la prezența unui agent reducător, un compus care donează un electron unei alte specii chimice într-o reacție chimică redox. Exemple ilustrative, nelimitative de agenți reducători sunt DTT (ditiotreititol), b-mercaptoetanol sau TCEP (tris(2-carboxietil)fosfină). Este posibil ca cantitatea de homodimeri să fie aceeași *in vitro*, și ca diferența dintre

polipeptida din invenție și Omomyc să fie prezentă numai în celule în prezența partenerilor de heterodimerizare, în care absența disulfurii permite o formare potențial mai mare de heterodimeri.

Mai multe teste pot fi utilizate pentru a determina homodimerizarea unei peptide, cu titlu de exemplu ilustrativ, nelimitativ, prin denaturare termică monitorizată prin dicroism circular, astfel încât dimerizarea să poată fi detectată prin pliere și cuantificarea stabilității termice.

Variante echivalente funcțional adecvate includ polipeptide constând, în principal, din polipeptida din SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină.

În acest context, "constând, în principal, din" înseamnă că molecula specificată nu va conține nicio secvență suplimentară care ar modifica activitatea SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină.

Variante funcționale adecvate ale peptidei de țintire sunt cele care prezintă un grad de identitate în raport cu peptida cu SECV ID NR: 1 (de preferință OmoCS, SECV ID NR: 4) mai mare de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99%. Gradul de identitate între două polipeptide este determinat utilizând algoritmi și metode computerizate care sunt larg cunoscute pentru persoanele de specialitate în domeniu. Identitatea dintre două secvențe de aminoacizi este determinată, de preferință, prin utilizarea algoritmului BLASTP, așa cum a fost descris anterior [BLAST Manual, Altschul, S., și colab., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., și colab., J. Mol. Biol. 1990;215: 403-410]. Într-o variantă de realizare preferată, identitatea secvenței este determinată pe toată lungimea polipeptidei din SECV ID NR: 1 sau pe toată lungimea variantei sau a ambelor.

Variantele echivalente funcțional ale polipeptidei din invenție pot include, de asemenea, modificări post-tranlaționale, cum ar fi glicozilare, acetilare, izoprenilare, miristolare, procesare proteolitică etc.

Ca alternativă, variante funcționale adecvate ale peptidei de țintire sunt acelea în care una sau mai multe poziții din polipeptida din invenție conțin un aminoacid care este o substituție conservatoare a aminoacidului prezent în proteina menționată mai sus. „Substituții conservatoare de aminoacizi” rezultă din înlocuirea unui aminoacid cu altul având proprietăți structurale și/sau chimice similare. De exemplu, următoarele șase grupări conțin fiecare aminoacizi care sunt substituții conservatoare unul pentru celălalt: 1) Alanină (A), Serină (S), Treonină (T); 2) Acid aspartic (D), Acid glutamic (E); 3) Asparagină (N), Glutamină (Q); 4) Arginină (R), Lizină (K); 5) Isoleucină (I), Leucină (L), Metionină (M), Valină (V); și 6) fenilalanină (F), tirozină (Y), triptofan (W). Selectarea unor astfel de substituții conservatoare de aminoacizi este de competența unui specialist cu cunoștințe obișnuite în domeniu și este descrisă, de exemplu, de către Dordo și colab., (J. Mol. Biol. 1999, 217: 721-739) și Taylor și colab., (J. Theor. Biol., 1986, 119:205-218).

Într-o variantă de realizare preferată, întreaga secvență a variantei echivalente funcțional a SECV ID NR: 1 nu conține un aminoacid cisteină. Se va înțelege că variantele echivalente funcțional ale SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, care conține mutații la pozițiile corespondente mutațiilor E61T, E68I, R74Q și R75N găsite în Omomyc provin din c-Myc uman. Poziția în care mutațiile menționate trebuie să apară în varianta echivalentă funcțional poate fi determinată printr-o aliniere de mai multe secvențe a diferitelor secvențe Myc și este identificată prin alinierea acelor poziții corespondente pozițiilor 61, 68, 74 și 75 din secvența Omomyc provenită din c-Myc uman.

O aliniere de mai multe secvențe este o extensie a alinierii în perechi pentru a încorpora mai mult decât două secvențe simultan. Mai multe metode de aliniere aliniază toate secvențele dintr-un set dat de interogări. Un program preferat de aliniere de mai multe secvențe (și algoritmul său) este ClustalW, Clustal2W sau ClustalW XXL (vezi Thompson și colab. (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680). Odată ce secvențele de c-Myc de la diferite organisme și cele de variante sunt comparate (alinate), așa cum este descris aici, o persoană de specialitate în domeniu poate identifica cu ușurință pozițiile din fiecare dintre secvențe corespondente pozițiilor E61T, E68I, R74Q și R75N găsite în Omomyc, și le poate introduce în varianta cu SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, mutațiile corespondente mutațiilor E61T, E68I, R74Q și R75N găsite în Omomyc provin din c-Myc uman.

Teste adecvate pentru a determina dacă o polipeptidă poate fi considerată ca o variantă echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1, în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, includ, fără limitare:

- Teste care măsoară capacitatea polipeptidei de a forma complexe dimerice cu Max și Myc, cum ar fi testele bazate pe expresia unei gene reporter, așa cum este descris în Soucek și colab. (Oncogene, 1998, 17: 2463 - 2472), precum și PLA (testul de ligatură a proteinelor) sau Co-imunoprecipitarea.

- Teste care măsoară capacitatea polipeptidei de a se lega la situsul de recunoaștere Myc/Max din ADN (situsul CACGTG), cum ar fi testul de schimbare a mobilității electroforetice (EMSA) descris în Soucek și colab. (*de mai sus*).

- Teste care măsoară capacitatea de a reprima transactivarea indusă de Myc, cum ar fi testul bazat pe expresia unei gene reporter sub controlul situsurilor de legare la ADN specifice pentru Myc/Max, așa cum este descris de către Soucek și colab. (*de mai sus*).

- Teste bazate pe capacitatea produsului genetic sau a polipeptidei de a inhiba creșterea celulelor care exprimă myc oncogenă, așa cum este descris de către Soucek și colab. (*de mai sus*).

- Teste care măsoară capacitatea polipeptidei de a spori apoptoza indusă de myc, cum ar fi testele descrise de către Soucek și colab. (Oncogene, 1998: 17, 2463 - 2472). Mai mult, poate fi utilizat orice test cunoscut de obicei în domeniu pentru evaluarea apoptozei într-o celulă, cum ar fi colorarea Hoechst, colorarea cu iodură de propidiu (PI) sau cu anexină V, albastru tripan, desfacerea/fragmentarea AND-ului și TUNEL.

Într-o variantă de realizare preferată, o variantă echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină include acele secvențe care au una sau mai multe, de preferință, toate următoarele caracteristici: capacitatea de a dimeriza cu Myc și inhibarea activității sale, translocarea prin membrana celulară, translocarea în nucleu, incapacitatea de a forma homodimeri sau capacitatea redusă de a forma homodimeri în comparație cu cea a Omomyc, o viabilitate celulară într-un *test in vitro* așa cum este efectuat în Exemplul 1, mai mică decât cea cu Omomyc la o cantitate de ARNm de 12,5 nM care codifică polipeptida din invenție. Într-o variantă de realizare preferată, varianta echivalentă funcțional din invenție corespunde unei secvențe care mediază o viabilitate celulară într-un *test in vitro*, așa cum este efectuat în Exemplul 1, mai mică decât cea cu Omomyc la o cantitate de ARNm de 12,5 nM care codifică polipeptida din invenție.

Într-o variantă de realizare preferată, o polipeptidă este considerată o variantă echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, dacă prezintă o activitate în unul sau în mai multe dintre testele de mai sus care este cel puțin 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100% din activitatea SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină (de preferință, din activitatea OmoCS).

În plus, variantele echivalente funcțional ale SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sunt, de asemenea, capabile de a transduce celule după ce varianta intră în contact cu celula menționată.

Într-o variantă de realizare preferată, o polipeptidă este considerată o variantă echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, dacă este capabilă să transducă o celulă țintă cel puțin 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100% la fel de eficient ca SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină (de preferință, ca OmoCS, SECV ID NR: 4).

În plus, variantele echivalente funcțional ale SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sunt, de asemenea, capabile să se transloce în nucleul celulei tumorale țintă.

Într-o variantă de realizare preferată, o polipeptidă este considerată o variantă echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, dacă este capabilă să se transloce în nucleul celulei tumorale țintă cel puțin 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100% la fel de eficient ca SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină (de preferință, ca OmoCS, SECV ID NR: 4).

Teste adecvate pentru a determina dacă o polipeptidă este o variantă echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, în ceea ce privește capacitatea sa de a se transloca prin membrana celulară și către nucleu, includ marcarea dublă a unei celule cu un reactiv specific pentru polipeptidă și cu un colorant care marchează în mod specific nucleul celulei (cum ar fi DAPI sau colorantul Hoechst). Într-o variantă de realizare preferată, detectarea polipeptidei conform invenției este realizată prin microscopie confocală sau prin microscopie de fluorescență.

Polipeptida, conform invenției, din SECV ID NR: 1 conține, de asemenea, domeniul M2 al c-Myc, care are secvența RQRRNELKRSF (SECV ID NR: 55) (vezi, Dang și Lee, Mol. Cell. Biol., 1988, 8:4048-4054), și care corespunde unui semnal de localizare nucleară.

Într-o altă variantă de realizare preferată, varianta echivalentă funcțional a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, cuprinde secvența SECV ID NR: 55.

Termenul "semnal de localizare nucleară", așa cum este utilizat aici, se referă la o secvență de aminoacizi cu lungime de aproximativ 4-20 de reziduuri de aminoacizi, care servește la direcționarea

unei proteine către nucleu. De obicei, secvența de localizare nucleară este bogată în aminoacizi bazici și secvențe exemplificatoare sunt bine-cunoscute în domeniu (Gorlich D. (1998) EMBO 5.17:2721-7).

În unele variante de realizare, NLS este selectat din grupul constând din antigenul T mare SV40 NLS (PKKKRKV, SECV ID NR: 6); Nucleoplasmina NLS (KRPAATKKAGQAKKKK, SECV ID NR: 7); CBP80 NLS (RRRHSDENDGGQPHKRRK, SECV ID NR: 8); proteina HIV-I Rev NLS (RQARRRRRRRWE, SECV ID NR: 9); HTLV-I Rex (MPKTRRRPRRSQRKPPT, SECV ID NR: 10); hnRNP A NLS (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFKPRNQGGY, SECV ID NR: 11); rpL23a NLS (VHSHKKKKIRTSPFTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLDHY, SECV ID NR: 12). Într-o variantă de realizare a invenției, semnalul de localizare nucleară cuprinde motivul K (K/R) X (K/R) (SECV ID NR: 13).

În plus, variantele echivalente funcțional ale SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sunt, de asemenea, capabile să ajungă la nucleolele celulelor transduse după ce varianta intră în contact cu celula menționată. Se va înțelege că variantele echivalente funcțional ale SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, conțin NLS găsit în SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sau un alt NLS funcțional. Într-o altă variantă de realizare, polipeptida din invenție nu conține NLS nativ găsit în SECV ID NR: 1 și conține un alt NLS funcțional care înlocuiește NLS menționat găsit în SECV ID NR: 1 sau în orice altă parte a polipeptidei din invenție.

Conjugat al invenției

Într-un alt aspect, invenția se referă la un conjugat care cuprinde:

- a) polipeptida sau varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției și
- b) un fragment chimic care facilitează preluarea celulară a polipeptidei conform invenției sau a variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate conform invenției.

Termenul "conjugat", așa cum este utilizat aici, se referă la doi sau mai mulți compuși care sunt legați covalent împreună, astfel încât funcția fiecărui compus este păstrată în conjugat.

În variantele de realizare preferate, conjugatii conform invenției cuprind cel puțin 1, cel puțin 2, cel puțin 3, cel puțin 4, cel puțin 5, cel puțin 6, cel puțin 7, cel puțin 8, cel puțin 9, cel puțin 10 sau mai multe fragmente chimice care facilitează absorbția celulară a polipeptidei sau a variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate.

Într-o variantă de realizare, fragmentul chimic care facilitează absorbția celulară a polipeptidei este o lipidă sau un acid gras.

Un acid gras este, în general, o moleculă care cuprinde un lanț de carbon cu un fragment acid (de ex., acid carboxilic) la un capăt al lanțului. Lanțul de carbon al unui acid gras poate fi de orice lungime, totuși, este de preferat ca lungimea lanțului de carbon să fie de cel puțin 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai mulți atomi de carbon și orice interval care poate proveni din acestea. În anumite variante de realizare, lungimea lanțului de carbon este de la 4 până la 18 atomi de carbon în porțiunea de lanț a acidului gras. În anumite variante de realizare, lanțul de carbon de acid gras poate cuprinde un număr impar de atomi de carbon, totuși, în anumite variante de realizare poate fi preferat un număr par de atomi de carbon în lanț. Un acid gras care cuprinde doar legături simple în lanțul său de carbon se numește saturat, în timp ce un acid gras care cuprinde cel puțin o legătură dublă în lanțul său se numește nesaturat. Acidul gras poate fi ramificat, deși în variantele preferate de realizare a prezentei invenții, este neramificat. Acizii grași specifici includ, dar nu sunt limitați la, acid linoleic, acid oleic, acid palmitic, acid linolenic, acid stearic, acid lauric, acid miristic, acid arahidic, acid palmitoleic, acid arahidonic.

Într-o variantă de realizare preferată, fragmentul chimic care facilitează absorbția celulară a polipeptidei este o secvență de peptidă care pătrunde în celulă, caz în care, conjugatul este o proteină de fuziune care cuprinde o polipeptidă conform invenției sau varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate și secvența de peptidă care pătrunde în celulă.

Termenul "proteină de fuziune" se referă la proteine generate prin tehnologia genelor care constau din două sau mai multe domenii funcționale provenite din proteine diferite. O proteină de fuziune poate fi obținută prin mijloace convenționale, de exemplu, cu ajutorul expresiei genei a secvenței de nucleotide care codifică proteina de fuziune menționată într-o celulă adecvată. Se va înțelege că peptida care pătrunde în celulă se referă la o peptidă care pătrunde în celulă, care este diferită de peptida care pătrunde în celulă care face parte din polipeptida din SECV ID NR: 1 sau din varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate.

Termenul "secvență de peptidă care pătrunde în celulă" este utilizat în prezenta specificație în mod interschimbabil cu "CPP", "domeniu de transducere a proteinei" sau "PTD". Acesta se referă la un lanț peptidic de lungime variabilă care direcționează transportul unei proteine în interiorul unei celule.

Procesul de livrare în celulă are loc, în mod obișnuit, prin endocitoză, dar peptida poate fi de asemenea internalizată în celulă prin translocare directă a membranei. CPP-urile au, de obicei, o compoziție de aminoacizi care, fie conține o abundență relativă mare de aminoacizi încărcăți pozitiv, cum ar fi lizină sau arginină, fie au secvențe care conțin un model alternant de aminoacizi polar/încărcat și aminoacizi nepolari, hidrofobi. Exemple de CPP-uri care pot fi utilizate în prezenta invenție includ, fără limitare, CPP-ul găsit în proteină de *Drosophila antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK; SECV ID NR:14), CPP-ul găsit în proteina de legare la ADN-ul VP22 de herpesvirus simplex 1 (HSV-1) (DAATATRGRSAASRPTRPRAPARSASRP RPVE; SECV ID NR: 15), CPP al Bac-7 (RRIRPRPPRLPRPRPLPFPRPG; SECV ID NR: 16), CPP-urile proteinei HIV-1 TAT constând din aminoacizii 49-57 (RKRRRQRRR; SECV ID NR: 17), aminoacizi 48-60 (GRKKRRQRRRTPQ; SECV ID NR: 18), aminoacizi 47- 57 (YGRKKRRQRRR; SECV ID NR: 19), CPP-ul peptidei S413-PV (ALWKTLLKKVLKAPKKRKV; SECV ID NR: 20), CPP-ul penetratinei (RQIKWFWQNRRMKWKK; SECV ID NR: 21), CPP al SynB 1 ((RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SECV ID NR: 22), CPP-ul lui SynB3 (RRLSYSRRRF; SECV ID NR:23), CPP-ul lui PTD-4 (PIRRRKLLRLK; SECV ID NR: 24), CPP-ul lui PTD-5 (RRQRRTSKLMKR; SECV ID NR: 25), CPP-ul stratului FHV-(35-49) (RRRRNRTRNRNRVR; SECV ID NR: 26), CPP-ul lui BMV Gag-(7-25) (KMTRAQRRAAARNRWTAR; SECV ID NR: 27), CPP-ul lui HTLV -II Rex-(4-16) (TRRQRTRRRNR; SECV ID NR:28), CPP al D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SECV ID NR:29), CPP-ul lui R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SECV ID NR: 30), CPP-ul lui MAP (KLALKLALKLALALKLA; SECV ID NR: 31), CPP-ul lui SBP (MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKRKV; SECV ID NR: 32), CPP-ul lui FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKV; SECV ID NR:33); CPP-ul lui MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV-cya; SECV ID NR: 34), CPP-ul lui MPG(ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQP KSKRKV-cya; SECV ID NR: 35), CPP-ul lui Pep-1 (ac-KETWWETWWTEWSQPKKRKV-cya; SECV ID NR: 36), CPP-ul lui Pep-2 (ac-KETWFETWTEWSQPKKRKV-cya; SECV ID NR: 37), o secvență de poliarginină având structura R_N (în care N este între 4 și 17), secvența GRKKRRQRRR (SECV ID NR: 38), secvența RRRRRRLR (SECV ID NR: 39), secvența RRQRRTSKLMKR (SECV ID NR: 40); Transportan GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SECV ID NR: 41); KALAWAEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKEA (SECV ID NR: 42); RQIKIWFQNRRMKWKK (SECV ID NR: 43), secvența YGRKKRRQRRR (SECV ID NR: 44); secvența RKRRRQRR (SECV ID NR: 45); secvența YARAAARQARA (SECV ID NR: 46); secvența THRLPRRRRR (SECV ID NR: 47); secvența GGRRARRRRR (SECV ID NR: 48).

Într-o variantă de realizare preferată, peptida menționată care pătrunde în celulă nu este cea endogenă conținută în SECV ID NR: 1.

Într-o variantă de realizare preferată, CPP-ul este CPP-ul proteinei TAT HIV-1 constând din aminoacizii 49-57 (RKRRRQRRR, SECV ID NR: 49). Într-o altă variantă de realizare preferată, CPP-ul este secvența GRKKRRQRRR (SECV ID NR: 50) sau RRRRRRRR (SECV ID NR: 51).

Într-o variantă de realizare, secvența de peptidă care pătrunde în celulă este fuzionată la capătul N-terminal al polipeptidei conform invenției sau al variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate. Într-o altă variantă de realizare, peptida care pătrunde în celulă este fuzionată la capătul C-terminal al polipeptidei conform invenției sau al variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate.

În variante de realizare preferate, conjugatele sau proteinele de fuziune conform invenției cuprind, în plus față de propria peptidă care pătrunde în celulă găsită în polipeptida cu SECV ID NR: 1 sau în varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate, cel puțin 1, cel puțin 2, cel puțin 3, cel puțin 4, cel puțin 5, cel puțin 6, cel puțin 7, cel puțin 8, cel puțin 9, cel puțin 10 sau mai multe peptide suplimentare care pătrund în celulă.

Proteine de fuziune din invenție adecvate includ polipeptidele OmoCS*TAT și OmoCS*LZArg, așa cum este definit mai jos:

Denumire	SECV ID NR:	Secvență
OmoCS*TAT	52	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAEQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNS S AGRKRRRQRR
OmoCS*LZArg	53	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAEQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNS S ARRRRRRR

Într-o altă variantă de realizare preferată, conjugatele sau proteinele de fuziune din invenție cuprind polipeptida din invenție sau o variantă echivalentă funcțional a acesteia și cuprind, în pus, un semnal de localizare nucleară de capăt N-terminal sau C-terminal.

Persoana de specialitate va înțelege că poate fi de dorit ca proteina de fuziune să cuprindă în plus una sau mai multe peptide flexibile care conectează polipeptida din invenție sau varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate, secvența de peptidă care pătrunde în celulă, și/sau NLS. Astfel, într-o variantă particulară de realizare, polipeptida din invenție este conectată în mod direct la secvența de peptidă care pătrunde în celulă. Într-o altă variantă particulară de realizare, polipeptida din invenție este conectată la secvența de peptidă care pătrunde în celulă printr-o peptidă flexibilă. Într-o variantă de realizare, polipeptida din invenție este conectată în mod direct la NLS. Într-o altă variantă de realizare, polipeptida din invenție este conectată la NLS printr-o peptidă flexibilă.

Într-o variantă particulară de realizare, polipeptida din invenție este conectată în mod direct la secvența de peptidă care pătrunde în celulă și la NLS.

Într-o variantă de realizare, NLS-ul este unul dintre NLS-ul care apare endogen în secvența de Myc, cum ar fi peptida M1 (PAAKRVKLD, SECV ID NR: 54) sau peptida M2 (RQRRNELKRSF, SECV ID NR: 55).

Într-o altă variantă de realizare, NLS-ul suplimentar se referă la un NLS care este diferit de NLS-ul endogen găsit în polipeptida cu SECV ID NR: 1 sau în varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate.

În variante de realizare preferate, conjugatele sau proteinele de fuziune conform invenției cuprind, în plus față de NLS-ul endogen găsit în polipeptida din invenție sau în varianta echivalentă funcțional a acesteia, cel puțin 1, cel puțin 2, cel puțin 3, cel puțin 4, cel puțin 5, cel puțin 6, cel puțin 7, cel puțin 8, cel puțin 9, cel puțin 10 NLS.

Într-o altă variantă particulară de realizare, polipeptida din invenție este conectată la secvența de peptidă care pătrunde în celulă printr-un prim linker peptidic flexibil, și la NLS printr-un al doilea linker peptidic flexibil.

Așa cum este utilizat aici, termenul „peptidă flexibilă”, „peptidă distanțier” sau „peptidă de legătură” se referă la o peptidă care leagă covalent două proteine sau fragmente, dar care nu face parte din niciuna dintre polipeptide, permițând mișcarea uneia față de cealaltă, fără a provoca un efect dăunător substanțial asupra funcției, fie a proteinei, fie a fragmentului. Astfel, linkerul flexibil nu afectează activitatea supresoare tumorală a secvenței polipeptidice, activitatea care pătrunde în celulă a peptidei care pătrunde în celulă sau capacitatea de localizare nucleară a NLS.

Peptida flexibilă cuprinde cel puțin un aminoacid, cel puțin doi aminoacizi, cel puțin trei aminoacizi, cel puțin patru aminoacizi, cel puțin cinci aminoacizi, cel puțin șase aminoacizi, cel puțin șapte aminoacizi, cel puțin opt aminoacizi, cel puțin nouă aminoacizi, cel puțin 10 aminoacizi, cel puțin 12 aminoacizi, cel puțin 14 aminoacizi, cel puțin 16 aminoacizi, cel puțin 18 aminoacizi, cel puțin 20 aminoacizi, cel puțin 25 aminoacizi, cel puțin 30 de aminoacizi, cel puțin 35 de aminoacizi, cel puțin 40 de aminoacizi, cel puțin 45 de aminoacizi, cel puțin 50 de aminoacizi, cel puțin 60 de aminoacizi, cel puțin 70 de aminoacizi, cel puțin 80 de aminoacizi, cel puțin 90 de aminoacizi sau aproximativ 100 de aminoacizi. În unele variante de realizare, peptida flexibilă va permite mișcarea unei proteine în raport cu cealaltă pentru a crește solubilitatea proteinei și/sau pentru a-și îmbunătăți activitatea. Regiuni linker adecvate includ o regiune poli-glicină, secvența GPRRRR (SECV ID NR: 56) a combinațiilor de reziduuri de glicină, prolină și alanină.

În unele variante de realizare, proteina de fuziune din invenție poate cuprinde un fragment chimic suplimentar care include, printre altele, grupări de fluorescență, biotină, polietilenglicol (PEG), analogi de aminoacizi, aminoacizi nenaturali, grupări fosfat, grupări glicozil, etichete radioizotopice și molecule farmaceutice. În alte variante de realizare, polipeptida heterologă poate cuprinde una sau mai multe grupări reactive chimic incluzând, printre altele, cetonă, aldehydă, reziduuri Cys și reziduuri Lys.

Într-o variantă particulară de realizare, conjugatele sau proteinele de fuziune din invenție cuprind o etichetă legată de conjugat sau de domeniul C-terminal sau N-terminal al proteinei de fuziune menționate sau al variantei de polipeptidă menționată. Eticheta menționată este, în general, o secvență de peptidă sau de aminoacizi care poate fi utilizată în izolarea sau purificarea proteinei de fuziune menționate. Astfel, eticheta menționată este capabilă să se lege la unu sau mai mulți liganzi, de exemplu, unu sau mai mulți liganzi ai unei matrice de afinitate, cum ar fi un suport de cromatografie sau granulă cu afinitate mare. Un exemplu de etichetă menționată este o etichetă de histidină (His-tag sau HT), cum ar fi o etichetă care cuprinde 6 reziduuri de histidină (His6 sau H6), care se poate lega cu afinitate mare la o coloană de nichel (Ni²⁺) sau de cobalt (Co²⁺). Eticheta His are caracteristica dorită, că își poate lega liganzii în condiții care denaturază majoritatea proteinelor și perturbă majoritatea interacțiunilor

proteină-proteină. Astfel, poate fi utilizată pentru a elimina proteina de momeală marcată cu H6 în urma întreruperii interacțiunilor proteină-proteină cu care a participat momeala.

Exemple suplimentare ilustrative, nelimitative, de etichete utile pentru izolarea sau purificarea unei proteine de fuziune includ Arg-tag, FLAG-tag (DYKDDDDK; SECV ID NR: 57), Strep-tag (WSHPQFEK; SECV ID NR: 58), un epitop capabil să fie recunoscut de către un anticorp, cum ar fi eticheta c-myc (recunoscută de un anticorp anti-c-myc), eticheta HA (YPYDVPDYA; SECV ID NR: 59), eticheta V5 (GKPIPNPLLGLDST; SECV ID NR: 60), eticheta SBP, eticheta S, peptida de legare a calmodulină, domeniul de legare a celulozei, domeniul de legare a chitinei, eticheta glutatión S-transferază, proteina de legare a maltozei, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag etc. (Terpe K., *Apl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 60:523-525), o secvență de aminoacizi cum ar fi AHGHRP (SECV ID NR: 61) sau PIHDHDPHPLVIHSGMTCXXC (SECV ID NR: 62), β -galactozidază.

Eticheta poate fi utilizată, dacă se dorește, pentru izolarea sau purificarea proteinei de fuziune menționate.

Polinucleotidă, vector și celulă gazdă ale invenției

Într-un alt aspect, invenția se referă la o polinucleotidă care codifică o polipeptidă conform invenției sau un conjugat conform invenției.

Termenii "polinucleotidă", "acid nucleic" și "moleculă de acid nucleic" sunt utilizați interschimbabil pentru a se referi la forme polimerice de nucleotide de orice lungime. Polinucleotidele pot conține dezoxiribonucleotide, ribonucleotide și/sau analogi ai acestora. Nucleotidele pot avea orice structură tridimensională și pot îndeplini orice funcție, cunoscută sau necunoscută. Termenul "polinucleotidă" include, de exemplu, molecule monocatenare, dublu catenare și triplu elicoidale, o genă sau un fragment de genă, exoni, introni, ARNm, ARNt, ARNr, ribozime, ADNc, polinucleotide recombinante, polinucleotide ramificate, plasmide, vectori, ADN izolat din orice secvență, ARN izolat din orice secvență, sonde de acid nucleic și primeri. Pe lângă o moleculă de acid nucleic nativ, o moleculă de acid nucleic din prezenta invenție poate cuprinde, de asemenea, molecule de acid nucleic modificate. Așa cum este utilizat aici, ARNm se referă la un ARN care poate fi translatat într-o celulă.

În varianta de realizare preferată, polinucleotida din invenție este un ARNm. ARNm poate fi sintetizat chimic, poate fi obținut cu ajutorul transcrierii *in vitro* sau poate fi sintetizat *in vivo* în celula țintă. Secvențele de nucleotidă care formează polinucleotida care codifică proteina conjugată sau de fuziune conform invenției sunt în același cadru de citire corect pentru exprimarea acestora.

Într-un alt aspect, invenția se referă la un vector care cuprinde o polinucleotidă din invenție.

Termenul "vector", așa cum este utilizat aici, se referă la o secvență de acid nucleic care cuprinde secvențele necesare astfel încât, după transcrierea și translatarea secvențelor menționate într-o celulă, să fie generată o polipeptidă codificată de polinucleotida din invenție. Secvența menționată este legată operațional de segmente suplimentare care asigură replicarea sa autonomă într-o celulă gazdă de interes. De preferință, vectorul este un vector de expresie, care este definit ca un vector care, în plus față de regiunile de replicare autonomă într-o celulă gazdă, conține regiuni legate operabil la acidul nucleic din invenție și care sunt capabile să îmbunătățească expresia produselor acidului nucleic conform invenției. Vectorii din invenție pot fi obținuți cu ajutorul tehnicilor larg cunoscute în domeniu.

Exemple de vectori includ, dar nu se limitează la, vectori virali, vectori de expresie a ADN sau ARN gol, vectori plasmidă, cosmidă sau fagi, vectori de expresie a ADN sau ARN asociați cu agenți de condensare cationici, vectori de expresie a ADN sau ARN încapsulați în lipozomi, și anumite celule eucariote, cum ar fi celulele producătoare. Vectori adecvați care cuprind o polinucleotidă din invenție sunt vectori proveniți din vectori de expresie în procariote, cum ar fi pUC18, pUC19, pBluescript și derivații acestora, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCRL, RP4, fagi și vectori „de transport”, cum ar fi pSA3 și pAT28, vectori de expresie în drojdii, cum ar fi vectori de tip plasmidă de 2 microni, plasmide de integrare, vectori YEP, plasmide centromerice și similare, vectori de expresie în celule de insectă, cum ar fi vectorii din seria pAC și din seria pVL, vectorii de expresie în plante, cum ar fi vectori din seria pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE și vectori similari și de expresie în celule eucariote superioare pe baza vectorilor virali (adenovirus, virus asociat adenovirusului, precum și retrovirusului și, în particular, lentivirus), precum și vectori neviralii, cum ar fi pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d și pTDT1. Într-o variantă de realizare preferată, polinucleotida conform invenției este cuprinsă într-un vector selectat din grupul constând din vectori retrovirali pEGFP sau pBabe și vectori lentivirali pTRIPZ sau pSLIK.

Vectorul din invenție poate fi utilizat pentru a transforma, transfecta sau infecta celulele care pot fi transformate, transfectate sau infectate de către vectorul menționat. Aceste celule pot fi procariote sau eucariote.

Vectorul cuprinde, de preferință, polinucleotida din invenție legată operațional la secvențe care reglează expresia polinucleotidei din invenție. Secvențele de reglare pentru utilizare în prezenta invenție pot fi promotori nucleari sau, ca alternativă, secvențe amplificatoare și/sau alte secvențe de reglare care măresc expresia secvenței heterologe de acid nucleic. În principiu, orice promotor poate fi utilizat în prezenta invenție cu condiția ca promotorul menționat să fie compatibil cu celulele în care polinucleotida urmează să fie exprimată. Astfel, promotori adecvați pentru realizarea prezentei invenții includ, dar nu sunt neapărat limitați la, promotori constitutivi, cum ar fi derivați ai genomului virusului eucariotic, cum ar fi virusul poliomului, adenovirusul, SV40, CMV, virusul sarcomului aviar, virusul hepatitei B, promotorul genei metalotioneinei, promotorul genei timidin kinază a virusului herpes simplex, regiunile LTR ale retrovirusurilor, promotorul genei imunoglobulinei, promotorul genei actinei, promotorul genei EF-1alfa, precum și promotorii inductibili în care expresia proteinei depinde de adăugarea unei molecule sau a unui semnal exogen, cum ar fi sistemele de tetraciclină, sistemul NFκB/lumină UV, sistemul Cre/Lox și promotorul genelor de șoc termic, promotorii reglabili ai ARN polimerazei II descriși în WO/2006/135436, și promotori specifici țesuturilor.

Într-un alt aspect, invenția se referă la o celulă gazdă care cuprinde o polipeptidă din invenție, un conjugat din invenție, o polinucleotidă din invenție sau un vector din invenție.

Celule adecvate în prezenta invenție includ, dar nu se limitează la, celule de mamifer, plantă, insectă, fungice și bacteriene. Celulele bacteriene includ, dar nu se limitează la, celule de la bacterii Gram-pozitive, cum ar fi speciile din genurile *Bacil*, *Streptomyces* și *Stafilococ*, și celule de la bacterii Gram-negative, cum ar fi celule din genuri *Escherichia* și *Pseudomonas*. Celulele fungice includ, de preferință, celule de drojdie cum ar fi *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* și *Hansenula polymorpha*. Celulele de insecte includ, dar nu se limitează la, celule *Drosophila* și celule Sf9. Celulele vegetale includ, printre altele, celule vegetale de cultură, cum ar fi cereale, plante medicinale sau ornamentale sau din bulbi. Celulele de mamifer adecvate pentru prezenta invenție includ linii celulare epiteliale (porcine etc.), linii celulare de osteosarcom (umane, etc.), linii celulare de neuroblastom (umane, etc.), carcinoame epiteliale (umane, etc.), celule gliale (murine etc.), linii celulare hepatice (de la maimuță etc.), celule CHO (Ovar de hamster chinezesc), celule COS, celule BHK, celule HeLa, 911, AT1080, A549, 293 sau PER.C6, celule umane NTERA-2 ECC, celule D3 din linia mESC, celule stem embrionare non-umane, celule NIH3T3, 293T, REH și MCF-7 și celule hMSC.

Toți termenii și variantele de realizare descrise anterior sunt aplicabile în mod egal acestui aspect al invenției.

Compoziție farmaceutică din invenție

Într-un alt aspect, invenția se referă la o compoziție farmaceutică care cuprinde o cantitate eficientă farmaceutic de o polipeptidă sau de o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției, la un conjugat conform invenției, la o polinucleotidă conform invenției, la un vector conform invenției, sau la o celulă gazdă conform invenției, și un excipient acceptabil farmaceutic.

Așa cum este utilizat în prezenta invenție, expresia „compoziție farmaceutică” se referă la o formulare care a fost adaptată pentru administrare a unei doze determinate de unu sau mai mulți agenți terapeutici utili, la o celulă, la un grup de celule, la un organ, la un țesut, sau la un animal în care diviziunea celulară este necontrolată, cum ar fi cancer.

Expresia "cantitate eficientă farmaceutic", așa cum este utilizat aici, este înțeleasă ca o cantitate capabilă să furnizeze un efect terapeutic și care poate fi determinată de persoana de specialitate în domeniu prin mijloace utilizate în mod obișnuit. Cantitatea de polipeptidă din invenție sau de variantă echivalentă funcțional a acesteia, de conjugat, de polinucleotidă, de vector sau de celulă gazdă din invenție, sau de compus antitumoral care poate fi combinată în compozițiile farmaceutice conform invenției va varia în funcție de subiect și de modul particular de administrare. Persoanele de specialitate în domeniu vor aprecia că dozele pot fi, de asemenea, determinate cu îndrumări din Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ediția a IX-a (1996), Anexa II, pp. 1707-1711 și din Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ediția a zecea (2001), Anexa II, pp. 475-493.

Doza adecvată de principiu sau de principii active din compoziția farmaceutică va depinde de tipul de cancer care urmează să fie tratat, de severitatea și evoluția bolii, de faptul că compoziția este administrată în scop preventiv sau terapeutic, de terapia anterioară, de istoricul clinic și răspunsul la peptidă sau polipeptidă ale pacientului, și de decizia medicului curant. Cantitatea de polipeptidă din invenție sau de variantă echivalentă funcțional a acesteia, de conjugat, de polinucleotidă, de vector sau

de celulă gazdă din invenție este administrată în mod adecvat pacientului la un moment dat sau pe parcursul unei serii de tratamente. În funcție de tipul și severitatea bolii, un nivel de doză adecvat va fi, în general, de aproximativ 0,01 până la 500 mg la fiecare kg de greutate corporală a pacientului pe zi, care pot fi administrate în doze unice sau multiple. De preferință, nivelul de doză va fi de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 250 mg/kg pe zi; mai preferat, aproximativ 0,5 până la aproximativ 100 mg/kg pe zi. Un nivel de doză adecvat poate fi de aproximativ 0,01 până la 250 mg/kg pe zi, aproximativ 0,05 până la 100 mg/kg pe zi sau aproximativ 0,1 până la 50 mg/kg pe zi. În acest interval, doza poate fi de la 0,05 până la 0,5, de la 0,5 până la 5 sau de la 5 până la 50 mg/kg pe zi. Pentru administrare orală, compozițiile sunt furnizate, de preferință, sub formă de tablete care conțin 1,0 până la 1000 miligrame de ingredient activ, în special, 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 și 1000,0 miligrame de ingredient activ pentru ajustarea simptomatică a dozei la pacientul care urmează să fie tratat. Compușii pot fi administrați într-un regim de 1 până la de 4 ori pe zi, de preferință, o dată sau de două ori pe zi.

Compozițiile farmaceutice din invenție conțin, de asemenea, unu sau mai mulți excipienți suplimentari acceptabili farmaceutic. Prin „excipient acceptabil farmaceutic” se înțelege o substanță inactivă terapeutic despre care se spune că este utilizată pentru încorporarea ingredientului activ și care este acceptabilă pentru pacient din punct de vedere farmacologic/toxicologic și, pentru chimistul farmaceutic care o produce, din punct de vedere fizico/chimic, în raport cu compoziția, formularea, stabilitatea, acceptarea de către pacient și cu biodisponibilitatea. Excipientul sau purtătorul include, de asemenea, orice substanță care servește la îmbunătățirea eliberării și a eficacității principiului activ în compoziția farmaceutică. Exemple de purtători acceptabili farmaceutic includ unul sau mai mulți dintre apă, soluție salină, soluție salină tamponată cu fosfat, dextroză, glicerol și etanol, precum și combinații ale acestora. În multe cazuri, va fi de preferat să se includă în compoziție agenți izotonici, de exemplu, zaharuri, polialcoolii cum ar fi manitol, sorbitol sau clorură de sodiu. Purtătorii acceptabili farmaceutic pot cuprinde în plus cantități minore de substanțe auxiliare, cum ar fi agenți de umectare sau emulsionare, conservanți sau tampon, care sporesc durata de valabilitate sau eficacitatea proteinei de fuziune sau a compozițiilor care fac parte din compozițiile farmaceutice. Exemple de purtători corespunzători sunt bine cunoscute în literatură (vezi de exemplu Remington's Pharmaceutical Sciences, ediția a 19-a, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Exemple de purtători, fără limitare, sunt o serie de zaharide, cum ar fi lactoză, dextroză, zaharoză, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol și maltitol; o serie de amidon, cum ar fi amidon de porumb, amidon de grâu, amidon de orez și amidon de cartof; o serie de celuloză, cum ar fi celuloză, metil celuloză, carboxi metil celuloză de sodiu și hidroxil propilmetil celuloză; și o serie de materiale de umplutură, cum ar fi gelatină și polivinil pirolidonă. În unele cazuri, se poate adăuga un agent de dezintegrare, cum ar fi polivinil pirolidonă reticulată, agar, acid alginic sau alginat de sodiu.

Numărul și natura excipienților acceptabili farmaceutic depind de forma de doză dorită. Excipienții acceptabili farmaceutic sunt cunoscuți de către persoana de specialitate în domeniu (Fauly y Trillo C. (1993) „Tratado de Farmacia Galénica”, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Compozițiile menționate pot fi preparate cu ajutorul metodelor convenționale cunoscute în stadiul tehnicii („Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, ediția a 20-a (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, US).

Pentru compoziții farmaceutice care cuprind un agent care este o moleculă de acid nucleic, molecula de acid nucleic poate fi prezentă în oricare dintre o varietate de sisteme de eliberare cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu, incluzând acid nucleic și sisteme de expresie bacteriene, virale și de mamifer, cum ar fi, de exemplu, constructe de expresie recombinante, așa cum este furnizat aici. Tehnicile de încorporare a ADN-ului în astfel de sisteme de expresie sunt bine cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu. ADN-ul poate fi, de asemenea, „nud”, așa cum este descris, de exemplu, în Ulmer și colab., Science 259:1745-49, 1993 și revizuit de Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. Absorbția ADN-ului nu poate fi crescută prin acoperirea ADN-ului pe granule biodegradabile, care sunt transportate eficient în celule.

Moleculele de acid nucleic pot fi livrate într-o celulă în conformitate cu oricare dintre mai multe metode descrise în domeniu (vezi, de ex., Akhtar și colab., Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisens Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer și colab., Mol. Membr. Biol. 16:129-40 (1999); Hofland și Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-92 (1999); Lee și colab., ACS Symp. Ser. 752:184-92 (2000); brevetul U.S. Nr. 6,395,713; Publicația cererii internaționale de brevet nr. WO 94/02595; Selbo și colab., Int. J. Cancer 87:853-59 (2000); Selbo și colab., Tumor Biol. 23:103-12 (2002); publicațiile cererilor de brevet U.S. numerele 2001/0007666, și 2003/077829). Astfel de metode de livrare cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu includ, dar nu se limitează la, încapsularea în lipozomi, prin iontoforeză sau prin încorporare în alte vehicule, cum

ar fi polimeri biodegradabili; hidrogeluri; ciclodextrine (vezi, de ex., Gonzalez și colab., Bioconjug. Chem. 10: 1068-74 (1999); Wang și colab., publicațiile cererilor internaționale numerele WO 03/47518 și WO 03/46185); microsfere de acid poli(lactic-co-glicolic) (PLGA) și PLCA (utile, de asemenea, pentru livrarea de peptide și polipeptide și alte substanțe) (vezi, de ex., brevetul U.S. Nr. 6,447,796; publicația cererii de brevet U.S. Nr. 2002/130430); nanocapsule biodegradabile; și microsfere bioadezive, sau prin vectori proteici (Publicația cererii internaționale nr. WO 00/53722). Într-o altă variantă de realizare, moleculele de acid nucleic pentru utilizare în modificarea (suprimarea sau creșterea) unui răspuns imunitar într-o celulă imună și pentru tratarea unei boli sau tulburări imunologice pot fi, de asemenea, formulate sau complexate cu polietilenimină și derivați ai acesteia, cum ar fi derivați de polietilenimină-polietilenglicol-N-acetilgalactozamină (PEI-PEG-GAL) sau de polietilenimină-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactozamină (PEI-PEG-triGAL) (vezi, de asemenea, de ex., publicația cererii de brevet U.S. Nr. 2003/0077829).

Într-o variantă de realizare preferată, compoziția farmaceutică sau combinația farmaceutică conform invenției cuprinde, în plus, împreună sau separat, un agent antitumoral.

Așa cum este utilizat aici, "agent antitumoral" este înțeles ca compusul biologic sau chimic menționat care tratează tumorile sau previne formarea acestora. Într-o variantă de realizare preferată, agentul antitumoral menționat este selectat din grupul constând din un agent citotoxic, un agent antiangiogenic, un agent antimetastatic și un agent antiproliferativ.

Așa cum este utilizat în prezenta invenție, termenul "agent citotoxic" se referă la un agent care este capabil să promoveze moartea celulelor și care are capacitatea de a reduce creșterea, de a opri creșterea sau de a distruge celulele și, în special, celulele cu proliferare rapidă și încă în mod deosebit, celulele tumorale. Moartea celulară poate fi cauzată de orice mecanism, cum ar fi, de exemplu, apoptoza, deși nu se limitează la această cauză, prin inhibarea metabolismului, interferența cu organizarea citoscheletului, sau modificarea chimică a ADN-ului. Termenul agent citotoxic cuprinde orice agent de chimioterapie, incluzând molecule organice mici, peptide, oligonucleotide; toxine; enzime; citokine; radioizotopi sau agenți de radioterapie.

"Agent antiangiogenic" este înțeles ca o substanță chimică sau biologică care inhibă sau reduce formarea de noi vase de sânge, adică angiogeneza.

Agenți antiangiogenici care pot fi utilizați cu polipeptida conform primului aspect al invenției, sau cu proteina de fuziune conform celui de-al doilea aspect al invenției, includ, fără limitare, un agent antiangiogenic selectat din grupul de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, acid dextrometorfan acetic, acid dimetilxantenon acetic, endostatină, IM-862, marimastat, penicilamină, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactat de squalamină, SU5416, talidomidă, combretastatină, tamoxifen, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticorpi anti-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleukin 12, IM862, amiloridă, angiostatină, K1-3 angiostatină, K1-5 angiostatină, Captopril, DL-alfa-difluorometilornitină, DL-alfa-difluorometilornitină HCl, endostatină, fumagilină, erbimicină A, 4-hidroxifenilretinamidă, juglonă, laminină, laminină hexapeptidă, laminină pentapeptidă, lavendustin A, medroxiprogesteron, minociclină, inhibitor de ribonuclează a placentei, suramin, trombospondin, anticorpi direcționați împotriva factorilor proangiogenici (de exemplu, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibitori de tirozin kinază cu greutate moleculară mică ai factorilor de creștere proangiogenici (de exemplu, Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inhibitori de mTOR (de exemplu, Torisel); interferon alfa, beta și gamma, IL-12, inhibitori ai metaloproteinazei matriceale (de ex., COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU1248, vitaxin; inhibitori de PDGFR (de exemplu, Gleevec); NM3 și 2-ME2; ciclopeptide, cum ar fi cilengitidă.

"Agent antimetastatic" este înțeles ca o substanță chimică sau biologică care inhibă sau reduce metastazele, adică propagarea la distanță, în mod fundamental prin fluxul limfatic sau sanguin, a celulelor cauzatoare de cancer și a creșterii de noi tumori în situsurile de destinație a metastazelor menționate.

"Agent antiproliferativ" este înțeles ca o substanță chimică sau biologică care este capabilă să prevină sau să inhibe formarea sau creșterea tumorilor. Agenți antiproliferativi includ, dar nu se limitează la (i) antimetaboliți, cum ar fi antimetaboliți ai acidului folic (aminopterina, denopterina, metotrexat, edatrexat, trimetrexat, nolatrexat, lometrexol, pemetrexat, raltitrexat, piritrexim, pteropterin, leucovorin, 10-propargil-5,8-dideazafolat (PDDF, CB3717)), analogi de purină (cladribină, clofarabină, fludarabină, mercaptopurină, pentostatina, tioguanină) și analogi de pirimidină (capecitabină, citarabină sau ara-C, decitabină, fluorouracil, 5-fluorouracil, doxifluridină, floxuridină și gemcitabină) (ii) produse naturale, cum ar fi antibiotice antitumorale și inhibitori mitotici, cum ar fi alcaloizi vinca, cum ar fi vindesină, vincristină, vinblastină, vinorelbină; taxani, cum ar fi paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™); colchicină (NSC 757), tiocolchicină (NSC 361792), derivați de colchicină (de ex., NSC 33410), și alocolchicină (NSC 406042); halicondrină B (NSC 609395);

dolastatină 10 (NSC 376128); maitansină (NSC 153858); rizoxină (NSC 332598); epotilonă A, epotilonă B; discodermolid; estramustină; nocodazol; (iii) hormoni și antagoniști ai acestora, cum ar fi tamoxifen, toremifen, anastrozol, arzoxifen, lasofoxifen, raloxifen, nafoxidină, fulvestrant, aminoglutetimidă, testolactonă, atamestan, exemestan, fadrozol, formestan, letrozol, goserelin, leuporelin sau leuprolidă, buserelin, histrelin, megestrol și fluoximesteron; (iv) agenți biologici, cum ar fi vectori virali, interferon alfa și interleukine; (v) compuși pe bază de platină, cum ar fi carboplatină, cisplatină [cis-diaminedicloroplatină, (CDDP)], oxaliplatină, iproplatină, nedaplatină, tetranitrat de triplatină, tetraplatină, satraplatină (JM216), JM118 [cis aminodicloro (II)], JM149 [cis aminodicloro (ciclohexilamină) trans dihidroxo platină (IV)], JM335 [trans aminodicloro dihidroxo platină (IV)], transplatină, ZD0473, cis, trans, cis-Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OOCCH₃H₇)₂Cl, malanat-1,2-diaminociclohexanoplatină(II), 5-sulfosalicilat-trans-(1,2-diaminociclohexan)platină (II) (SSP), poli-[(trans-1,2-diaminociclohexan)platină]-carboxiamiloză (POLY-PLAT) și 4-hidroxi-sulfonilfenilacetat (trans-1,2-diaminociclohexan) platină (II) (SAP) și (vi) medicamente de alchilare a ADN-ului, cum ar fi azot iperită, nitrozouree, derivați de etilenimină, alchil sulfonați și triazeni, incluzând, dar fără limitare la, ciclofosfamidă (CytosanTM), busulfan, improsulfan, piposulfan, pipobroman, melfalan (L-sarcolizina), clorambucil, mecloretamină sau mustină, uramustină sau uracil iperită, novembichin, fenesterină, trofosfamidă, ifosfamidă, carmustină (BCNU), lomustine (CCNU), clorozotocină, fotemustină, nimustină, ranimnustină, semustină (metil-CCNU), streptozocină, tiotepa, trietilenmelamină, trietilentiofosforamină, procarbazine, altretamină, dacarbazină, mitozolomidă și temozolomidă.

În cazul compozițiilor sau combinațiilor farmaceutice conform invenției, care conțin un agent antitumoral, compoziția poate fi prezentată ca o singură formulare (de ex., sub formă de tabletă sau capsulă care cuprinde o cantitate fixă din fiecare dintre componente) sau pot, pe de altă parte, să fie prezentate ca formulări separate pentru a fi ulterior combinate pentru administrare împreună, succesivă sau separată. Compozițiile sau combinațiile din invenție includ, de asemenea, formularea ca un kit de constituenți, în care componentele sunt formulate separat, dar sunt ambalate în același recipient. Persoanele de specialitate în domeniu vor aprecia că formularea diferitelor componente în cazul celei de-a doua compoziții farmaceutice conform invenției poate fi similară, cu alte cuvinte, formulată în mod similar (în tablete sau pilule), ceea ce permite administrarea lor pe aceeași cale. În cazul în care diferitele componente din invenție sunt formulate separat, cele două componente pot fi prezentate într-un blister. Fiecare blister conține medicamentele care trebuie consumate în timpul zilei. Dacă medicamentele trebuie administrate de mai multe ori pe zi, medicamentele corespunzătoare fiecărei administrări pot fi plasate în diferite secțiuni ale blisterului, înregistrând, de preferință, în fiecare secțiune a blisterului momentul din zi în care trebuie administrate. Ca alternativă, componentele compoziției din invenție pot fi formulate în mod diferit, astfel încât diferitele componente să fie administrate în mod diferit. Astfel, este posibil ca prima componentă să fie formulată ca tabletă sau capsulă pentru administrarea sa orală, iar a doua componentă să fie formulată pentru administrarea sa intravenoasă, sau invers. Raportul dintre componentele care fac parte din compozițiile utilizate în a doua compoziție farmaceutică din invenție poate fi ajustat de către o persoană de specialitate în funcție de agentul antitumoral utilizat în fiecare caz particular, precum și de indicația dorită. Astfel, invenția are în vedere compoziții în care raportul dintre cantitățile celor două componente poate varia de la 50:1 până la 1:50, în particular, de la 20:1 până la 1:20, de la 1:10 până la 10:1 sau de la 5:1 până la 1:5.

Compozițiile sau combinațiile farmaceutice din invenție pot fi administrate pe orice tip de cale adecvată, cum ar fi pe cale orală, pe cale locală, pe cale inhalatorie sau parenterală, astfel încât să fie incluși excipienții acceptabili farmaceutic necesari pentru formularea formei de doză dorite. Calea preferată de administrare a compozițiilor farmaceutice menționate este calea endovenoasă.

"Calea orală" este înțeleasă ca încorporarea în organism a compoziției farmaceutice după deglutiție. Într-o variantă de realizare particulară, compoziția farmaceutică din invenție poate fi într-o formă de doză adecvată pentru administrarea sa pe cale orală, fie că este solidă sau lichidă. Formele de doză adecvate pentru administrarea lor pe cale orală pot fi tablete, capsule, siropuri sau soluții, și pot conține orice excipient convențional cunoscut în domeniu, cum ar fi lianți, de exemplu, sirop, salcâm, gelatină, sorbitol sau polivinilpirolidonă; agenți de umplere, de exemplu, lactoză, zahăr, amidon de porumb, fosfat de calciu, sorbitol sau glicină; lubrifianți pentru comprimare, de exemplu, stearat de magneziu; agenți de dezintegrare, de exemplu, amidon, polivinilpirolidonă, glicolat de sodiu de amidon sau celuloză microcristalină; sau agenți de umectare acceptabili farmaceutic, cum ar fi lauril sulfat de sodiu. Compozițiile solide orale pot fi preparate cu ajutorul procedeelelor convenționale de amestecare, umplere sau comprimare. Operațiile de amestecare repetitivă pot fi utilizate pentru a distribui complet agentul activ în acele compoziții care utilizează cantități mari de agenți de umplere. Operațiile menționate sunt convenționale în domeniu. Tabletele pot fi preparate, de exemplu, prin granulare umedă

sau uscată, și opțional cu acoperirea lor conform procedeelelor cunoscute în practica farmaceutică obișnuită, în special, cu o acoperire enterică.

Pe de altă parte, "calea topică" este înțeleasă ca o administrare pe cale nesistemică, și include aplicarea externă a unei compoziții farmaceutice conform invenției pe epidermă, în cavitatea bucală, și instilarea compoziției menționate în urechi, ochi și nas, și care nu intră semnificativ în fluxul sanguin. "Calea sistemică" este înțeleasă ca administrarea pe cale orală, cale intravenoasă, cale intraperitoneală și cale intramusculară. Prin "inhalare" se înțelege administrarea pe cale intranazală și prin inhalare orală. Formele de doză adecvate pentru administrarea menționată, cum ar fi o formulare în aerosol sau un inhalator cu doză măsurată, pot fi preparate cu ajutorul tehnicilor convenționale. Într-o variantă de realizare, calea de administrare este calea intranazală.

Așa cum este utilizat aici, termenul "parenteral", include administrare pe cale intravenoasă, pe cale intraperitoneală, pe cale intramusculară sau pe cale subcutanată. Formele de doză subcutanată, intramusculară și intravenoasă pentru administrare parenterală sunt în general preferate.

Într-o variantă de realizare, compozițiile farmaceutice din invenție pot fi adaptate pentru administrarea lor parenterală, cum ar fi soluții sterile, suspensii sau produse liofilizate în forma unitară de doză corespunzătoare. Compoziții farmaceutice adecvate pentru utilizarea lor prin injectare includ soluții apoase sterile (atunci când sunt solubile în apă) sau dispersii și pulberi sterile pentru prepararea extemporanee a soluțiilor sau a dispersiilor sterile injectabile. Pentru administrarea lor pe cale intravenoasă, unii purtători adecvați includ soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). În toate cazurile, compoziția trebuie să fie sterilă și trebuie să fie fluidă până la punctul în care are o capacitate de a fi injectată cu ușurință. Aceasta trebuie să fie stabilă în condițiile de preparare și depozitare, și trebuie protejată de acțiunea de contaminare a microorganismelor, cum ar fi bacterii și fungi. Purtătorul poate fi un solvent sau un mediu de dispersare care conține, de exemplu, apă, etanol, un poliol acceptabil farmaceutic, cum ar fi glicerol, propilenglicol, polietilenglicol lichid și amestecuri adecvate ale acestora. Fluiditatea adecvată poate fi menținută, de exemplu, prin utilizarea unei acoperiri cum ar fi lecitină, prin menținerea dimensiunii particulelor necesare, în cazul dispersiei, și prin utilizarea surfactanților. Prevenirea acțiunii microorganismelor poate fi realizată cu ajutorul diversilor agenți antibacterieni și antifungici, de exemplu, parabenii, clorbutanol, fenol, acid ascorbic și tiomersal. În cele mai multe cazuri, va fi de preferat să se includă în compoziție agenți izotonici, de exemplu, zaharuri; polialcoolii cum ar fi manitol, sorbitol; sau clorură de sodiu. Absorbția prelungită a compozițiilor injectabile poate fi cauzată de includerea unui agent care întârzie absorbția, de exemplu, monostearat de aluminiu și gelatină.

Soluțiile injectabile sterile pot fi preparate prin încorporarea compusului activ în cantitatea necesară într-un solvent adecvat cu unul sau cu o combinație de ingrediente menționate mai sus, după cum este necesar, urmată de sterilizare prin filtrare prin membrane sterile. În general, dispersiile sunt preparate prin încorporarea compusului activ într-un vehicul steril care conține un mediu bazic de dispersare și restul de ingrediente necesare dintre cele enumerate anterior. În cazul pulberilor sterile pentru prepararea soluțiilor injectabile sterile, procedeele preferate de preparare sunt uscarea în vid și liofilizarea care dau naștere la o pulbere cu ingredientul activ plus orice ingredient suplimentar dorit dintr-o soluție a acestuia sterilă, filtrată anterior.

Compozițiile farmaceutice din invenție pot fi administrate în mod adecvat cu ajutorul perfuziei cu impulsuri, de exemplu, cu doze descrescătoare de compoziție. De preferință, doza este administrată cu ajutorul injecțiilor, mai preferat, injecții intravenoase sau subcutanate, în funcție, parțial, de faptul că administrarea este acută sau cronică.

Într-o variantă de realizare, prima sau a doua compoziție farmaceutică din invenție este preparată cu purtători care vor proteja polipeptida menționată față de o eliminare rapidă din organism, cum ar fi o formulare cu eliberare controlată, incluzând implanturi și sisteme de administrare microîncapsulate. Pot fi utilizați polimeri biocompatibili biodegradabili, cum ar fi vinilacetat de etilenă, polianhidride, acid poliglicolic, collagen, poliortoesteri și acid polilactic. Procedeele de preparare a formulărilor menționate vor fi clare pentru persoanele de specialitate în domeniu. Materialele pot fi, de asemenea, obținute comercial de la Alza Corporation și Nova Pharmaceuticals, Inc.

Compozițiile cu eliberare susținută includ, de asemenea, preparate din cristale de anticorpi suspendate în formulări adecvate care pot menține cristalele în suspensie. Aceste preparate, atunci când sunt injectate pe cale subcutanată sau intraperitoneală, pot produce un efect de eliberare susținută. Alte compoziții includ, de asemenea, anticorpi prinși în lipozomi. Lipozomii care conțin astfel de anticorpi sunt preparați prin metode cunoscute, cum ar fi din Epstein și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. US, (1985) 82:3688-3692; Hwang și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. US, (1980) 77:4030-4034; EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

În ciuda faptului că polipeptida din invenție și conjugatele și proteinele de fuziune care conțin polipeptida din invenție sunt capabile să se transloce prin membrane biologice, persoana de specialitate va înțelege că poate fi, de asemenea, convenabil să formuleze în nanoparticule conjugatele sau proteinele de fuziune care cuprind polipeptidele din invenție.

Așa cum este utilizat aici, termenul "nanoparticulă" se referă la orice material care are dimensiuni în intervalul 1-1000 nm. În unele variante de realizare, nanoparticulele au dimensiuni în intervalul 2-200 nm, de preferință, în intervalul 2-150 nm, și chiar mai preferat, în intervalul 2-100 nm.

Nanoparticulele pot contribui la păstrarea integrității polipeptidei în fluidele biologice până când ajunge la organul țintă. Mai mult, în cazul compozițiilor care cuprind un agent antitumoral, încapsularea compoziției poate să scadă efectele secundare cauzate de agentul antitumoral. În final, nanoparticulele pot fi, de asemenea, modificate astfel încât să includă fragmente care permit direcționarea nanoparticulei către un organ de interes.

Astfel, într-o altă variantă de realizare, compozițiile farmaceutice din invenție cuprind conjugatii, proteinele de fuziune și compozițiile conform invenției care fac parte dintr-o nanoparticulă.

Nanoparticulele adecvate care pot fi utilizate în contextul prezentei invenții includ astfel de materiale la scară nanometrică, cum ar fi o nanoparticulă pe bază de lipide, o nanoparticulă superparamagnetică, un nanoînveliș, un nanocristal semiconductor, un punct cuantic, o nanoparticulă pe bază de polimer, o nanoparticulă pe bază de siliciu, o nanoparticulă pe bază de silice, o nanoparticulă pe bază de metal, o fulerenă și un nanotub.

Livrarea țintită poate fi realizată prin adăugare de liganzi fără a compromite capacitatea nanoparticulelor de a-și livra încărcăturile polipeptidice utile. Este avut în vedere că acest lucru va permite livrarea către anumite celule, țesuturi și organe. Specificitatea de țintire a sistemelor de livrare pe bază de liganzi se bazează pe distribuția receptorilor ligandului pe diferite tipuri de celule. Ligandul de țintire poate fi asociat, fie necovalent, fie covalent cu o nanoparticulă și poate fi conjugat la nanoparticule printr-o varietate de metode, așa cum a fost discutat aici.

Exemple de proteine sau peptide care pot fi utilizate pentru nanoparticule de țintire includ transferină, lactoferină, TGF- β , factor de creștere a nervilor, albumină, peptidă HIV Tat, peptidă RGD și insulină, precum și altele.

Se va înțelege că formularea produsului conform invenției într-o nanoparticulă nu este destinată sau nu este destinată exclusiv să faciliteze accesul produsului la interiorul celulei, ci să protejeze produsul de degradare și/sau să faciliteze țintirea nanoparticulei către organul de interes.

Compozițiile farmaceutice din invenție sunt adecvate pentru administrare la orice tip de mamifer, de preferință, la o ființă umană.

Toți termenii și variantele de realizare descrise anterior sunt aplicabile în mod egal acestui aspect al invenției.

Utilizări medicale

Într-un alt aspect, invenția se referă la o polipeptidă sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției, la un conjugat conform invenției, la o polinucleotidă conform invenției, la un vector conform invenției, la o celulă gazdă conform invenției, sau la o compoziție farmaceutică conform invenției, pentru utilizare în medicină.

Într-un alt aspect, invenția se referă la o polipeptidă sau la o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform invenției, la un conjugat conform invenției, la o polinucleotidă conform invenției, la un vector conform invenției, la o celulă gazdă conform invenției, sau la o compoziție farmaceutică conform invenției, pentru utilizare în prevenirea și/sau tratamentul cancerului.

"Prevenirea" este înțeleasă ca administrarea unui compus într-un stadiu inițial sau timpuriu al bolii sau, de asemenea, pentru prevenirea apariției acesteia.

Termenul "tratament" este utilizat pentru a indica administrarea unui compus pentru a controla progresia bolii înainte sau după apariția semnelor clinice. Controlul progresiei bolii este înțeles ca rezultatele clinice benefice sau dorite care includ, dar nu se limitează la, reducerea simptomelor, reducerea duratei bolii, stabilizarea afecțiunilor patologice (evitarea în mod specific a deteriorării suplimentare), întârzierea progresiei bolii, ameliorarea afecțiunii patologice și remisiunea (atât parțială, cât și completă). Controlul progresiei bolii presupune, de asemenea, o prelungire a supraviețuirii, în comparație cu supraviețuirea așteptată dacă nu a fost aplicat tratamentul.

Un "subiect", așa cum este utilizat aici, include orice animal care are un cancer sau prezintă un simptom sau cancer, sau este expus riscului de a avea un cancer sau de a prezenta un simptom de cancer. Subiecții adecvați (pacienți) includ animale de laborator (cum ar fi șoarece, șobolan, iepure sau cobai), animale de fermă și animale domestice sau animale de companie (cum ar fi o pisică sau un câine). Sunt incluse primate non-umane și, de preferință, pacienți oameni.

Termenul "cancer" se referă la o boală caracterizată prin diviziune celulară necontrolată (sau printr-o creștere a supraviețuirii sau a rezistenței la apoptoză), prin capacitatea celulelor menționate de a invada alte țesuturi învecinate (invazie) sau prin răspândirea în alte zone ale organismului în care celulele nu sunt localizate în mod normal (metastaze) prin vasele limfatice și sanguine. În funcție de faptul că tumorile se pot răspândi sau nu prin invazie și metastază, ele sunt clasificate ca fiind, fie benigne, fie maligne: tumorile benigne sunt tumori care nu se pot răspândi prin invazie sau metastază, adică cresc doar local; în timp ce tumorile maligne sunt tumori care sunt capabile să se răspândească prin invazie și metastaze. Polipeptidele conform prezentei invenții sunt utile pentru tratamentul tumorilor locale și maligne. Așa cum este utilizat aici, termenul cancer include, dar nu se limitează la, următoarele tipuri de cancer: cancer de sân; cancer de căi biliare; cancer de vezică urinară; cancer cerebral, incluzând glioblastoame și meduloblastoame; cancer de col uterin; coriocarcinom; cancer de colon; cancer endometrial; cancer esofagian; cancer gastric; neoplasme hematologice incluzând leucemie acută limfocitară și mielogenă; leucemie/limfom limfoblastic acut cu celule T; leucemie cu celule păroase; leucemie mielogenă cronică, mielom multiplu; leucemii asociate cu SIDA și leucemie/limfom cu celule T la adulți; neoplasme intraepiteliale, incluzând boala Bowen și boala Paget; cancer hepatic; cancer pulmonar; limfoame incluzând boala Hodgkin și limfoame limfocitare; neuroblastoame; cancer oral, incluzând carcinom cu celule scuamoase; cancer ovarian incluzând pe cele care provin din celule epiteliale, celule stromale, celule germinale și celule mezenchimale; cancer pancreatic; cancer de prostată; cancer rectal; sarcoame, incluzând leiomiiosarcom, rabdomiosarcom, liposarcom, fibrosarcom și osteosarcom; cancer de piele, incluzând melanom, carcinom cu celule Merkel, sarcom Kaposi, carcinom bazocelular și cancer cu celule scuamoase; cancer testicular, incluzând tumori germinale, cum ar fi seminoame, non-seminoame (teratoame, coriocarcinoame), tumori stromale și tumori cu celule germinale; cancer tiroidian, incluzând adenocarcinom tiroidian și carcinom medular; și cancer renal, incluzând adenocarcinom și tumoră Wilms. Alte tipuri de cancer vor fi cunoscute unei persoane de specialitate în domeniu. Într-o variantă de realizare preferată, cancerul tratat este cancer pulmonar, de preferință, adenocarcinom pulmonar, mai preferat, un adenocarcinom pulmonar determinat de KRas.

Într-o variantă de realizare preferată, cancerul este o tumoră solidă.

Toate combinațiile de compuși din invenție și tipurile de cancer sunt incluse în prezenta invenție.

Într-o variantă de realizare preferată, cancerul este selectat din grupul constând din glioblastom și cancer pulmonar fără celule mici.

"Glioblastomul", cunoscut, de asemenea, cu denumirea de glioblastom și astrocitom de gradul IV, este cel mai frecvent și mai agresiv cancer care începe în creier.

Termenul "NSCLC" sau "cancer pulmonar fără celule mici", așa cum este utilizat aici, se referă la un grup de boli eterogene grupate împreună, deoarece prognosticul și gestionarea lor sunt aproximativ identice conform clasificării histologice a Organizației Mondiale a Sănătății/Asociației Internaționale pentru Studiul cancerului pulmonar (Travis WD și colab. Histological typing of lung and pleural tumours, a 3-a ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999):

1. carcinomul cu celule scuamoase (SCC), reprezentând 30% până la 40% din NSCLC, începe în tuburile respiratorii mai mari, dar crește mai lent, ceea ce înseamnă că dimensiunea acestor tumori variază la diagnosticare.

2. adenocarcinomul este cel mai frecvent subtip de NSCLC, reprezentând 50% până la 60% din NSCLC, care începe în apropierea suprafeței de schimb de gaze a plămânului și care include un subtip, carcinomul bronșioalveolar, care poate avea răspunsuri diferite la tratament.

3. carcinomul cu celule mari este o formă cu creștere rapidă care crește aproape de suprafața plămânului. Este, în principal, un diagnostic de excludere, iar atunci când se fac mai multe investigații, este de obicei reclasificat în carcinom cu celule scuamoase sau adenocarcinom.

4. carcinomul adenoscuamos este un tip de cancer care conține două tipuri de celule: celule scuamoase (celule subțiri, plate care câpтуșesc anumite organe) și celule de tip glandular.

5. carcinoame cu elemente pleomorfe, sarcomatoide sau sarcomatoase. Acesta este un grup de tumori rare care reflectă un continuum în eterogenitatea histologică, precum și diferențiere epitelială și mezenchimală.

6. tumora carcinoidă este o tumoră pulmonară neuroendocrină cu creștere lentă și începe în celulele care sunt capabile să elibereze un hormon ca răspuns la un stimul furnizat de sistemul nervos.

7. carcinoamele de tip glandă salivară încep în celulele glandelor salivare situate în interiorul căilor respiratorii mari ale plămânului.

8. carcinoamele neclasificate includ cancere care nu se încadrează în niciuna dintre categoriile de cancer pulmonar menționate mai sus.

Toți termenii și variantele de realizare descrise anterior sunt aplicabile în mod egal acestui aspect al invenției.

Invenția este detaliată mai jos cu ajutorul următoarelor exemple care sunt doar ilustrative și în niciun caz limitative pentru sfera de întindere a invenției.

5

EXEMPLE

Materiale și metode

10 *Transfecția celulelor cu ARNm de Omomyc și OmoCS*

ARNm pentru mutanți Omomyc și OmoCS a fost achiziționat de la Trilink Biotechnologies la concentrații de 0,782 mg/mL și, respectiv, 0,876 mg/mL (ARCA acoperit și complet substituit cu 5-metil-C și pseudo-U modificat).

15 Oricare dintre secvența de ADN de Omomyc sau OmoCS a fost introdusă într-un vector în aval de promotorul ARN polimerazei T7 și de o coadă poli(T) situată la capătul 3p. 5-metilcitidin-5"-trifosfat și ARN modificat cu pseudouridin-5'-trifosfat au fost produse prin transcriere *in vitro* folosind o ARN polimerază T7. ARN-ul a fost de asemenea acoperit utilizând analogul structurii capacului ARN [3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G]. Vectorul ADN șablon a fost degradat utilizând ADNază și trifosfat rezidual a fost îndepărtat printr-un tratament cu fosfatază. Produsul ARN a fost apoi purificat, și integritatea și cantitatea au fost evaluate prin electroforeză pe gel de agaroză și, respectiv, Nanodrop. ARN-ul a fost depozitat la -80°C. Reactivul de transfecție Lipofectamine MessengerMAX a fost achiziționat de la Thermo Fisher Scientific. Liniile de celule A549 și U87 au fost însemănțate la 500 și, respectiv, 1000 de celule în fiecare godeu, în plăci cu 96 de godeuri. Celulele au fost crescute în Mediu Eagle Modificat de Dulbecco (DMEM) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS) și 1% L-glutamină (mediu complet). După 24 de ore, celulele au fost transfectate cu complexe lipofectamină-ARNm. 3 μg de ARNm pentru fiecare 2 μl de lipofectamină au fost diluate separat în mediu fără ser și au fost incubate timp de 10 minute. Diluțiile de ARNm și lipofectamină au fost apoi amestecate și incubate timp de 5 minute pentru a permite formarea complexelor. Godeurile au fost spălate de două ori cu mediu fără ser. Celulele au fost diluate în serie începând de la 1 μg până la 0,0625 μg de ARNm la fiecare godeu în 100 μl de mediu total fără ser. Pentru fiecare concentrație, celulele de control au fost tratate numai cu lipofectamină și au fost utilizate triplicate pentru fiecare condiție. După 4 ore de transfecție, mediile fără ser și complexele mARN-lipofectamină au fost îndepărtate din godeuri și au fost substituite cu medii complete. Celulele au fost incubate timp de 3 zile. Apoi, viabilitatea a fost evaluată folosind CellTiter-Blue de la Promega. Absorbanța relativă la godeurile netratate a fost calculată pentru fiecare condiție. Semnificația statistică a fost calculată prin test t.

Transfecția celulelor cu ARNm de OmoCS și OmoCA

ARNm pentru mutanți OmoCS și OmoCA a fost achiziționat de la Trilink Biotechnologies (ARCA acoperit și complet substituit cu 5-metil-C și pseudo-U modificat). Concentrațiile de ARNm pentru OmoCS și OmoCA au fost determinate la 0,845 mg/mL și, respectiv, 0,832 mg/mL utilizând un Nanodrop. Reactivul de transfecție Lipofectamine MessengerMAX a fost achiziționat de la Thermo Fisher Scientific. Celulele A549 au fost însemănțate la 500 de celule în fiecare godeu, într-o placă cu 96 de godeuri. Celulele au fost crescute în mediu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS) și 1% L-glutamină (mediu complet). După 24 de ore, celulele au fost transfectate cu complexe lipofectamină-ARNm. 2 μg de ARNm pentru fiecare 1,5 μL de lipofectamină au fost diluate separat în mediu fără ser și au fost incubate timp de 10 minute. Diluțiile de ARNm și lipofectamină au fost apoi amestecate și au fost incubate timp de 5 minute pentru a permite formarea complexelor. Godeurile au fost spălate de două ori cu mediu fără ser. Celulele au fost tratate cu diluții seriale 1:2 începând cu 1 μg de ARNm la fiecare godeu în 50 μl de mediu total fără ser (200 nM). Pentru fiecare concentrație, celulele au fost, fie netratate (fără tratare), fie tratate numai cu lipofectamină (doar Lipo) ca godeuri de control. Au fost efectuate triplicate pentru fiecare condiție. După 4 ore de transfecție, mediile fără ser și complexele mARN-lipofectamină au fost îndepărtate din godeuri și au fost substituite cu medii RPMI complete. Celulele au fost incubate timp de 3 zile. În acel moment, densitatea celulară a fost evaluată folosind colorarea cu violet cristal. Absorbanța relativă în godeurile netratate a fost calculată pentru fiecare concentrație.

Exemplul 1

În mod surprinzător, mutantul OmoCS prezintă o inhibare mai mare a creșterii celulare, în comparație cu secvența originală Omomyc la concentrație scăzută (Figura 1). Această eficacitate

- 5 îmbunătățită, în comparație cu secvența originală Omomyc ar putea fi explicată, cel puțin parțial, prin ipoteza că cisteina interfacială oxidată a homodimerului Omomyc ar preveni heterodimerizarea Omomyc cu Myc sau cu Max, limitând activitatea Omomyc la simpla competiție pentru legare la caseta E. În schimb, mutantul OmoCS ar favoriza alte activități biologice ale Omomyc prin promovarea formării populațiilor heterodimerice.

Exemplul 2

În mod surprinzător, mutantul OmoCA se comportă exact ca OmoCS în același test de proliferare (Figura 2).

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- SOUCEK LAURA ET AL: "Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 62, no. 12, 15 June 2002 (2002-06-15) , pages 3507-3510, XP002705287, ISSN: 0008-5472
- WO-A1-2014/180889
- DATABASE UniProt [Online] 16 March 2016 (2016-03-16), "SubName: Full=C-myc {ECO:0000313|EMBL:AAQ57178.1}; Flags: Fragment;", XP55413001, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q6WDE6 Database accession no. Q6WDE6
- DATABASE REFSEQ [Online] 27 May 2016 (2016-05-27), "myc proto-oncogene protein isoform X1, partial [Cricetulus griseus]", XP55413005, Database accession no. XP_003516054
- DATABASE UniProt [Online] 16 March 2016 (2016-03-16), "SubName: Full=Myc proto-oncogene protein {ECO:0000313|EMBL:EBB05990.1};", XP002774402, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:G5B9M9 Database accession no. G5B9M9

(57) Revendicări:

1. O polipeptidă care cuprinde polipeptida din SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sau o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate având un grad de identitate, în raport cu SECV ID NR: 1, mai mare de 90% și având o treonină în poziția corespondentă poziției 61 din SECV ID NR: 1, o izoleucină în poziția corespondentă poziției 68 din SECV ID NR: 1, o glutamină în poziția corespondentă poziției 74 din SECV ID NR: 1 și o asparagină în poziția corespondentă poziției 75 din SECV ID NR: 1, și în care reziduul X de la poziția corespondentă poziției 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, în care varianta echivalentă funcțional menționată păstrează activitatea supresoare tumorală a SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină.

2. Polipeptida conform revendicării 1, în care varianta echivalentă funcțional poate dimeriza cu Myc și/sau cu partenerul său obligatoriu p21/p22Max și poate inhiba activitatea Myc odată găsită în nucleu, fiind capabilă să se transloce prin membrana celulară și prin învelișul nuclear.

3. Polipeptida conform oricăreia dintre revendicările 1 sau 2, în care polipeptida menționată este selectată din grupul constând din:

a) o polipeptidă care constă din polipeptida din SECV ID NR: 1 în care reziduul X de la poziția 89 din SECV ID NR: 1 nu este o cisteină, sau constă dintr-o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate, conform revendicării 1; și

b) o polipeptidă care constă din polipeptida din SECV ID NR: 3 în care reziduul X de la poziția 90 din SECV ID NR: 3 nu este o cisteină.

4. Polipeptida conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, în care reziduul X este serină sau alanină.

5. Polipeptida conform revendicării 4, care constă din SECV ID NR: 4.

6. Un conjugat care cuprinde:

a. polipeptida sau varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform oricăreia dintre revendicările 1-5 și

b. un fragment chimic care facilitează absorbția celulară a polipeptidei conform oricăreia dintre revendicările 1-5 sau a variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate conform oricăreia dintre revendicările 1-5.

7. Conjugatul conform revendicării 6, în care fragmentul chimic care facilitează absorbția celulară a polipeptidei sau a variantei echivalente funcțional a polipeptidei menționate este o secvență de peptidă care pătrunde în celulă, și în care secvența de peptidă menționată care pătrunde în celulă și polipeptida menționată sau varianta echivalentă funcțional a polipeptidei menționate formează o proteină de fuziune, de preferință, secvența de peptidă care pătrunde în celulă este selectată din grupul constând din GRKKRRQRRR (SECV ID NR: 38) și RRRRRRLR (SECV ID NR: 39).

8. Conjugatul conform oricăreia dintre revendicările 6 sau 7, care cuprinde, în plus, un alt semnal de localizare nucleară, în special, semnalul de localizare nucleară este selectat din grupul constând din PKKKRKV (SECV ID NR: 6), PAAKRVKLD (SECV ID NR: 54) și KRPAATKKAGQAKKKK (SECV ID NR: 7).

9. O polinucleotidă care codifică o polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările de la 1 până la 5 sau un conjugat conform oricăreia dintre revendicările de la 6 până la 8.

10. Un vector care cuprinde o polinucleotidă conform revendicării 9.

11. O celulă gazdă care cuprinde o polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările de la 1 până la 5, un conjugat conform oricăreia dintre revendicările de la 6 până la 8, o polinucleotidă conform revendicării 9 sau un vector conform revendicării 10.

12. O compoziție farmaceutică care cuprinde o cantitate eficientă farmaceutic de o polipeptidă sau de o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate, conform oricăreia dintre revendicările de la 1 până la 5, de un conjugat conform oricăreia dintre revendicările 6 până la 8, de o polinucleotidă conform revendicării 9, de un vector conform revendicării 10, sau de o celulă gazdă conform revendicării 11, și un excipient acceptabil farmaceutic.

13. O polipeptidă sau o variantă echivalentă funcțional a polipeptidei menționate conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 5, un conjugat conform oricăreia dintre revendicările de la 6 până la 8, o polinucleotidă conform revendicării 9, un vector conform revendicării 10, o celulă gazdă conform revendicării 11, sau o compoziție farmaceutică conform revendicării 12, pentru utilizare în medicină.

14. O polipeptidă sau o variantă echivalentă funcțional a acesteia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 5, un conjugat conform oricăreia dintre revendicările de la 6 până la 8, o polinucleotidă conform revendicării 9, un vector conform revendicării 10, o celulă gazdă conform revendicării 11, sau o compoziție farmaceutică conform revendicării 12, pentru utilizare în prevenirea și/sau tratamentul cancerului.

15. Polipeptida sau varianta echivalentă funcțional a acesteia, conjugatul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă sau compoziția farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 14, în care cancerul este selectat din grupul constând din glioblastom și cancer pulmonar fără celule mici.

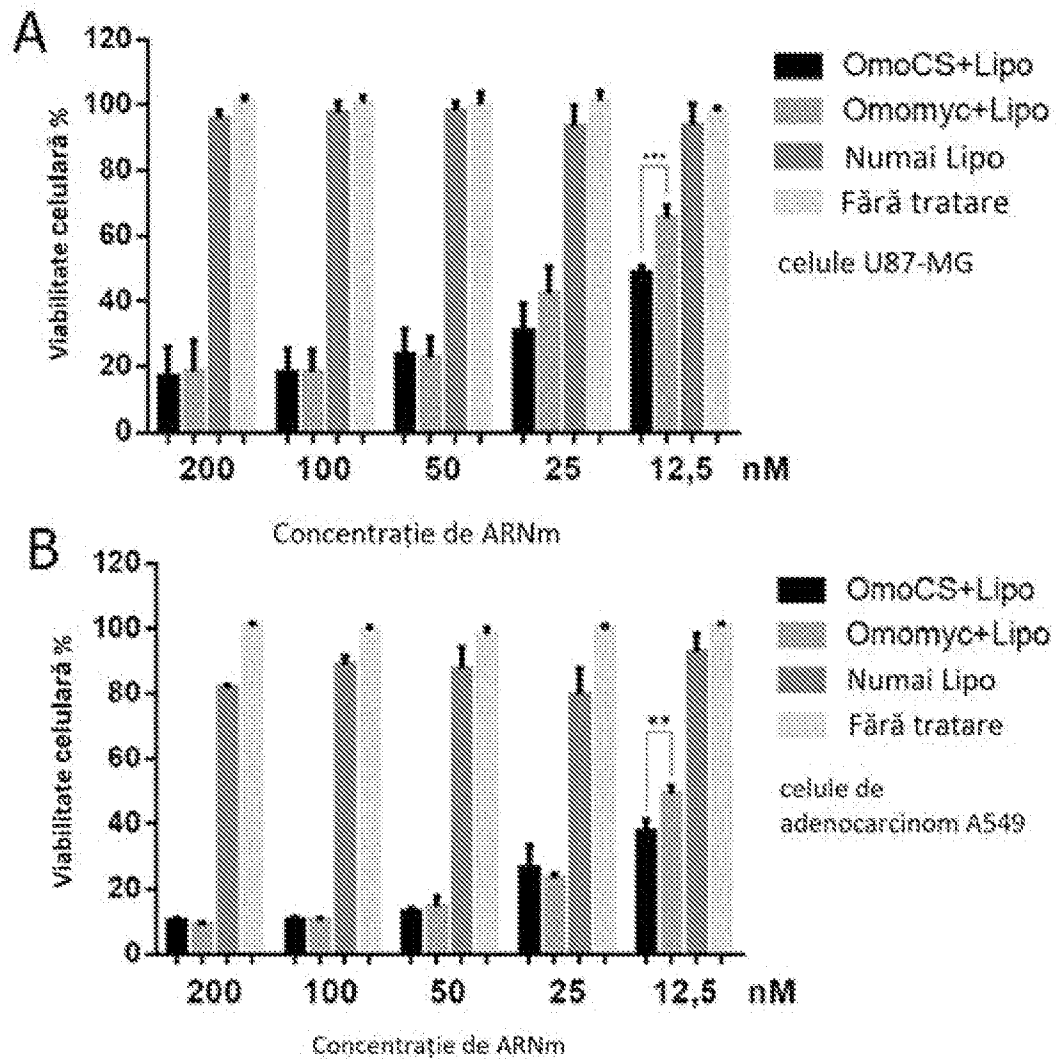


Fig. 1

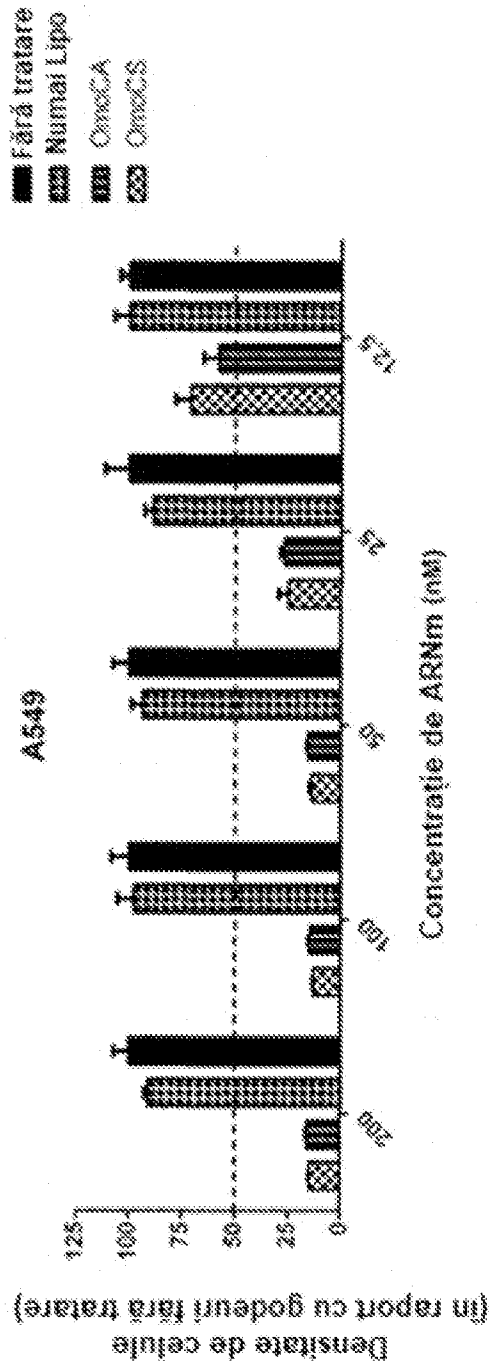


Fig 2