(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 526 109**

(21) Número de solicitud: 201330793

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

30.05.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

05.01.2015

Fecha de la concesión:

06.10.2015

(45) Fecha de publicación de la concesión:

14.10.2015

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070444

Fecha de publicación de la mención al informe de búsqueda internacional:
09.01.2015

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca (Salamanca) ES

(72) Inventor/es:

TABERNERO URBIETA, Arantxa;
MEDINA JIMÉNEZ, José María y
GANGOSO RODRÍGUEZ, Ester

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **PÉPTIDO Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

(57) Resumen:

Péptido y composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se relaciona con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y el uso del mismo para el tratamiento de enfermedades que cursen con proliferación celular, en particular, para el tratamiento del cáncer y la metástasis. Asimismo, también se incluyen dentro de la presente invención la composición farmacéutica y el kit que comprende dicho péptido.

ES 2 526 109 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Péptido y composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer

DESCRIPCIÓN

La presente invención se relaciona con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y el uso del mismo para el tratamiento de enfermedades que cursen con proliferación celular, en particular, para el tratamiento del cáncer y la metástasis. Por lo tanto, la presente invención se incluye dentro del campo de la medicina, en particular, en el campo del tratamiento del cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los gliomas son los tumores cerebrales más frecuentes y en general presentan muy mal pronóstico. De hecho, los pacientes diagnosticados con un glioblastoma multiforme, el tipo de glioma más frecuente y severo, presentan una esperanza de vida media que no supera el año. A pesar de los avances en el estudio de esta patología y de su tratamiento, este dato apenas ha variado en los últimos años. El alto grado de infiltración de estos tumores hace muy difícil su eliminación completa en la cirugía y por tanto la recurrencia es muy frecuente. Recientemente, se ha identificado una subpoblación en los gliomas con características semejantes a células madre, denominada “células madre de glioma” (glioma stem cells, GSC) o “células iniciadoras de glioma” (glioma initiating cells, GIC). Estas células se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y diferenciación en diferentes tipos celulares, su alto potencial oncogénico y su resistencia a los tratamientos convencionales. Por ello, se propone que las células madre de glioma son responsables de la recurrencia de los gliomas. Debido a la resistencia a los tratamientos convencionales, las células madre tumorales persisten tras la terapia y dada su alta capacidad oncogénica provocan la recurrencia del tumor. Por esta razón, las células madre de glioma se han convertido en una prometedora diana terapéutica, ya que su eliminación o la reversión del fenotipo de célula madre supondría que todas las células del glioma serían susceptibles a los tratamientos antitumorales. Entre las características del fenotipo de célula madre de glioma está la expresión del regulador transcripcional Id1 (Soroceanu et al. Cancer Res. 2013, 73: 1559; Gautschi et al. 2008 Cancer Res, 68: 2250-2258), que mantiene

a la célula en un estado indiferenciado o la expresión del factor de transcripción Sox-2 (Gangemi et al. 2009. Stem cells, 27:40-48).

La conexina43 (Cx43) [NCBI, número acceso AAA52131, versión AAA52131.1 GI:181209], la conexina más abundante en los mamíferos, es una proteína integral de membrana que se expresa ampliamente en diferentes tejidos. En el sistema nervioso central (SNC), la Cx43 se localiza fundamentalmente en los astrocitos, la glía mayoritaria, donde forma las “gap junctions” (Gjs), canales de comunicación intercelular que permiten el comportamiento de los astrocitos como de forma cooperativa. Desde que en los años 60 Lowenstein propusiera que las Gjs regulaban la proliferación celular, el papel de las Gjs y las conexinas en la regulación de la proliferación celular ha sido ampliamente estudiado.

En los astrocitos, la inhibición en la expresión de la Cx43, bien por péptidos endógenos como la endotelina-1 o por siRNAs específicos, aumenta la tasa de proliferación así como la captación de glucosa destinada a este proceso (Herrero-Gonzalez, et al. 2009. Glia, 57: 222-233). Por otra parte, en un gran número de tumores, incluidos los gliomas, se observa una disminución en la expresión de la Cx43. De hecho, la expresión de la Cx43 disminuye a medida que aumenta el grado de malignidad de estos tumores (Huang et al. 1999. J Surg Oncol, 70: 21-23; Pu et al. 2004. Clin Neurol Neurosurg, 107: 49-54; Shinoura et al. 1996. J Neurosurg, 84: 839-845; Soroceanu et al. 2001. Glia, 33: 107-117). Además, la restauración de la expresión de la Cx43 en las células de glioma, bien por la transfección del cDNA o por agentes como la tolbutamida, reduce la exacerbada tasa de proliferación, indicando que la Cx43 se comporta como una proteína supresora del fenotipo tumoral en gliomas (Huang et al. 1998. Cancer Res, 58: 5089-5096; Zhu et al. 1991 citado *ad supra*). Recientemente se ha descrito que las células madre de glioma apenas expresan Cx43 y que su restauración en estas células revierte el fenotipo de células madre y reduce la capacidad de estas células de generar gliomas (Yu et al. 2012. Stem Cells, 30: 108-120).

El mecanismo por el cual la Cx43 reduce la proliferación de células de glioma no se conoce del todo. No obstante, existen estudios que muestran que la Cx43 impide el paso de G1 a la fase S del ciclo celular en las células de glioma C6 (Herrero-Gonzalez et al. 2010. Oncogen, 29: 5712-5723). Así, la Cx43 modifica la expresión de varios

genes implicados en la regulación del ciclo celular, como p21 y p27, dos inhibidores de kinasas dependientes de ciclina (CKI). En cuanto a la vía de señalización por la que la Cx43 logra modificar la expresión de estos genes reguladores del ciclo celular, hay que mencionar que el extremo carboxilo terminal citoplasmático de la Cx43 interacciona con un gran número de señales y proteínas de andamiaje. Existen estudios que indican que la interacción con la tirosina quinasa c-Src desencadena el efecto antiproliferativo (Herrero-González et al. 2010, citado *ad supra*). Cuando c-Src está activa fosforila los residuos Tyr247 y Tyr265 de la Cx43 provocando una inhibición de la comunicación intercelular. Pues bien, esta interacción entre la Cx43 y c-Src disminuye la alta actividad oncogénica de c-Src en las células de glioma de rata C6. Tanto es así que el mutante de Cx43 en Tyr247 y Tyr265, los residuos que fosforila c-Src, carece de actividad sobre la proliferación y sobre la expresión de estos reguladores del ciclo celular. En resumen, la Cx43 reduce la actividad oncogénica de c-Src y por tanto la proliferación de las células de glioma de rata C6 (Herrero-González et al. 2010, citado *ad supra*).

La solicitud de patente CN101966332 describe el uso de proteínas “gap junction”, en particular Cx43, para revertir el fenotipo maligno de una célula madre cancerígena. La solicitud de patente CA2321976 describe el uso de un vector retroviral para liberar en las células una proteína “gap junction”, tal como Cx43, restaurando la expresión de dichas proteínas “gap junction” y tratando así enfermedades como el cáncer. Sin embargo, el empleo de la proteína Cx43 en clínica presenta los inconvenientes de que su solubilización en agua a concentraciones eficaces es baja así como su internalización y correcto plegamiento en la célula, lo que hace necesario el empleo de vectores y terapia génica para su administración a un individuo.

Por otro lado, la solicitud de patente WO2007/084895 describe el empleo del extremo carboxilo terminal de Cx43 en la búsqueda de compuestos ó péptidos capaces de regular la actividad de Cx43 y su empleo en el tratamiento de arritmias y cáncer. Sin embargo, la búsqueda de dichos compuestos o péptidos es un proceso lento, en el que los péptidos de interés no siempre se acaban obteniendo, y en caso de obtenerse, es necesario comprobar a posteriori su efecto, lo que puede retrasar el tratamiento eficaz de tumores o cáncer.

En vista a lo expuesto en los párrafos anteriores, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar nuevos compuestos alternativos a los descritos en el estado de la técnica, que presenten los mismos efectos que la proteína Cx43 en la reversión del fenotipo de células madre tumorales y/o la inhibición de la proliferación celular, cuya eficacia en el tratamiento de tumores ya haya sido probada, pero que su administración no presente los inconvenientes mencionados en párrafos anteriores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Es conocido en el estado de la técnica que la conexina-43 (Cx43) revierte el fenotipo de las células madre de glioma humano, pero hasta ahora se desconocía qué parte de la proteína es responsable de dicho efecto. Los inventores han descubierto que dicho efecto reside en el extremo carboxilo terminal la Cx43, concretamente, en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1), y que péptidos que comprendan dicha secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 presentan el mismo efecto que la Cx43, siendo útiles en el tratamiento de tumores o cáncer.

Para averiguar que dicho efecto residía en la secuencia SEQ ID NO: 1, los inventores transfectaron por electroporación células madre de glioma humano con un vector conteniendo Cx43, y observaron que restaurando la expresión de Cx43 en dichas células se inhibía la actividad de c-Src, se revertía el fenotipo de célula madre y se inhibía la proliferación celular de las mismas. Además demostraron que el efecto de la Cx43 sobre el fenotipo de célula madre de glioma y sobre la proliferación se desencadena cuando Cx43 interacciona con c-Src. Una vez demostrado que el efecto de la Cx43 en las células madre de glioma dependía de su interacción con c-Src, se procedió a diseñar péptidos basados en la región de Cx43 que se une a c-Scr o en la región de Cx43 que se une a c-Src más la que se fosforila por c-Scr, en ambos casos unidos a una secuencia de internalización celular. A continuación, células madre de glioma se incubaron en presencia de estos péptidos y se observó que dichos péptidos tenían el mismo efecto que la proteína Cx43, es decir, eran capaces de revertir el fenotipo de célula madre y de inhibir la proliferación celular (ver Ejemplo 1). El conocimiento del mecanismo de acción de la Cx43 responsable de revertir el fenotipo de célula madre y de inhibir la proliferación celular permitió definir las regiones de la proteína que podrían desencadenar el efecto y por tanto el desarrollo de péptidos basados en dichas regiones que, al ser más pequeños que la propia proteína Cx43,

presentan una solubilización más alta que Cx43, no requieren un plegamiento complejo y su internalización en la célula es más fácil, lo que favorece su administración a un individuo en el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular o en las que hay implicadas células madre tumorales, tales como el cáncer, en particular, cáncer metastásico. Otra ventaja adicional es que al emplear sólo la región responsable de revertir el fenotipo de la célula madre tumoral y/o de inhibir la proliferación celular, se previene la aparición de efectos no deseados por interacción del resto de la Cx43 con otros efectores celulares. Por último, el empleo de péptidos tiene la ventaja añadida de que es posible unir secuencias de internalización celular a los péptidos para que, cuando son administrados a un individuo, estos puedan internalizarse en la célula para ejercer su efecto sin necesidad de emplear técnicas de terapia génica.

En base a este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos a continuación.

Péptido de la invención

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 [AYFNGCSSPTAPLSPMSP], de aquí en adelante “péptido de la invención”, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

La secuencia SEQ ID NO: 2 presenta la secuencia de aminoácidos
SPSKDCGSPKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTGDRNNSSCRNYNKQASEQNWANYSAEQN
RMGQAGSTISNSHAQPFDFPDDNQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRPDDLE
descrita en la Figura 1A de Sorgen et al.2004 (citado ad supra).

En el contexto de la presente invención se entiende por péptido a aquella molécula formada por la unión de entre 15 y 150 aminoácidos mediante enlaces peptídicos. No obstante, en una realización particular, el péptido de la invención tiene una longitud de entre 18 y 100 aminoácidos, preferiblemente, entre 18 y 50 aminoácidos. El experto en la materia entenderá que, cuanto más pequeño sea el péptido, más fácil será su administración y presentará menos efectos secundarios.

El péptido de la invención puede obtenerse por técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica, tales como síntesis química, recombinación genética, expresión del polinucleótido que codifica el péptido de la invención, etc. Todas estas técnicas son práctica de rutina para el experto en la materia.

Adicionalmente, los extremos carboxilo y amino terminal del péptido de la invención pueden estar protegidos contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo amino terminal puede estar en forma de grupo acetilo y/o el extremo carboxilo terminal puede estar en forma de grupo amida. También cabe la posibilidad de llevar acabo modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis, por ejemplo, en el que al menos un puente peptídico –CONH- se modifica y reemplaza por un enlace reducido (CH2NH), un enlace retroinverso (NHCO), un enlace oximetileno (CH2-O), un enlace tiometileno (CH2-S), un enlace cetometileno (CO-CH2), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH2), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace –CH=CH- . Los aminoácidos del péptido de la invención pueden estar en configuración D, que pueden dar lugar a péptidos resistentes a proteólisis. Los péptidos también pueden estabilizarse por cruzamiento intramolecular, por ejemplo, mediante la modificación al menos de dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales de oleofin, preferiblemente, cadenas alquenilo C3-C8, preferiblemente, cadenas pentel-2-il, seguidas de un entrecruzamiento de las cadenas tal como se describe en la tecnología denominada "*staple*" (Walensky *et al.,* 2004, Science 205: 1466-1470). Todos estos péptidos modificados de forma química para resistir a la proteolisis también están contemplados dentro de la presente invención.

Modificaciones adicionales al péptido de la invención comprenden la unión covalente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo carboxilo terminal o a un residuo de lisina, con la finalidad de disminuir su eliminación urinaria y la dosis terapéutica, y de incrementar la vida media del péptido en el plasma sanguíneo. La vida media del péptido también puede incrementarse mediante la inclusión del péptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para formar microesferas que son empleadas como un sistema de administración de fármacos. Polímeros y copolímeros son, por ejemplo, poli (D, L-lactido-co-glicólico) o PLGA. Las técnicas y procedimientos de cómo fabricar microesferas o nanocapsulas lipídicas para su empleo en la administración de fármacos son ampliamente conocidas por el experto en la materia.

Cualquier otro método de administración de fármacos dirigidos selectivamente a una población tumoral puede ser empleado en el contexto de la presente invención.

Asimismo, el péptido de la invención puede comprender en su secuencia de aminoácidos sustituciones de aminoácidos conservativas que no varían la capacidad del péptido de revertir el fenotipo de célula madre tumoral y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de una célula madre tumoral. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, también se contemplan péptidos derivados del péptido de la invención, denominados “variantes”, que aunque no presenten una identidad de secuencia del 100% con el péptido de la invención, conservan su capacidad de inhibir la proliferación celular, pues los aminoácidos han sido reemplazados por otros biológicamente similares. Ejemplo de un ensayo para averiguar si un péptido derivado del péptido de la invención presenta la capacidad de revertir el fenotipo de una célula tumoral y/o inhibir la proliferación celular se describe en el Ejemplo 1.

Tal como se ha explicado previamente, cualquier péptido que contenga en su secuencia de aminoácidos la SEQ ID NO: 1 tendrá capacidad de revertir el fenotipo de una célula madre tumoral y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, de inhibir la proliferación celular de una célula madre tumoral. Sin embargo en una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3:

SEQ ID NO: 3 - *DPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP*

Como entiende el experto en la materia, para que el péptido de la invención pueda revertir el fenotipo de célula madre y/o de inhibir la proliferación celular, es necesario que éste entre en la célula e interaccione con las correspondientes moléculas, principalmente, c-Src. La introducción del péptido en la célula puede hacerse por cualquiera de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como inyección directa, electroporación, transfección, etc. pero se trata de técnicas relativamente complejas y con limitaciones cuando se tienen que aplicar *in vivo* y acceder a toda la población de células tumorales. En caso de que el péptido vaya a administrarse a un individuo, el péptido puede introducirse en la célula mediante técnicas de terapia génica gracias el empleo de vectores virales, o mediante

secuencias de internalización celular que permiten a péptido atravesar la membrana plasmática.

Así, en una realización particular, el péptido de la invención se encuentra covalentemente unido a una secuencia de aminoácidos de internalización celular.

En la presente invención se entiende por “secuencia de aminoácidos de internalización celular” o “secuencia de internalización celular” o “péptidos de penetración celular” (CPPs) a las secuencias de aminoácidos que poseen la habilidad de transportar moléculas a través de la membrana plasmática, sin pérdida de su integridad. Entre las secuencias más empleadas se encuentran TAT, Antennapedia (Antp) y oligo-argininas, cuya característica en común es la presencia de grupos de aminoácidos catiónicos. Estas secuencias de internalización permiten la internalización del péptido directamente a la célula. Ejemplos de secuencias de internalización celular incluyen, pero no se limitan a, RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 7), VKKKKIKREIKI (SEQ ID NO: 8) [Guergnon J, et al. 2006. Mol Pharmacol. 69(4): 1115-24], FFLIPKG (SEQ ID NO: 9) [Ueda et al. 2012. Biomaterials, 35: 9061], SMoCs [Okuyama et al, 2007. *Nature Methods,* 4, 153 - 159], YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4), DSLKSYWYLQKFSWR (SEQ ID NO: 10), KLWMRWWSPTTRRYG (SEQ ID NO: 11), RLWMRWYSPWTRRWG (SEQ ID NO: 12), RLIMRIYAPTTRRYG (SEQ ID NO: 13), RLYMRYYSPTTRRYG (SEQ ID NO: 14), RLWMRWYSPRTRAYG (SEQ ID NO: 15), KRPTMRFRYTWNPMK (SEQ ID NO: 16), WKCRRQCFRVLHHWN (SEQ ID NO: 17), WKCRRQAFRVLHHWN (SEQ ID NO: 18), WKARRQAFRVLHHWN (SEQ ID NO: 19), la secuencia penetrante en células de glioma (Berges et al. Plos One 2012; 7(11):e49436) y *Biotin-YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS*-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 20).

En una realización particular, la secuencia de internalización celular comprende la SEQ ID NO: 4 (YGRKKRRQRRR).

La secuencia de internalización celular puede estar unida al péptido de la invención tanto al extremo amino terminal como al extremo carboxilo terminal del péptido. No obstante, en una realización particular, la secuencia de internalización celular se encuentra unida al extremo amino terminal del péptido.

Así, en el contexto de la presente invención, los péptidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 pueden llevar unido a su extremo amino o carboxilo terminal una secuencia de internalización celular. Por lo tanto, en una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 ó SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 5 - *YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPMSP*
SEQ ID NO: 6 - *YGRKKRRQRRRDPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP*

Tal como se ha indicado previamente, el péptido de la invención puede obtenerse por técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica, como la expresión en una célula del polinucleótido que codifica el péptido de la invención, y su posterior aislamiento. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido, de aquí en adelante “polinucleótido de la invención”, que codifica el péptido de la invención.

El término "polinucleótido", según se usa en la presente invención, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y similares). El polinucléotido de la invención puede ser ADN, ARN o cDNA.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, de aquí en adelante “construcción génica de la invención”, que comprende el polinucleótido de la invención.

Preferiblemente, la construcción comprende el polinucleótido de la invención operativamente unido a secuencias reguladoras de la expresión del polinucleótido de la invención. En principio, cualquier promotor puede ser utilizado en las construcciones génicas de la presente invención, siempre que dicho promotor sea compatible con las células en las que se desea expresar el polinucleótido.

Un promotor, o región promotora, es una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen determinado (secuencias nucleotídicas). En la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción del polinucleótido de la invención. Las secuencias promotoras pueden ser unidireccionales

o bidireccionales. Un promotor unidireccional es aquel que controla la transcripción de un gen o de más genes que se sitúan en tándem con el primero. “En tándem” se refiere a que el extremo 3’ del primer gen va seguido, bien consecutivamente o separados por una determinada secuencia nucleotídica, por el extremo 5’ del segundo gen. Un promotor bidireccional se refiere a la región promotora que controla la transcripción en dos direcciones opuestas, por ejemplo la secuencia que precede al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 que actúa como promotor bidireccional. Es decir, que un promotor bidireccional dirige la transcripción de dos genes situados de manera divergente, es decir en sentido opuesto, estando el extremo 5’ de ambas secuencias nucleotídicas más cercano entre sí que el extremo 3’. En la presente invención se utilizan los términos “promotor” y “región promotora” indistintamente. Además, los promotores en la presente invención pueden ser constitutivos o inducibles. El término “inducible”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de que el promotor tenga un elemento de control que permita activar o desactivar (reprimir) la transcripción del gen que regula, en presencia de un factor externo al promotor.

Promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar limitados a, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del polioma, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneina, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobuina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1 alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFKB/luz VV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II así como promotores específicos de tejido. Promotores de genes específicos de células gliales son, entre otros, GFAP, nestina y s-100. Promotores de células madre de glioma son, entre otros, Id1 y Sox-2.

Adicionalmente, la construcción génica de la invención puede contener marcadores o etiquetas que permiten el aislamiento del péptido de la invención una vez que es sintetizado en la célula.

Por otro lado, el polinucleótido o la construcción génica de la invención puede estar formando parte de un vector. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, de aquí en adelante “vector de la invención”, que comprende el polinucléotido o la construcción génica de la invención.

El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado, ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación o un vector de expresión. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIEl, pCRl, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFVHis, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Ze02, pTRACER HCMV, pUB6N5-His, pVAXl, pZeoSV2, pCl, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTl.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula, de aquí en adelante “célula de la invención”, que comprende un polinucleótido, una construcción génica o un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser

transformada, transfectada o infectada con una construcción o un vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

Células huésped adecuadas para la expresión del péptido de la invención incluyen, sin limitar a, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin limitar a, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus, Streptomyces y Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas.* Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces, Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha.* Células de insectos incluyen, sin limitar a, células de Drosophila y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, celulas ECCs humana 5 NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH Y MCF-7 y células hMSCs.

Usos del péptido de la invención

Los inventores han descubierto que el extremo carboxilo terminal la Cx43, concretamente, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y péptidos que comprendan dicha secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, son capaces de revertir el fenotipo de células madre tumorales y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre tumorales, tales como la células madre de glioma, lo que permite el empleo de los péptidos de la invención en el tratamiento de tumores o cáncer presentes en un sujeto.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica. Las técnicas y procedimientos para elaborar composiciones farmacéuticas son descritas más adelante.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores benignos o malignos.

En la presente invención se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se utilizar para tratar, aliviar o curar una enfermedad, en particular, tumores o cáncer.

En la presente invención se entiende por “tumor” a todo crecimiento de un tejido por la proliferación incontrolada de células. El tumor puede ser benigno o maligno. Se considera que un tumor es benigno cuando las células que forman el tumor no invaden otros tejidos ni causan metástasis en otras partes del cuerpo. Normalmente, el tumor benigno está bien encapsulado y las células no presentan cambios de estructura. Por el contrario, se considera que un tumor es maligno cuando las células que forman el tumor invaden los tejidos adyacentes, lo que se conoce como metástasis, y sus células presentan anaplasia. En general, los tumores malignos se conocen como cáncer. Así, en una realización particular, el tumor maligno es cáncer que, en otra realización más particular, es un cáncer metastásico Por otro lado, el tumor o cáncer (en caso de que sea maligno) puede estar localizado u originarse en cualquier tejido u órgano del cuerpo. Así, cualquier tumor o cáncer es susceptible de ser tratado con el péptido de la invención, independientemente de su estado de desarrollo, su origen o su localización. Ejemplos de cáncer incluyen, sin limitar a, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cuello de útero, etc. No obstante, en una realización particular, el tumor es un tumor cerebral (benigno o maligno), es decir, está localizado el cerebro.

En una realización particular, el tumor es un glioma. El glioma es un tipo de neoplasia que se produce en el cerebro o en la médula espinal. Se llama glioma, ya que surge a partir de células gliales. Su ubicación más frecuente es el cerebro aunque también puede presentarse en la médula espinal. Cualquier glioma puede ser tratado con la

composición farmacéutica elaborada con el péptido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector o la célula de la invención.

Los gliomas son nombrados de acuerdo con el tipo específico de células que más se asemejan, clasificándose en ependimonas (células ependimarias), astrocitomas (astrocitos) y oligodendrogliomas (oligodendrocitos), o según el grado de patología del tumor, pudiendo ser de bajo grado, es decir, los gliomas están bien diferenciados y son beningnos, o de alto grado, esto es, los gliomas son indiferenciados o anaplásicos.

En una realización particular, el glioma es un glioma seleccionado del grupo que consiste en un astrocitoma, un oligodendroglioma y un ependimoma que, en una realización todavía más particular, el astrocitoma es un glioblastoma multiforme.

Es conocido en el estado de la técnica de la existencia de células madre tumorales o cancerosas que, además de poseer las propiedades típicas de una célula madre, es decir, la autorenovación y la habilidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, son resistentes a los tratamientos convencionales y persisten en los tumores como una población distinta, causando la recaída y la metástasis del tumor al dar crecimiento u origen a nuevos tumores. Así, en una realización particular, el tumor comprende células madre, en particular, células madre tumorales.

Como se demuestra en los ejemplos que ilustran la presente invención, el péptido de la invención es capaz de revertir el fenotipo de las células madre tumorales y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre, más en particular, células madre tumorales, aún más particular, células madre de glioma.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención en elaboración de una composición farmacéutica para revertir el fenotipo de las células madre tumorales y/o inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre, más en particular, células madre tumorales, aún más particular, células madre de glioma.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención en elaboración de una composición farmacéutica para prevenir la proliferación celular y/o prevenir la metástasis del cáncer. En una realización particular, la prevención de la proliferación celular comprende la prevención de la proliferación celular de células madre, más en particular, células madre tumorales, aún en particular, células madre de glioma.

Además de las aplicaciones terapéuticas que pueden tener los péptidos de la invención y los aspectos inventivos derivados de él, también es posible su aplicación en ensayos experimentales *in vitro*. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con uso de un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención como reactivo para revertir *in vitro* el fenotipo de células madre tumorales y/o inhibir *in vitro* la proliferación celular. De nuevo, en una realización particular, la prevención de la proliferación celular comprende la prevención de la proliferación celular de células madre, más en particular, células madre tumorales, aún en particular, células madre de glioma.

En la presente invención se entiende por “revertir el fenotipo de células madre tumorales” a que las células madre tumorales pierdan sus características fenotípicas, es decir, su alto potencial tumorigénico (capacidad de generar tumores malignos) y su resistencia a las terapias convencionales en el tratamiento de tumores. Molecularmente, una célula madre tumoral cuyo fenotipo ha sido revertido se caracteriza por la elevada expresión de Id1, Sox2 y N-caderina, la baja expresión de Cx43 y E-caderina, y la alta actividad de c-Src. Así, en la presente invención se dice que “un péptido tiene la capacidad de revertir el fenotipo de células madre tumorales” cuando dicho péptido al entrar en contacto con las células madre tumorales origina que dichas células pierdan las características fenotípicas mencionadas. Ejemplo de un ensayo para comprobar si el fenotipo de una célula madre tumoral ha sido revertido es, por ejemplo, un estudio inmunocitoquímico, por PCR o por Western blot de la expresión de Id1, Sox2, N-caderina, E-caderina o cualquier otro marcador de célula madre.

En la presente invención se entiende por “inhibición de la proliferación celular” a la reducción, disminución, atenuación o bloqueo de la división o ciclo celular. Un ensayo para comprobar que la proliferación celular de una célula ha sido inhibida es, por

ejemplo, el ensayo colorimétrico con MTT tal como se describe en el Ejemplo 1 de la presente memoria.

En la presente invención se entiende por “sujeto” a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, en particular, un ser humano, de cualquier raza, sexo o edad.

Por otro lado, tal como se demuestra en el Ejemplo 1, los inventores han descubierto que la restauración de la Cx43 en células madre de glioma reduce o inhibe la actividad de c-Src y/o del regulador transcripcional Id1, consiguiendo con ello revertir el fenotipo de las células madre tumorales y/o la inhibición de la proliferación celular. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con uso de un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención como reactivo para inhibir *in vitro* la actividad de la proteína quinasa c-Scr o la actividad del regulador transcripcional Id1.

En otro aspecto, la invención se relaciona con uso de un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención para la identificación *in vitro* de compuestos reguladores o moduladores de la tumorigenicidad.

Composición farmacéutica de la invención

Tal como se ha explicado en el aspecto inventivo anterior, el péptido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector o la célula de la invención pueden emplearse en la elaboración de una composición farmacéutica.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, de aquí en adelante, composición farmacéutica de la invención, que comprende un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención se entiende por “composición farmacéutica” o “medicamento” a toda preparación o forma farmacéutica, cuya fórmula de composición expresada en unidades del sistema internacional, está constituida por una sustancia o mezcla de

sustancias, con peso, volumen y porcentajes constantes, elaborada en laboratorios farmacéuticos legalmente establecidos, envasada o etiquetada para ser distribuida y comercializada como eficaz para diagnóstico, tratamiento, mitigación y profilaxis de una enfermedad, anomalía física o síntoma, o el restablecimiento, corrección o modificación del equilibrio de las funciones orgánicas de los seres humanos y de los animales. La elaboración de la composición farmacéutica puede llevarse por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto o de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicho compuesto o dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Los vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse a, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender un adyuvante. Por "adyuvante" se entiende cualquier substancia que intensifica la efectividad de la composición farmacéutica de la invención. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, adyuvantes formados por sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc, formulaciones de emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite como la Adyuvante completo de Freunds (CFA) así como el Adyuvante incompleto de Freunds (IFA); geles minerales; copolimeros en bloque, Avridine™, SEAM62, adyuvantes formados por componentes de la pared celular de bacterias como adyuvantes que incluyan liposacaridos (P.ej. lipido A o Lipido A monofosforil (MLA), trealosa dimicolato (TDM), y componentes de el esqueleto de la pared celular (CWS), proteínas *heat shock* o sus derivados, adyuvantes derivados de toxinas bacterianas ADPribosilatinadas, que incluyen toxina de difteria (DT), toxina pertusis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas de *E.coli* lábiles al calor (LT1 y LT2), Endotoxina A y exotoxina de *Pseudomonas,* exoenzima B de

B.cereus, toxina de B. sphaerieus, toxinas C2 y C3 *de* C. *botulinum,* exoenzima de C. *limosum* así como las toxinas de C. *perfringens,* C. *spiriforma* and C. *diffieile,* S. *aureus,* EDIM y mutantes de toxina mutantes como la CRM-197, toxina mutante no toxica de la difteria; saponinas como las ISCOMs (complejos inmunoestimuladores), kemocinas quimioquinas y citoquinas como la interleuquinas (IL-I IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 12, etc), interferones (como el interferon gama) factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), Factor de necrosis tumoral (TNF), defensinas 102, RANTES, MIPl -.alpha,y MEP-2, péptidos muramil como los N- acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L- alanyl-Disoglutaminyl- L-alanine-2-(1 '-2'-dipalmitoyl-s- n-glycero-3 huydroxyphosphoryloxy)ethylamine (MTP-PE) etc; adyuvantes derivados de la familia de moléculas CpG, CpG dinucleótidos y oligonucleótidos sintéticos que comprendan motivos CpG, lisosum exoenzyma de C. *Limosum* y adyuvantes sintéticos como PCPP, la toxina del cólera, toxina de Salmonella, alumbre y similares, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-Ltreonil- D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, MTP-PE y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno a12%/Tween 80. Otros ejemplos de adyuvantes incluyen DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio), adyuvantes completo e incompleto de Freund y QuilA.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un agente quimioterapéutico.

Por "agente quimioterapéutico", se entiende cualquier substancia que es capaz de inhibir la proliferación celular sin matar a la célula necesariamente, o que es capaz de inducir la muerte celular. Los agentes capaces de inhibir la proliferación celular sin provocar muerte celular se denomina de forma genérica, agentes citostáticos, mientras que aquellos que son capaces de inducir la muerte celular normalmente mediante la activación de la apoptosis se denominan de forma genérica agentes citotóxicos. Ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen (i) agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos, paclitaxel, docetaxel, epothilonas y laulimalides, (ii) inhibidores de quinasas tales como Iressa(R), Gleevec, Tarceva™, (Erlotinib HCl), BAY-43-9006, (iii) anticuerpos específicos para receptors con actividad quinasa incluyendo, sin

limitación, Trastuzumab (Herceptin(R)), Cetuximab (Erbitux(R)), Bevacizumab (Avastin™), Rituximab (ritusan(R)), Pertuzumab (Omnitarg™); (iv) inhibidores de la ruta mTOR, tales como rapamicina y CCI-778; (v) Apo2L1Trail, (vi) agents anti-angiogenicos tales como endostatina, combrestatina, angiostatina, trombospondina y el inhibidor del crecimiento endothelial vascular (VEGI); (vii) vacunas antineoplásicas incluyendo células T activadas, agentes inmunopotenciadores inespecíficos (por ejemplo interferones, interleuquinas); (viii) agentes citotóxicos antibióticos tales doxorubicina, bleomcina, dactinomicina, daunorubicina, epirubicina, mitomicina y mitozantrona; (ix) agentes alquilantes tales como Melphalan, Carmustina, Lomustina, ciclofosfamida, ifosfamide, Clorambucilo, Fotemustine, Busulfano, Temozolomida y thiotepa; (x) agentes hormonales antineoplasticos tales como Nilutamida, acetato de ciproterona, anastrozol, Exemestano, Tamoxifeno, Raloxifeno, Bicalutamida, Aminoglutetimida, acetato de leuprorelina, citrato de Toremifeno, Letrozol, Flutamida, acetato de Megestrol y acetato de goserelina; (xi) hormonas gonadales tales como acetato de ciproterona y acetato de medoxiprogesterone; (xii) antimetabolitos tales como Citarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Topotecano, Hidroxyurea, Tioguanina, Metotrexato, Colaspasa, Raltitrexedo y capicitabina; (xiii) agentes anabólicos tales como nandrolone; (xiv) hormonas adrenales esteroideas tales como acetato de metilprednisolona, dexametasone, hidrocortisona, prednisolona y prednisona; (xv) agentes antineoplásicos tales como Carboplatino, Cisplatino, Oxaliplatino, Etoposido and Dacarbazina e (xvi) inhibidores de topoisomerasa tales como topotecana e irinotecano.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intratecal, intraventricular, intraarticular, intratumoral, oral, enteral, parenteral, intranasal, ocular o tópica. Una vía de administración preferida de las composiciones y/o formulaciones del compuesto de la invención para la prevención o el tratamiento de un cáncer es la vía intratumoral. Una vía de administración preferida de las composiciones y/o formulaciones del compuesto de la invención para la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide es la vía intraarticular. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención está formulada para su administración oral, parenteral, nasal o sublingual.

Kit de la invención

La administración del péptido de la invención requiere una serie de componentes que pueden disponerse juntos en forma de pack o kit.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante “kit de la invención”, que comprende un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención descritos en los aspectos inventivos anteriores junto a sus correspondientes realizaciones particulares.

Componentes útiles para la administración del péptido de la invención y que pueden estar comprendidos dentro del kit incluyen, pero no se limitan a, solución tampón, solución de lisis, material estéril (jeringuillas, hisopos, torundas, pinzas, etc.), agua destiladas, alcoholes (etanol), etc. Adicionalmente, el kit puede contener instrucciones o indicaciones que guíen al experto en la materia en la administración del péptido de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit para la determinación del efecto de dicho péptido sintético en la tumorigenicidad de una línea celular, para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o revertir *in vitro* el fenotipo de células madre tumorales, o para inhibir *in vitro* la actividad de la proteína quinasa c-Scr o la actividad del regulador transcripcional Id1.

Los términos y expresiones empleados en el presente aspecto inventivo ya han sido definidos en aspectos inventivos anteriores.

En una realización particular del kit de la invención, la prevención de la proliferación celular comprende la prevención de la proliferación celular de células madre, más en particular, células madre tumorales, aún en particular, células madre de glioma.

Método de tratamiento de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento y/o la prevención de tumores en un sujeto, tanto benignos como malignos (cáncer), que

comprende la administración a dicho sujeto de un péptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula según la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Dosis respuesta de la Cx43 sobre la actividad de c-Src en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con diferentes concentraciones (0,5, 1, 1,5 y 2 µg/µL) de plásmido Ires ó Ires-Cx43 y se recogieron las proteínas a las 48h después de la transfección. Western blot de c-Src Y416, c-Src total y Cx43. Se utilizó α-actinina como control de carga.

Figura 2. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre actividad y de c-Src en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con 1 µg/µL de plásmido Ires ó Ires-Cx43 y se recogieron las proteínas 2 y 5 días después de la transfección. a) Western blot de c-Src Y416, c-Src total, Cx43 y α-actinina. Los valores de c-Src Y416 (b) y c-Src total (c) fueron cuantificados y normalizados con α-actinina. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) y son medias ± SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresan como **$p < 0,01$ (test *t* de Student).

Figura 3. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre el crecimiento de las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con 1µg/µL de plásmido Ires ó Ires-Cx43. a) Fotomicrografías representativas en constrastes de fases que muestran la disminución de la densidad celular cuando transfectamos con Ires-Cx43. b) A partir de 3 h después de la transfección y durante 7 días se hicieron medidas del número de células viables por placa, mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan

como porcentaje del máximo valor de absorbancia a día 7 y son medias ± SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situación control se expresa como ** p<0,01 (test *t* de Student).

Figura 4. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre la expresión de la proteína Ki-67 en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con 1µg/µL de plásmido Ires ó Ires-Cx43. Se fijaron las células 2 y 5 días después de la transfección, para realizar una inmunocitoquímica tal y como se describe en Material y Métodos. a) Las fotomicrografías muestran la tinción nuclear con DAPI, la inmunocitoquímica de Ki-67 y la superposición de ambas, 2 y 5 días después de la transfección con los plásmidos. Las células que son positivas para Ki-67 se señalan con una flecha en la imagen superpuesta. Barra= 20µm. b) Porcentaje de células Ki-67 positivas 2 y 5 días después de la transfección. Se cuantificó el porcentaje de células Ki-67 positivas con respecto al número total de células (núcleos teñidos con DAPI). Los datos representados son medias ± SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a las situación control se expresa como * p<0,05 (test *t* de Student).

Figura 5. Efecto de la Cx43 sobre la expresión de Sox2, E-cadherina y N-cadherina en la línea de células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con 1µg/µL de plásmido Ires ó Ires-Cx43. Se cultivaron en condiciones e célula madre. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección. a) Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Sox2 transfección b) Doble inmunocitoquímica de Sox2 y Cx43 en células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43. c) Western blot de E-cadherina, Sox2, Cx43 y α-actinina. d) Doble inmunocitoquímica de N-cadherina y Cx43 en células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43.

Figura 6. Efecto de la Cx43 sobre la expresión de Id1 en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con 1µg/µL de plásmido Ires ó Ires-Cx43. Se cultivaron en medio de célula madre. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección. a) Fotomicrografías de contraste de fases e

inmunocitoquímica de Id1 b) Doble inmunocitoquímica de Id1 y Cx43 en células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43. c) Western blot de Id1, Cx43 y α-actinina.

Figura 7. Efecto de la inhibición de c-Src sobre la expresión de Id1 en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se resembraron a una densidad de 50000 células/cm^2 y se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores de c-Src, Dasatinib, Saracatinib y PP2. Usando siempre como control la misma concentración de DMSO, empleado como vehículo. Al cabo de 24 ó 48 horas se recogieron proteínas y se analizaron mediante análisis de transferencia tipo Western. a) Western de blot Id1, c-Src Y416, c-Src total y α-actinina. b) Western blot de Id1 y α-actinina.

Figura 8. Efecto de la inhibición de c-Src sobre la expresión de Sox2 , E-cadherina y N-cadherina en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre de glioma GliNS2 se resembraron a una densidad de 50.000 células/cm^2 y se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores de c-Src, Dasatinib, Saracatinib y PP2. Usando siempre como control la misma concentración de DMSO, empleado como vehículo. Al cabo de 24 ó 48 horas se recogieron proteínas y se analizaron mediante análisis de transferencia tipo Western.

Figura 9. Efecto del péptido TAT-Cx43Src sobre la expresión de Sox2, Id1, N-cadherina, E-cadherina, c-Src Y416 y c-Src total en las células madre de glioma GliNS2. Las células madre GliNS2 se resembraron a una densidad de 50000 células/cm^2 y se incubaron en presencia de los péptidos TAT ó TAT-Cx43Src a la concentración de 50 µM. Se recogieron muestras a las 24 y 48 horas y se analizaron mediante transferencia tipo Western. a) Secuencia del péptido penetrante que contiene la región de la Cx43 que interacciona con c-Src. La secuencia TAT es YGRKKRRQRRD (SEQ ID NO: 4), las tirosinas fosforiladas por c-Src aparecen en negrita y más grandes, la región de unión SH3 de c-Src aparece subrayada. b) Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Cx43 c) Western blot de Sox2, Id1, N-cadherina, E-cadherina, c-Src Y416, c-Src total y α-actinina.

Figura 10. Efecto del péptido TAT-Cx43S sobre la expresión de Sox2, Id1, N-cadherina, E-cadherina y c-Src Y416 en las células madre de glioma GliNS2. Las

células madre GliNS2 se resembraron a una densidad de 50.000 células/cm^2 y se incubaron en presencia de los péptidos TAT ó TAT-Cx43S a la concentración de 50 ó 100µM. Se recogieron muestras a las 24 horas y se analizaron mediante transferencia tipo Western. a) Secuencia del péptido penetrante que contiene la región de la Cx43 que interacciona con c-Src. La secuencia TAT es YGRKKRRQRRD (SEQ ID NO: 4), la región de unión SH3 de c-Src aparece subrayada. b) Western blot de N-cadherina, E-cadherina, c-Src Y416 y α-actinina. c) Western blot de Sox2, Id1, c-Src Y416, y α-actinina

EJEMPLO 1

Inhibición del fenotipo de célula madre y de la proliferación de células madre de glioma por un péptido penetrante basado en la secuencia de la conexina-43 que interacciona con c-Src

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos de células madre de glioma (GSC) humano:

Para llevar a cabo este trabajo se han empleado líneas de células madre de glioma caracterizadas y depositadas recientemente en Biorep (Steve Pollard, Austin Smith, Peter Dirks e Ian Clarke). Las células madre de glioma humano G144, G166, GliNS2 y G179 se han purificado a partir de glioblastomas después de la cirugía en cuatro diferentes pacientes. Estas células presentan las características de células madre de glioma humano, incluida la capacidad de autorrenovación, la diferenciación en distintos linajes neurales, la resistencia a terapias convencionales y lo más importante, presentan una alta capacidad de generar tumores muy agresivos, similares a los originales en los pacientes, cuando se xenotrasplantan en ratones inmunodeprimidos.

En todos estos casos, las células se han cultivado en medio de cultivo neurobasal suplementado con B27 al 2%, N2 al 1%, 20 ng/ml de EGF y 20 ng/ml bFGF, en placas de cultivo recubiertas con laminina, para generar cultivos de células adherentes. Gracias a su capacidad de autorenovación, cuando estas células se expanden en cultivos adherentes en estas condiciones de cultivo, mantienen las propiedades mencionadas anteriormente, es decir el fenotipo y genotipo cararterísticos de GSC, incluyendo su tumorigenicidad, durante más de 20 pases.

Preparación del plásmido con la secuencia de la Cx43 y transfección celular

Se ha seguido el método empleado habitualmente en el laboratorio (Herrero-González et al., 2010, citado *ad supra*). El cDNA de la conexina43 se obtuvo a partir de la línea de glioma humano GliNs2 y se clonó en el plásmido bicistrónico pIRESpuro2 (Clontech) que proporciona resitencia a puromicina. La secuencia obtenida se confirmó en el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca.

La transfección del vector vacio (Ires) o del vector que contiene la Cx43 (Ires-Cx43) en las células madre de glioma humano GliNs2 se realizó por electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron con 0,1 mg /ml de puromicina.

La transfección del vector vacio (Ires) o del vector que contiene la Cx43 (Ires-Cx43) en las células madre de glioma humano GliNs2 se realizó por electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron con 0,1 mg /ml de puromicina.

Tratamiento con inhibidores de la actividad de c-Src

Las células se trataron con dasatinib (1 ó 2 µM; Selleck Chemicals) o con el vehículo (DMSO) durante 24 horas en medio de cultivo.

Tratamiento con los péptidos objeto de la invención

Se diseñaron dos péptidos basados en la región de la Cx43 que interacciona con c-Src. El primero de ellos, comprende la secuencia de unión de la Cx43 con el dominio SH3 de c-Src [SEQ ID NO: 1 (AYFNGCSSPTAPLSPMSP)] y el segundo, además comprende la región de la Cx43 que incluye a las dos tirosinas que fosforila c-Src [SEQ ID NO: 3 (DP**Y**HATSGALSPAKDCGSQK**Y**AYFNGCSSPTAPLSPMSP)] (las tirosinas aparecen marcadas en negrita). A estas secuencias se les añadió la secuencia TAT de internalización celular SEQ ID NO: 4 [YGRKKRRQRRR]. El resultado final fueron dos secuencias internalizantes basadas en la región de unión de la Cx43 con c-Src (SEQ ID NO: 5) y en la región de unión de la Cx43 con c-Src junto con la región de la Cx43 fosforilable por c-Src (SEQ ID NO: 6).

SEQ ID NO: 5 - YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPMSP

SEQ ID NO: 6 - YGRKKRRQRRRDPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP

La síntesis y purificación de estos péptidos (>90% pureza) fue llevada a cabo por

GenScript. La secuencia SEQ ID NO: 4 se utilizó como control.

La internalización de los péptidos se consiguió solubilizándolos en agua y añadiéndolos al medio de cultivo a 37ºC durante 24 o 48 horas. Estos péptidos se emplearon a concentraciones de 50-100 µM

Determinación de la actividad de c-Src.

La actividad de c-Src depende de su autofosforilación en Tyr416 que aumenta su actividad catalítica. Por otro lado, la fosforilación en Tyr527 inhibe su actividad. Por tanto para deteminar la actividad de c-Src se analizaron los niveles de c-Src fosforilada en Tyr416 y en Tyr527.

Análisis de transferencia tipo Western.

El análisis de transferencia de tipo "Western" se realizó siguiendo el método empleado habitualmente en el laboratorio. Brevemente, se trata de homogeneizar las células en cultivo, en tampón Tris que contiene SDS, EDTA, EGTA y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se realizaron electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa donde se realizó la inmunodetección. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario deseado seguido de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. La detección se realizó por quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones del fabricante (Luminol; Santacruz). Los anticuerpos empleados y las diluciones fueron los siguientes: Cx43 (Transduction Laboratories 610062, 1:250), Y416-Src (Cell Signaling Technology 2101, 1:250), total-Src (Cell Signaling Technology 2108 and 2110, 1:500), Id1 (Santa Cruz Biotechnolgy Inc. sc-488, 1:500), Sox2 (Abcam ab97959, 1:1000), E-cadherin (S Santa Cruz Biotechnolgy Inc sc-7870, 1:100), N-cadherin (Santa Cruz Biotechnolgy Inc sc-7939, 1:500). Los anticuerpos contra GAPDH (Applied Biosystems AM4300, 1:5000) o α-actinin (Merk Millipore MAB1682, 1:1000) se emplearon como control de carga.

Inmunocitoquímica.

Las células se fijaron con paraformaldehido al 4%, durante 20 min. Después de sucesivos lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo primario. Las diluciones empleadas y las características de los anticuerpos fueron las siguientes: Cx43 (Transduction Laboratories 610062, 1:200), Id1 (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-488, 1:500), Sox2 (Abcam ab97959 1:500), Ki-67 (Sigma P6834, 1:200), N-cadherin

(Santa Cruz Biotechnology Inc sc-7939, 1:200). Al cabo de 12 horas a 4ºC, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia, diluido en PBS que contiene 10% de FCS, 0,1 M glicina y 0,02% azida sódica. Después de 1 hora las células se lavaron con PBS y se añadió medio de montaje para su observación en un microscopio invertido de fluorescencia o en un microscopio confocal, con los filtros adecuados. En todos los casos se llevaron controles empleando exclusivamente el anticuerpo secundario.

Curvas de crecimiento mediante el ensayo colorimétrico con MTT:

Para realizar este estudio las células se sembraron a baja densidad y se determinó el número de células viables a lo largo de los diferentes días en cultivo. Para ello se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con 300 µl de PBS en presencia de MTT (0,5 mg/ml), durante 75 minutos, en oscuridad, a 37ºC, en un incubador de CO_2. Posteriormente se retiró el medio, y se añadieron 500 µl de DMSO. Se procedió a agitar las células en oscuridad durante 10 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm.

RESULTADOS

Efecto de la restauración de la conexina43 sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las células madre de glioma GliNS2.

Como se ha descrito en la introducción, los gliomas están compuestos de una población heterogénea de células, algunas de ellas con características de células madre, estás son las llamadas células madre del glioma. Estás células se caracterizan por su capacidad de autorenovación, la generación de múltiples tipos de células, su alto potencial oncogénico, y la resistencia a los tratamientos convencionales. Recientemente hemos demostrado que la Cx43 reduce la actividad oncogénica de cSrc en células de glioma de rata C6, por tanto, en este trabajo quisimos investigar, en primer lugar si la Cx43 afecta también a la actividad de c-Src en las células madre de glioma. Para ello, las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron por electroporación con diferentes concentraciones de la construcción Ires-Cx43 o con el vector vacío Ires. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante la técnica de Western blot. En la figura 1 se observa un aumento de expresión de la Cx43, a medida que aumenta la concentración de plásmido IresCx43. En este mismo experimento analizamos la actividad de c-Src y, como se puede observar, las células transfectadas

con el plásmido que contiene Cx43 tienen menos Src activo, incluso a las concentraciones más bajas de plásmido. Después de analizar estos resultados, seleccionamos la concentración de 1 µg/µL para restaurar los niveles de expresión de Cx43 sin sobreexpresar esta proteína.

A continuación, estudiamos el efecto de la restauración de la Cx43 sobre la actividad de c-Src a diferentes tiempos. La figura 2 muestra que la transfección con Ires-Cx43 disminuyó aproximadamente un 35% y un 25% la forma activa de c-Src, 2 y 5 días después de la transfección, respectivamente. Sin embargo, los niveles de c-Src total no se modificaron significativamente con la restauración de la Cx43.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la transfección de la Cx43 en las células de glioma C6 disminuye considerablemente la velocidad de proliferación de estas células. Por ello, una vez comprobado que la restauración de la Cx43 disminuye la actividad de c-Src en las células madre de glioma humano, y teniendo en cuenta que c-Src es un proto-oncogén con una importante función en la regulación de la proliferación, decidimos estudiar la velocidad de proliferación en estas circunstancias. Para ello, las células madre de glioma GliNS2, se transfectaron con 1 µg/µL de los plásmidos Ires e Ires-Cx43 y se determinó el número de células vivas por placa mediante el ensayo de absorbancia de MTT desde las 3 horas hasta los 7 días después de la transfección. En las imágenes de contraste de fases (figura 3A) se observa que la restauración de la Cx43 redujo la densidad celular a los 5 días después de la transfección. De hecho, la figura 3B muestra que las células transfectadas con Cx43 (Ires-Cx43) tienen una curva de crecimiento analizada por MTT, menor que las células transfectadas con el plásmido vacío (Ires), siendo esta diferencia altamente significativa al cabo de 5 y 7 días.

Puesto que la determinación de Ki-67 da un idea del estado proliferativo de las células, analizamos si la diminución del crecimiento se debía a una disminución en la proliferación de estas células. Para ello, se realizaron inmunocitoquímicas contra Ki-67. La figura 4A muestra imágenes, de las células GliNS2 transfectadas con Ires o Ires-Cx43. Las células se tiñeron con colorante fluorescente DAPI (que tiñe la totalidad de los núcleos) y con el anticuerpo contra Ki-67, mostrándose imágenes de ambas tinciones en el mismo campo. Nuestros resultados muestran que 2 días después de la transfección hay menos núcleos Ki-67 positivos en las células que hemos restaurado

la Cx43. Después de 5 días no se observan diferencias. La figura 4B muestra el porcentaje de núcleos Ki-67 positivos con respecto al número total de núcleos, 2 y 5 días después de la restauración de la Cx43. Se observa una disminución significativa del porcentaje de núcleos Ki-67 positivos, 2 días después de la transfección con el vector Ires-Cx43 comparadas con las células transfectadas con el vector vacío. Cinco días después de la transfección no se observan diferencias significativas.

Por tanto, la restauración de la Cx43 en células madre de glioma reduce la actividad de c-Src y la velocidad de proliferación. Puesto que c-Src es un importante regulador de la autorenovación de las células madre, se podría sugerir que la inhibición de la proliferación es consecuencia de la inhibición en la actividad de c-Src provocada por la Cx43.

Efecto de la restauración de la conexina43 sobre el fenotipo característico de células madre de glioma.

Muchos autores sugieren que el fenotipo de célula madre es reversible, siendo éste un punto crítico para la búsqueda de una nueva estrategia terapéutica. De hecho, se ha demostrado que transfectando Cx43 en células madre de glioma, obtenidas de la línea celular U87 y cultivadas en condiciones de diferenciación, se reduce la expresión de algunos marcadores de células madre, como Sox2 y aumenta la expresión de E-cadherina. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue determinar si este efecto de la Cx43 tenía lugar en las células madre GliNS2. Para ello, se analizó la expresión de Sox-2 y E-caderina en las condiciones experimentales del presente estudio. En la figura 5A se muestran fotomicrografías de la inmunocitoquímica de Sox2 en las células transfectadas. Los resultados indican que los niveles de Sox2 disminuyen en las células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43, comparadas con células transfectadas con el plásmido Ires. Más específicamente, Sox2 disminuye en las células que contienen niveles muy altos de Cx43 (figura 5B). La figura 5C muestra el Western blot que confirma la disminución de Sox2 y el aumento de E-cadherina en las células GliNS2 en las que se ha restaurado la Cx43.

Numerosos estudios han mostrado que la pérdida de E-cadherina en tumores en muchas ocasiones se acompaña de una ganancia de N-cadherina, lo que promueve la movilidad e invasión de las células. Por tanto, quisimos determinar la expresión de N-cadherina en las condiciones experimentales de este estudio. La figura 5D muestra

que en las células GliNS2 que expresan Cx43 disminuye la expresión de N-cadherina, sugiriendo que la Cx43 promueve el cambio en la expresión de las isoformas de cadherinas en las células madre de gliomas. Es decir, se produce un cambio de E-cadherina por N-cadherina.

Tanto la expresión de Sox2 como el cambio de N-cadherina a E-cadherina están reguladas por el inhibidor de diferenciación Id1. Esta proteína se une a los factores de transcripción de tipo bHLH implicados en la diferenciación celular e impide su interacción con el DNA. El regulador transcripcional Id1 juega un papel crítico modulando la invasividad en células de glioma y la expresión de marcadores mesenquimales. Por tanto, decidimos investigar si Id1 participaba en los cambios de expresión de Sox2 y en el intercambio de N-cadherina por E-cadherina promovido por la Cx43. Para ello, siguiendo el mismo protocolo experimental, se analizó la expresión de Id1. En la figura 6A se muestra la inmunocitoquímica de Id1, apreciándose que los niveles de Id1 disminuyen en las células que expresan Cx43 comparadas con células transfectadas con el plásmido Ires. Más específicamente, Id1 disminuye en células que contienen niveles más altos de Cx43 (figura 6B). El Western blot de la figura 6C confirmó la disminución de Id1 en las células en las que se ha restaurado la Cx43.

Por tanto, la reducción en la expresión de Sox-2 y el cambio de N-caderina por E-caderina están ocasionados por la reducción en los niveles de Id1 observados tras la restauración de la Cx43 en células madre de glioma.

Estudio de la participación de c-Src en el efecto de la conexina43 sobre el fenotipo de célula madre.

Hay que mencionar que la expresión de Id1 está regulada por la actividad de c-Src en distintos tipos de células tumorales, aunque no hay nada descrito de esta relación en gliomas. Aquí se muestra que la Cx43 disminuye la actividad de c-Src, la expresión de Id1, de Sox2 y el cambio de expresión de caderinas. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue determinar si c-Src era el mediador en el efecto de la Cx43 sobre el fenotipo de células madre de glioma. Para ello, en primer lugar se analizó el efecto de la inhibición de c-Src en la expresión de Id1 en las células madre de glioma. Las células GliNS2 se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores de la actividad de c-Src: dasatinib, saracatinib y PP2. Se uso siempre como control DMSO,

que es el vehículo empleado para disolver estos inhibidores. Las células se procesaron para analizar por Western blot al cabo de 24 y 48 horas.

La figura 7A muestra como la inhibición de la actividad de c-Src con dasatinib, disminuye los niveles de expresión de Id1 respecto al control, a las dos concentraciones y tanto a 24 como a 48 horas. Estos resultados se corroboraron con saracatinib y PP2 (figura 7B).

Como se ha mencionado Id1 regula la expresión de Sox2 y promueve el cambio de N-cadherina por E-cadherina contribuyendo a la reducción del fenotipo mesenquima. Por lo tanto, estudiamos el efecto de la inhibición de la actividad de c-Src sobre la expresión de Sox2 y el cambio de cadherinas. Para ello, se inhibió la actividad de c-Src con dasatinib usando como control DMSO. En la figura 8A se observa como al inhibir la actividad de c-Src disminuyó la expresión de Sox2 y N-cadherina con el consiguiente aumento de E-cadherina (figura 8B).

Por tanto, la inhibición de c-Src ejerce el mismo efecto que la restauración de la Cx43 en las células madre de glioma. Es decir, reduce los niveles de Id1 y Sox2 y promueve un cambio de N- a E-caderina.

Efecto de los péptidos penetrantes basados en la región de la conexina43 que interacciona con c-Src sobre el fenotipo de célula madre.

Una vez conocido el efecto de la inhibición de c-Src sobre el fenotipo de las células madre de glioma se procedió a confirmar la participación de c-Src en el efecto de la Cx43 sobre el cambio de fenotipo de las células madre de glioma. Para ello, se diseñaron dos péptidos penetrantes basados en la región de la Cx43 que interacciona con c-Src. Uno de ellos, el péptido TAT-Cx43Src [SEQ ID NO: 6] incluye el dominio de unión a c-Src y las dos tirosinas que fosforila esta kinasa (figura 9A), fusionado a la secuencia penetrante TAT [YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4)]. El otro péptido TAT-Cx43S [SEQ ID NO: 5] incluye el dominio de unión a c-Src (figura 10A) fusionado a la secuencia penetrante TAT [YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4)].

Por tanto, las células GliNS2 se incubaron con el péptido TAT-Cx43Src, TAT-Cx43S o con el péptido TAT, usado como control, durante 24 ó 48 horas. En la figura 9B se muestra una inmunocitoquímica de Cx43, 24 horas después de la incubación con el

péptido. Como se puede observar, el péptido TAT-Cx43Src se internaliza muy eficazmente en todas las células del cultivo. Como es de esperar, las células incubadas con el péptido TAT no muestra expresión de la Cx43. Por otro lado, el Western blot muestra que el péptido TAT-Cx43Src disminuyó transitoriamente la actividad de Src en las células madre de glioma. Así, los niveles de c-Src Y416 descendieron a las 24 horas y se recuperaron a las 48 horas. Además, estos resultados muestran que TAT-Cx43Src disminuyó la expresión de Id1, N-cadherina (solo a las 48 horas) y Sox2 mientras que la expresión de E-cadherina aumentó comparada con el péptido control TAT (figura 9C). Por su parte, el péptido TAT-Cx43S también disminuyó la actividad de Src (figuras 10B y 10C) y revertió el fenotipo de las células madre de glioma, ya que redujo la expresión de Id1, Sox2 y N-caderina mientras que la expresión de E-cadherina aumentó comparada con el péptido control TAT (figura 10B).

Por tanto, la región de la Cx43 que interacciona con c-Src es suficiente para revertir el fenotipo en las células madre de glioma, confirmando que la Cx43 ejerce este efecto antitumorigénico a través de c-Src.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido tiene una longitud de entre 18 y 100 aminoácidos.

3. Péptido según la reivindicación 1 ó 2, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido se encuentra covalentemente unido a una secuencia de aminoácidos de internalización celular.

5. Péptido según la reivindicación 4, en el que la secuencia de aminoácidos de internalización celular se encuentra unido al extremo amino terminal del péptido.

6. Péptido según la reivindicación 4 ó 5, en el que la secuencia de internalización celular comprende la SEQ ID NO: 4.

7. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el péptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 ó SEQ ID NO: 6.

8. Un polinucleótido que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 8.

10. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 9.

11. Vector según la reivindicación 10, en el que el vector es un vector viral, en particular, un retrovirus, un lentivirus o un adenovirus.

12. Una célula que comprende un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9 o un vector según la reivindicación 10 u 11.

13. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, en elaboración de una composición farmacéutica.

14. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, en elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores benignos o malignos.

15. Uso según la reivindicación 14, en el que el tumor maligno es cáncer.

16. Uso según la reivindicación 15, en el que el cáncer es metastásico.

17. Uso según la reivindicación 15 ó 16, en el que el tumor es un tumor cerebral.

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el tumor es un glioma.

19. Uso según la reivindicación 18, en el que el glioma es un glioma seleccionado del grupo que consiste en un astrocitoma, un oligodendroglioma y un ependimoma.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que astrocitoma es un glioblastoma multiforme.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en el que el tumor comprende células madre, en particular, células madre tumorales.

22. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, en elaboración de una composición farmacéutica para prevenir la proliferación celular y/o prevenir la metástasis del cáncer.

23. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, como reactivo para inhibir *in vitro* de la proliferación celular y/o revertir el fenotipo de las células madre tumorales.

24. Uso según la reivindicación 22 o 23, en el que la prevención o la inhibición de la proliferación celular comprende la prevención o la inhibición de la proliferación celular de células madre, en particular, células madre tumorales, más en particular, células madre de glioma.

25. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, como reactivo para inhibir *in vitro* la actividad de la proteína quinasa c-Scr o la actividad del regulador transcripcional Id1.

26. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, para la identificación *in vitro* de compuestos reguladores o moduladores de la tumorigenicidad.

27. Composición farmacéutica que comprende péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12, en una cantidad terapéuticamente efectiva, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. Composición farmacéutica según la reivindicación 27 que comprende, además, un agente quimioterapéutico.

29. Composición farmacéutica según la reivindicación 27 ó 28, en el que dicha composición está formulada para su administración oral, parenteral, nasal o sublingual.

30. Kit que comprende péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, una construcción génica según la reivindicación 9, un vector según la reivindicación 10 u 11, o una célula según la reivindicación 12.

31. Uso del kit según la reivindicación 30, para la determinación del efecto de dicho péptido sintético en la tumorigenicidad de una línea celular, para inhibir *in vitro* de la proliferación celular y/o revertir el fenotipo de las células madre tumorales o para inhibir *in vitro* la actividad de la proteína quinasa c-Scr o la actividad del regulador transcripcional Id1.

32. Uso según la reivindicación 31, en el que la inhibición de la proliferación celular comprende inhibición de la proliferación celular de células madre tumorales, en particular, células madre de glioma.

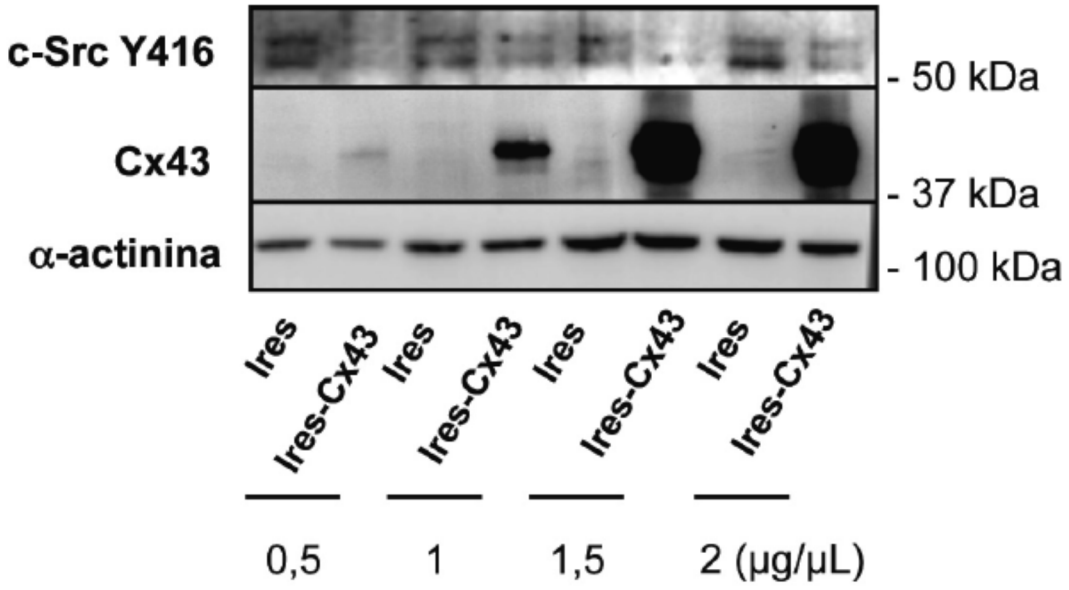
c-Src Y416
Cx43
α-actinina
- 50 kDa
- 37 kDa
- 100 kDa
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43
0,5
1
1,5
2 (µg/µL)

FIG. 1

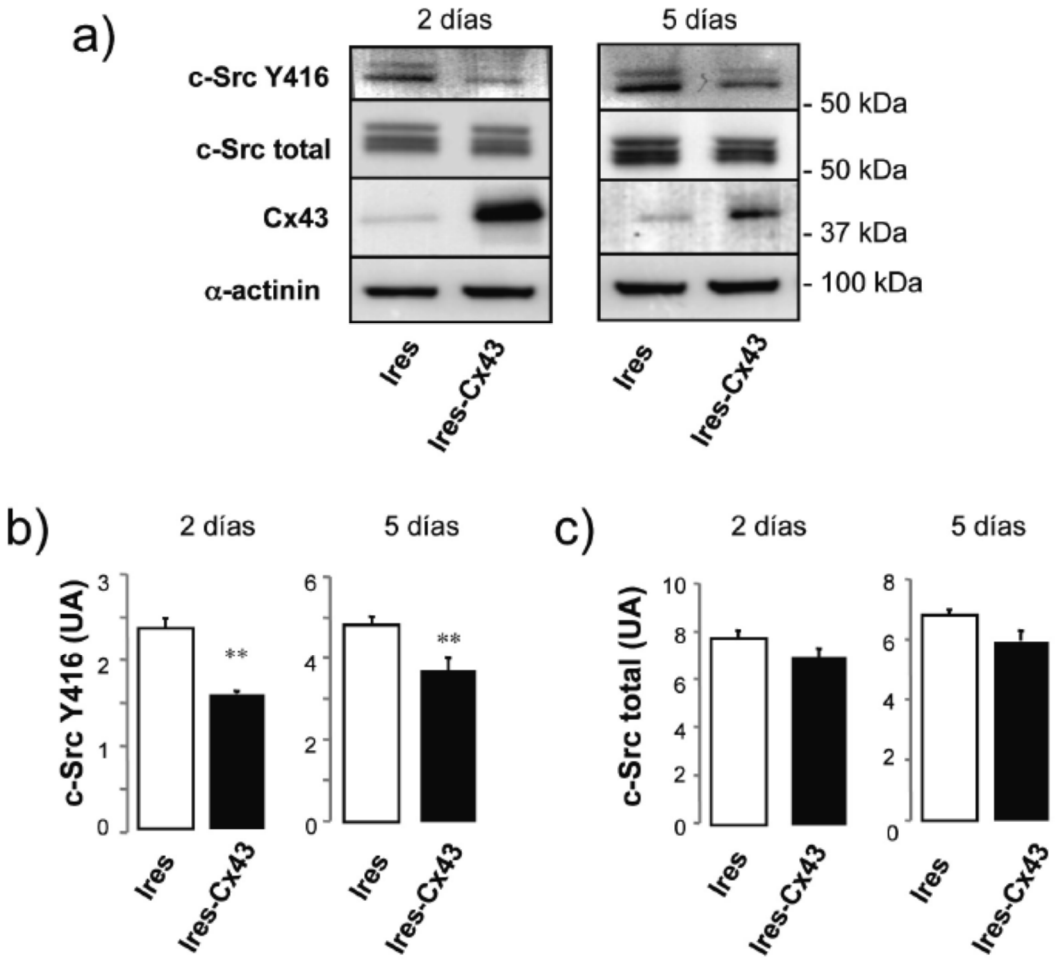
a)
2 días
5 días
c-Src Y416
c-Src total
Cx43
α-actinin
- 50 kDa
- 50 kDa
- 37 kDa
- 100 kDa
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43
b)
2 días
5 días
c-Src Y416 (UA)
**
**
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43
c)
2 días
5 días
c-Src total (UA)
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43

FIG. 2

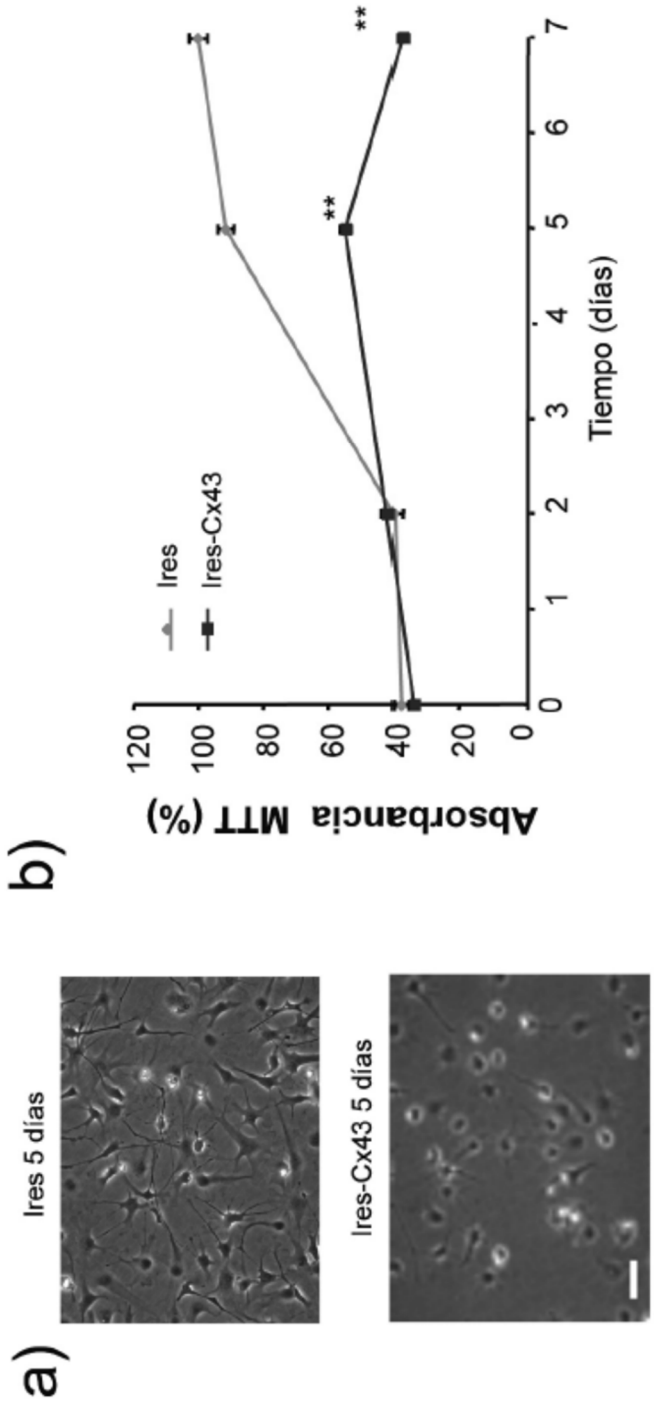
a)
Ires 5 días
Ires-Cx43 5 días
b)
Absorbancia MTT (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
Tiempo (días)
Ires
Ires-Cx43
**
**

FIG. 3

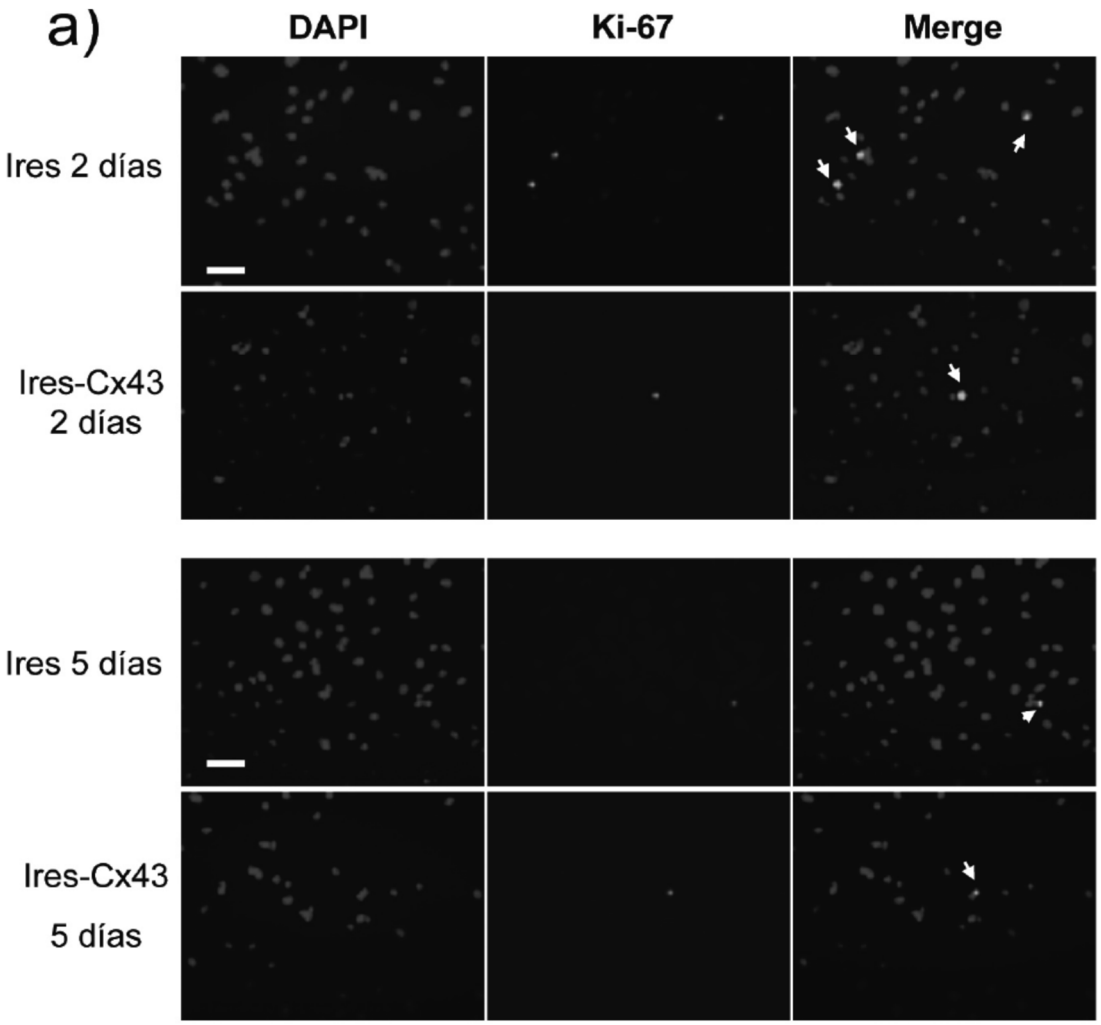
a)
DAPI
Ki-67
Merge
Ires 2 días
Ires-Cx43
2 días
Ires 5 días
Ires-Cx43
5 días

FIG. 4

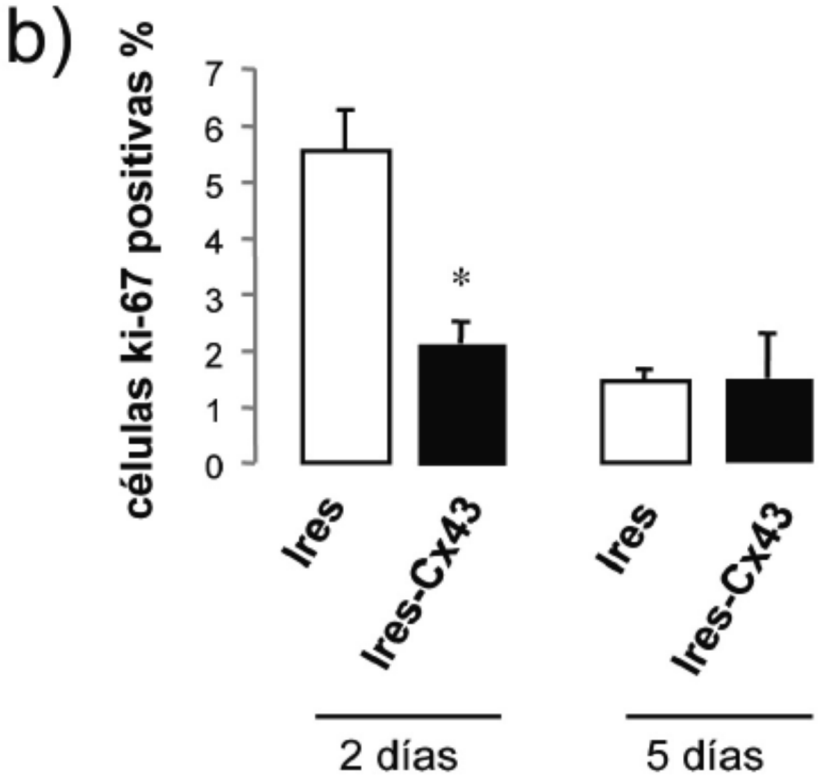
b)
células ki-67 positivas %
7
6
5
4
3
2
1
0
*
Ires
Ires-Cx43
Ires
Ires-Cx43
2 días
5 días

FIG. 4

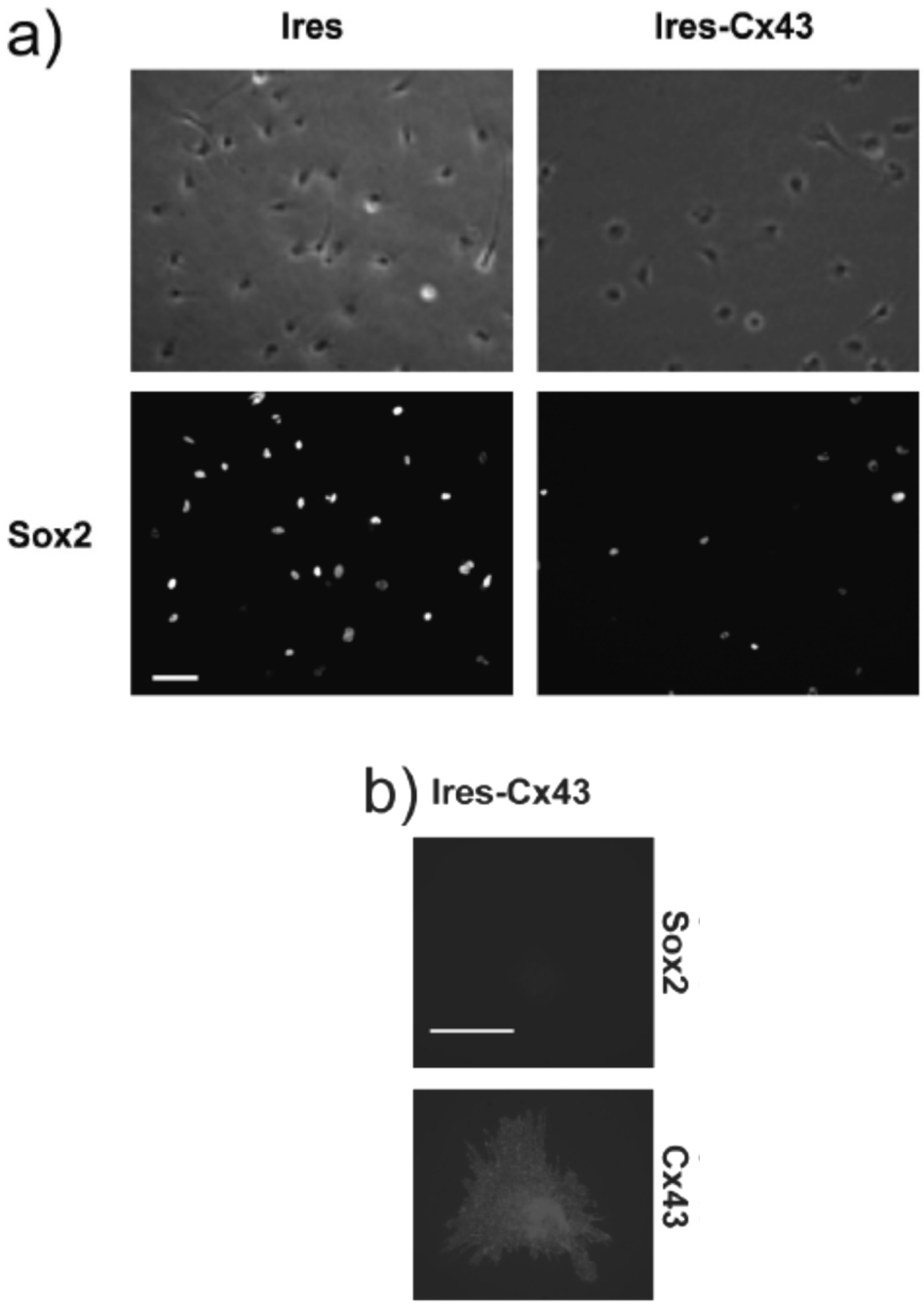

FIG. 5

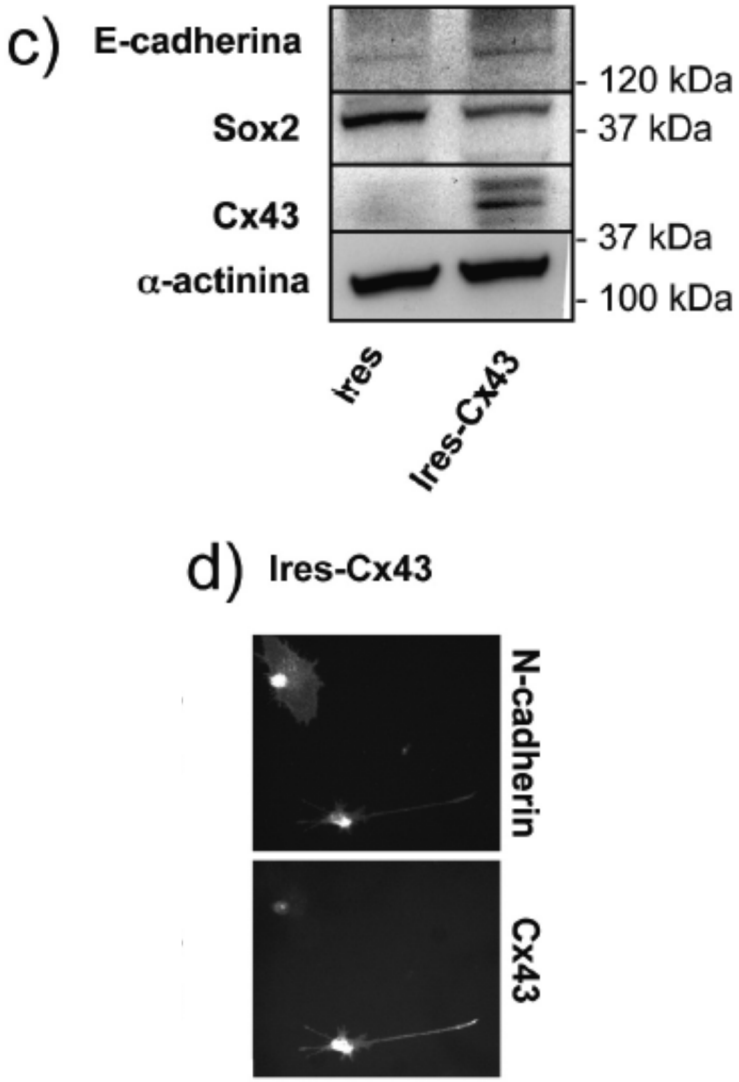
c)
E-cadherina
Sox2
Cx43
α-actinina
120 kDa
37 kDa
37 kDa
100 kDa
Ires
Ires-Cx43
d)
Ires-Cx43
N-cadherin
Cx43

FIG. 5

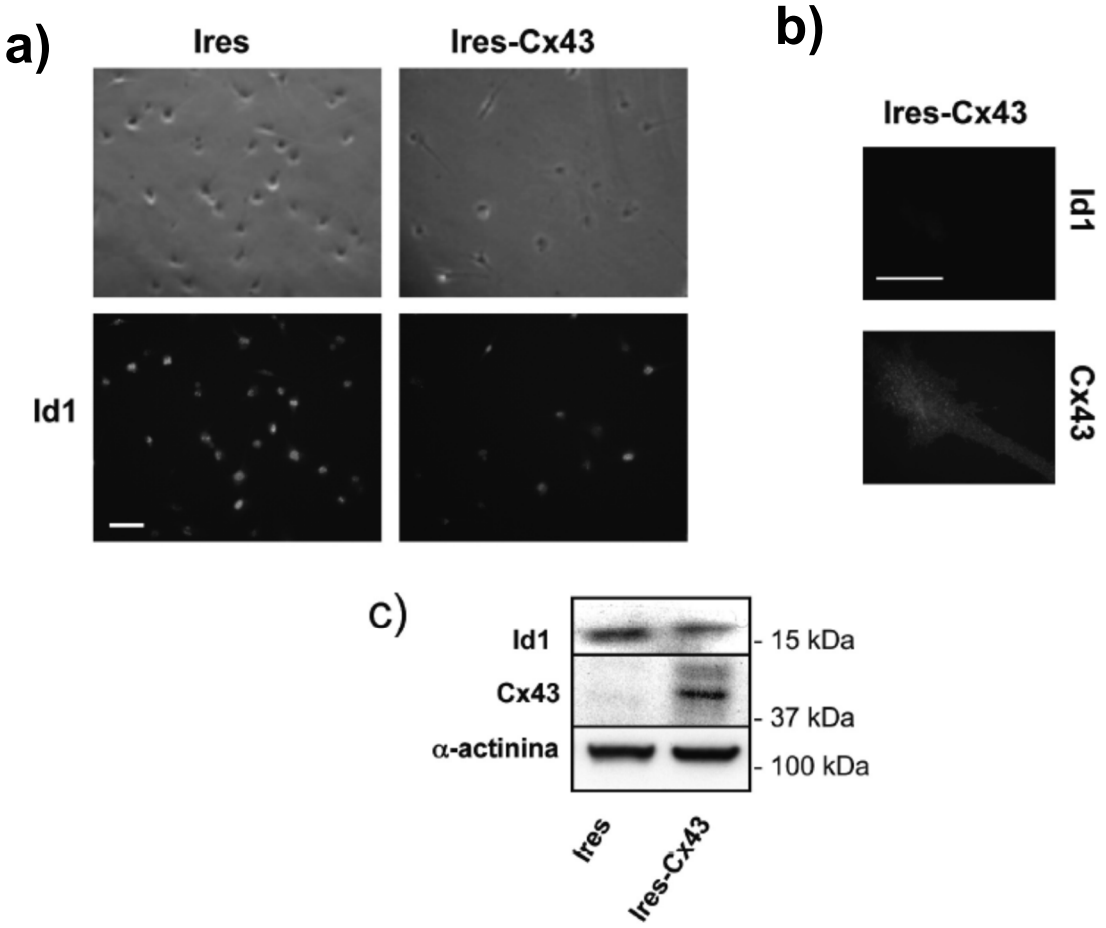
a)
Ires
Ires-Cx43
Id1
b)
Ires-Cx43
Id1
Cx43
c)
Id1
Cx43
α-actinina
- 15 kDa
- 37 kDa
- 100 kDa
Ires
Ires-Cx43

FIG. 6

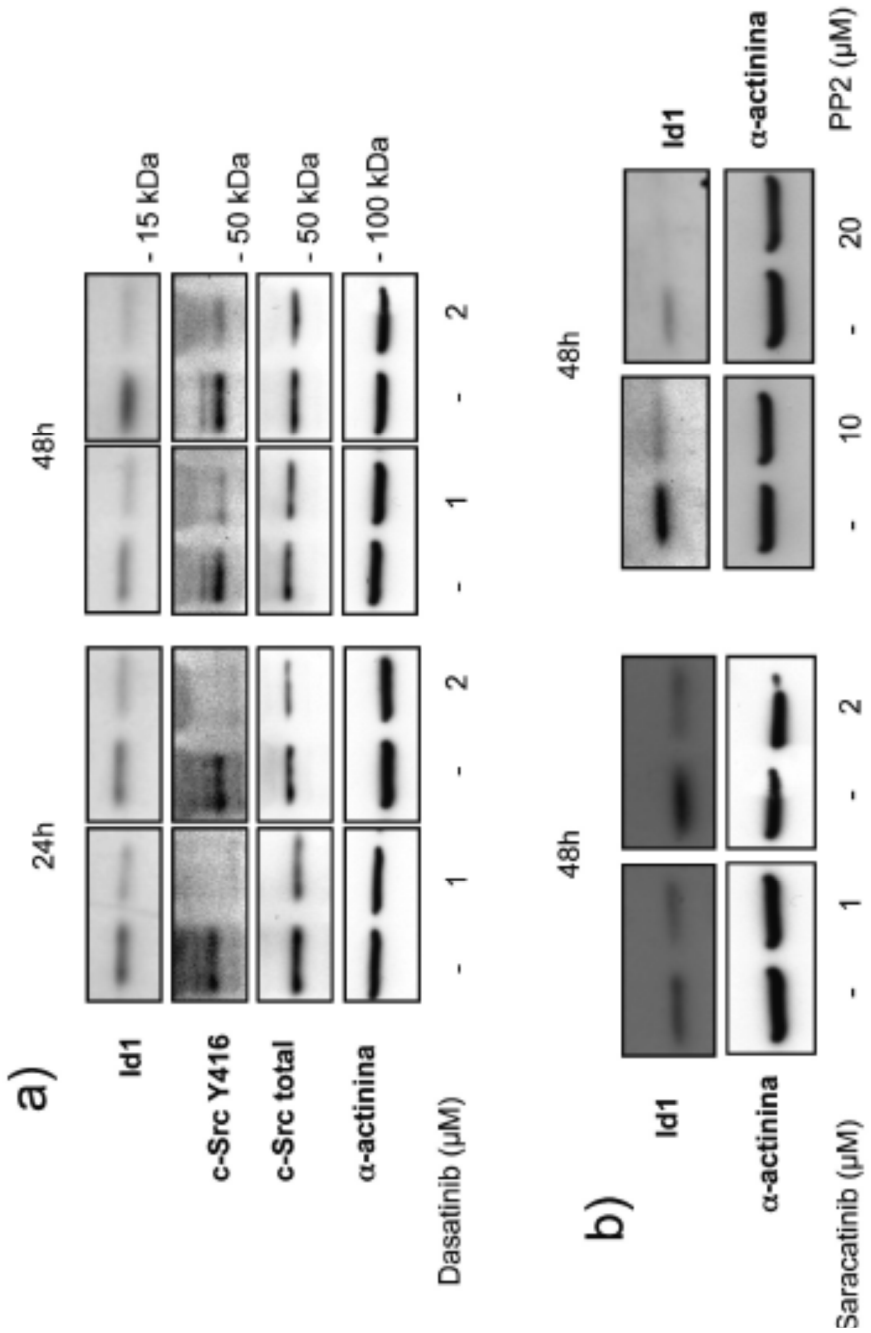
a)
24h
48h
Id1
c-Src Y416
c-Src total
α-actinina
- 15 kDa
- 50 kDa
- 50 kDa
- 100 kDa
Dasatinib (μM)
-
1
-
2
b)
Id1
α-actinina
Saracatinib (μM)
PP2 (μM)
10
20

FIG. 7

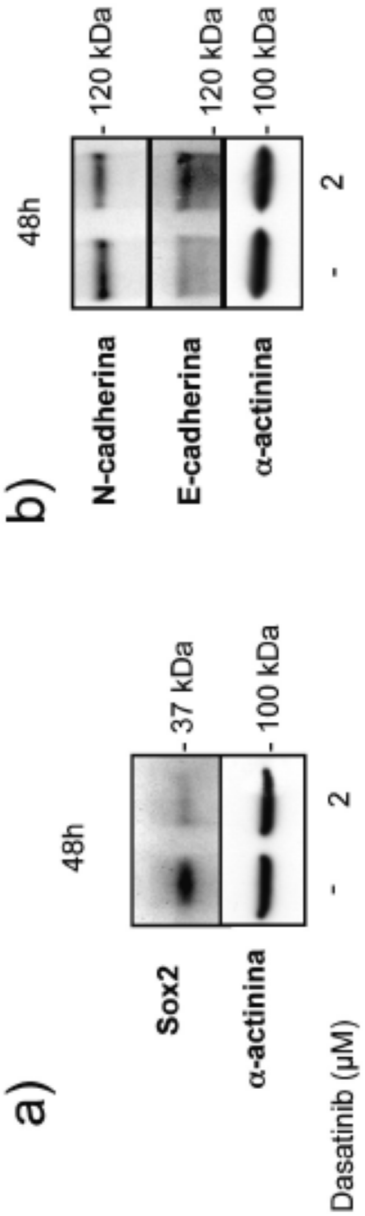
a)
48h
Sox2
α-actinina
- 37 kDa
- 100 kDa
Dasatinib (μM)
-
2
b)
48h
N-cadherina
E-cadherina
α-actinina
- 120 kDa
- 120 kDa
- 100 kDa
-
2

FIG. 8

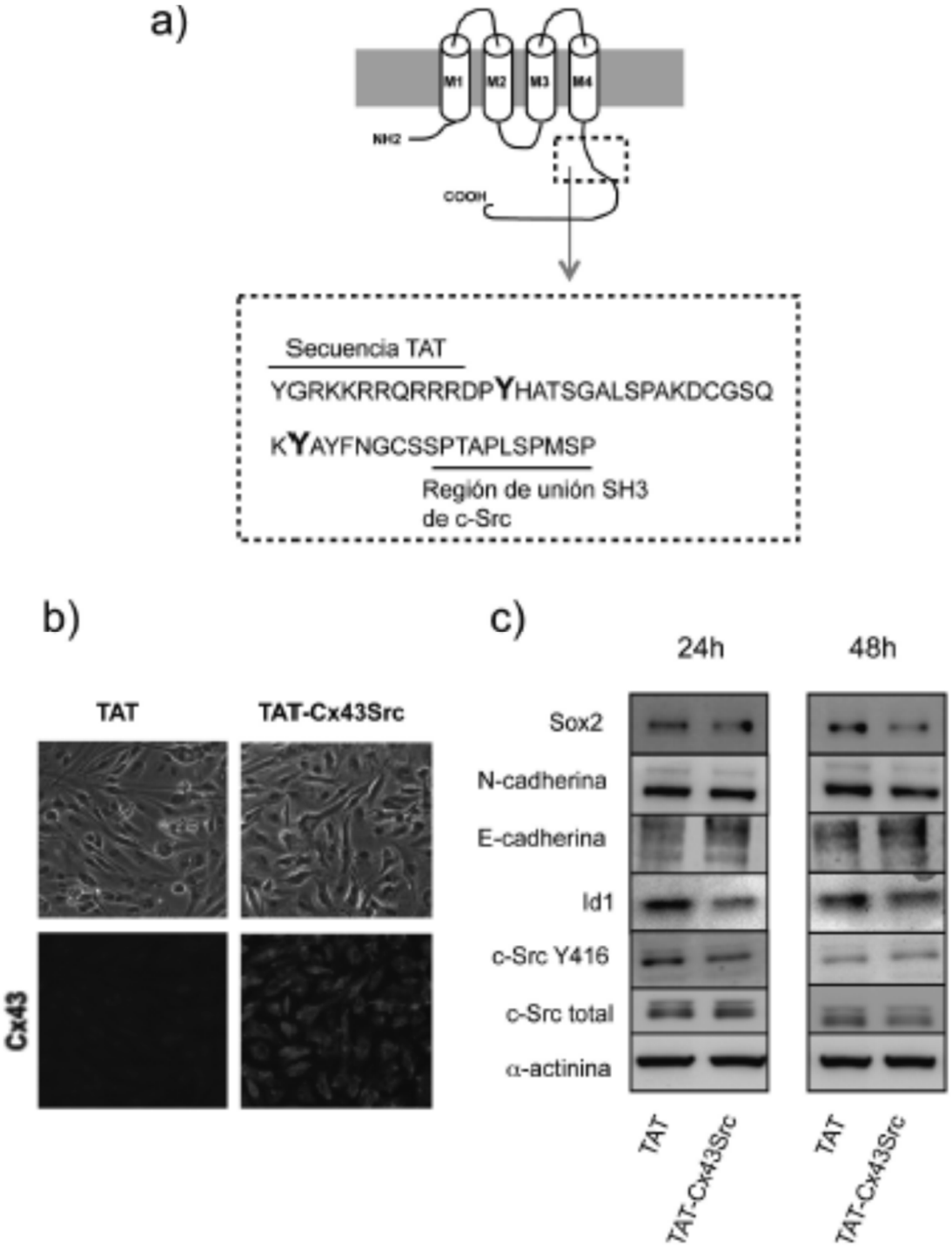
a)
M1
M2
M3
M4
NH2
COOH
Secuencia TAT
YGRKKRRQRRRDPYHATSGALSPAKDCGSQ
KYAYFNGCSSPTAPLSPMSP
Región de unión SH3
de c-Src
b)
TAT
TAT-Cx43Src
Cx43
c)
24h
48h
Sox2
N-cadherina
E-cadherina
Id1
c-Src Y416
c-Src total
α-actinina
TAT
TAT-Cx43Src
TAT
TAT-Cx43Src

FIG. 9

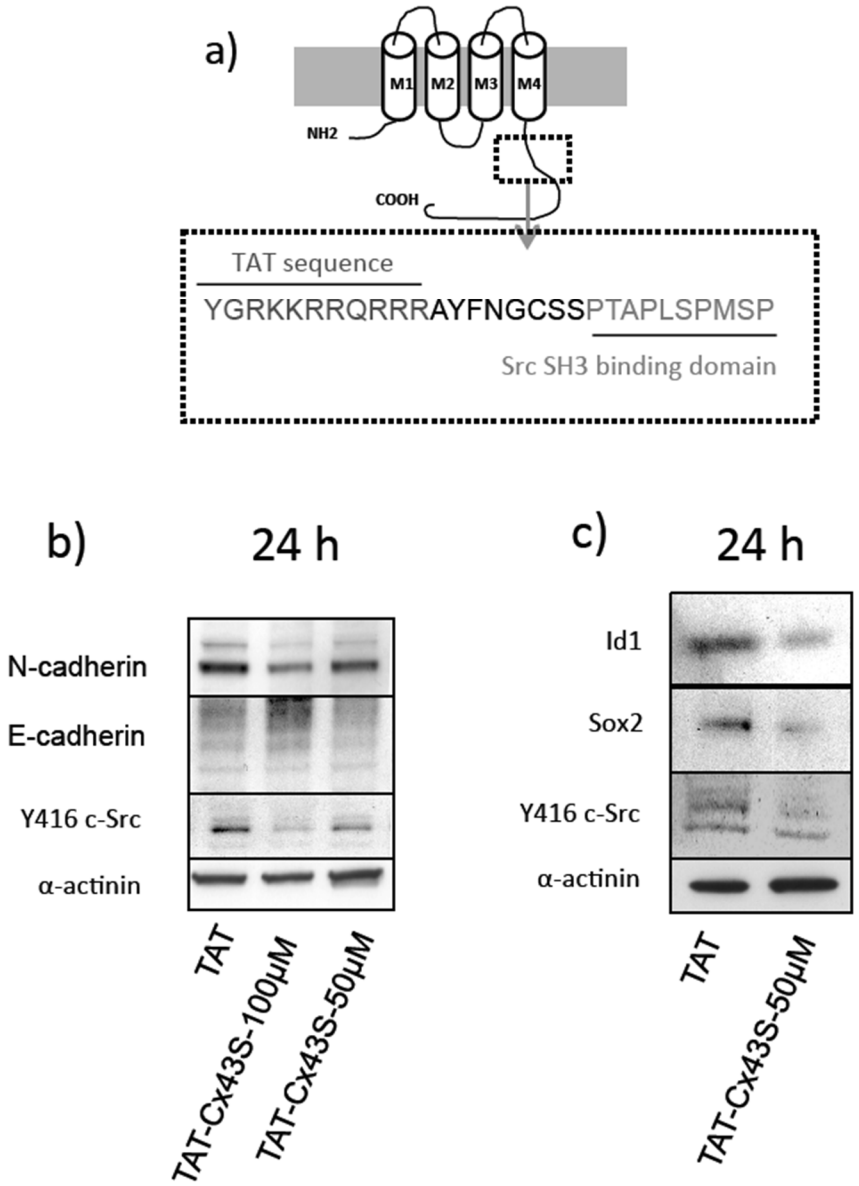
a)
M1
M2
M3
M4
NH2
COOH
TAT sequence
YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPMSP
Src SH3 binding domain
b)
24 h
N-cadherin
E-cadherin
Y416 c-Src
α-actinin
TAT
TAT-Cx43S-100μM
TAT-Cx43S-50μM
c)
24 h
Id1
Sox2
Y416 c-Src
α-actinin
TAT
TAT-Cx43S-50μM

FIG. 10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Salamanca

<120> Péptido y composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer

<130> ES1367.65

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido

<400> 1

Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met
1 5 10 15

Ser Pro

<210> 2
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína Conexina43

<400> 2

Ser Pro Ser Lys Asp Cys Gly Ser Pro Lys Tyr Ala Tyr Phe Asn Gly
1 5 10 15

Cys Ser Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro Pro Gly Tyr
20 25 30

Lys Leu Val Thr Gly Asp Arg Asn Asn Ser Ser Cys Arg Asn Tyr Asn
35 40 45

Lys Gln Ala Ser Glu Gln Asn Trp Ala Asn Tyr Ser Ala Glu Gln Asn
50 55 60

Arg Met Gly Gln Ala Gly Ser Thr Ile Ser Asn Ser His Ala Gln Pro
65 70 75 80

Phe Asp Phe Pro Asp Asp Asn Gln Asn Ala Lys Lys Val Ala Ala Gly
85 90 95

His Glu Leu Gln Pro Leu Ala Ile Val Asp Gln Arg Pro Ser Ser Arg
100 105 110

Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu
115 120 125

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido

<400> 3

Asp Pro Tyr His Ala Thr Ser Gly Ala Leu Ser Pro Ala Lys Asp Cys
1 5 10 15

Gly Ser Gln Lys Tyr Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser Ser Pro Thr Ala
20 25 30

Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro
35

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

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 4

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

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido

<400> 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Tyr Phe Asn Gly
1 5 10 15

Cys Ser Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro
20 25

<210> 6
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Asp Pro Tyr His Ala
1 5 10 15

Thr Ser Gly Ala Leu Ser Pro Ala Lys Asp Cys Gly Ser Gln Lys Tyr
20 25 30

Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met
35 40 45

Ser Pro
50

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 7

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

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 8

Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 9

Phe Phe Leu Ile Pro Lys Gly
1 5

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 10

Asp Ser Leu Lys Ser Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Phe Ser Trp Arg
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 11

Lys Leu Trp Met Arg Trp Trp Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 12

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Trp Thr Arg Arg Trp Gly
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 13

Arg Leu Ile Met Arg Ile Tyr Ala Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 14

Arg Leu Tyr Met Arg Tyr Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 15

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Arg Thr Arg Ala Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 16

Lys Arg Pro Thr Met Arg Phe Arg Tyr Thr Trp Asn Pro Met Lys
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 17

Trp Lys Cys Arg Arg Gln Cys Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

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

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 18

Trp Lys Cys Arg Arg Gln Ala Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<400> 19

Trp Lys Ala Arg Arg Gln Ala Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

<210> 20
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de internalización celular

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Biotina

<400> 20

Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg
1 5 10 15

Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser
20