

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 251**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/KR2014/012502**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093854**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14872577 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3085380**

54 Título: **Composición para tratar cáncer de próstata**

30 Prioridad:

17.12.2013 KR 20130157456

19.12.2013 KR 20130159571

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

03.03.2021

73 Titular/es:

GEMVAX & KAEL CO., LTD. (100.0%)

58, Techno 11-ro, Yuseong-gu

Daejeon 34036, KR

72 Inventor/es:

KIM, SANG JAE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 809 251 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para tratar cáncer de próstata

[Campo técnico]

5 La presente divulgación se refiere a una composición para tratar el cáncer de próstata y, en particular, a una composición para tratar el cáncer de próstata, que incluye un péptido derivado de la telomerasa y es eficaz para inhibir el crecimiento y la metástasis de las células de cáncer de próstata.

[Técnica antecedente]

10 El cáncer de próstata es un cáncer que se desarrolla con frecuencia en los hombres occidentales y, en los Estados Unidos de América, aproximadamente un tercio de los pacientes con cáncer masculino sufren de cáncer de próstata. Refiriéndose a las estadísticas de Estados Unidos en 2008, se informan aproximadamente 190.000 nuevos casos anualmente, y más del 15% de los mismos, es decir, 29.000 pacientes, mueren de cáncer de próstata (Jemal et al, Cancer statistics, 58(2):71-96, 2008).

15 En Corea, la tasa de incidencia de cáncer de próstata fue de 1,2% en 1989, pero está aumentando rápidamente: 2,8% en 2001, 4,5% en 2005 y 10,7% en 2010. El cambio en la tasa de incidencia estandarizada por edad de los cánceres mayores es 13,2% de 1999 a 2007, solo después del cáncer de tiroides. En el caso de los hombres, el cáncer de próstata ocupa el quinto lugar en cuanto a la frecuencia de desarrollo del cáncer. Una posición tan alta de cáncer de próstata puede deberse a patrones de dieta occidentalizados (Cancer Center, Cancer statistics, 2012).

20 El cáncer de próstata puede tratarse con terapia hormonal, tratamiento quirúrgico, radioterapia, quimioterapia o una combinación de los mismos. La terapia hormonal consiste en inhibir la producción de andrógenos que se asocia con el crecimiento del cáncer de próstata o una función de los andrógenos. Como una forma de tratar el cáncer de próstata, se puede extirpar un testículo que produce hormona masculina; se puede administrar análogo de hormona liberadora de hormona luteinizante (HLHL) o preparación de estrógenos, que actúa sobre la hipófisis para reducir el andrógeno; o se pueden administrar preparaciones antiandrogénicas.

25 Fenoglio et al., (Cancer Immunol Immunother. 2013 Jun;62(6):1041-52), se relaciona con un multipéptido, vacuna de telomerasa doble adyuvante (GX301), que se encuentra altamente inmunogénica en pacientes con cáncer de próstata y riñón.

30 Como tratamiento para el cáncer de próstata, solo se usa la terapia hormonal. Sin embargo, en la mayoría de los casos de pacientes con cáncer de próstata avanzado que experimentan terapia hormonal, durante varios años, se produce tolerancia hormonal y, por lo tanto, es difícil continuar los tratamientos. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento para tratar el cáncer de próstata que sea aplicable incluso a pacientes que tengan tolerancia a la terapia hormonal.

[Técnica Anterior][Documento de Patente]

(Documento de Patente 1) KR 2008-0084818

35 [Documento No Patente]

(Documento No Patente 1) Jemal et al, Cancer statistics, 58(2):71-96, 2008

[Descripción detallada de la invención]**[Problema técnico]**

40 Los inventores de la presente solicitud habían hecho esfuerzos para desarrollar un procedimiento para tratar eficazmente el cáncer de próstata, y descubrieron que cuando un péptido derivado de la telomerasa se administra solo o cuando el péptido derivado de la telomerasa se administra conjuntamente con un fármaco convencional para el cáncer de próstata, tal como docetaxel o acetato de leuprolida, se podía obtener una eficacia anticancerígena significativa, completando la presente divulgación.

45 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una composición para tratar el cáncer de próstata que inhibe el crecimiento y la metástasis del cáncer de próstata y un procedimiento para tratar el cáncer de próstata que incluye administrar la composición a un sujeto.

[Solución técnica]

50 Un aspecto de la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata, en la que la composición se administrará a un paciente con cáncer de próstata para inhibir el crecimiento o metástasis del cáncer de próstata, comprendiendo la composición un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:1 o un fragmento activo del mismo, en el que el péptido o el fragmento de péptido se incluye en una cantidad efectiva para tratar el cáncer de próstata y en el que, en dicho uso, la composición debe administrarse conjuntamente con un fármaco anticáncer.

En una realización, el fármaco anticáncer comprende, como agente quimioterapéutico, docetaxel.

- 5 En una realización, el fármaco anticáncer comprende acetato de leuprolida.

En una realización, la composición se administra mientras se combina con un adyuvante.

En una realización, el adyuvante comprende un adyuvante de citoquina.

En una realización, el adyuvante de citoquina comprende un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FEC-GM).

- 10 En una realización, la composición se administra a un paciente que tiene, a nivel sérico, una concentración (p/v) de al menos una de eotaxina y MIP1 α que es al menos 10% tan alta como las concentraciones promedio de eotaxina y MIP1 α de todos los pacientes incluido el paciente.

En una realización, la composición se usa para tratar el cáncer de próstata que tiene una tolerancia hormonal.

- 15 En una realización, la composición se usa conjuntamente con acetato de leuprolida, que es un fármaco anticáncer, y se usa con FEC-GM como adyuvante.

En una realización, la composición está comprendida en un kit junto con un manual.

- 20 En una realización, el manual comprende un contenido en el que la composición para tratar el cáncer de próstata se administra conjuntamente con un fármaco anticáncer seleccionado de docetaxel y acetato de leuprolida; la composición se administra mientras se combina con un adyuvante; y la composición se administra a un paciente que tiene, a nivel sérico, una concentración de eotaxina (p/v) que es al menos 10% tan alta como una concentración promedio de eotaxina de pacientes con cáncer de próstata, incluido el paciente.

- 25 En un aspecto, la invención proporciona un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 para usar en el tratamiento del cáncer de próstata, en el que el péptido inhibe el crecimiento o metástasis del mismo en un paciente con cáncer de próstata, y en el que, en dicho uso, el péptido se administrará conjuntamente con un fármaco anticáncer.

En una realización, el fármaco anticáncer es docetaxel.

En una realización, el fármaco anticáncer es acetato de leuprolida.

[Efectos ventajosos de la invención]

- 30 Según la presente divulgación, los efectos terapéuticos anticáncer pueden mejorarse mediante la administración de un péptido derivado de la telomerasa para tratar el cáncer de próstata.

- 35 La presente divulgación proporciona una composición y un procedimiento para tratar el cáncer de próstata que proporcionan mayores efectos terapéuticos sinérgicos al coadministrar un péptido derivado de la telomerasa con un fármaco convencional para el cáncer de próstata, como docetaxel o acetato de leuprolida, en el tratamiento del cáncer de próstata. En particular, la presente divulgación proporciona un procedimiento terapéutico que es útil para pacientes en los que los efectos anticancerígenos no se producen suficientemente cuando un fármaco convencional para el cáncer de próstata, como docetaxel o acetato de leuprolida, se administra solo, y para pacientes que tienen tolerancia a las hormonas.

[Descripción de los dibujos]

- 40 Las FIGURAS 1 y 2 muestran gráficos del crecimiento celular relativo con respecto a la concentración de Pep1 obtenida por el ensayo MTT en una línea celular de cáncer de próstata (LNCaP) para identificar los efectos de inhibición del crecimiento de las células cancerosas de un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 ("Pep1").

- 45 La FIGURA 3 muestra un gráfico del crecimiento celular relativo obtenido mediante el ensayo MTT en un LNCaP para identificar los efectos de inhibición del crecimiento de las células cancerosas cuando Pep1 se administra conjuntamente con docetaxel.

La FIGURA 4 muestra un gráfico del volumen del tumor a lo largo del tiempo de los grupos de prueba a los que se administran Pep1 y acetato de leuprolida por separado o juntos, para evaluar la eficacia de Pep1 y el acetato de leuprolida en un modelo de xenoinjerto de células LNCaP.

La FIGURA 5 muestra un gráfico del volumen tumoral a lo largo del tiempo de los grupos de prueba a los que se administran conjuntamente diversas concentraciones de Pep1 y docetaxel, para evaluar los efectos de la administración conjunta de Pep1 y docetaxel en un modelo de xenoinjerto de células LNCaP.

5 La FIGURA 6 muestra un gráfico del peso corporal a lo largo del tiempo de los grupos de prueba a los que se administran diversas concentraciones de Pep1 y acetato de leuprolida por separado o juntas, para evaluar la seguridad de Pep1 y la administración conjunta de Pep1 y acetato de leuprolida en un modelo de xenoinjerto de células LNCaP.

10 La FIGURA 7 muestra un gráfico de un número de células migradas cuando se administran diversas concentraciones de Pep1 a las células, para evaluar los efectos de inhibición de la migración de Pep1 en un LNCaP identificado por el ensayo de migración transpocillo.

La FIGURA 8 muestra imágenes de células a las que se administran diversas concentraciones de Pep1, para evaluar los efectos de inhibición de la migración de Pep1 en un LNCaP identificado por el ensayo de migración transpocillo.

15 La FIGURA 9 muestra un gráfico de un número de células migradas cuando se administran conjuntamente diversas concentraciones de Pep1 y docetaxel a las células, para evaluar los efectos de inhibición de la migración de la administración conjunta de Pep1 y docetaxel en un LNCaP identificado por el ensayo de migración transpocillo.

20 Las FIGURAS 10 a 14 muestran imágenes de células a las que se administran conjuntamente diversas concentraciones de Pep1 y docetaxel, para evaluar los efectos de inhibición de la migración de la administración conjunta de Pep1 y docetaxel en un LNCaP identificado por el ensayo de migración transpocillo.

La FIGURA 15 muestra un gráfico de un nivel de expresión de MMP9, que es un marcador de ARNm asociado con la migración de células cancerosas en un modelo de xenoinjerto de células LNCaP, cuando se administran 10 mg/kg de Pep1 y 0,1 mg/kg de acetato de leuprolida a los grupos de prueba y un control.

25 La FIGURA 16 muestra un gráfico de un nivel de expresión de MMP2, que es un marcador de ARNm asociado con la migración de células cancerosas en un modelo de xenoinjerto de células LNCaP, se administran 10 mg/kg de Pep1, y 0,1 mg/kg de acetato de leuprolida a los grupos de prueba y un control.

[Mejor modo]

30 Dado que la presente divulgación se puede adaptar a diversos campos de uso y en diversas modificaciones, las siguientes son descripciones más detalladas de la presente divulgación. Sin embargo, esto no es un medio para limitar la forma de aplicación práctica; debe entenderse que la intención es incluir el concepto y el alcance de la tecnología en todas las modificaciones, equivalentes a las alternativas. Al describir la presente divulgación, si se considera que cualquier descripción detallada sobre la técnica anterior deteriora los principios fundamentales de la presente divulgación, se omitirá la descripción.

35 Un telómero es conocido como una secuencia repetitiva de material genético que se encuentra en los extremos de los cromosomas que evita que los cromosomas se dañen o se fusionen con otros cromosomas. La longitud del telómero se acorta en cada división celular, y después de un cierto número de división celular, la longitud del telómero se acorta extremadamente en la medida en que la célula deja de dividirse y muere. Por otro lado, se sabe que el alargamiento de los telómeros extiende la vida útil de una célula. Por ejemplo, las células cancerosas excretan una enzima llamada telomerasa, que previene el acortamiento de los telómeros, lo que resulta en la proliferación de células cancerosas. Los inventores de la presente solicitud encontraron que un péptido derivado de la telomerasa es eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata, completando así la presente divulgación.

40 Un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición para tratar el cáncer de próstata que incluye un péptido derivado de la telomerasa, en el que el péptido derivado de la telomerasa es un péptido derivado de la telomerasa, por ejemplo, un péptido derivado de la telomerasa de *Homo sapiens*, y puede ser un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 que consiste en 16 aminoácidos (en lo sucesivo denominados Pep1) o un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia del péptido de la telomerasa.

SEQ ID NO: 1: EARPALLTSRLRFIPK

45 En una realización de la presente divulgación, un péptido de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, un fragmento de péptido del péptido mencionado anteriormente o un péptido que tiene una identidad de secuencia del 80% o mayor con respecto a la secuencia de aminoácidos del péptido mencionado anteriormente comprende telomerasa, en particular, se incluyó telomerasa derivada de *Homo sapiens*.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99 % de homología de secuencia con el péptido de SEQ ID NO 1 o un fragmento del

5 mismo. Además, los péptidos descritos en la presente divulgación pueden incluir péptidos que tienen diferencias con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de los mismos en al menos un aminoácido, al menos 2 aminoácidos, al menos 3 aminoácidos, al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, o al menos 7 aminoácidos. En una realización, un péptido para inhibir la proliferación de células cancerosas puede incluir 30 o menos aminoácidos.

10 El péptido descrito en SEQ ID NO: 1 es el mismo que en la siguiente tabla 1. El "nombre" en la Tabla 2 más adelante se usó para distinguir los péptidos. En un aspecto, el péptido de SEQ ID NO:1 es el péptido completo de una telomerasa humana. En una realización específica diferente de la presente divulgación, el péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO 1, el péptido que es un fragmento del péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO 1 o el péptido que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con el péptido de acuerdo con la presente divulgación incluye "péptidos sintéticos" sintetizados seleccionando y sintetizando un péptido correspondiente a la posición pertinente dentro de la telomerasa. SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de toda la telomerasa.

[Tabla 1]

SEQ ID No.	Nombre	POSICIÓN EN TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
1	Pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2		[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLG PQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDAR PPPAAPSFQVVSCLKELVARVLQRLCERGAKN VLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTV TDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALF VLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHAS GPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGA RRRGGASASRSLPLPKRPRR GAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGF CVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGR QHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFL YSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIF LGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLE	1132 aa

ES 2 809 251 T3

(continuación)

SEQ ID No.	Nombre	POSICIÓN EN TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
			LLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCA REKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSP WQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFL RNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWL RRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVY VVELLSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKL QSIGIRQHLKRVQLRELSAEVRQHREARPALL TSRLRFIPKPDGLRPVINDYVVGARTFRREK RAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVL GLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDV TGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVV QKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVA HLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLR FMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSL CYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHL THAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFV EDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLE VQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRK LFGVLRKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILL QAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDT ASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQ WLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQL SRKLPGT TLTALEAAANPALPSDFKTILD	

En una realización de la presente divulgación, los cambios en los aminoácidos incluyen modificaciones de las características físicas y químicas del péptido. Por ejemplo, la modificación de aminoácidos se puede realizar para mejorar la estabilidad térmica del péptido, alterar la especificidad del sustrato y cambiar el pH óptimo.

- 5 El término "aminoácido" en el presente documento incluye no solo los 22 aminoácidos estándar que se integran naturalmente en un péptido sino también los isómeros D y los aminoácidos modificados. Por lo tanto, en una realización específica de la presente divulgación, un péptido en el presente documento incluye un péptido que tiene D-aminoácidos. Además, un péptido puede incluir aminoácidos no estándar como los que se han modificado postraducción. Ejemplos de modificación postraducción incluyen fosforilación, glicosilación, acilación (incluidas acetilación, miristilación, palmitoilación), alquilación, carboxilación, hidroxilación, glicación, biotinilación, ubiquitinilación, modificación de propiedades químicas (por ejemplo, desimidación, desamidación por eliminación en β) y modificación estructural (por ejemplo, formación de puente disulfuro). Además, los cambios de aminoácidos incluyen los cambios de aminoácidos que ocurren debido a la reacción química durante el proceso de combinación con los reticuladores para la formación de un conjugado peptídico, como los cambios en un grupo amino, grupo carboxilo o cadena lateral.
- 10
- 15 Un péptido descrito en el presente documento puede ser un péptido de tipo salvaje que se ha identificado y aislado de fuentes naturales. Mientras tanto, en comparación con la SEQ ID NO: 1 o sus fragmentos, los péptidos divulgados en el presente documento pueden ser variantes artificiales que comprenden uno o más aminoácidos sustituidos, eliminados y/o insertados. La alteración de aminoácidos en polipéptidos de tipo salvaje -no solo en variantes artificiales- comprende el plegamiento de proteínas y/o sustituciones conservadoras de aminoácidos que no influyen significativamente en las actividades. Ejemplos de sustituciones conservadoras pueden estar dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparaginas), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran las actividades específicas son conocidas en la técnica. Las alteraciones más comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, y las alteraciones opuestas de los mismos. Otros ejemplos de sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente Tabla 2:
- 20
- 25

[Tabla 2]

Aminoácido original	Ejemplos de sustitución de residuos	Sustitución de residuos preferible
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg

(continuación)

Aminoácido original	Ejemplos de sustitución de residuos	Sustitución de residuos preferible
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

5 La composición para tratar el cáncer de próstata puede incluir un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de péptido de la misma, en una concentración de 0,01 g/L a 1 kg/L, 0,1 g/L a 100 g/L, o 1 g/L a 10 g/L.

10 La dosis, el procedimiento de administración y el intervalo de administración de un péptido como se usa en este documento ya se conocen en la técnica. En consecuencia, de acuerdo con el estado del paciente, el paciente puede ser tratado teniendo en cuenta las referencias conocidas en la técnica. La dosis puede estar dentro del rango que puede considerar un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, una dosis por día puede estar en un rango de 0,1 ng/kg/día a 10 mg/kg/día, o 0,1 µg/kg/día a 1 mg/kg/día, o 1 µg/kg/día a 100 µg/kg/día, o 2 µg/kg/día a 50 µg/kg/día, pero no está limitada a estas. La dosis por día puede depender de diversos factores que incluyen, por ejemplo, la edad, el estado de salud o las complicaciones de un sujeto al que se administrará el péptido.

15 En una realización, los péptidos pueden administrarse por vía intracutánea. El intervalo de administración puede ser una vez al día a intervalos de dos días, y con el tiempo, el intervalo de administración puede ampliarse. Durante la primera semana, la administración se puede realizar tres veces por semana (1°, 3° y 5° día), y durante la segunda, tercera, cuarta y sexta semana, la administración se puede realizar una vez por semana (8°, 15°, 22° y 36° día). A partir de entonces, cada cuatro semanas, la administración puede realizarse una vez por semana. Con respecto a los adultos, la dosis puede estar en un rango de 0,1 a 3 mg. En una o más realizaciones, la dosis puede ser al menos 0,1 mg, al menos 0,2 mg, al menos 0,3 mg, al menos 0,4 mg, al menos 0,45 mg o al menos 0,5 mg. En una o más realizaciones, la dosis puede ser como máximo 3 mg, como máximo 2,5 mg, como máximo 2,0 mg, como máximo 1,5 mg, como máximo 1,0 mg, como máximo 0,9 mg, como máximo 0,8 mg, como máximo 0,7 mg, o como máximo 0,6 mg.

25 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una composición para tratar el cáncer de próstata, incluyendo la composición un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% de la secuencia de aminoácidos, o un fragmento peptídico del mismo; y, como ingrediente activo, docetaxel o acetato de leuprolida, que son fármacos convencionales contra el cáncer de próstata.

30 El docetaxel es un fármaco anticáncer clasificado como "taxeno", "agente antimicrotubular" o "alcaloide vegetal", e inhibe el crecimiento de las células cancerosas al interrumpir la separación de los microtúbulos, que es una estructura para la división y la autoclonación durante la división celular.

35 La leuprolida es un fármaco contra el cáncer de próstata que bloquea hormonas, clasificado como acetato de leuprolida, "Leuprorellina" o "Leuplin®". La leuprolida es un péptido clasificado como un agonista de la hormona liberadora de hormonas gonadotrópicas e incluye 9 aminoácidos. La leuprolida tiene una actividad diez veces mayor que la de la hormona gonadotrópica *in vivo* y, en consecuencia, se une fuertemente a un receptor de la misma, deteniendo así cualquier reacción del receptor, lo que lleva a inhibir la secreción de la hormona sexual, como la testosterona.

El docetaxel se usa para tratar el cáncer de próstata que tiene tolerancia a las hormonas. Se informa que la eficacia del tratamiento con docetaxel en el cáncer de próstata que tiene tolerancia hormonal es de aproximadamente el 40% (Beer et al, *Ann Oncol.*, 12:1273-1279, 2001). La dosis de docetaxel varía según el paciente. Por ejemplo, la dosis de docetaxel puede estar en un rango de 60 a 400 mg/m². En general, el docetaxel puede administrarse por vía intravenosa cada tres semanas en una dosis de 60 a 100 mg/m² durante 1 hora (France Cavelli et al, *Textbook of Medical Oncology*, Martin Dunitz Ltd., p4623(1997)).

Actualmente, la Food and Drug Administration (FDA) aprueba, para el tratamiento del cáncer de próstata, el uso de docetaxel solo o en una combinación con prednisolona para reducir los efectos secundarios. Sin embargo, para tratar el cáncer de próstata intratable, es necesario combinar fármacos anticáncer que tengan diferentes mecanismos.

Por ejemplo, existe un informe de que cuando la rapamicina, que es un inhibidor de mTOR, se usa junto con docetaxel, el crecimiento de diversos cánceres de próstata se inhibe de manera eficiente, y cuando la lenalidomida, que es un análogo de la talidomida, se administra conjuntamente, los efectos anticancerígenos aumentan significativamente (Liu et al, *Chin Med J (Engl)*, 123(3):356-60, 2010; Henly et al. *Prostate*, 72(8):856-67, 2012).

Cuando los péptidos de la composición para tratar el cáncer de próstata de acuerdo con una realización se usan junto con un fármaco anticancerígeno, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, el péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% para la secuencia de aminoácidos o el fragmento de péptido de la misma puede estar en una cantidad de 0,01 g/L a 1 kg/L, 0,1 g/L a 100 g/L, o 1 g/L a 10 g/L, y el docetaxel puede estar en una cantidad de 0,01 ng/mL a 100 mg/mL, 0,1 ng/mL a 10 mg/mL, o 1 ng/mL a 1 mg/mL. Sin embargo, estas cantidades pueden ajustarse adecuadamente cuando los efectos difieren dependiendo de la dosis. Dentro de estos rangos o menos o por debajo de los límites inferiores de los rangos, se pueden obtener los efectos previstos de acuerdo con la presente divulgación, y se puede satisfacer la estabilidad y seguridad de la composición, y se pueden obtener los efectos apropiados incluso cuando se tienen en cuenta los costes.

Los péptidos de acuerdo con las realizaciones y/o un fármaco anticáncer pueden administrarse en combinación con un adyuvante. En un aspecto inmunológico, se agrega un adyuvante a una vacuna para estimular las reacciones inmunológicas con respecto a un antígeno diana. El adyuvante, sin embargo, no proporciona inmunogenicidad. Además del adyuvante que estimula las reacciones inmunológicas, existen adyuvantes que se utilizan para estabilizar la formulación de una vacuna. Los adyuvantes inmunológicos son bien conocidos en la técnica [*J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 831486. Published online Mar 13, 2012]. Un adyuvante inmunológico incluye un adyuvante inorgánico, como una sal de aluminio, y un adyuvante orgánico, como un aceite, virosoma, o escualano. Ejemplos del adyuvante orgánico incluyen emulsión, adyuvante sintético derivado de microorganismos, citoquina, etc., pero no se limitan a los mismos. Hay 9 tipos de adyuvantes de citoquina. Ejemplos de adyuvantes de citoquinas incluyen granulocitos adultos y un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FEC-GM), que puede activar los macrófagos. Estos adyuvantes de citoquinas pueden usarse en vacunas para la hepatitis de tipo B, VIH y cáncer [*J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 831486. Published online Mar 13, 2012].

Las dosis de los adyuvantes descritos anteriormente pueden ser conocidas en la técnica, y pueden administrarse apropiadamente a un paciente dependiendo del estado del paciente teniendo en cuenta las referencias de dosis conocidas en la técnica. Las dosis pueden estar dentro de los intervalos que puede considerar un experto habitual en la técnica. Sus dosis por día pueden estar en un rango de 1 µg/kg/día a 10 g/k/día, 10 µg/kg/día a 100 mg/kg/día, o 50 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, pero no se limitan a las mismas. Las dosis pueden depender de diversos factores que incluyen, por ejemplo, la edad, el estado de salud o las complicaciones de un sujeto al que se administrarán los adyuvantes.

Por ejemplo, en el caso de FEC-GM, puede administrarse FEC-GM, por ejemplo, en la dosis para adultos de 7 a 700 mg, 1 minuto a 150 minutos, 5 minutos a 80 minutos, o 10 a 15 minutos, antes de administrar los péptidos según las realizaciones. En una o más realizaciones, FEC-GM puede administrarse al menos 1 minuto, al menos 3 minutos, al menos 5 minutos, al menos 7 minutos, al menos 8 minutos, al menos 9 minutos, o al menos 10 minutos, antes de la se administran péptidos según las realizaciones. En una o más realizaciones, FEC-GM puede administrarse como máximo 150 minutos, como máximo 130 minutos, como máximo 110 minutos, como máximo 100 minutos, como máximo 90 minutos, como máximo 80 minutos, como máximo 70 minutos, como máximo 60 minutos, como máximo 50 minutos, como máximo 40 minutos, como máximo 30 minutos, como máximo 20 minutos, o como máximo 15 minutos, antes de administrar los péptidos según las realizaciones. En una o más realizaciones, la dosis puede ser de al menos 7 mg, al menos 10 mg, al menos 20 mg, al menos 30 mg, al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, o al menos 70 mg. En una o más realizaciones, la dosis puede ser como máximo 700 mg, como máximo 600 mg, como máximo 500 mg, como máximo 400 mg, como máximo 300 mg, como máximo 200 mg, como máximo 100 mg, como máximo 90 mg, o como máximo 80 mg.

La composición de acuerdo con una realización de la presente divulgación puede tener aplicaciones con todos los animales, incluidos humanos, perros, pollos, cerdos, vacas, ovejas, cobayas, y monos.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que incluye, como ingrediente activo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos, o un fragmento peptídico de la misma. La composición farmacéutica de acuerdo con una realización puede administrarse por vía oral, rectal, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, en la médula ósea, intradural, o rutas subcutáneas.

- 5 Las formas de administración oral pueden ser, entre otras, tabletas, píldoras, cápsulas blandas o duras, gránulos, polvos, solución, o emulsión. Las formas de administración no oral pueden ser, entre otras, inyecciones, gotas, lociones, pomadas, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, supositorios, parches, o aerosoles.

- La composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la presente divulgación, si es necesario, puede contener aditivos, tales como diluyentes, excipientes, lubricantes, aglutinantes, desintegrantes, tampones, dispersantes, tensioactivos, agentes colorantes, aromáticos o edulcorantes. En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede fabricarse por procedimientos convencionales de la industria en la técnica.
- 10

- Un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar el cáncer, incluyendo el procedimiento el uso de los niveles séricos y plasmáticos de citoquina de eotaxina, MIP1 α y CRP como un biomarcador que se usa para determinar si se usa un tratamiento inmunológico en el tratamiento del cáncer. A nivel sérico, cuando una concentración (p/v) de uno de eotaxina y MIP1 α es al menos 10% tan alta como las concentraciones promedio de eotaxina y MIP1 α de pacientes con enfermedad idéntica, se puede realizar el tratamiento inmunológico. En una o más realizaciones, cuando un nivel de eotaxina en suero es al menos un nivel predeterminado, por ejemplo, al menos 20 pg/mL, al menos 40 pg/ml, o al menos 80 pg/ml, tan alto como un promedio del nivel de eotaxina en suero de pacientes que tienen una enfermedad idéntica, de entre los pacientes, un paciente que tiene dicho nivel de eotaxina en suero puede recibir selectivamente tratamientos inmunológicos junto con el tratamiento anticáncer existente. [MODO]
- 15
- 20

- En lo sucesivo, la estructura y los efectos de la presente divulgación se describirán haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan en este documento solo con fines ilustrativos y no limitan el alcance de la presente divulgación.
- 25

Ejemplo 1: Síntesis de péptido y preparación de reactivos y línea celular

Síntesis de péptido

- Se preparó un péptido de SEQ ID NO: 1 (en lo sucesivo denominado "Pep1") de acuerdo con un procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) conocido en la técnica. Por ejemplo, los péptidos se sintetizaron usando ASP48S (Pepton, Inc., Daejeon, Korea) a través de Fmoc SPFS de tal manera que un aminoácido se sometió a acoplamiento en una dirección desde el extremo C-terminal uno por uno. Como a continuación, en los péptidos, se une una resina al primer aminoácido del extremo C-terminal. Ejemplos de tales péptidos son los siguientes:
- 30

Resina NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-Tritilo

Resina NH₂-Ala-2-cloro-Tritilo

- 35 Resina NH₂-Arg(Pbf)-2-cloro-Tritilo

- En el caso de todos los materiales de aminoácidos utilizados en la síntesis de péptidos, el -término N estaba protegido por Fmoc, y todos los residuos estaban protegidos por Trt, Boc, t-Bu (t-butiléster), Pbf (2,2,4,6,7-pentametil dihidro-benzofuran-5-sulfonil), etc. que son removibles por un ácido. Ejemplos de los mismos son los siguientes: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, y ácido Trt-Mercaptoacético.
- 40

- Como reactivo de acoplamiento, se usó HBTU[2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,3,3-tetrametilammonio hexafluorofosfato]/HOBt [N-Hidroxibenzotriazol] /NMM [4-Metilmorfolina]. Se eliminó Fmoc usando piperidina en DMF al 20%. Para la separación de los péptidos sintetizados de las resinas y la eliminación del protector de los residuos, se usó un cóctel de escisión [TFA (ácido trifluoroacético)/TIS (triisopropilsilano)/EDT (etanoditiol)/H₂O=92,5/2,5/2,5/2,5].
- 45

- Un aminoácido de partida con un protector de aminoácidos unido al mismo se unió a un soporte sólido, y los aminoácidos correspondientes se dejaron reaccionar con el aminoácido de partida, seguido de lavado usando un disolvente y desprotección. Al hacerlo, se sintetizaron diversos péptidos. Los péptidos sintetizados se escindieron de las resinas, y luego, se purificaron usando HPLC, y se identificaron por MS y se liofilizaron. El nivel de pureza de todos los péptidos utilizados en los experimentos fue al menos del 95%. Los péptidos se cristalizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 50

El péptido de SEQ ID NO: 1 (Pep1) se preparó como sigue:

1) Acoplamiento

Un aminoácido (8 e.q.) protegido por NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-tritil-resina y un reactivo de acoplamiento HBTU(8 e.q.)/HOBt(8 e.q.)/NMM(16 e.q.) se disolvió en DMF, y el resultado se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de un lavado secuencial con DMF, MeOH y DMF en este orden de estado.

2) Desprotección de Fmoc

5 Se añadió piperidina en DMF al 20%, y luego, el resultado se hizo reaccionar dos veces a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de un lavado secuencial con DMF, MeOH y DMF en este orden de estado.

3) Los procesos 1) y 2) se realizaron repetidamente para obtener un esqueleto peptídico principal: NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-tritil-resina.

10 4) Escisión: se añadió cóctel de escisión a la resina peptídica completamente sintetizada para separar el péptido de la resina.

5) La mezcla resultante se mezcló con éter dietílico de enfriamiento, y luego se centrifugó para precipitar el péptido obtenido.

6) Después de la purificación por HPLC preparativa, se identificó una cantidad molecular del resultado por LC/MS. El resultado fue liofilizado y preparado en polvo.

15 2. Preparación de reactivos y materiales

Los reactivos y materiales para su uso en experimentos se prepararon de la siguiente manera: Pep1 preparado en polvo se disolvió en 0,2 µm de agua esterilizada filtrada, y luego, se almacenó después de separar una alícuota a una temperatura de -70°C, y la alícuota se disolvió para su uso; se disolvió docetaxel en EtOH al 100% y se mezcló con Tween 80 y PBS; se disolvió 5-fluorouracilo en PBS; y se disolvió acetato de leuprolida directamente en PBS.

20 3. Preparación de la línea celular

Se usó una línea celular LCCaP para los experimentos. La línea celular LCCaP era una célula de metástasis de cáncer de próstata humana, y se obtuvo de American Type Cell Culture (ATCC, Rockville, MD). La línea celular LNCaP se incubó en un medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contenía 10% de FBS (suero bovino fetal), 50 U/ml de penicilina y estreptomycin 50 µg/ml hasta que la población celular fuera de 1 a 2 x 10⁶/ml en una incubadora de CO₂ al 5% en la que la temperatura se mantuvo a 37°C.

Ejemplo 2: Evaluación de los efectos de inhibición del crecimiento de células cancerosas de Pep1 en el modelo de línea celular LNCaP

30 Para identificar los efectos de Pep1 sobre el cáncer de próstata, la línea celular LNCaP se sometió a un ensayo MTT. Los efectos de inhibición del crecimiento de las células cancerosas se identificaron usando los reactivos y materiales y el procedimiento de incubación de la línea celular que se describe en relación con el Ejemplo 1. El ensayo MTT se realizó de la siguiente manera:

35 La línea celular LNCaP que tiene una determinada población celular (3x10³/pocillo) incubada en una placa de 96 pocillos (SPL) se incubó en un medio de crecimiento que contiene Pep1 (0, 0,1, 0,3, 1, 3 y 10 µM) y docetaxel (3 nM) durante 72 horas, y se añadió reactivo MTT en una cantidad de 40 µl a cada pocillo. Después de cuatro horas de reacción, las células se disolvieron en DMSO y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

40 Por separado, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente, excepto que el tiempo de incubación y la concentración de Pep1 variaron. La línea celular LNCaP que tenía una determinada población celular (3x10³/pocillo) incubada en una placa de 96 pocillos (SPL) se cultivó en un medio de crecimiento que contenía Pep1(0, 0,01, 1, 10, y 30 µM) durante 96 horas, y luego, se añadió el reactivo MTT en una cantidad de 40 µl a cada pocillo. Después de cuatro horas de reacción, las células se disolvieron en DMSO y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Para analizar los resultados de la prueba, se verificaron los promedios de los grupos de prueba realizando la -prueba t de Student. La referencia de la significación estadística se estableció en p<0,05(*) o p<0,01(**).

45 Al realizar el ensayo MTT como se describe anteriormente para identificar los efectos de inhibición del crecimiento de las células cancerosas de Pep1 en diversas concentraciones del mismo, se encontró que en comparación con el medio que contiene Pep1 que tenía una concentración de 0 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM o 3 µM, el medio que contiene Pep1 que tenía una concentración de 10 µM mostró efectos de inhibición del crecimiento celular estadísticamente significativos (véase la FIGURA 1). El mismo experimento se realizó adicionalmente repetidamente, y los resultados de la prueba obtenidos también mostraron que Pep1 inhibió el crecimiento celular de una manera dependiente de la concentración (véase FIGURA 2).

50 El ensayo MTT se realizó en el medio que contenía docetaxel 3 nM y diversas concentraciones de Pep1. Los resultados del ensayo también mostraron que, en comparación con el medio que contenía docetaxel 3 nM y Pep1

que tenía una concentración de 0 μM , 0,1 μM , 0,3 μM o 1 μM , el medio que contenía docetaxel 3 nM y Pep1 tenía una concentración de 3 μM , 10 μM , o 30 μM mostraron efectos de inhibición del crecimiento celular estadísticamente significativos (véase la FIGURA 3). Este resultado muestra que incluso cuando Pep1 se usa junto con docetaxel, Pep1 tiene efectos de inhibición del crecimiento celular dependientes de la concentración.

5 Ejemplo 3: Medición del volumen de células cancerosas a las que se administró Pep1 en el modelo de xenoinjerto de células LNCaP

Este experimento se realizó para confirmar los efectos de Pep1 en el volumen de células cancerosas.

Los grupos de prueba 1) a 7) recibieron injerto de la célula LNCaP. Este experimento se realizó utilizando los reactivos y materiales y el procedimiento de incubación de la línea celular que se describe en relación con el Ejemplo 1.

La línea celular LNCaP era una célula de metástasis de cáncer de próstata humana, y se obtuvo del American Type Cell Culture (ATCC, Rockville, MD). La línea celular LNCaP se incubó en un medio del Roswell Park Memorial Institute (IMPR) que contenía FBS al 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta que la población celular fue de 1 a 2 $\times 10^6/\text{ml}$ en una incubadora de CO_2 al 5% en la que la temperatura se mantuvo a 37°C.

Animales de prueba: se injertaron 7 grupos de prueba con la célula LNCaP. Los grupos de prueba consistieron en ratones BALB/c-nu de 5 semanas (obtenidos de Central Lab. Animal Inc., Seoul, Korea). Para cada grupo, se estabilizaron 6 ratones y 5 ratones adicionales durante 1 semana. Cada ratón se injertó en su costado con células LNCaP que tenían la población celular de 1×10^7 células suspendidas en 100 μl de PBS, y se observó durante 2 semanas. Del total de 11 ratones, no se utilizaron 5 ratones que no habían desarrollado tumor o que habían tenido un tumor significativamente pequeño. Los 7 grupos de prueba, cada uno formado por los 6 ratones restantes, fueron tratados durante 20 días de acuerdo con las condiciones que se detallan a continuación. El volumen del tumor se midió usando calibradores de acuerdo con lo siguiente:

$$[\text{ancho}^2 \times \text{longitud} \times 0,5 \text{ cm}^3]$$

Después del injerto, se administraron Pep1 y acetato de leuprolida (control positivo) a los 7 grupos de prueba por inyección subcutánea todos los días.

- 1) Control injertado con LNCaP (vehículo)
- 2) Injerto LNCaP + 0,01 mg/kg de Pep1
- 3) Injerto LNCaP + 0,1 mg/kg de Pep1
- 4) Injerto LNCaP + 1 mg/kg de Pep1
- 5) Injerto LNCaP + 10 mg/kg de Pep1
- 6) Injerto LNCaP + 0,1 mg/kg de acetato de leuprolida
- 7) Injerto LNCaP + 0,1 mg/kg de acetato de leuprolida + 0,1 mg/kg de Pep1

Además, los efectos del uso conjunto de Pep1 y docetaxel sobre el volumen de células cancerosas se evaluaron de la siguiente manera:

Los grupos de prueba 8) a 13) se injertaron con la célula LNCaP. Este experimento se realizó utilizando los reactivos y materiales y el procedimiento de incubación de la línea celular que se describe en relación con el Ejemplo 1.

Animales de prueba: se injertaron 6 grupos de prueba con la célula LNCaP. Los grupos de prueba consistieron en ratones BALB/c-nu de 5 semanas (obtenidos de Central Lab. Animal Inc., Seúl, Korea). Para cada grupo, se estabilizaron 6 ratones y 5 ratones adicionales durante 1 semana. Cada ratón se injertó en su costado con la célula LNCaP que tenía la población celular de 1×10^7 células suspendidas en 100 μl de PBS, y se observó durante 2 semanas. Del total de 11 ratones, no se utilizaron 5 ratones que no habían desarrollado tumor o que habían tenido un tumor significativamente pequeño. Los 7 grupos de prueba, cada uno formado por los 6 ratones restantes, fueron tratados de acuerdo con las condiciones que se detallan a continuación durante 20 días. El volumen del tumor se midió usando calibradores de acuerdo con lo siguiente:

$$[\text{ancho}^2 \times \text{longitud} \times 0,5 \text{ cm}^3]$$

Después del injerto, se administraron Pep1 y docetaxel a los 6 grupos de prueba.

- 8) Control injertado con LNCaP
- 9) Injerto LNCaP + 20 mg/kg de docetaxel (una vez a la semana, administración intraperitoneal)

- 10) Injerto LNCaP + 30 mg/kg de Pep1 (tres veces por semana, administración subcutánea)
- 11) Injerto LNCaP + 3 mg/kg de Pep1 + 20 mg/kg de docetaxel
- 12) Injerto LNCaP + 10 mg/kg de Pep1 + 20 mg/kg de docetaxel
- 13) Injerto LNCaP + 30 mg/kg de Pep1 + 20 mg/kg de docetaxel

5 Luego, se midieron las cantidades de agua y dieta, el volumen del tumor (un diámetro más corto, un diámetro más largo), el peso del tumor/peso corporal, el peso muscular del muslo. Además, se prepararon muestras de células cancerosas y se realizó la tinción con PCNA (marcador de crecimiento celular)/TUNEL (marcador de apoptosis).

Para analizar los resultados de la prueba, se verificaron los promedios de los grupos de prueba realizando la prueba t de Student. La referencia de la significación estadística se estableció en $p < 0,05$ (*) o $p < 0,01$ (**).

10 Los resultados de las pruebas mostraron que cuando se administró Pep1 en una concentración de 0,01 mg/kg y 0,1 mg/kg, no se obtuvieron efectos significativos de inhibición del crecimiento del cáncer, pero cuando se administró Pep1 en una concentración de 1 mg/kg y 10 mg/kg, en comparación con el acetato de leuprolida, que era un control positivo, se obtuvieron efectos de inhibición elevados (véase la FIGURA 4, el eje Y de la FIGURA 4 indica un volumen tumoral (mm^3)). Es decir, se identificaron efectos significativos de inhibición de Pep1 en el crecimiento del

15 cáncer en la célula LNCaP incluso en un modelo animal. Con referencia al grupo de prueba 7) en el que se administró Pep1 conjuntamente con acetato de leuprolida y al grupo de prueba 6) en el que se administró acetato de leuprolida solo, se confirma que incluso la administración conjunta de Pep1 y acetato de leuprolida produce efectos de inhibición del volumen de células cancerosas.

20 Según los resultados de las pruebas asociadas con la administración conjunta de Pep1 y docetaxel, se confirmó que cuando se administró docetaxel conjuntamente con Pep1, se obtuvieron efectos de inhibición significativos. En el caso del grupo de prueba en el que se administraron conjuntamente 10 mg/kg de Pep1 con 20 mg/kg de docetaxel, en una fase de evaluación final, se obtuvieron distintos efectos de inhibición del crecimiento del cáncer (véase FIGURA 5, el eje Y de la FIGURA 5 indica un volumen tumoral (mm^3)). Es decir, incluso la administración conjunta de Pep1 y docetaxel ha tenido importantes efectos de inhibición del crecimiento del cáncer en la célula LNCaP en un

25 modelo animal.

Ejemplo 4: Medición del peso corporal del modelo de xenoinjerto de células LNCaP cuando se administró Pep1 al mismo

El peso corporal de cada uno de los grupos de prueba 1) de 7) descritos en el Ejemplo 3 se midió con respecto al crecimiento de células tumorales en el modelo de xenoinjerto LNCaP.

30 Los resultados de los ensayos obtenidos de los grupos de prueba muestran que el Pep1 administrado es seguro *in vivo* ya que no hubo una diferencia significativa en el peso corporal entre el control (vehículo. grupo de prueba 1)), los grupos de prueba 6) y 7) en los que el acetato leuprolida se administró solo o junto con Pep1, y los grupos de prueba 2) a 5) que tenían diferentes concentraciones de Pep1 (véase la FIGURA 6).

35 **Ejemplo 5: Evaluación de los efectos de inhibición de la migración de células cancerosas de Pep1 en el modelo de línea celular LNCaP**

Los efectos de Pep1 sobre la migración de células cancerosas se evaluaron mediante un ensayo de transpocillo.

La migración de células cancerosas se evaluó usando los reactivos y materiales y el procedimiento de incubación de la línea celular que se describe en relación con el Ejemplo 1. Un procedimiento de ensayo de migración utilizado para este experimento es el siguiente.

40 La línea celular LNCaP se incubó en una placa de 6 pocillos durante la noche, y luego se trató con diversas concentraciones de Pep1 (0, 1, 10, 30 μM) y se incubó durante 24 horas. Posteriormente, la línea celular LNCaP resultante se sembró en la población celular de 1×10^4 /pocillo en una placa de transpocillo. Tres horas después, se retiró el compartimento superior de cada pocillo, y las células que habían migrado hacia abajo fueron inmovilizadas, teñidas y cuantificadas.

45 Se realizó un experimento por separado para identificar la migración celular cuando Pep1 se administró conjuntamente con docetaxel. La línea celular LNCaP se incubó en una placa de 6 pocillos durante la noche, y luego, se trató con diversas concentraciones de Pep1 (0, 1, 3, 10 y 30 μM) y se incubó durante 24 horas. Además, la línea celular se incubó en un medio de crecimiento que contenía docetaxel (3 nM) durante 48 horas y luego se sembró en una placa de transpocillo a una población celular de 1×10^4 /pocillo. Tres horas después, se retiró el

50 compartimento superior de cada pocillo, y las células que habían migrado hacia abajo fueron inmovilizadas, teñidas y cuantificadas.

Para analizar los resultados de la prueba, se verificaron los promedios de los grupos de prueba realizando la -prueba t de Student. La referencia de la significación estadística se estableció en $p < 0,05$ (*) o $p < 0,01$ (**).

Según los resultados del ensayo transpocillo realizado como se describe anteriormente, en el caso del medio libre de Pep1 (0 μ M, control), la migración de células cancerosas se incrementó, pero en el caso del medio tratado con Pep1 (1 μ M, 10 μ M y 30 μ M), la migración de células cancerosas se inhibió estadísticamente de manera significativa (véanse las FIGURAS 7 y 8). Con referencia a las FIGURAS 7 y 8, el control se refiere a un grupo de prueba que se inyecta con LNCaP y no se trata con Pep1.

Se realizaron más experimentos en coadministración con docetaxel. En el caso del medio que contenía docetaxel (3 nM), la migración de células cancerosas aumentó, pero cuando el medio que contenía docetaxel (3 nM) se trató con Pep1 (3 μ M, 10 μ M y 30 μ M), la migración de células cancerosas fue significativamente inhibida estadísticamente (véanse las FIGURAS 9 a 14).

10 Ejemplo 6: Medición de la expresión de ARNm de marcadores de migración de células cancerosas (MMP9, MMP2) cuando el modelo de línea celular LNCaP se administró con Pep1

Se evaluaron los niveles de expresión relativos en tejidos con xenoinjerto de LNCaP para identificar la expresión de MMP9 (matriz de metaloproteinasa-9) y MMP2 (matriz de metaloproteinasa-2), que son marcadores de ARNm y muestran migración de células cancerosas (véanse FIGURAS 15 y 16).

15 Los grupos de prueba (14 a 16) se inyectaron con células LNCaP. Este experimento se realizó utilizando los reactivos y materiales y el procedimiento de incubación de la línea celular que se describe en relación con el Ejemplo 1.

La línea celular LNCaP era una célula de metástasis de cáncer de próstata humana, y se obtuvo del American Type Cell Culture (ATCC, Rockville, MD). La línea celular LNCaP se incubó en un RPMI que contenía 10% de FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina hasta que la población celular fue de 1 a 2 x 10⁶/ml en una incubadora de CO₂ al 5% en la que se mantuvo la temperatura a 37°C.

Animales de prueba: se inyectaron 3 grupos de prueba con la célula LNCaP. Los grupos de prueba consistieron en ratones BALB/c-nu de 5-semanas (obtenidos de Central Lab. Animal Inc., Seúl, Corea). Para cada grupo, se estabilizaron 6 ratones y 5 ratones adicionales durante 1 semana. Cada ratón se inyectó en su costado con la célula LNCaP que tenía la población celular de 1*10⁷ células suspendidas en 100 μ l de PBS, y se observó durante 25 semanas. Del total de 11 ratones, no se utilizaron 5 ratones que no habían desarrollado tumor o que habían tenido un tumor significativamente pequeño. Los 3 grupos de prueba, cada uno formado por los 6 ratones restantes, fueron tratados de acuerdo con las condiciones que se detallan a continuación durante 20 días.

Después del injerto, se administraron Pep1 y acetato de leuprolida (control positivo) a los 3 grupos de prueba mediante inyección subcutánea todos los días.

- 30 14) Control injertado con LNCaP (vehículo)
- 15) Injerto LNCaP + 10 mg/kg de Pep1
- 16) Injerto de LNCaP + 0,1 mg/kg de acetato de leuprolida

Para analizar los resultados de la prueba, se verificaron los promedios de los grupos de prueba realizando la prueba t de Student. La referencia de la significación estadística se estableció en p<0,05(*) o p<0,01 (**).

35 De los tejidos tumorales recolectados de los 3 grupos de prueba, se extrajo ARN, y se realizó RT-PCR sobre los mismos usando cebadores de MMP9 y MMP2. Cada muestra obtenida por amplificación por RT-PCR se dejó fluir a través de gel 2D por electroforesis, y luego, se tiñó con fluorescencia para medir el nivel de expresión. El ensayo de PCR de ARNm se realizó utilizando un procedimiento bien conocido.

40 El nivel de expresión relativo de MMP9 se evaluó con referencia al nivel de expresión del control (vehículo) establecido en 2 (véase la FIGURA 15), y el nivel de expresión relativo de MMP2 se evaluó con referencia al nivel de expresión del control (vehículo) se establece en 38 (véase FIGURA16).

MMP9 y MMP2 mostraron bajos niveles de expresión en tejidos tumorales que recibieron administración de Pep1 en comparación con el control (vehículo) y el control positivo (Leuprolida). Este resultado muestra que Pep1 es eficaz para la disminución de la migración de células cancerosas en los tejidos cancerosos.

45 En el Ejemplo 2, se confirmó que Pep1 mostró efectos de inhibición del crecimiento de la línea celular del cáncer de próstata cuando Pep1 se administró solo o junto con fármacos anticancerígenos convencionales. En los Ejemplos 3 y 5, se confirmó que Pep1 fue efectivo para la disminución del volumen de células cancerosas en un modelo animal injertado con la línea celular de cáncer de próstata (Ejemplo 3) y fue efectivo para la inhibición de la migración de células cancerosas de próstata (Ejemplo 5). En el Ejemplo 6, se confirmó que Pep1 fue efectivo para la inhibición de la expresión de un marcador de ARNm asociado con la migración de células cancerosas que muestra metástasis de 50 cáncer de próstata. En el Ejemplo 4, se confirmó que Pep1 tenía seguridad cuando se administraba ya que el peso corporal no cambiaba significativamente cuando se administraba. En conclusión, se ve que Pep1 es efectivo para inhibir el crecimiento y la metástasis del cáncer de próstata y tiene seguridad y, en consecuencia, Pep1 puede

incluirse en un agente inhibidor del crecimiento del cáncer de próstata o un agente inhibidor de la metástasis del cáncer de próstata. Por lo tanto, es probable que Pep1 se use en un fármaco contra el cáncer de próstata.

<110> KAEL-GEMVAX CO., LTD. KIM, Sangjae

<120> Una composición para el tratamiento del cáncer de próstata

5 <130> OF14P223/PCT

<150> KR 10-2013-0157456

<151> 2013-12-17

<150> KR 10-2013-0159571

<151> 2013-12-19

10 <160> 2

<170> PatentIn versión 3,2

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15

<210> 2

<211> 1132

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 809 251 T3

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
 85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
 100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
 115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
 130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val

ES 2 809 251 T3

				485						490						495
Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
			500					505					510			
Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
		515					520					525				
Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
	530					535					540					
Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
545					550					555					560	
Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
				565					570					575		
Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
			580					585					590			
Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
		595					600					605				
His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
	610					615					620					
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
625					630					635					640	
Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
				645					650					655		
Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
			660					665					670			
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	
		675					680					685				
Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro	
	690					695					700					
Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile	
705					710					715					720	
Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln	
				725					730					735		
Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His	
			740					745					750			
Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	
		755					760					765				
Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	
	770					775					780					
Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	
785					790					795					800	
Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His	
				805					810					815		
Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro	

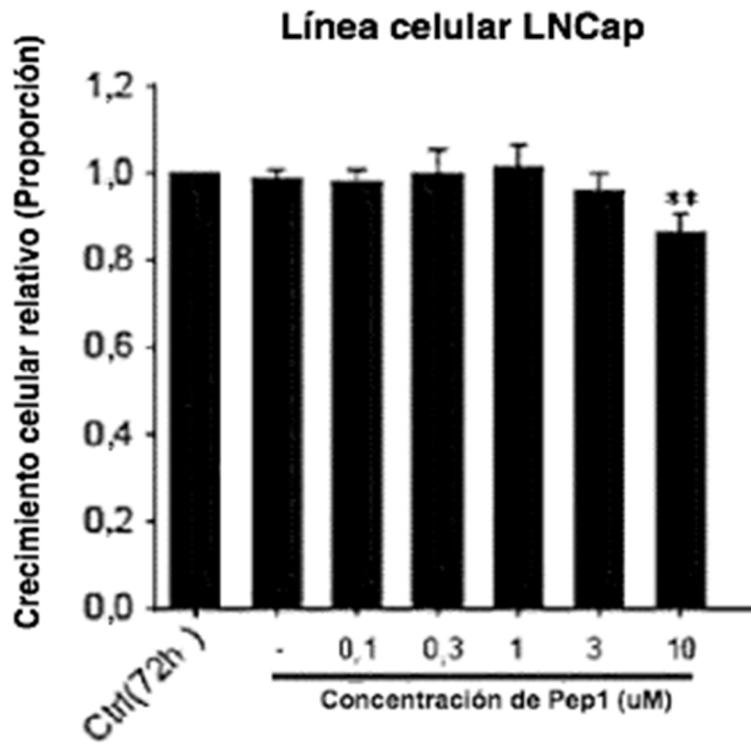
ES 2 809 251 T3

			820					825				830			
Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp
		835					840					845			
Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu
	850					855					860				
Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala
865					870					875					880
Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys
				885					890					895	
Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu
			900					905					910		
Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe
		915					920					925			
Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser
	930						935				940				
Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe
945					950					955					960
Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly
				965					970					975	
Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn
			980					985					990		
Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln
		995					1000					1005			
Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	Gln
	1010					1015					1020				
Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala
1025					1030					1035					1040
Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Met	Ser	Leu
				1045					1050					1055	
Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Trp
			1060					1065					1070		
Leu	Cys	His	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	Arg	His	Arg	Val	Thr
		1075						1080				1085			
Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Ser
	1090					1095					1100				
Arg	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn
1105					1110					1115					1120
Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp				
				1125					1130						

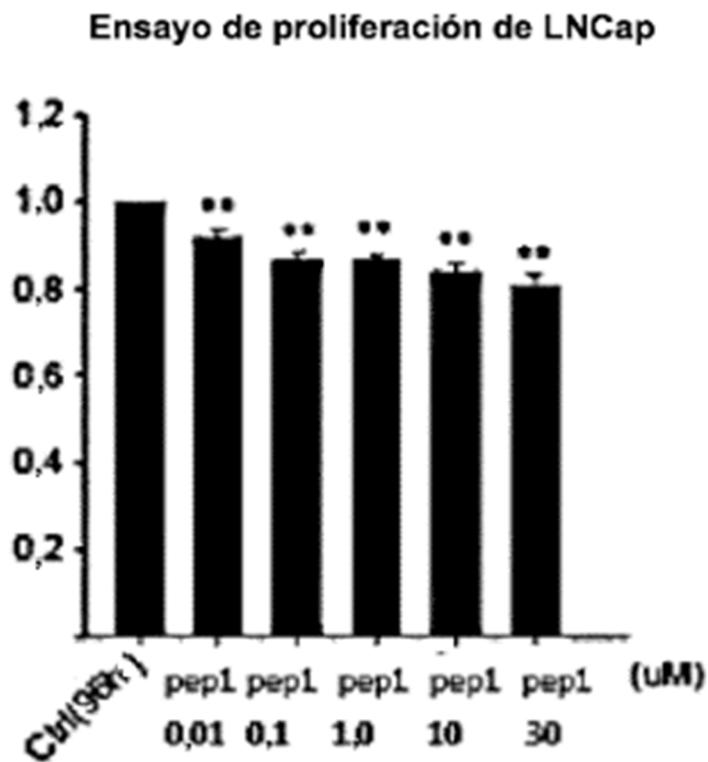
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata, en la que la composición es para ser administrada a un paciente con cáncer de próstata para inhibir el crecimiento o metástasis del cáncer de próstata, comprendiendo la composición un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o un fragmento activo de la misma, en la que el péptido o el fragmento de péptido se incluye en una cantidad efectiva para tratar el cáncer de próstata y en la que, en dicho uso, la composición es para ser administrada conjuntamente con un fármaco anticancerígeno.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el fármaco anticancerígeno comprende, como agente quimioterapéutico, docetaxel.
- 10 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el fármaco anticancerígeno comprende acetato de leuprolida.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición se administra a la vez que se combina con un adyuvante.
5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en la que el adyuvante comprende un adyuvante de citoquina.
- 15 6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que el adyuvante de citoquina comprende un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FEC-GM).
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición se administra a un paciente que tiene, a nivel sérico, una concentración (p/v) de al menos uno de eotaxina y MIP1 α que es al menos 10% tan alta como una concentración promedio de eotaxina y MIP1 α de todos los pacientes, incluido el paciente.
- 20 8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición se usa para tratar el cáncer de próstata que tiene una tolerancia hormonal.
9. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición se usa conjuntamente con acetato de leuprolida, que es un fármaco anticáncer, y se usa con FEC-GM como adyuvante.
- 25 10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; en el que la composición está comprendida en un kit junto con un manual.
11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en el que el manual comprende un contenido en el que la composición para tratar el cáncer de próstata se administra conjuntamente con un fármaco anticancerígeno seleccionado de docetaxel y acetato de leuprolida; la composición se administra a la vez que se combina con un adyuvante; y la composición se administra a un paciente que tiene, a nivel sérico, una concentración de eotaxina (p/v) que es al menos 10% tan alta como una concentración promedio de eotaxina de pacientes con cáncer de próstata, incluido el paciente.
- 30 12. Un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata, en el que el péptido inhibe el crecimiento o metástasis del mismo en un paciente con cáncer de próstata, y en el que, en dicho uso, el péptido es para ser administrado conjuntamente con un fármaco anticancerígeno.
- 35 13. El péptido para el uso de la reivindicación 12, en el que el fármaco anticancerígeno es docetaxel.
14. El péptido para el uso de la reivindicación 12, en el que el fármaco anticancerígeno es acetato de leuprolida.

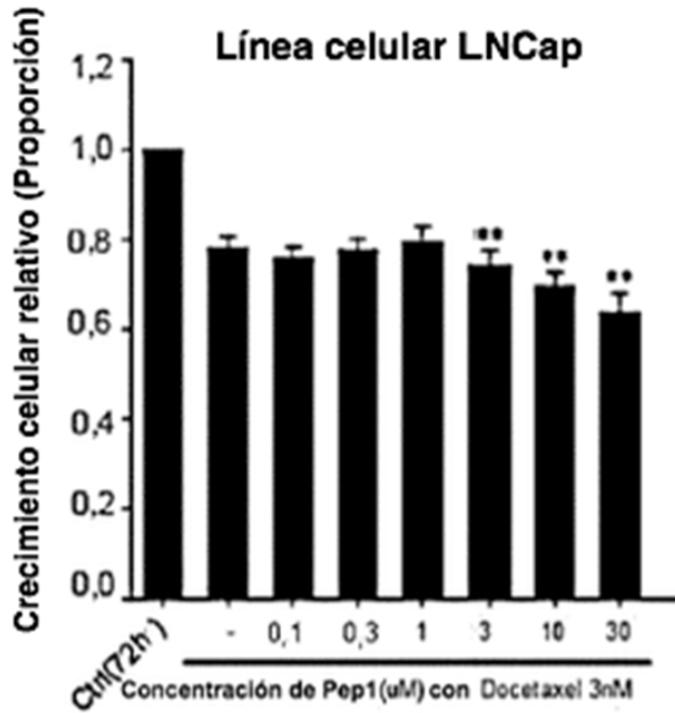
[figura1]



[figura2]

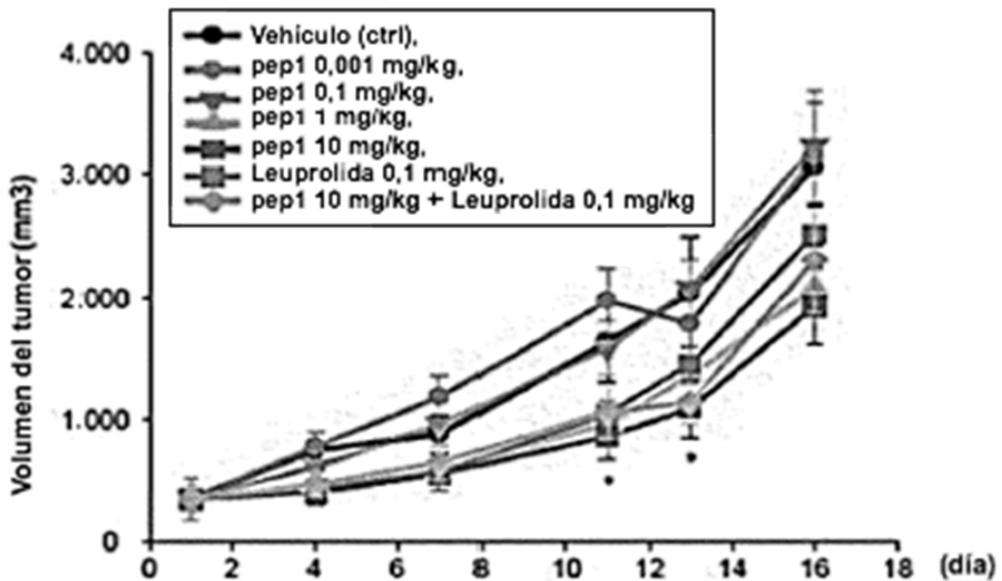


[figura 3]

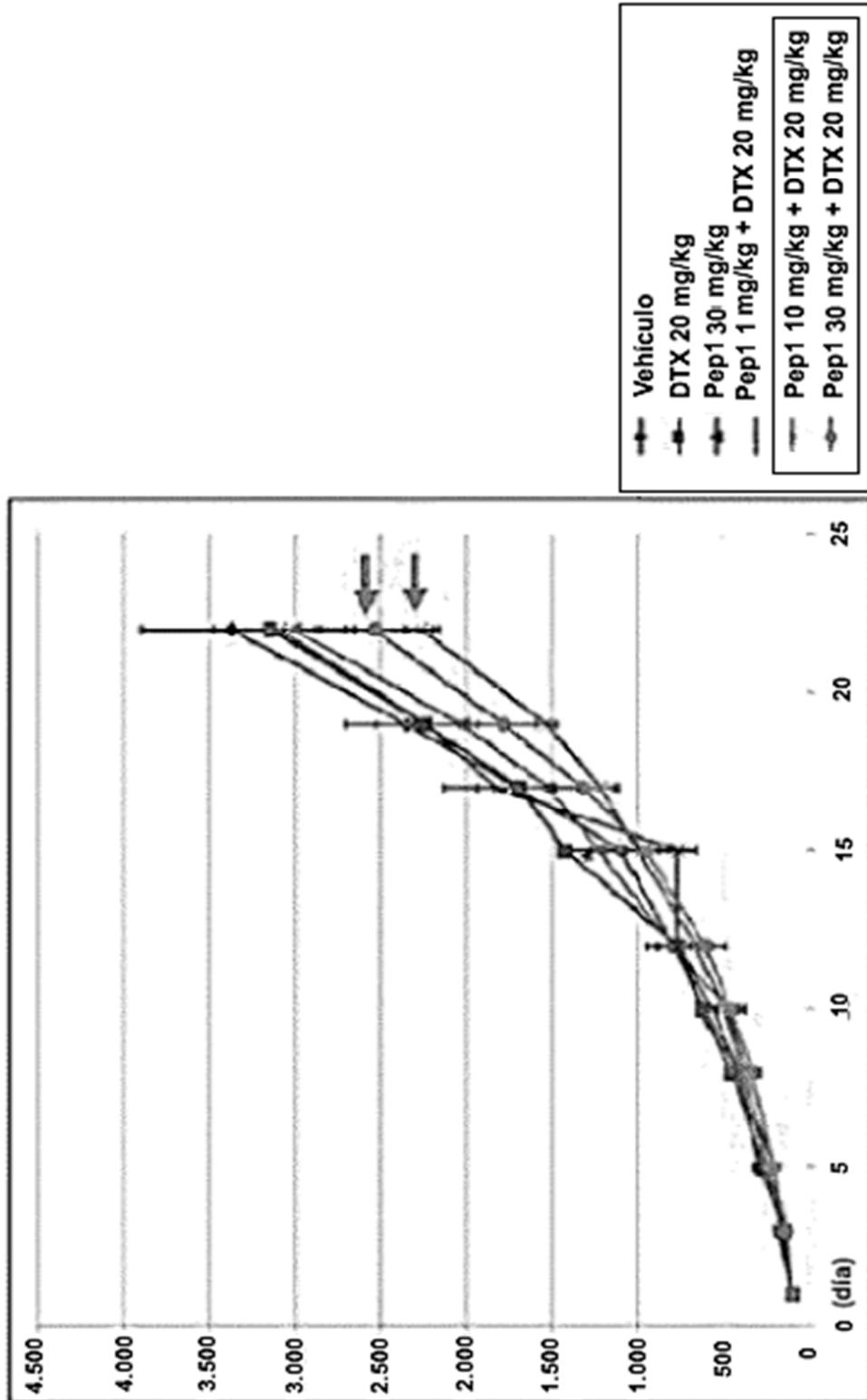


[figura 4]

**Modelo de xenoinjerto de LNCap
Crecimiento del tumor**

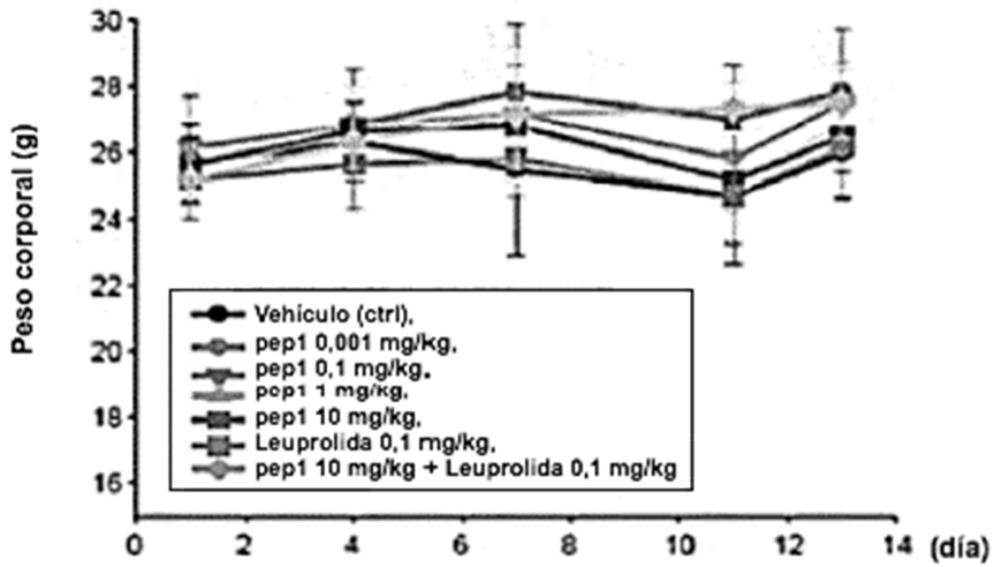


[figura 5]



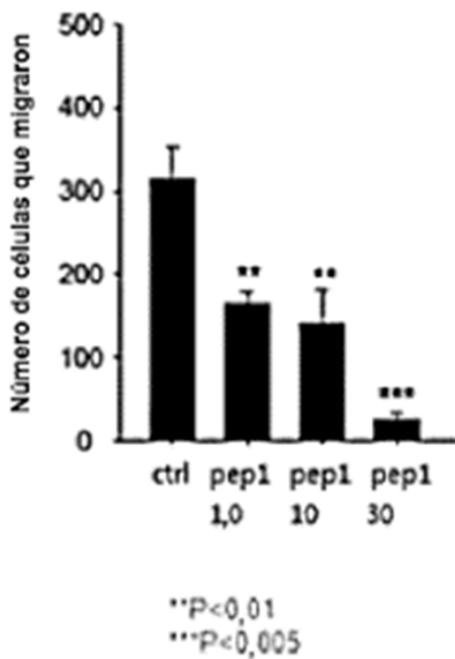
[figura 6]

**Modelo de xenoinjerto de LNCap
Crecimiento del tumor**

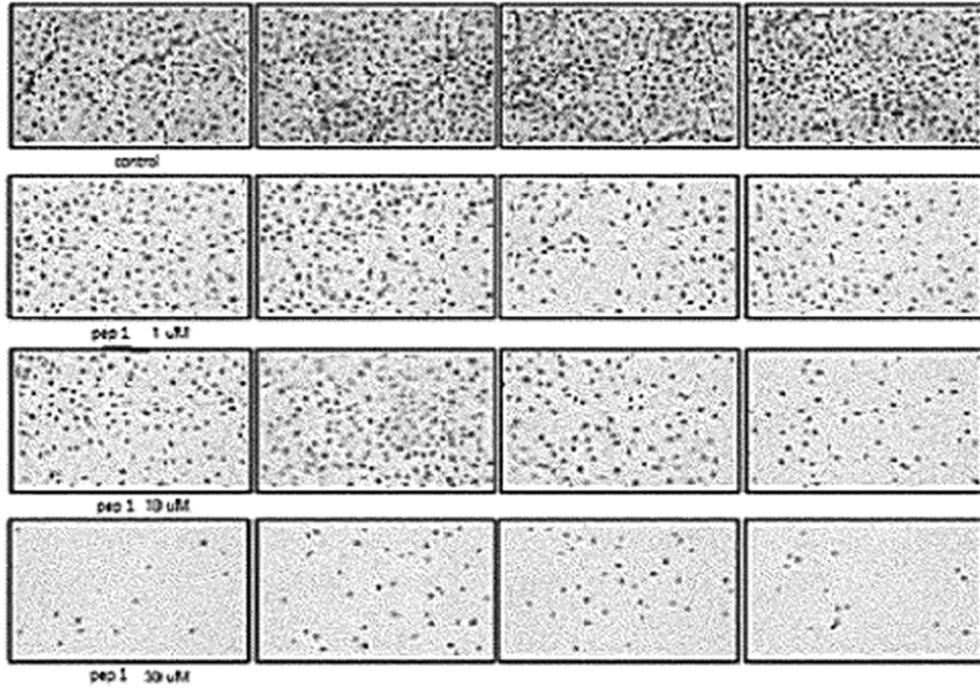


[figura 7]

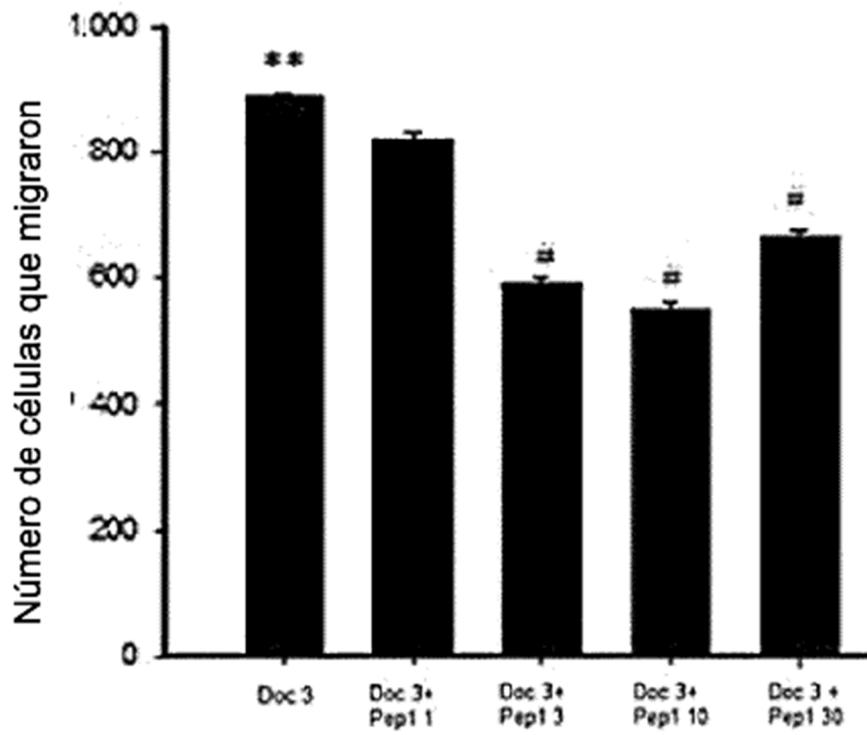
Ensayo de migración de LNCap



[figura8]

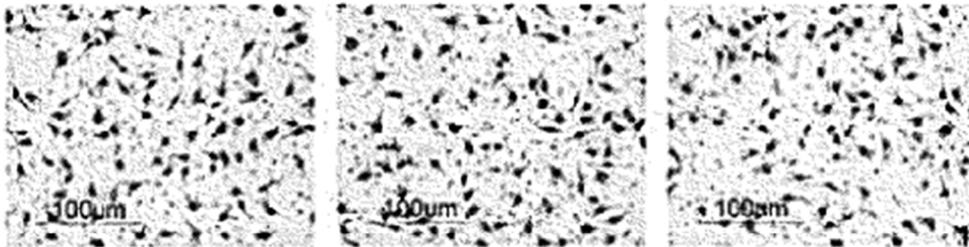


[figura9]



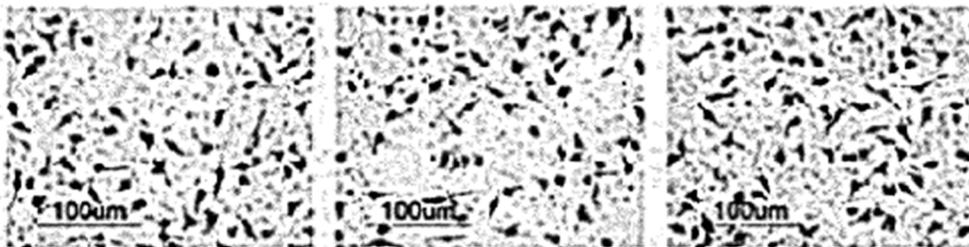
[figura 10]

Docetaxel 3 nM



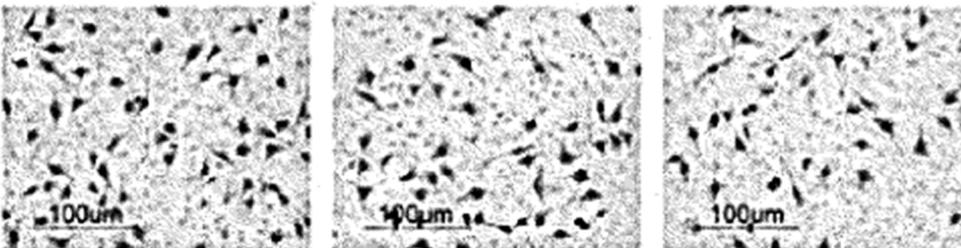
[figura 11]

Docetaxel 3 nM + Pep1 1 µM



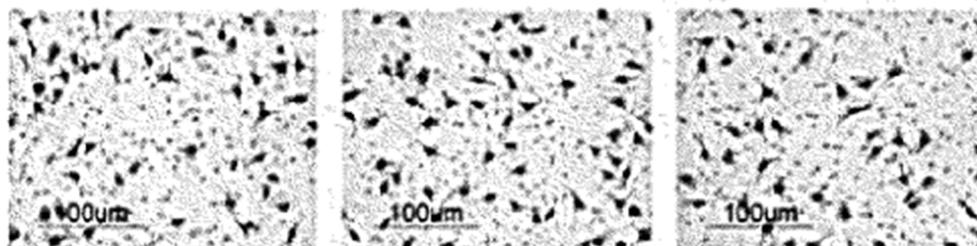
[figura 12]

Docetaxel 3 nM + Pep1 3 µM



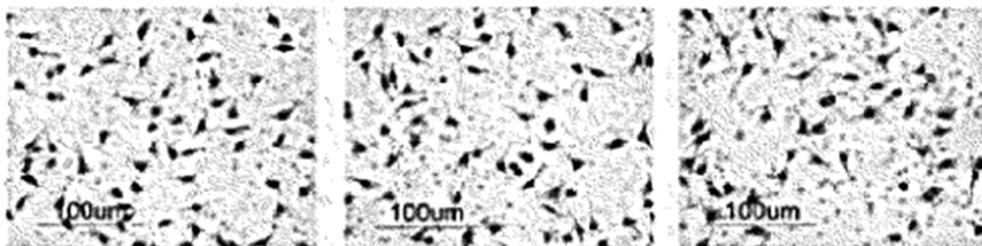
[figura 13]

Docetaxel 3 nM + Pep1 10 µM

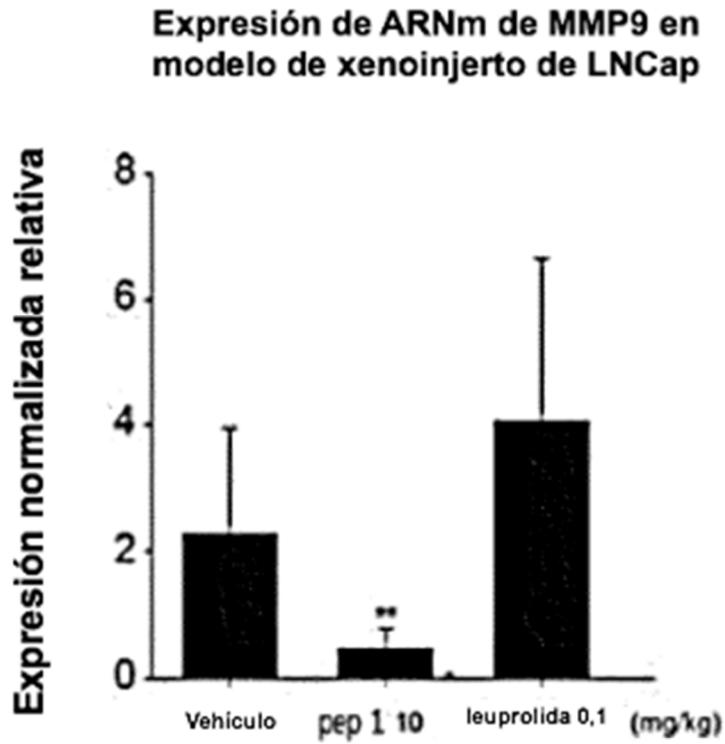


[figura 14]

Docetaxel 3 nM + Pep1 30 µM



[figura15]



[figura 16]

