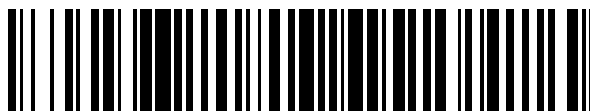


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 910**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2017 E 17382546 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3438128**

54 Título: **Uso de un anticuerpo antipresenilina para la prevención y/o tratamiento del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.04.2021**

73 Titular/es:  
**ALZHEIMUR 2012 S.L (25.0%)  
C/ Extremadura 4  
30565 Las Torres de Cotillas (Murcia), ES;  
IECSCYL, FUNDACIÓN INSTITUTO DE ESTUDIOS  
DE CIENCIAS DE LA SALUD DE CASTILLA Y  
LEÓN (25.0%);  
FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO  
(25.0%) y  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (25.0%)**

72 Inventor/es:  
**GONZÁLEZ SARMIENTO, ROGELIO;  
RODRÍGUEZ MANOTAS, MIGUEL;  
FERNÁNDEZ MATEOS, JAVIER;  
GALLAR RUIZ, JUAN CARLOS y  
FLORENCIANO GÓMEZ, DAVID**

74 Agente/Representante:  
**DÍAZ PACHECO, María Desamparados**

ES 2 817 910 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

Uso de un anticuerpo antipresenilina para la prevención y/o tratamiento del cáncer

5 La presente invención se refiere al uso de anticuerpos anti-presenilina en el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, la presente invención se encuadra en el sector de la medicina, más concretamente, en el sector de la biología molecular aplicada a la medicina, la farmacología y la oncología.

**Estado de la técnica**

10 Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer provoca cerca de 8 millones de muertes al año, lo que la convierte en la principal causa de muerte a nivel mundial. Incluso se espera que de aquí al 2035 cerca de 15 millones de fallecimientos por año estarán relacionados con los tumores.

15 El tratamiento del cáncer es abordado por diferentes aproximaciones, normalmente combinadas, que pueden clasificarse en los siguientes grupos principales: terapias biológicas, quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia, trasplantes de células madre y de médula ósea, cirugía, y terapias de soporte (p.ej. bifosfonatos, eritropoyetina, factores de crecimiento hematopoiético, esteroides y transfusiones de plaquetas). La terapia biológica, también conocida como inmunoterapia, utiliza sustancias que produce el cuerpo naturalmente para destruir las células cancerosas. Hay diversos tipos de tratamientos incluyendo anticuerpos monoclonales, inhibidores del crecimiento del cáncer, inhibidores de la angiogénesis, vacunas y terapia génica, entre otros. La inmunoterapia está dirigida a una múltiple variedad de dianas.

20 El conocimiento de las diferentes vías moleculares, de las características de los diferentes tumores, así como de la fisiología de las células tumorales, ha permitido el diseño de nuevos fármacos para bloquear la acción de diferentes proteínas implicadas en las diferentes vías de transducción de la señal críticas para el crecimiento y la división celular. De entre las vías mejor caracterizadas están aquellas mediadas por receptores de la familia de las proteínas tirosin-quinasa (TK), siendo uno de los miembros principales de esta familia el factor de crecimiento EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), que incluye los receptores EGFR/HER1, ErbB- 2/HER2, ErbB-3/HER3 y ErbB-4/HER4, involucrados principalmente en las vías de señalización MAPK (proteínas quinasa activadas por mitógenos), la ruta P13K (fosfatidilinositol- 3-kinasa), que contribuye a la progresión del ciclo celular, disminuye la apoptosis y promueve la metástasis de células cancerígenas, y las vías JAK/STAT y fosfolipasa C 1 gamma (PLCγ), relacionadas con la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular. Otros miembros de esta familia también son las proteínas PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGFR (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos) y VEGFR (receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular). Los receptores de esta familia se encuentran frecuentemente implicados en neoplasias de animales y humanos y una sola célula tumoral puede sobre-  
35 expresar más de un tipo de estos receptores. Para estos receptores se han desarrollado inhibidores de la actividad tirosin-quinasa, tales como por ejemplo, gefitinib, erlotinib y lapatinib, así como anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular del receptor. De entre los anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados para su uso en oncología, el trastuzumab es un anti- ErbB2/HER2 para el cáncer de mama, el cetuximab es un anti-ErbB1/EGFR para el cáncer de colon, y bevacizumab es un anti-VEGF para cánceres colorectales, de mama y de pulmón (cfr. G. Adams et al., Nature Biotechnology 2005, vol. 23, pp. 1147-57). Inhibidores multidiana (como Sutent) que inhiben la actividad tirosin-quinasa de VEGFR, PDGFR y FGFR.

40 Alternativamente, también diferentes inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales humanizados han sido diseñadas basadas en la proteína MUC1. MUC1 ha sido utilizado como marcador tumoral en seguimiento terapéutico en pacientes con cáncer de mama, conocido como el marcador CA15.3; se encuentra elevado 10 a 15 veces en pacientes con cáncer metastásico, aunque su valor pronóstico solo es importante cuando se analiza junto con otros parámetros. De entre los anticuerpos monoclonales diseñados frente a MUC1 destacan el huBrE-3 y el R-1549 (pemtumomab), utilizados en tratamientos combinados de radioinmunoterapia en cáncer de mama y otros cánceres con resultados prometedores.

50 Por otro lado, también se ha observado que células del sistema inmunológico asociadas al microambiente tumoral expresan mayor cantidad de receptores, como el CTLA4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) y la PD1 (proteína de muerte programada 1), implicados en la regulación negativa de la activación de los linfocitos y en la tolerancia inmunológica. El bloqueo de los receptores CTLA4 mediante anticuerpos dirigidos contra ellos o sus ligandos favorece la inmunidad antitumoral; es por ello que la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado el uso de algunos de estos anticuerpos, como el Ipilimumab, para la terapia complementaria en cáncer.

60 Sin embargo, la mayoría de estas terapias, las cuales generalmente han sido complementarias a los tratamientos tradicionales ya conocidos, así como a los nuevos agentes de quimioterapia diseñados, han dado resultados bastante modestos, tanto en la enfermedad local avanzada, como en el estado metastásico. Por lo tanto, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, dirigiendo dichas estrategias a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

**Descripción de la invención**

Los inventores han descubierto la utilidad de un anticuerpo anti-presenilina, o un fragmento del mismo, para su uso en la

prevención y/o tratamiento del cáncer. Específicamente, los inventores han demostrado que el uso de un anticuerpo anti-presenilina o un fragmento del mismo, específicamente un anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de unirse al antígeno que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 [LIYTPFTE] de la presenilina, es útil en la prevención y/o tratamiento del cáncer.

5 Las presenilinas son proteínas transmembrana cuyos genes, preferiblemente en humanos, presentan una elevada homología entre ellos (80% de identidad a nivel de nucleótidos). En la presente invención se entiende, por tanto, por "presenilina" la presenilina 1 que comprende la SEQ ID NO: 2, o la presenilina 2 que comprende la SEQ ID NO: 3.

10 El término "antígeno" a efectos de la presente invención se refiere a una región predeterminada al que el anticuerpo es capaz de unirse de manera selectiva. El antígeno puede ser un polipéptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un lípido, un hapteno u otra molécula natural o sintética. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido, más preferiblemente, el antígeno comprende la SEQ ID NO: 1.

15 Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 1 [LIYTPFTE] de la presenilina para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, en un sujeto. Alternativamente, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 1 [LIYTPFTE] de la presenilina, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento del cáncer en un sujeto.

20 En una realización preferida, la presenilina se selecciona de entre presenilina 1 que comprende la SEQ ID NO: 2, o la presenilina 2 que comprende la SEQ ID NO: 3.

25 En una realización preferida, el uso del anticuerpo descrito en la presente invención es útil en la prevención y/o tratamiento de tumores mediante la inhibición del crecimiento de las células tumorales, consecuencia de la inhibición y/o disminución de la expresión de proteínas tales como NOTCH.

30 Una de las ventajas del uso de un anticuerpo anti-presenilina que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1 para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, tal y como se describe en el presente documento, es que dicho anticuerpo no atraviesa la barrera hematoencefálica, evitando así los efectos adversos de dicho hecho.

35 El péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 es un péptido de ocho aminoácidos que corresponde a los residuos 14 a 21 de la secuencia aminoacídica del bucle luminal 1 (LL1 ) de la primera región luminal (RL1 ) de la presenilina 1 ó presenilina 2. El LL1 de la RL1 de la presenilina 1 comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4. El LL1 de la RL1 de la presenilina 2 comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de SEQ ID NO: 1 como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles en la prevención y/o tratamiento del cáncer.

40 A efectos de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulinas, o a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el LL1 de la RL1 de las presenilina 1 (SEQ ID NO: 2) ó presenilina 2 (SEQ ID NO: 3), y más específicamente con el péptido de SEQ ID NO: 3, que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina, o recombinantemente.

45 En una realización preferida, el anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión "anticuerpo monoclonal" alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítomo particular del antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del antígeno. En una realización preferida el anticuerpo, según se describe su uso en la presente invención, es preferiblemente un anticuerpo policlonal.

50 En otra realización preferida del uso del anticuerpo según se describe en la presente invención, éste se caracteriza porque puede ser un anticuerpo recombinante, humanizado, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un "anticuerpo recombinante" (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con un polinucleótido que codifica para el péptido que comprende la SEQ ID NO: 1, con un ácido nucleico codificante para el anticuerpo de la invención, o que produce el anticuerpo que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1, o el péptido de SEQ ID NO: 1, como resultado de la recombinación homóloga. Un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo en el que una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias

correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

5 El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- 10 (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

15 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

20 A efectos de la presente invención, el término "cáncer" se refiere a un tumor maligno de potencial crecimiento ilimitado que se expande localmente por invasión y sistémicamente por metástasis. El término cáncer en la presente invención abarca tumores sólidos, así como tumores hematológicos, tales como las leucemias, linfomas y los síndromes mielodisplásicos. De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1 de la presenilina, preferiblemente humana, se administran a individuos con cáncer.

25 En una realización preferida del uso del anticuerpo según se describe en la invención, se caracteriza por que el cáncer comprende tumores sólidos, y/o tumores hematológicos, tales como las leucemias, linfomas y los síndromes mielodisplásicos.

30 En otra realización preferida, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cérvix, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma

35 de células renales, tumores del sistema nervioso central (SNC) y periférico, tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas y/o adenoma de hipófisis, linfomas y leucemias. En una realización particular, el cáncer es preferiblemente cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma, linfomas y/o leucemias.

40 El término "sujeto" o "paciente", como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un medicamento o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-presenilina, según se ha descrito previamente, junto con un vehículo y/o excipiente farmacológicamente aceptable, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer. Alternativamente, la presente invención se refiere al uso de un medicamento o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-presenilina, según se ha descrito previamente, junto con un vehículo y/o excipiente farmacológicamente aceptable, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento del cáncer.

50 El término "medicamento" o "composición farmacéutica", utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en los organismos, preferiblemente seres humanos, o que pueda usarse o administrarse a los organismos, preferiblemente seres humanos, con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

55 El medicamento o composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para prevenir y/o mejorar el cáncer a modo de terapia combinada, pudiendo ser administrados al mismo tiempo o en tiempos diferentes. La elaboración de la composición farmacéutica puede llevarse por cualquiera de los métodos conocidos y descritos en el estado de la técnica.

60 El "vehículo farmacéuticamente aceptable", se refiere a una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Se emplean preferiblemente como

vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Los "vehículos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables" 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. Dichos compuestos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

Tanto el anticuerpo descrito en la presente invención como la composición farmacéutica que lo comprende, se utilizan en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de anticuerpo de la invención o de composición farmacéutica que lo comprenda, que produzca el efecto deseado de prevención y/o tratamiento del cáncer, preferiblemente inhibiendo el crecimiento del mismo, sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrado el anticuerpo o a la composición farmacéutica de la invención que lo comprende.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, pildoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables. En una realización particular del uso de la composición farmacéutica de la invención, ésta está formulada para su administración oral, parenteral, intravenosa o intratumoral.

Tal composición 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, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intrasinovial, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intracapsular, oral, enteral, parenteral, intranasal, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico o bomba de infusión. Una vía de administración preferida de la invención para el tratamiento y/o prevención del cáncer es la administración intravenosa.

En otra realización particular de los usos de la composición farmacéutica de la invención, ésta se caracteriza por que comprende además un agente antitumoral.

Por "agente antitumoral" o "agente quimioterapéutico", utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se entiende cualquier sustancia capaz de inhibir la proliferación celular o que es capaz de inducir la muerte celular. Los agentes capaces de inhibir la proliferación celular sin provocar muerte celular se denominan 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 antitumorales adecuados para su uso en la composición de la invención incluyen, sin limitar a, (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 receptores con actividad quinasa incluyendo, sin limitarse a, Trastuzumab (Herceptin(R)), Cetuximab (Erbix(R)), Bevacizumab (Avastin™), Rituximab (ritusan(R)), Pertuzumab (Omnitarg™); (iv) inhibidores de la ruta mTOR, tales como rapamicina y CCI-778; (v) Apo2L1Trail, (vi) agentes anti-angiogénicos 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 como doxorubicina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, epirubicina, mitomicina, mitozantrona, etc; (ix) agentes alquilantes tales como Melphalan, Carmustina, Lomustina, ciclofosfamida, ifosfamida, Clorambucilo, Fotemustine, Busulfano, Temozolomida y thiotepa; (x) agentes hormonales antineoplásicos 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, dexametasona, hidrocortisona, prednisolona y prednisona; (xv) agentes antineoplásicos tales como Carboplatino, Cisplatino, Oxaliplatino, Etoposido y Dacarbazina, (xvi) inhibidores de topoisomerasa tales como topotecana e irinotecano; (xvii) agentes epigenéticos tales como inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de metiltransferasas de histonas, inhibidores de desmetilasas de histonas e inhibidores de

metiltransferasas de DNA y (xviii) agentes moduladores de la autofagia tales como cloroquina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo o de la composición farmacéutica que lo comprende, según se describe en la presente invención.

5 Los términos y expresiones empleados en el presente aspecto inventivo ya han sido definidos en aspectos inventivos anteriores. A su vez, todas las realizaciones particulares anteriormente descritas en la presente invención son aplicables a los métodos de la invención.

10 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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

**Descripcion de las figuras**

15 Fig. 1. Análisis de la viabilidad de las líneas celulares tumorales MCF7 (A), PC3 (B), CAL33 (C), HCT116 (D) y MEF (E), en presencia del anticuerpo anti-presenilina 1 que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1, a las concentraciones de 5 y 50 µg/mL, durante 0, 24, 48 y 72h, respecto al grupo control no tratado con el anticuerpo. El crecimiento celular se midió con el ensayo de MTT y es expresado como el porcentaje respecto a las células control.

20 Fig. 2. Fotografías de Western Blot de las proteínas NOTCH, NFKb e IKKb en células MCF7 tratadas con el anticuerpo anti-presenilina 1 que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1, a las concentraciones de 5 y 50 µg/mL, durante 0, 24, 48 y 72h, respecto al grupo control no tratado con el anticuerpo.

**Ejemplos**

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

30 Los siguientes ejemplos demuestran que el uso de un anticuerpo específico frente a la proteína presenilina dirigido frente al péptido LIYTPFTE (SEQ ID NO: 1) que se encuentra dentro del bucle luminal 1 de dicha proteína es útil en el tratamiento del cáncer, ya que es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales en cultivo. El anticuerpo anti-presenilina dirigido frente al péptido de SEQ ID NO: 1 utilizado en los siguientes ejemplos es un anticuerpo policlonal.

**Material y métodos.**

**Cultivos celulares**

35 Para demostrar la capacidad de prevención y/o tratamiento del cáncer, preferiblemente tumores sólidos, del anticuerpo descrito en el presente documento se han utilizado líneas celulares todas ellas derivadas de diferentes tipos de cáncer (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de líneas celulares utilizadas en los ejemplos de la invención. Todas las líneas celulares han sido adquiridas en la ATCC (*American Type Culture Collection*)

40

	Cáncer	Líneacelular	Tipo
45	Mama	MCF7 (ATCC® HTB-22™)	Luminal
	Cabeza y cuello	CAL33 (ACC 447)	Carcinoma escamoso
50	Colon	HCT116 (ATCC® CCL-247™)	Epitelial
55	Próstata	PC3 (ATCC® CRL-1435™)	Adenocarcinoma

Además de las líneas celulares de la Tabla 1, se ha ensayado el uso del anticuerpo de la invención en un cultivo primario de fibroblastos humanos (MEF). Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de dichas líneas celulares se prepararon a partir de los medios comerciales RPMI y DMEM (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) suplementados con FBS (suero fetal bobino) (*Sigma, St Louis, MO, USA*) al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% (*Invitrogen*). Todas las líneas celulares se cultivaron a una temperatura de 37°C y, 5% de CO<sub>2</sub>, con DMEM a excepción de la línea celular del cáncer de cabeza y cuello (CAL33) que se cultivó en medio RPMI. Se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37°C, en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de aire (aire saturado de humedad).

#### **Obtención del Anticuerpo anti-presenilina que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1.**

La SEQ ID NO: 1 es un péptido de 8 aminoácidos que se corresponde a los residuos 14 a 21 de la secuencia aminoacídica del bucle luminal 1 (LL1) de la primera región luminal (RL1) de la presenilina 1 o 2. Dicho péptido antigénico de SEQ ID NO: 1 fue sintetizado mediante técnicas de fase sólida y purificado por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) alcanzando una pureza del 97,21 %. Se modificó la secuencia peptídica original de la SEQ ID NO: 1, añadiendo un residuo de cisteína al extremo N- terminal del péptido. El péptido se unió covalentemente mediante enlaces disulfuro a BC ("*Blue Carrier Immunogenic Protein*" de Pierce). Se inmunizaron un total de dos gallinas con el complejo BC-péptido y adyuvante de Freund (de Sigma) y se inyectaron refuerzos con intervalos de 14, 28 y 56 días. Se recogieron los huevos de cada gallina entre los días 40 y 71 posteriores al comienzo de la inmunización. Se separaron las yemas, eliminaron los lípidos y precipitaron/purificaron los anticuerpos con el kit de separación de Pierce ("*Pierce Chicken IgY Purification Kit*" de Thermo Scientific). Se obtuvieron dos lotes de anticuerpo correspondientes a cada uno de los animales inmunizados: Policlonal1 y Policlonal2.

#### **Ensayo de viabilidad celular MTT**

El MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio, es una sal de tetrazolio que en solución acuosa presenta color amarillento. En células metabólicamente activas es reducido vía mitocondrial por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), dando lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul oscuro, formazán, el cual es soluble en DMSO (dimetilsulfóxido), dando lugar a una disolución cuya absorbancia se mide a 570nm en un espectofotómetro, siendo la intensidad de color proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas. Por lo tanto, el método MTT es un ensayo colorimétrico que permite determinar el crecimiento y la supervivencia celular, así como el efecto citotóxico de cualquier agente sobre líneas celulares encultivo.

Para llevar a cabo el ensayo MTT, se sembraron 10.000 células por pocillo (10.000 cel/ml) en 4 placas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir su adherencia. A continuación, se testaron diferentes concentraciones del anticuerpo, 5µg/ml y 50µg/ml, por triplicado a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas. Como control se utilizaron células no tratadas con el anticuerpo. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 110µl de MTT. Transcurrida 1h a 37°C, se aspira el sobrenadante y se añade 1ml de DMSO para disolver los cristales de formazán depositados en el fondo de los pocillos. Por último, se determinaron las absorbancias a 570 nm mediante un lector de microplacas UltraEvolution (TecanR).

#### **Western Blot**

Utilizando la técnica de Western-blot (WB) se determinó mediante anticuerpos monoclonales la cantidad de las proteínas NOTCH (anticuerpo monoclonal ab52627 de Abcam), NFκB (anticuerpo monoclonal sc.8008 de Santa Cruz Biotechnology) e IKKβ (anticuerpo monoclonal D30C6 de Cell Signalling), en la línea celular de cáncer de mama MCF7. En la Fig. 2 se muestran fotografías representativas de Western Blot de dichas proteínas en la línea celular MCF7 sin tratamiento o tratada con el anticuerpo anti-presenilina utilizado en la invención, a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas. Todos los anticuerpos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos

Tipo de anticuerpo	Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Referencia	Dosis usada
Primario	Anti- $\beta$ -Actina	Ratón	Sigma-Aldrich	A5441	1:10000
	Anti-Notch-1	Conejo	ABCAM	ab52627	1:2000
	Anti-NF- $\kappa$ B	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc8008	1:200
	Anti-I $\kappa$ $\beta$	Conejo	Cell Signaling	8943S	1:1000
	Anti-Notch (región extracelular)	Conejo	EMD Millipore	ABS90	1:500
Secundario	Anti-Ratón	Oveja	Sigma-Aldrich	NXA931V	1:10000
	Anti-Conejo	Cabra	EMD Millipore	AP307P	1:10000

5 Brevemente, las células se recogieron a los tiempos de estudio mencionados y se extrajo la proteína total soluble con PBS en presencia de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich), mediante 3 ciclos de congelación-descongelación. Una vez cuantificada por el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA), 10 microgramos de proteína total soluble se sometieron a PAGE-SDS al 10% y posterior transferencia a membrana de polifluoruro de vinilideno. A continuación, se llevó a cabo el WB de forma estándar usando las concentraciones de los anticuerpos monoclonales sugeridos por la casa comercial. La captura de imagen de los WB se realizó con el sistema de documentación Gel Doc™ XR+ (BioRad) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó con el software Image Lab v5.2 (BioRad). El estudio por WB se repitió en tres ensayos independientes. Como control positivo de carga se utilizó el anticuerpo frente a la  $\beta$ -actina.

15 A modo de ejemplo se muestran en la Fig. 2 las fotografías de los resultados de Western Blot obtenidos los resultados con la línea celular

**Ejemplo 1. El anticuerpo anti-presenilina 1 que reconoce específicamente la SEQ ID NO: 1 inhibe el crecimiento de células tumorales.**

20 Los resultados mostrados en las Fig. 1 ponen de manifiesto que el tratamiento con 50

25  $\mu$ g/ml del anticuerpo anti-presenilina 1 que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1 es capaz de inhibir la viabilidad de líneas celulares tumorales de diferente procedencia, tales como: células de cáncer de mama (MCF7), cáncer de próstata (PC3), cáncer de cabeza y cuello (CAL33), cáncer de colon (HCT116) y el cultivo primario de fibroblastos (MEF), respecto a las células control, también tumorales pero no tratadas con el anticuerpo anti-presenilina aquí indicado.

30 Además, tal y como se observa también en la Fig. 2, el tratamiento con 50  $\mu$ g/ml del anticuerpo anti-presenilina 1 disminuye la viabilidad celular en función del tiempo, analizado mediante WB. A las 72 h de incubación de las células MCF7 en presencia del anticuerpo anti-presenilina se produce una inhibición de la expresión de las proteínas NOTCH, NFB e I $\kappa$  $\beta$ . La ausencia de expresión de NOTCH y de las proteínas de la vía NFKB podrían ser las responsables de la disminución de la viabilidad de las células tumorales.



ES 2 817 910 T3

<110> ALZHEIMUR 2012 SL Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

<120> USO DE UN ANTICUERPO ANTIPRESENILINA PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DEL CANCER

<130> EP3597.1

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Residuos 14 a 21 de la secuencia aminoacidica del bucle luminal 1 (LL1) de la primera region luminal (RL1) de la presenilina 1 ó 2.

<400> 1

Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu  
1 5

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met  
1 5 10 15

Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn  
20 25 30

Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu  
35 40 45

Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu  
50 55 60

Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys  
65 70 75 80

His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val  
85 90 95

Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln  
100 105 110

ES 2 817 910 T3

Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg  
 115 120 125  
 Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val  
 130 135 140  
 Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys  
 145 150 155 160  
 Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe  
 165 170 175  
 Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala  
 180 185 190  
 Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val  
 195 200 205  
 Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala  
 210 215 220  
 Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr  
 245 250 255  
 Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val  
 260 265 270  
 Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr  
 275 280 285  
 Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu  
 290 295 300  
 Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe  
 325 330 335  
 Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg  
 340 345 350  
 Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile



ES 2 817 910 T3

	100		105		110										
Thr	Glu	Lys	Asn	Gly	Gln	Leu	Ile	Tyr	Thr	Pro	Phe	Thr	Glu	Asp	Thr
	115						120					125			
Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Arg	Leu	Leu	Asn	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Leu	Ile
	130					135					140				
Met	Ile	Ser	Val	Ile	Val	Val	Met	Thr	Ile	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Tyr
145				150						155					160
Lys	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Lys	Phe	Ile	His	Gly	Trp	Leu	Ile	Met	Ser	Ser
				165					170					175	
Leu	Met	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Gly	Glu	Val	Leu
			180					185					190		
Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Ala	Met	Asp	Tyr	Pro	Thr	Leu	Leu	Leu	Thr	Val
		195					200					205			
Trp	Asn	Phe	Gly	Ala	Val	Gly	Met	Val	Cys	Ile	His	Trp	Lys	Gly	Pro
	210					215					220				
Leu	Val	Leu	Gln	Gln	Ala	Tyr	Leu	Ile	Met	Ile	Ser	Ala	Leu	Met	Ala
225					230					235					240
Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Tyr	Leu	Pro	Glu	Trp	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Leu
				245					250					255	
Gly	Ala	Ile	Ser	Val	Tyr	Asp	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Pro	Lys	Gly
			260					265					270		
Pro	Leu	Arg	Met	Leu	Val	Glu	Thr	Ala	Gln	Glu	Arg	Asn	Glu	Pro	Ile
		275					280					285			
Phe	Pro	Ala	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ala	Met	Val	Trp	Thr	Val	Gly	Met
	290					295					300				
Ala	Lys	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Gln	Gly	Ala	Leu	Gln	Leu	Pro	Tyr	Asp
305					310					315					320
Pro	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ser	Phe	Gly	Glu	Pro	Ser	Tyr
				325					330					335	
Pro	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Pro	Leu	Thr	Gly	Tyr	Pro	Gly	Glu	Glu	Leu
			340					345					350		

ES 2 817 910 T3

Glu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile  
355 360 365

Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp  
370 375 380

Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys  
385 390 395 400

Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu  
405 410 415

Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr Asp Asn  
420 425 430

Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu Tyr Ile  
435 440 445

- <210> 4
- <211> 35
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Bucle Luminal de la primera region luminal de la presenilina 1

<400> 4

Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

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

Ser Ile Leu  
35

- <210> 5
- <211> 35
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> bucle luminal 1 de la primera región luminal de la presenilina 2

<400> 5

ES 2 817 910 T3

Ile Lys Ser Val Arg Phe Tyr Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr  
1                    5                    10                    15

Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn  
          20                    25                    30

Ser Val Leu  
          35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la SEQ ID NO: 1 de la presenilina para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer.
2. Un anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o cualquier combinación de los anteriores.
- 10 3. Un anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
4. Un anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el anticuerpo es monoclonal o policlonal.
5. Una composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer.
- 15 6. Una composición para su uso según la reivindicación 5 que comprende además al menos un agente antitumoral.
7. Un anticuerpo o una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el cáncer comprende un tumor sólido y/o un tumor hematológico.
- 20 8. Un anticuerpo o una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cérvix, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, tumores del sistema nervioso central y periférico, tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de hipófisis, leucemia, linfoma y/o síndrome mielodisplásico.
- 25 9. Un anticuerpo o una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma, leucemia, linfoma y/o síndrome mielodisplásico.
- 30

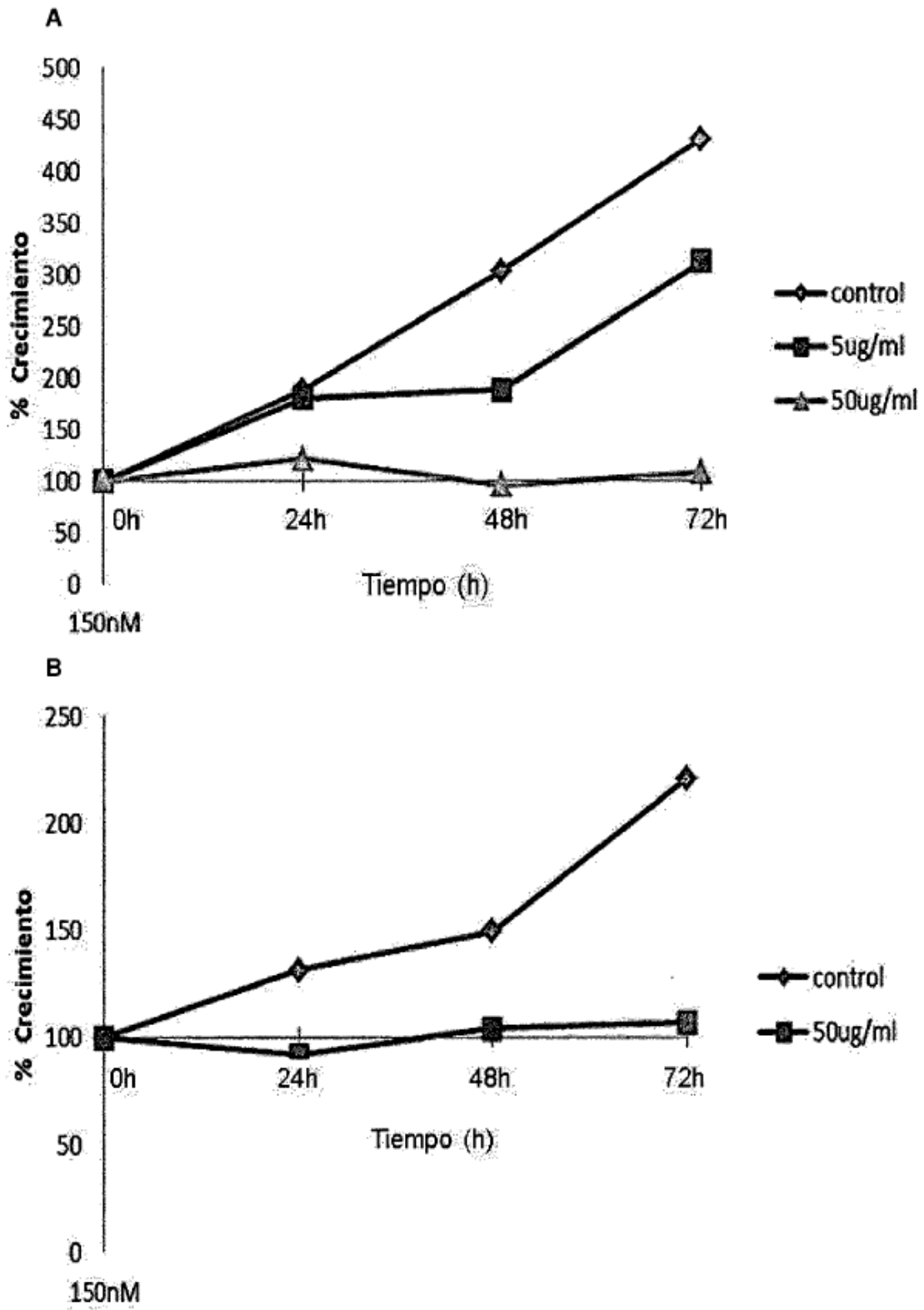
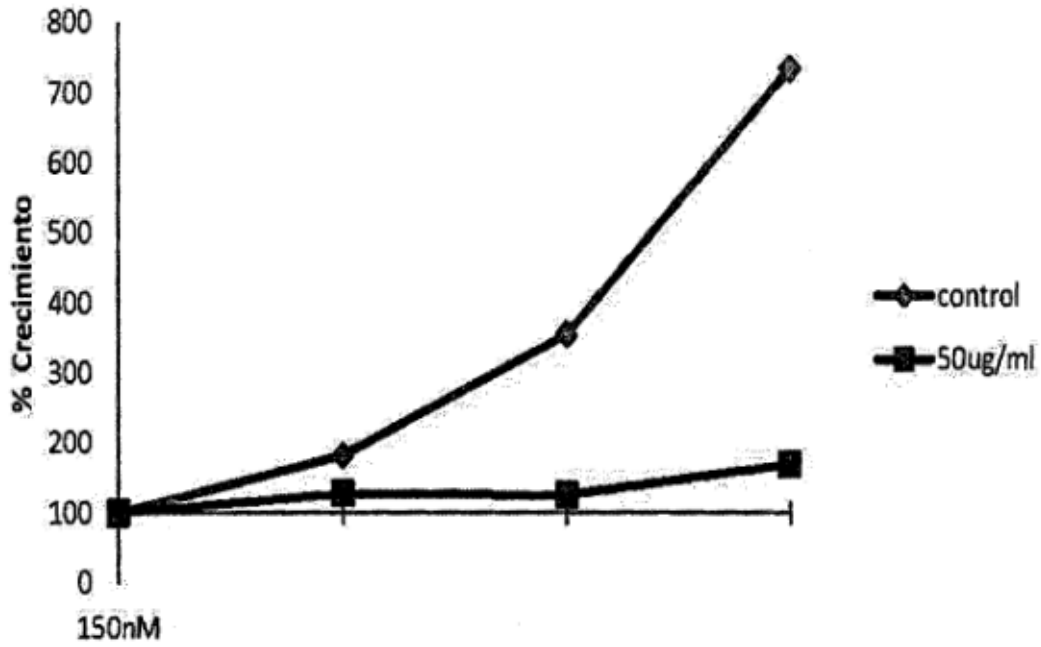


Fig. 1



C



D

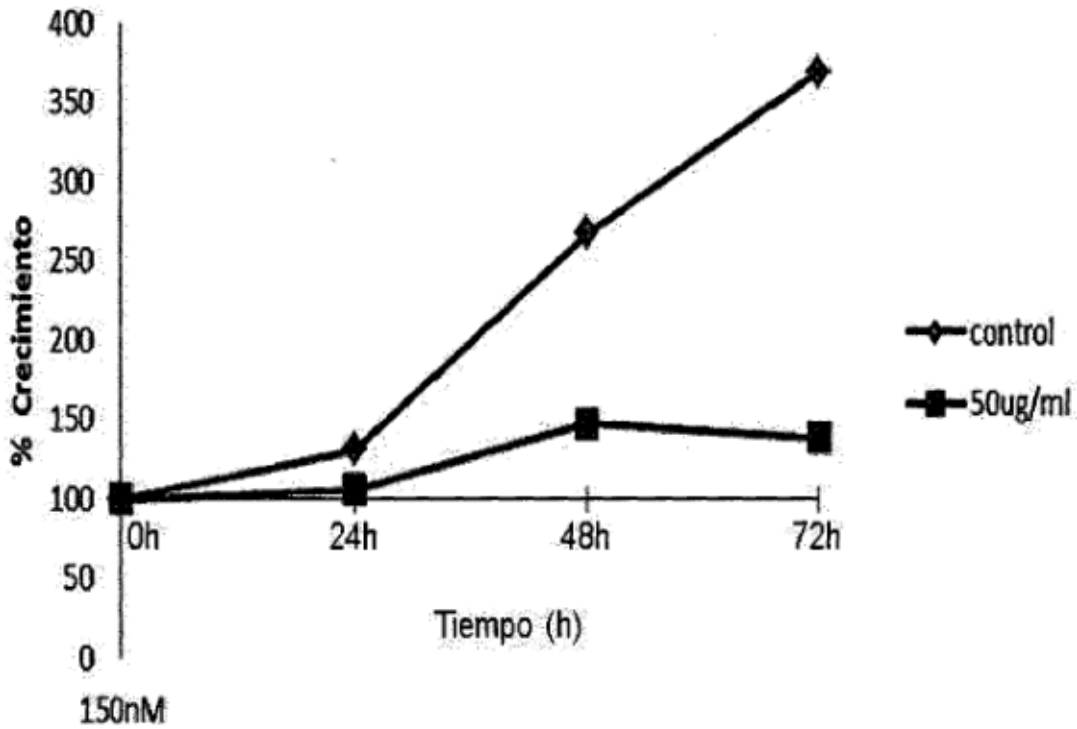


Fig. 1 (cont.)

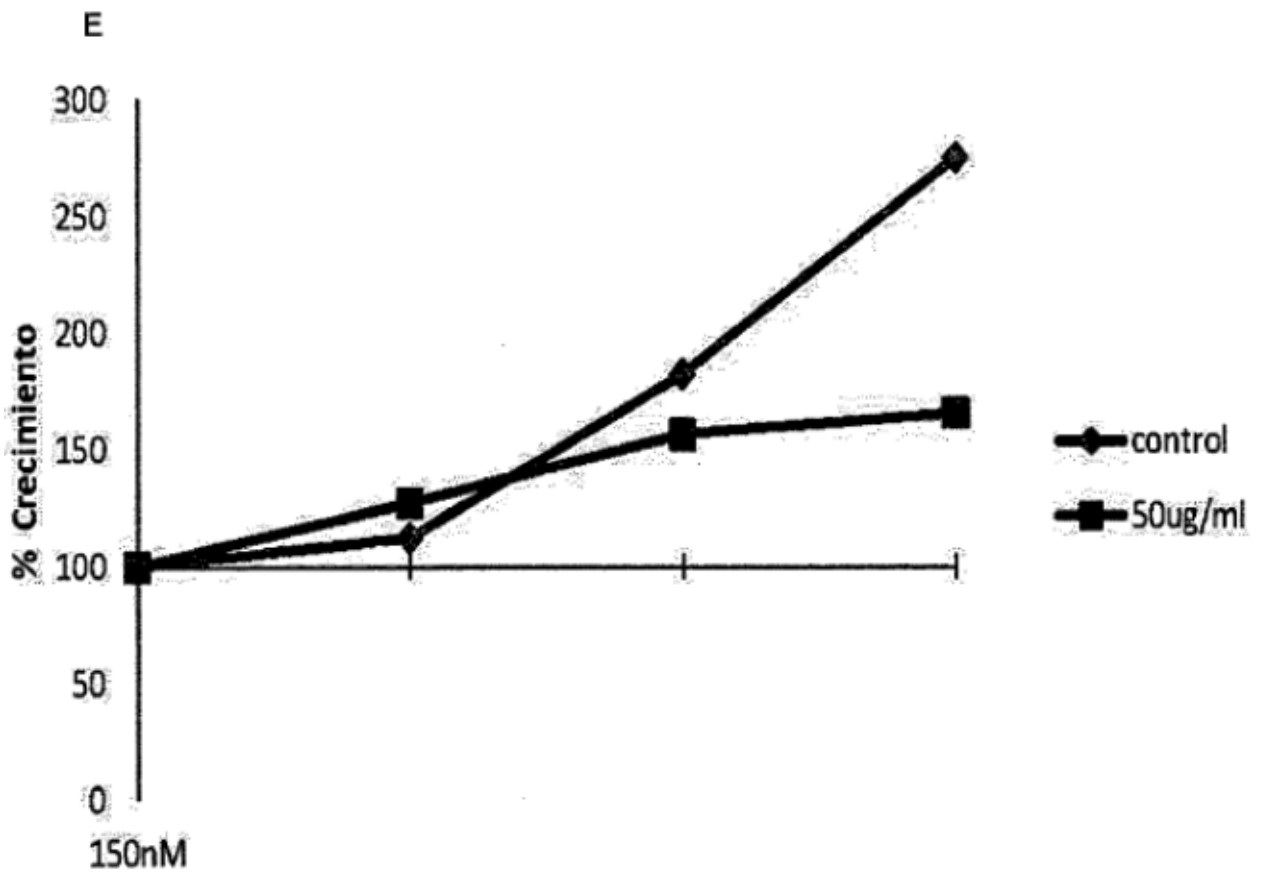


Fig. 1 (cont.)

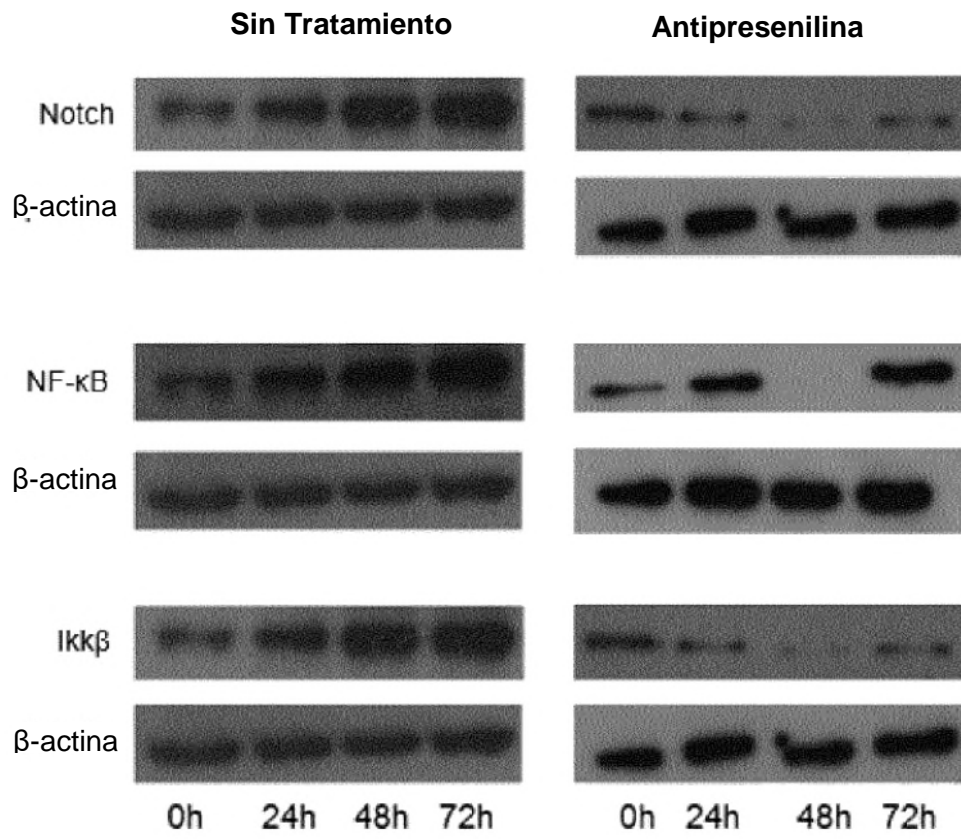


Fig. 2